

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253038

研究課題名(和文)腎障害時の臓器間臓器内恒常性機構と幹細胞分化誘導タイミングにおける分子時計の役割

研究課題名(英文)Role of molecular clock on the homeostatic communication between each organ in chronic kidney disease

研究代表者

大戸 茂弘 (Ohdo, Shigehiro)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00223884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)の合併症を発症させる機構は未だ明らかにされていない。本研究では、CKD時に上昇したTGF- β 1が、分子時計を変容させ、腎線維化促進に加え、肝障害を併発させることを突き止めた。また肝代謝異常で上昇したレチノールが、腎障害を増強させることを明らかにした。さらに細胞分化に関わりリズムカルに振動する細胞周期制御因子が腎臓の炎症に関与していることを明らかにした。それを標的とした化合物を探索し、創薬の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease (CKD) increases the disease risk of liver as well as that of kidney. However, the mechanisms remain unclear. In the present study, an increase of plasma transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in 5/6 nephrectomy (5/6Nx) mice led to the decreased expression of the Dbp gene, controlling the function of cytochrome P450 (CYPs). Cyp3a11 and Cyp26a1, encoding key proteins in retinol metabolism, decreased in 5/6Nx mice. The accumulation of serum retinol induced renal apoptosis in 5/6Nx mice. The alterations of retinol metabolism and renal dysfunction in 5/6Nx mice were decreased by an anti-TGF- β 1 antibody. The present study suggests that the chronic renal failure in 5/6Nx mice causes the inflammation by the abnormal signal transduction in high TGF- β 1 expression from the kidney and decrease the function of CYPs in liver. Finally, the cell cycle regulatory factor in kidney plays an important role of CKD and may be a promising therapeutic target in the treatment of CKD.

研究分野：医歯薬学

キーワード：薬学 腎障害 恒常性 幹細胞 分子時計

1. 研究開始当初の背景

生体機能には、地球の自転、公転と関連した昼夜や季節のような外部環境の周期的変化に伴った多くの周期的現象(リズム)が存在する。ヒトの場合、生体リズムは健康を保持・増進させる上でも重要で、その破綻が不眠や精神疾患などの慢性疾患を生じる。体内時計の本体は、視神経が交差する視交叉上核(SCN)に位置し、時計遺伝子により制御されている。SCNが中枢時計として、ホルモンや自律神経の日周リズムを制御し、末梢の分子時計を制御している。一方で、疾患と分子時計の研究も進められ、疾患の日周リズムを分子時計が制御していることも明らかにされつつある。心血管系の転写因子の日内変動と脂肪代謝およびエネルギー代謝との関連、睡眠障害と時計遺伝子との関連、Per2変異マウスにおいて、線照射による発癌リスクが高まること、さらに癌細胞など障害を有する細胞において、時計遺伝子の発現が変容していることが明らかにされた。

我々は、インターフェロンが末梢のみならず中枢の分子時計を変容させ、光による体内時計の調節機能等を傷害することを明らかにした。また分子時計の変容により薬物代謝・輸送機能が障害されることを突き止めた。さらに癌細胞の増殖・修復・アポトーシスにリズムが認められ、正常時とは異なった分子時計機構により制御されていることを明らかにした。そして癌細胞のトランスフェリン受容体の日周リズムにあわせたトランスフェリンリポソーム製剤の新規時間薬物送達方法の開発に成功した。

種々の疾患時の合併症の重要性が臨床的に多数報告されているが、その原因については不明な点が多い。例えば、腎障害時の合併症の重要性は、Nature Rev Neurol (2009)などでも取り上げられている。我が国でも慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease ; CKD)患者は約1300万人存在し、年々透析患者数は増加している。CKDは腎機能の低下のみならず、肝疾患、心疾患や精神神経疾患などの合併症を引き起こすが、その機序は未だ明らかでない。

慢性腎臓病とは、腎機能が50%以下の状態が慢性的に続く病態の総称を指す。一般に、CKD患者に薬物を投与する際、腎排泄型薬物の血中濃度上昇等を考慮する必要がある。近年、これら薬物動態学的変化に影響を及ぼす因子として、腎臓のみならず肝臓の薬物代謝を担う酵素であるシトクロムP450(CYPs)の発現量が健常時と比較して顕著に減少することが報告されている。中でもCKD時に発現量が減少するCYPs分子種のCYP3A4は現在臨床で使用されている医薬品の50%以上の代謝に関与する代表的な分子種である。

我々は、腎障害マウスの腎不全進行に伴い

血中TGF- β 1(transforming growth factor β 1)濃度が上昇し、それが臓器間シグナルとなり、正常な分子時計機構を変容させ、肝障害および脳障害を併発させることを突き止めた。さらに障害された肝代謝機能がレチノール濃度を高め、原発臓器の腎障害を増強させること、また原発障害臓器ごとに異なった臓器間シグナルの存在も明らかにしつつある。一般に、肝幹細胞は、肝障害時に活性化され肝修復を促しているが、幹細胞の増殖および分化にはどのような肝内微小環境が必要なのかなど不明な点が多い。我々は、ジエチルニトロソアミン(DEN)誘発性肝癌マウスにおいて、分化誘導剤であるオールトランス型レチノイン酸(ATRA)が核内受容体RARを介して、リズムカルに振動する細胞周期制御因子の発現を、発癌初期に抑制することで、発癌を抑えることを突き止めた。

