

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11540

研究課題名(和文)腎近位尿細管における正常と傷害アルブミン分子分別メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms of molecular recognition and sorting for normal from damaged albumin molecules in renal proximal tubules.

研究代表者

大寺 恵子(Odera, Keiko)

東邦大学・薬学部・助教

研究者番号：70453850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、老齢ラット腎近位尿細管にカルボニル化、AGE化、CML化された傷害アルブミン分子が蓄積することを見出した。この結果は、加齢で傷害アルブミン分子の分別・分解能が低下していることを示唆する。そこで異常タンパク質分解能を高める食餌制限を老齢ラットに実施した。アルブミン分解能および傷害アルブミン蓄積量に食餌制限の影響は認められなかった。一方、標識アルブミンのin vivoでの近位尿細管における取り込み量は食餌制限老齢で高まっていた。原尿に漏れ出た正常アルブミンの再吸収の活性化がアルブミン尿症改善に関わっている可能性があるが、傷害アルブミン分子の動向については今後解明すべき課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病患者に対し、腎臓病の進行を遅らせるために、タンパク質制限による食事療法が行われる。これは、窒素代謝物排泄などによる腎臓への負担軽減を目指したものである。腎臓病患者に対するタンパク質制限の臨床研究は、タンパク質摂取量の継続的な管理の難しさ、合併症や薬物療法の有無、年齢などの様々な要因が複雑に絡み合うためにタンパク質制限の効果の明確なエビデンスがないのが現状である。本研究は、ラットを用いた基礎研究ではあるが、平日隔日食餌制限老齢ラットのアルブミントランスサイトーシスの活性化機構が明らかになれば、タンパク尿の予防法や治療法の提案に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that abnormally modified (carbonylated, AGE-, CML-) albumin accumulated in the renal proximal tubular cells (RPTC) of old rats. These results suggest that the ability of abnormal albumin sorting and degradation was decreased with age. We also found that dietary restriction (DR) initiated from even old age reduced the amount of abnormal proteins in the kidney. However, no significant effect of DR was observed in the degradation rate of albumin and the amount of abnormal albumin in the kidney. In contrast, the ability of albumin uptake by RPTC in vivo tended to increase in old DR rats compared with old control ones. These results suggest that the improvement of albuminuria by DR may be due to the activation of reabsorption of normal albumin in primary urine. Future studies should be elucidated the intracellular behavior of abnormal albumin in RPTC.

研究分野：基礎老化学

キーワード：老化 食事制限 腎臓 タンパク尿

## 1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い非生理的な酸化、脂質過酸化付加、糖化を受けた異常タンパク質が蓄積することが知られている。さらに、ラットは、高齢期にタンパク(アルブミン)尿症を発症する。これまでに、私の所属する研究室では、老齢ラットの腎臓には、通常のサイズのアルブミンに加え、分解物および架橋体と思われるものが蓄積していること、加齢に伴い増加する主要なカルボニル化タンパク質が 66kDa のアルブミンと思われるものであることを見出している。また、高齢期のラットに数か月間食餌制限を施すと、脳、肝臓、腎臓に加齢に伴い蓄積した熱不安定異常酵素 (Takahashi R, et al, Mech Ageing Dev, 33, 65, 1985) やミトコンドリアのカルボニル化タンパク質が減少すること (Nagai M, Takahashi R. et al. Biogerontol 1: 321-328, 2000) 加齢に伴い低下した肝臓の異常タンパク質分解に関わるプロテアソーム活性を若齢レベルに回復させることを明らかにした。さらに、アルブミン尿症を発症した老齢ラットに平日隔日給餌法による食餌制限を施すとアルブミン尿症が比較的短期間(2週間程度)に改善することを見出した (K.Odera, et al. in prep.)。しかしながら、食餌制限によるアルブミン尿症改善のメカニズムの詳細はまだ明らかになっていない。

加齢に伴うアルブミン尿症の発症の原因は糸球体基底膜の透過性亢進による血漿アルブミンの原尿への流出によると考えられている。しかし、近年、正常な腎臓においても多くのアルブミンが糸球体基底膜を通過していることが明らかになり、近位尿細管におけるアルブミン再吸収の重要性が指摘されるようになった。原尿に漏れ出たアルブミンは、近位尿細管の刷子縁膜近傍に局在する2種類のアルブミン再吸収受容体、megalin と cubilin の協調的作用により細胞内に取り込まれる。しかし、再吸収されたアルブミンが、その後、「リソソーム分解系」あるいは「トランスサイトosis再利用系」へと進むの

