

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591585

研究課題名(和文)腎障害の進展における抗酸化防御機構の関与

研究課題名(英文)Involvement of antioxidant defense mechanisms in the pathogenesis of renal damage

研究代表者

新村 文男(NIIMURA, Fumio)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30282750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：有用な免疫抑制薬であるシクロスポリンによる腎障害が問題となっている。抗酸化防御機構の司令塔、Keap1-Nrf2系が不活化されたマウス、および恒常的に活性化しているマウスにてこの腎障害を検討した。Keap1-Nrf2系の不活化により腎臓の酸化ストレスの増加、尿細管障害の増強があり、シクロスポリンは腎臓の酸化ストレスを増強させる一方、抗酸化防御機構の作動を介して酸化ストレスや腎障害を軽減していた。Keap1-Nrf2系が恒常的に活性化されたマウスでは、予測に反して腎障害の軽減を認めず、酸化ストレスとは独立した別のメカニズムも腎障害に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cyclosporine-induced nephrotoxicity was studied in Nrf2 knockout mice and Keap1 knockdown mice. The Keap1-Nrf2 system is known to play a central role in promoting antioxidant mechanisms. In Nrf2 knockout mice, in which the antioxidant Keap1-Nrf2 system is inactivated, cyclosporine A induces oxidative stress in the kidney and tubular damage, suggesting that Keap1-Nrf2 system plays a protective role in the pathogenesis of cyclosporine nephrotoxicity. However, in Keap1 knockdown mice, in which antioxidant mechanisms are constitutively activated, renal damage was not attenuated. These data suggest that, although antioxidant system is involved in attenuating cyclosporine nephrotoxicity, uncontrolled activation of Keap1-Nrf2 system is not always accompanied by beneficial effects in attenuating cyclosporine nephrotoxicity, suggesting that there may be some mechanisms other than oxidative stress in the pathogenesis of cyclosporine nephrotoxicity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

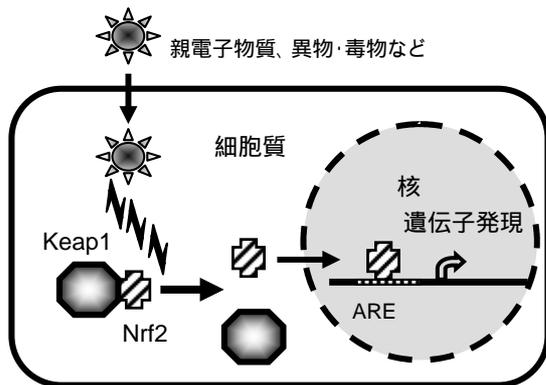
キーワード：腎障害 酸化ストレス 抗酸化防御機構 Keap1 Nrf2 シクロスポリン

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトは好気性生物であるために、常に酸素による酸化傷害にさらされているが、進化の過程で獲得した抗酸化防御システムが作動することにより重大な臓器障害を免れている。病的条件においては酸化傷害と抗酸化防御システムとのバランスが崩れ、酸化傷害が顕性化する。種々の病態において酸化傷害が抗酸化防御システムを凌駕した状態(すなわち酸化ストレス)を招来し、臓器障害に関与していることが近年の研究により明らかにされている。

(2) 腎疾患における酸化ストレスについては、主に尿毒症・腎不全病態における検討が進められており、腎不全におけるアミロイドーシスの発症に酸化ストレスが深く関わっていることなどが解明された。また、腎不全に至る病態として重要な糸球体硬化や尿細管・間質障害においても、酸化ストレスマーカーが血中や組織において証明される、さらに抗酸化物質投与の有効性が示されるといった知見から、酸化ストレスが関与していることが示唆されつつある。

(3) 近年、山本雅之らにより、生体における抗酸化防御システムとして、Keap1-Nrf2 系が中心的な役割を果たしていることが発見され、注目されている。Nrf2 はヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) に代表される第 2 相異物代謝酵素群の発現を促進する転写因子であり、各遺伝子の上流にある抗酸化剤応答配列への結合を介して、転写レベルの発現調節を行っている。Nrf2 は細胞質において Keap1 と結合し細胞質に留まっているため、核内へ移行できず転写活性が抑制されているが、親電子物質の産生や進入により酸化ストレスが加わると Keap1 のシステイン残基が修飾される結果、Nrf2 は Keap1 から離れて核内へ移行可能となり、転写活性を発揮する (図 1)。