一方、世界の研究者たちも病態時の体内時計の分子機構に注目しはじめ、今後この分野は激烈な競争に突入することが確実視されてきた。そこで、本邦独自の研究を維持・発展させるには、直ちに、腎障害時の体内時計の分子機構に着目して、合併症臓器ごとに臓器間臓器内のシグナル分子の類似点と相違点を抽出し、腎障害時の合併症の詳細なメカニズムを解明することを目的に本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、慢性腎不全という病態下における各種臓器の時計遺伝子発現リズムを解析し、各臓器における時計遺伝子発現リズムが変化する分子機構を解明する。すなわち、腎不全時の各臓器間のコミュニケーションに関わる細胞外因子および細胞内因子を同定する。また合併症の予防および治療といった点から、詳細な機序を解明する。本研究の学術的な特色は、生体の恒常性の維持に最重要な体内時計の分子機構を指標に、病態時の特殊生体環境下における臓器間のコミュニケーションといった全く新しい視点から、合併症および発病の機構を解明し、予防薬、治療薬の開発を目指している点である。

3. 研究の方法

実験動物およびCKDモデルマウス(5/6 nephrectomy; 5/6Nx)の作製において、ICR雄性野生型マウス、ICR雄性 Circadian locomotor output cycles kaput (*Clock*) mutant (*Cik/Cik*) マウス(C57BL/6J*Clock^{mlJt/J}*)およびICR雄性 Inhibitor of DNA binding 2 (*Id2*) knockout [*Id2*(-/-)]マウスを、自由摂食・摂水、12時間の明暗周期(明期: 7:00-19:00)で飼育した。野生型、*Cik/Cik* マウスは7週齢時に左腎を2/3摘出、翌8週齢時に右腎を全摘出手術後、さらに8週間飼育した16週齢マウスをCKDモデルマウスとして使用した。シャムオペレーションマ

ウス (Sham マウス) として、手術の際 ope 群と同じだけの切り口を入れ縫合した。腎 5/6 摘出手術後、血中クレアチニン濃度および血中 TGF- β 1 濃度を測定した。マウスの肝臓から total RNA を抽出し、各種遺伝子の発現量を測定した。

TGF- β 1 阻害剤の投与では、腎 5/6 摘出手術後、6 週目から 8 週目まで経日的 (14 日間、9:00) に TGF- β 1 阻害剤を経口投与した。TGF- β 1 阻害剤投与 14 日目に、血中クレアチニン濃度および血中 TGF- β 1 濃度を測定した。TGF- β 1 阻害剤投与 14 日目のマウスの肝臓から total RNA を抽出し、各種遺伝子の発現量を測定した。

レチノール欠損給餌群では、5/6Nx 手術 4 週間後からレチノールを含まない餌に切り替え、その後 4 週間自由摂食・摂水、12 時間の明暗周期条件下で飼育したマウスを Retinol(-) 群として使用した。

マウス肝臓初代培養細胞の検討には、雄性マウスからコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を単離し、単離 4 時間後の細胞を各実験に使用した。

腎機能評価方法として、血中クレアチニン (Scr)、血中尿素窒素 (BUN) をプロトコールに従い、腎 5/6 摘出手術後、1、2、3、4、6、8 週目にマウスから血液を採取し、濃度を測定した。

血中 TGF- β 1 濃度の測定には、腎 5/6 摘出手術後、1、2、4、6、8 週目および TGF- β 1 阻害剤投与 14 日目のマウスから血液を採取し、血中 TGF- β 1 濃度を、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay により測定した。

遺伝子発現解析として、9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00 の 6 時点において採取した臓器および培養細胞から、各遺伝子のタンパク質発現量は western blotting 法で測定した。mRNA の発現量は microarray 法もしくは Total RNA を逆転写反応した後に real-time PCR 法で定量した。mRNA の発現量の測定は、TGF- β 1 阻害剤投与後 14 日目のマウスの肝臓から total RNA を抽出し、Real time-PCR 法を用いて薬物代謝酵素 *Cyp*、受容体およびその転写因子などの発現量を測定した。

統計解析として、独立多群の比較には一元配置分散分析または二元配置分散分析 および Tukey-Kramer test を用い、有意水準 $P < 0.05$ を有意な差とした。また、日内変動の解析には cosinor analysis を使用し、有意水準 $P < 0.05$ を有意な差とした。

4. 研究成果

5/6Nx 後のマウス血中クレアチニン濃度の経時変化を検討したところ、術後より血中クレアチニン濃度は Sham マウス群と比較し 5/6Nx マウス群において高値を示した。この結果より、5/6Nx により慢性腎不全が発症し