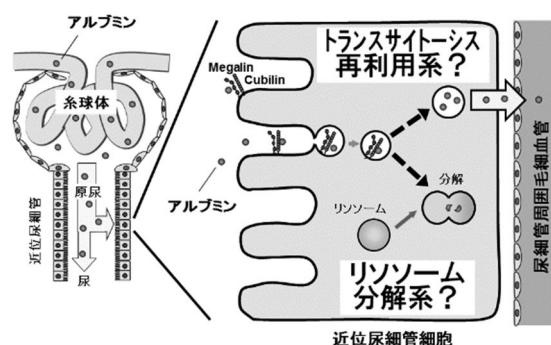


図1 近位尿細管における再吸収アルブミンの運命

か、明らかにされていない(図1)。異常アルブミンは「リソソーム分解系」へと進み、正常アルブミンは、「トランスサイトosis再利用系」へ進むというような再吸収後の経路に違いがあるかもしれない。最近、申請者は食餌制限ラット腎臓のアルブミンの細胞内挙動に関する免疫組織学的研究から、近位尿細管細胞でアルブミンが基底膜付近や間質側に分布していることを見つけた。これらの結果から、食餌制限が近位尿細管のアルブミンの「再利用系」であるトランスサイトosisを活性化している可能性を見出した。食餌制限によるトランスサイトosisの活性化は、食餌制限による異常アルブミンの減少による可能性や食餌制限に伴い何らかのトランスサイトosis活性化因子が誘導されている可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

腎近位尿細管細胞で再吸収された異常アルブミンは「リソソーム分解系」、正常アルブミンは「トランスサイトosis再利用系」へと進む経路が存在する可能性がある。もし、この仮説が正しければ、正常と異常アルブミンの識別機構が尿細管細胞に存在し、その機構を活性化する因子が存在すると考えられる。本研究では、この仮説を検証する。

## 3. 研究の方法

雄の4週齢ラット(F344/DuCrj)を日本チャールズ・リバー社から購入し、東邦大学薬学部実験動物センターのSPF動物室で気温 $22 \pm 1$ 、湿度50~60%、12時間明暗サイクルにて飼育した動物を使用した。飼料は日本クレアのCE-7を用いた。なお、本センターにおける平均寿命は約29ヶ月である。食餌制限は老齢(28月齢)の雄性ラットを用いて平日隔日給餌法により約3ヶ月行った。腎臓の異常タンパク質蓄積は、PC化、AGE化、CML化を指標にWestern blot(WB)解析および免疫染色により調べた。尿タンパク質の分子種はゲルろ過を行い、得られた各分画溶液を用いてSDS-PAGE解析を行うことにより調べた。アルブミン分解速度は、FITC-標識アルブミンを基質とし、腎ホモジネートを用いて調べた。アルブミンの*in vivo*における腎近位尿細管取り込みは、麻酔下の老若ラット(F344)に対し、Alexa Fluor 594 標識アルブミンを静脈投与して調べた。標識アルブミンの腎臓への取り込みは組織学的に調べた。