ARE: 抗酸化剤応答配列
図 1

2. 研究の目的

本研究においては Keap1-Nrf2 系に注目し、各種腎障害のなかでも既に腎不全に至っている病態ではなく、腎不全の進行、あるいは、腎不全を招来する病態として重要な尿細

管・間質障害、ならびに糸球体硬化の発症・進展における役割を解析し、酸化ストレスの軽減という観点から腎障害進展阻止の治療戦略を構築することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) マウス

Nrf2 遺伝子の不活化アレルを有するマウス Nrf2(-/WT) どうしを交配して得られる、Nrf2(-/-)マウス (Nrf2 knockout mouse; K0 マウス) と、Nrf2(WT/WT) マウスを実験に用いた。

また、Keap1 遺伝子について不活化されたアレルをヘテロ接合体で有する Keap1(-/WT) と、loxP 配列が挿入されたアレルをヘテロ接合体で有する Keap1(loxP/WT) とを交配して得られる、Keap1(-/loxP) マウスと Keap1(WT/WT) マウスを実験に用いた。Keap1(-/loxP) マウス (Keap1 knockdown mouse; KD マウス) は Keap1 の遺伝子発現が著明に減弱して Nrf2 の分解が抑制される結果、Nrf2 が恒常的に約 4 倍量存在し、Nrf2 を介した抗酸化防御機構が増強しているマウスである。

(2) シクロスポリン (CyA) 腎症の惹起

サンディムン®内用液 10% をコーン油で希釈し、50mg/kg/day を連日 3 週間、腹腔内投与した。対照群にはコーン油のみを腹腔内投与した。餌は、減塩食とするためにレトルトの米 (加熱済みのごはん) を与えた。

(3) 高度蛋白尿による腎障害の惹起

イムノトキシンを投与すると足細胞特異的に障害が惹起される NEP25 マウス (東海大学松阪泰二氏により開発されたもの) と、Nrf2 K0 マウスの交配により、Nrf2 K0 マウスにおいて足細胞特異的な腎障害を惹起し、高度蛋白尿を呈するモデルを作製した。

(4) 遺伝子発現の検討

種々の遺伝子発現は TaqMan® Gene Expression Assays を用いて実施した。野生型マウスに vehicle を投与した群の発現を 1 として他群の発現を表記した。

4. 研究成果

(1) Nrf2 K0 マウスにおける CyA 腎症の検討
腎組織の検討

CyA 投与による尿細管間質病変は、理由は明らかではないが、光学顕微鏡による観察では予測したよりも軽微な変化にとどまっていた。Nrf2 K0 マウスでは間質病変の増悪が予測されたが、極端な間質病変の悪化は観察されなかった。

Nrf2 下流にある遺伝子発現の検討

Nrf2 による発現調節を受けている抗酸化防御作用のある遺伝子である HO-1、GSTM1、NQO1 について、定量 RT-PCR 法により遺伝子発現を検討した (図 2a, 2b, 2c)。

いずれの遺伝子も Nrf2 K0 マウスでは発現が減弱しており、Nrf2 の遺伝子不活化の影響が確認できた。HO-1 は CyA 投与により発現増強が顕著に認められ、Nrf2 K0 マウスではさ

ほど顕著ではなかったことから、CyA 投与による HO-1 発現増強は Nrf2 を介したものであることが示された (図 2a)。

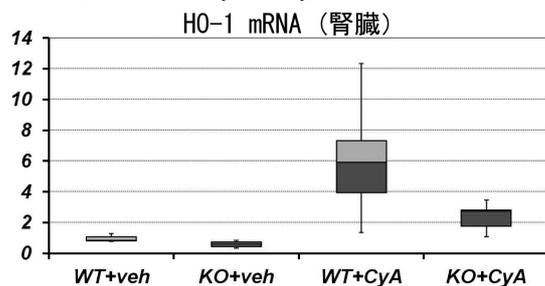


図 2a

一方、GSTM1 と NQO1 については CyA 投与による発現増強はなかったことから、CyA 投与による HO-1 発現増強に Nrf2 は必須ではあるものの、それ以外の因子の関与が示唆された (図 2b, 2c)。