#### 4. 研究成果

本研究では、高齢ラットにおけるタンパク(アルブミン)尿症の発症および食餌制限による改善における腎臓の異常アルブミン蓄積の関与を調べるとともに異常アルブミンが腎近位尿細管再吸収後にどのような運命をたどるのかを検証した。初年度は高齢ラットおよび食餌制限高齢ラットの異常タンパク質蓄積についてカルボニル化、終末糖化産物(advanced glycation end products, 以下 AGE)化、カルボキシメチルリジン(carboxy methyl lysine, 以下 CML)化を指標に Western Blot(WB)解析により調べた。WB解析の結果、高齢ラット腎臓には通常のアルブミンに加え、分解物および架橋体と思われるものが蓄積していた。また、カルボニル化、AGE化、CML化タンパク質の増加も認められ、それぞれの主要なタンパク質はアルブミンであった。食餌制限は、タンパク尿症を改善したが、AGE化、CML化タンパク質の蓄積量に対しては影響を与えなかった。次年度は食餌制限によるラットにおけるアルブミン分解の亢進について尿排泄アルブミンの解析を行った。アルブミンは、近位尿細管で megalin、cubilin を介したエンドサイトーシスにより取り込まれ、リソソームのタンパク質分解酵素によって分解され、アミノ酸となり再利用されると考えられている。ところが、ヒトやラットの尿のゲルろ過やラット摘出腎臓を用いたアルブミン灌流実験からアルブミン分解産物が尿へと排泄されることが示されている。このことは、腎臓で分解されたアルブミンの一部は尿へと排泄されていることを示している。そこで、高齢ラットおよび食餌制限高齢ラットの尿を用いて尿タンパク質の分子種について調べた。高齢ラットを食餌制限することにより尿へのアルブミン排泄のみならず、100-200 kDa の高分子量タンパク質および低分子量タンパク質(数 100 Da-約 10 kDa)の排泄量が低下することがわかった。食餌制限によりアルブミン分解が亢進し、その分解産物の尿へ排泄される量が増加すると考えられたが、実際には食餌制限により低分子量タンパク質の排泄量は減少していた。次に腎ホモジネートの FITC-アルブミンアルブミン分解活性についても調べたが、食餌制限による影響は認められなかった。このように食餌制限によるアルブミン分解亢進を示す結果はこれまでに得られていない。最終年度は、腎近位尿細管細胞におけるアルブミンのトランスサイトーシスの食餌制限による活性化の影響を *in vivo* で検討した。Alexa Fluor 594 標識アルブミンの取り込みを指標としたアッセイでは、近位尿細管細胞への標識アルブミンの取り込み量は、高齢で低下する傾向にあったが、食餌制限高齢ラットの取り込み量は若齢と同レベルまで増加していた。これらの結果から食餌制限高齢ラットのアルブミン尿症改善は、アルブミン分解低下よりはむしろ近位尿細管細胞におけるアルブミン再吸収系の活性化による可能性が高いことがわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 大寺恵子, 高橋良哉	4. 巻 17
2. 論文標題 クルクミン・クルクミン誘導体とサーチェイン遺伝子（長寿遺伝子）について	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本食品安全協会誌	6. 最初と最後の頁 22-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大寺恵子, 高橋良哉	4. 巻 48
2. 論文標題 腎近位尿管細胞におけるアルブミン再吸収.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 52-53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tatsuya Sakamoto, Keiko Odera, Mayu Onozato, Hiroshi Sugawara, Ryoya Takahashi, Yasuto Fujimaki, and Takeshi Fukushima	4. 巻 94
2. 論文標題 Direct fluorescence evaluation of D-amino acid oxidase activity using a synthetic D-kynurenine derivative.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical chemistry	6. 最初と最後の頁 14530-14536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.2c00775	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 6件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keiko Odera, Ryoya Takahashi
2. 発表標題 Intestinal distribution pattern of fatty acid binding proteins in SAMP8 and SAMR1.
3. 学会等名 第44回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryoya Takahashi, Keiko Odera
2. 発表標題 Effect of fasting-refeeding on the levels of glycogen and triglyceride in the liver of SAMP8 and SAMR1.
3. 学会等名 第44回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大寺恵子、高橋良哉
2. 発表標題 老化促進モデルマウスSAMP8とSAMR1の脳におけるカルボニル化酸化タンパク質の組織化学的および生化学的解析.
3. 学会等名 第36回 老化促進モデルマウス (SAM) 学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋良哉、大寺恵子
2. 発表標題 絶食 - 再摂食が老化促進モデルマウス (SAM) のP8系とR1系の脂質代謝系に及ぼす影響.
3. 学会等名 第36回 老化促進モデルマウス (SAM) 学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大寺恵子、高橋良哉
2. 発表標題 中高年齢からの食餌制限.
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋良哉、大寺恵子
2. 発表標題 加齢に伴う異常タンパク質蓄積.
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大寺恵子, Richa Yadav, Abhishek Rai, 野口明実, Lallan Mishra, 高橋 良哉
2. 発表標題 ファゴサイトーシス過程で発生する次亜塩素酸イオンの新規蛍光プローブを用いた可視化.