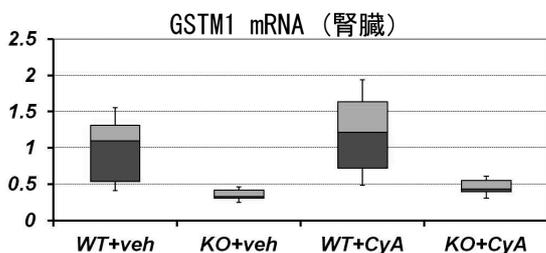


図 2b

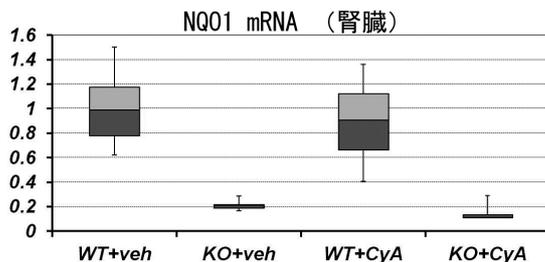


図 2c

腎障害に関連する遺伝子発現の検討
組織学的には間質繊維化は軽微であったため、腎における TGF β 発現を前繊維化の指標として検討した。また、尿細管障害の指標として Kim-1 の発現を検討した。

野生型マウス (WT) においては CyA 投与による TGF β の発現増強を認めなかったが、Nrf2 KO マウス (KO) においては TGF β の発現増強を認めた (図 3)。近年、HO-1 が TGF β の発現に対して抑制的に働くことが示されている。本研究で KO において腎 TGF β 発現が増強した背景には、Nrf2 の欠損により HO-1 が誘導されず、TGF β の発現抑制がかからなかったためと考えると合理的である。

尿細管障害の指標として近年注目されている Kim-1 発現は KO+CyA 群で著明に増強しており、CyA による尿細管障害が Nrf2 非存在かでは増強されることが示された (図 4)。

これらの結果は、CyA による尿細管間質障害の、Nrf2 を介した抗酸化防御機構の働きにより軽減されるメカニズムの存在を示すものである。

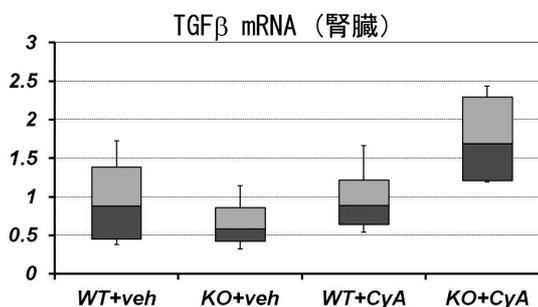


図 3

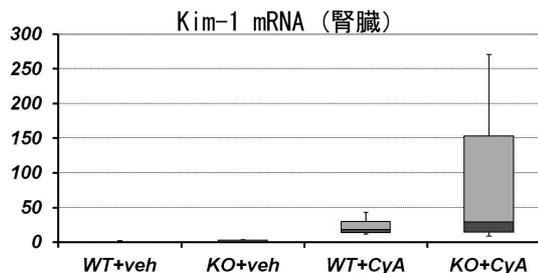


図 4

アポトーシスの検討

腎障害の発症にアポトーシスが関与している可能性を考え、TUNEL 法による染色と caspase 3 の mRNA 発現によりアポトーシスを検討した。今回の研究では WT と KO との間で差を認めず、Nrf2 の存在 / 非存在がアポトーシスの増減に影響を及ぼしていることは確認できなかった。

腎組織における酸化ストレスの検討

酸化ストレスを反映する物質として、腎組織中の MDA (malondialdehyde) を測定したところ、KO+CyA 群において上昇がみられており、Nrf2 の欠損が抗酸化防御機構の作動を抑制し、その結果として酸化ストレスが増強していることが示された (図 5)。

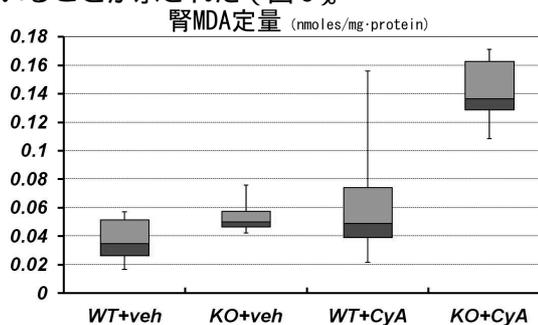


図 5

すなわち、CyA 投与は腎臓における酸化ストレスを増強させる方向に働くものの、同時に Nrf2 を介して誘導される HO-1 により酸化ストレスを減弱する方向のメカニズムも働いていることが示唆される結果であった。

(2) Keap1 KD マウスにおける CyA 腎症の検討 腎組織の検討

Keap1 KD マウスでは Nrf2 の作用が恒常的に亢進していることから、CyA 投与による腎障害を著明に軽減することを予測して実験を行った。野生型マウスにおいて CyA 投与により惹起された尿細管間質病変は比較的軽

微ではあったが、Keap1 KD マウスにおいてもほぼ同等の尿細管室病変が観察され、予測と反する結果であった。

Nrf2 下流にある遺伝子発現の検討

Nrf2 KO マウスにおける検討と同様に、Nrf2 の下流にある遺伝子として、HO-1、GSTM1、NQO1 を検討した。HO-1 は CyA 投与により増強される傾向を示し、特に Keap1 KD マウスではその傾向が顕著であった(図6)。これは CyA 投与により Nrf2 を介して HO-1 発現の増強がもたらされることと矛盾しない結果である。

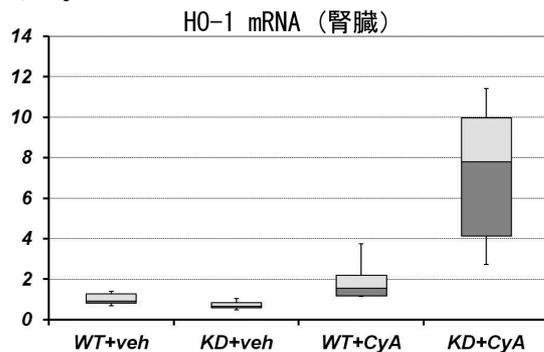


図6

GSTM1、NQO1 の発現については、CyA 投与による影響はほとんどなかった。Keap1 KD マウスにおいて、基礎発現量の増加が予測されたが、今回の検討では増加しておらず、むしろやや抑制されていた。

腎障害に関連する遺伝子発現の検討

Nrf2 KO マウスにおける実験と同様に、腎障害を反映する指標として、TGF β と Kim1 の遺伝子発現を検討した。

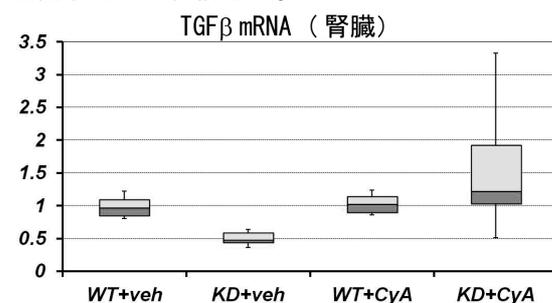


図7

TGF β の基礎発現量は、Keap1 KD マウスにおいて低下していた。CyA 投与による増強は WT マウスでは認めなかったが、KD マウスにおいては増強する傾向(バラツキが大きく、有意差には至らず)を認めた(図7)。