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋良哉、大寺恵子
2. 発表標題 加齢に伴うラットおよびマウスの肝のプロテアソーム活性変化.
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本 達弥、大寺 恵子、小野里 磨優、高橋 良哉、藤巻 康人、福島 健
2. 発表標題 D-アミノ酸化酵素活性の直接的評価を可能にするD-キヌレニン型酵素蛍光プローブの開発.
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keiko Odera, Yi Shang, Toshiaki Kokubo, Ramesh Sharma, Shizuko Kakinum, Yoshiya Shimada, Ryoya Takahashi
2. 発表標題 Effect of short-term dietary restriction by every-other-day feeding on the level of Akt-1 in the liver of aged rats
3. 学会等名 第43回 日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryoya Takahashi, Keiko Odera
2. 発表標題 Effects of fasting and refeeding on glycogen, lipid and protein contents in the liver and skeletal muscle of rats at different ages
3. 学会等名 第43回 日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大寺恵子、高橋良哉
2. 発表標題 老化促進モデルマウス (SAM) P8系とR1系の脳におけるカルボニル化酸化タンパク質の組織化学的および生化学的解析
3. 学会等名 第35回 老化促進モデルマウス (SAM) 学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋良哉、大寺恵子
2. 発表標題 絶食 - 再摂食が老化促進モデルマウス (SAM) のP8系とR1系の脂質代謝系に及ぼす影響
3. 学会等名 第35回 老化促進モデルマウス (SAM) 学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiko Odera, Richa Yadav, Abhishek Rai, Akimi Noguchi, Lallan Mishra Ryoya Takahashi
2. 発表標題 Detection of hypochlorite ion generation during phagocytosis
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋良哉、大寺恵子
2. 発表標題 老化促進モデルマウスP8系とR1系の脂質代謝系に対する絶食・再摂食の影響
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryoya Takahashi, Keiko Odera
2. 発表標題 Protein Homeostasis (Proteostasis): Effect of Age on Protein Repair and Degradation Systems.
3. 学会等名 International Symposium on "Recent Advances in Research on Healthy Aging and Future Challenges" and 20th Biennial Meeting of Association of Gerontology (India)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋良哉、大寺恵子
2. 発表標題 老化モデル動物：酵母からサルまで。
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 高橋良哉、大寺恵子
2. 発表標題 老化基礎研究からの情報発信：種差・性差.
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大寺恵子、高橋良哉
2. 発表標題 ラット腎臓における異常修飾タンパク質蓄積：加齢と食餌制限の影響.
3. 学会等名 第45回 日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋良哉、大寺恵子
2. 発表標題 ラットとマウスの肝プロテアソームの加齢変化の比較.
3. 学会等名 第45回 日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大寺恵子、高橋良哉
2. 発表標題 脳のカルボニル化タンパク質の組織化学的および生化学的解析：老化促進モデルマウスSAMP8とSAMR1の比較.
3. 学会等名 第37回 老化促進モデルマウス（SAM）学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋良哉、大寺恵子
2. 発表標題 絶食負荷が老化促進モデルマウスのP8系とR1系の脂質代謝系に与える影響.
3. 学会等名 第37回 老化促進モデルマウス (SAM) 学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大寺恵子、高橋良哉
2. 発表標題 腎近位尿細管におけるアルブミン取り込み：老齡ラットに対する食餌制限の影響.
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大寺恵子、高橋 良哉
2. 発表標題 ラット腎近位尿細管におけるアルブミン再吸収：加齡の影響
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂本達弥、大寺恵子、小野里磨優、高橋良哉、藤巻康人、福島健
2. 発表標題 D-アミノ酸化酵素活性評価のためのD-キヌレニン型蛍光プローブの開発と応用 (第2報)
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂本達弥、大寺恵子、小野里磨優、高橋良哉、藤巻康人、福島健
2. 発表標題 光学活性キヌレニン誘導体 MeS-D, L-キヌレニンの合成ならびに応用.
3. 学会等名 日本トリプトファン研究会 第41回学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高橋 良哉  (Takahashi Ryoya)		
研究協力者	ミシュラ ララン  (Mishra Lallan)		
研究協力者	シャーマ ラメッシュ  (Sharma Ramesh)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
インド	Banaras Hindu University		