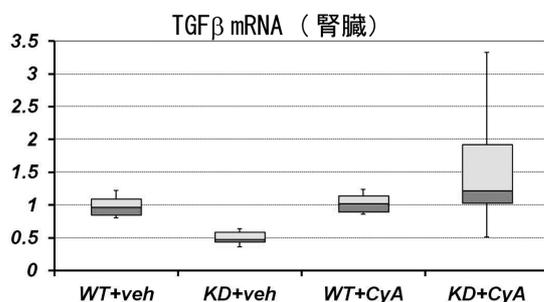


図8

尿細管障害の指標となる Kim-1 の発現は、CyA 投与により著明に増強していたが、Keap1 KD マウスでもほぼ同様の増強、あるいは一部のマウスではさらなる増強を認めた(図8)。

腎組織における酸化ストレスの検討

Nrf2 KO マウスにおける検討と同様に、腎組織における酸化ストレスを反映する腎組織 MDA 定量を行った(図9)。

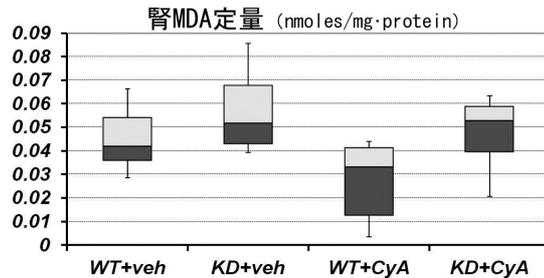


図9

いずれの群においても酸化ストレスは低く、腎障害の認められた Keap1 KD+CyA 群においても顕著な上昇を認めなかった。

Keap1 KD マウスを用いた実験結果は、以下の点で興味深いと考えている。

CyA を投与された Keap1 KD マウスでは豊富に Nrf2 が存在し、種々の抗酸化防御機構に関する遺伝子が活性化されていることを背景に、CyA 投与による腎障害が軽減することを予測した。HO-1 は確かに発現増強していたものの、組織学的にも、Kim-1 発現にても尿細管間質障害は軽減されていなかった。一方で、腎障害の増悪傾向を認めた Keap1 KD+CyA 群においても、酸化ストレス自体はさほど上昇していなかったことから、CyA による腎障害の発症には酸化ストレスとは独立した因子の影響が働いていることが示唆される結果であった。あるいは、Nrf2 が制御されない状況で単に豊富にあることが必ずしも腎障害の軽減には結びつかないことを示しているともいえる結果である。

(3) Nrf2 KO マウスにおける高度蛋白尿惹起モデルの検討

Nrf2 下流にある遺伝子発現の検討

他のモデルと同様に、HO-1、NQO1、GSTM1 の遺伝子発現を検討した。野生型マウス(WT)、Nrf2 KO マウス(KO)それぞれにおいて、イムノトキシン(I/R)投与前後での遺伝子発現を検討した(図10a,b,c)。

このモデルでは糸球体足細胞の特異的な障害により、高度蛋白尿が惹起され、それに引き続いて糸球体硬化、尿細管間質障害がもたらされる。上述の CyA 投与の実験においては、3つの遺伝子の内、HO-1 のみが CyA 投与により発現増強していたが、今回の高度蛋白尿惹起モデルにおいては、HO-1 のみならず、NQO1 の発現についても増強が見られた。GSTM1 については、高度蛋白尿の惹起に伴って発現が増強することはなかった。NQO1 の増強については、Nrf2 KO マウスにて認められなかったことから、この増強効果は Nrf2 を

介したものであることが示された。

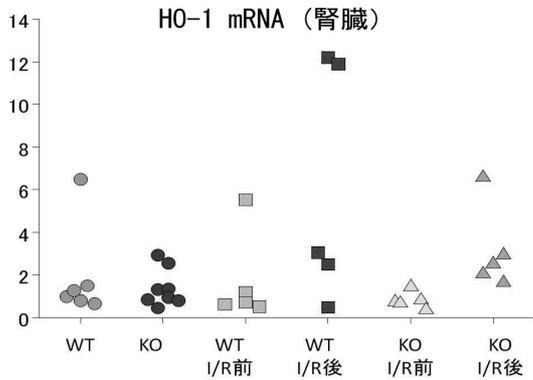


図 10a

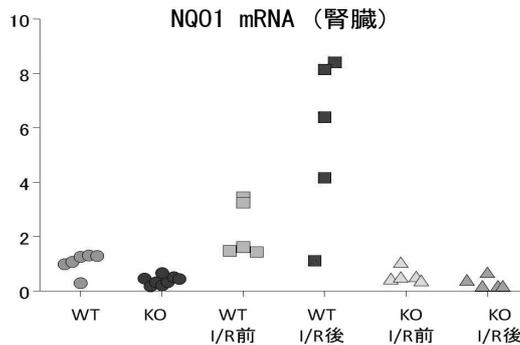


図 10b

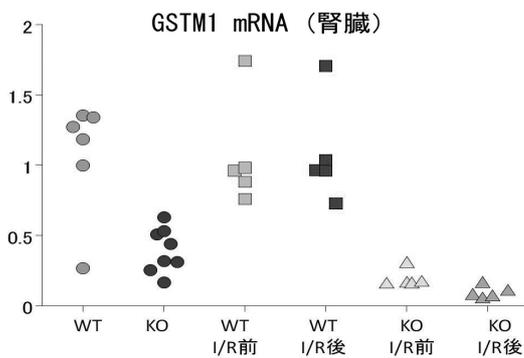


図 10c

腎障害に関連する遺伝子発現の検討
腎繊維化の指標として TGF β と Kim-1 の遺伝子発現を検討した。

TGF の発現は、Nrf2 KO マウスにおいて蛋白尿惹起により発現増強する傾向を認めしたが、その程度はさほどでもなく、蛋白尿惹起後の WT と KO との比較では有意差を認めなかった(図 11)。

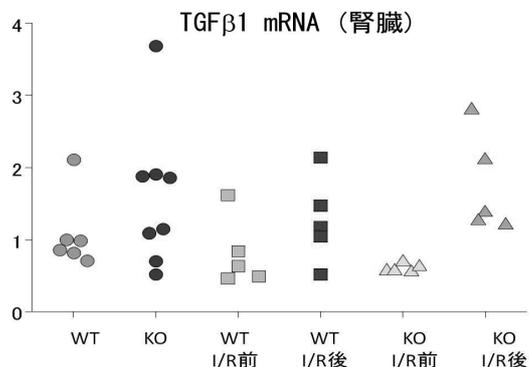


図 11

尿細管障害の指標として Kim-1 の発現を検討したところ、高度蛋白尿の惹起に伴って Kim-1 の発現増強が認められたが、蛋白尿惹起後の WT と KO 群との間に有意差を認めず、Nrf2 KO マウスでの腎障害増悪を示すことはできなかった。

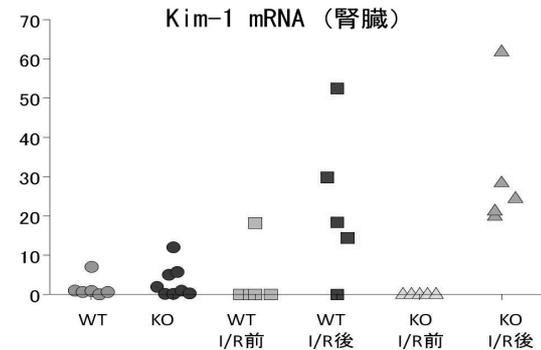


図 12

高度蛋白尿惹起モデルにおいても、尿細管障害が惹起されていることが示されたが、Nrf2 の存在・非存在による影響を大きく受けることはなかった。

また、Nrf2 の下流にある遺伝子の発現が増強しているが、その種類が腎障害惹起法により異なることは興味深い。何らかの合目的性があるものと想像され、今後の研究課題になるものと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

新村文男、松阪泰二、坂間隆、岡本正二郎、望月博之・Nrf2 はシクロスポリンにより誘導された腎の酸化ストレスを軽減する．第 57 回日本腎臓学会学術総会．

2014 年 7 月 6 日、パシフィコ横浜．

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新村 文男 (NIIMURA, Fumio)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：3 0 2 8 2 7 5 0

(2) 連携研究者

松阪 泰二 (MATSUSAKA, Taiji)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：5 0 3 1 7 7 4 9

望月 博之 (MOCHIZUKI, Hiroyuki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：5 0 2 7 0 8 5 6