ていることが示唆された。

5/6Nx 後のマウス血中 TGF- β 1 濃度の経時変化を検討したところ、血中 TGF- β 1 濃度は Sham マウス群と比較し 5/6Nx マウス群において、術後 6 週目から高値を示し、8 週目においては有意に高値を示した。この結果より、腎不全の進行に伴い、TGF- β 1 の発現が高値を示すことが明らかとなった。

5/6Nx マウス群の肝臓において、遺伝子発現変化の網羅的解析をマイクロアレイ法で行った。その結果、5/6Nx マウスの肝臓において多くの薬物代謝に関わる遺伝子の発現量が低下することが明らかとなった。その中でも、レチノール代謝の変容に着目した。レチノールは、ビタミン A の主要因子であり大部分が食事により摂取される。そこで発現が低下したレチノール代謝関連遺伝子の詳細を調べると、全て CYPs であることが明らかとなった。CYP3A11 は、ヒトでは CYP3A4 に相当する分子種の 1 つであり、CYP26A1 はレチノール代謝の律速酵素の一つであることから、この 2 つに着目した。

5/6Nx マウスにおける肝 CYP3A11 および CYP26A1 発現低下機構を解明するため、まず、CYP3A の基本転写因子である *pregnane X receptor (Pxr)*、*constitutive androstane receptor (Car)*、*hepatocyte nuclear factor 1 (Hnf1)*、*hepatocyte nuclear factor 4 (Hnf4)* 発現量に着目したが、腎障害時において変化しないことが明らかとなった。先のマイクロアレイ解析の結果から、時計遺伝子の変化が示唆されたことから発現量を測定したところ、転写促進因子の *D-site binding protein (DBP)* 発現量が有意に低下していた。

ヒト CYP3A4 発現には日リズムが存在するが、マウス CYP3A11 および CYP26A1 発現では不明であった。そこで正常時における *Cyp3a11* および *Cyp26a1* 遺伝子の発現日内変動の解析を行った結果、これら mRNA 発現に日内変動が存在し、このリズムは CYP3A4 と同様、時計遺伝子で転写促進因子の DBP、転写抑制因子の E4 promoter binding protein 4 (E4BP4) によりリズムカルに制御されていることを明らかにした。

5/6Nx マウス肝臓における *Cyp3a11* および *Cyp26a1* mRNA 発現量の日内変動を測定したところ、5/6Nx マウスでは発現量が有意に減少しており、Sham 群でみられた発現日内変動が消失していた。また、CYP3A11 および CYP26A1 の発現リズム制御因子である DBP の発現量を測定したところ、有意に低下していた。

これらの発現低下は angiotensin II 受容体阻害剤を投与した 5/6Nx においては起こらず、原因因子 TGF- β 1 を同定した。損傷部位である腎臓における過剰な TGF- β 1 の発現亢進が、血液循環を介し肝臓に移行し、

transcription factor 7-like 2 (*Tcf7l2*)、さらにその下流遺伝子である *Id2* の発現を上昇させた。*Id2* の上昇により DBP の発現量が減少し、CYP3A11 および CYP26A1 が減少することで、レチノールが代謝不全により過剰に蓄積することを明らかにした。

CKD 時にレチノールの血中濃度が上昇することは報告されているが、過剰なレチノールの蓄積が生体内に及ぼす影響は不明であった。そこで、野生型 5/6Nx をレチノール欠損給餌条件下にて飼育したところ、腎繊維化が抑制されることで、腎機能悪化が抑えられることを明らかにした。

Cik/Cik マウス 5/6Nx における腎機能悪化を抑制する機構を解明する目的で、体内時計の本体を担う時計遺伝子である *Clock* mutant マウスを対象に 5/6Nx を作製した。その結果、血中 TGF- β 1 濃度亢進が起こらないことを明らかにした。そして、繊維化が抑制され、腎機能悪化が抑制されることが示唆された。

5/6Nx マウスの血中クレアチニンおよび TGF- β 1 濃度に及ぼす TGF- β 1 阻害剤の影響について検討した。その結果、血中クレアチニン濃度および TGF- β 1 濃度は 5/6Nx マウスへの CMC 投与群と比較し、TGF- β 1 阻害剤投与群において、有意に低値を示した。この結果より、TGF- β 1 阻害剤投与により腎不全の改善が認められ、また腎不全の進行に伴い増加する TGF- β 1 の発現を抑制することを明らかにした。

5/6Nx マウスの肝薬物代謝酵素 *Cyp*、受容体およびその転写因子の発現量に及ぼす TGF- β 1 阻害剤の影響について検討した。*Cyp*、受容体およびその転写因子の発現量は、5/6Nx マウスにより Sham マウス群と比較し有意に低下した。また、TGF- β 1 阻害剤投与群においては、Sham マウス CMC 投与群と比較し有意な差異は認められなかった。この結果より、TGF- β 1 阻害剤投与により腎不全時に認められる肝薬物代謝酵素 *Cyp*、受容体およびその転写因子の発現低下を抑制することが示唆された。

以上のことから、5/6 腎摘出により作成した慢性腎不全モデルマウスの肝臓において、転写因子 DBP および CYP3A11 発現量の低下および TGF- β 1 シグナル活性の亢進を明らかにした。これらの機序および生理学的意義を詳細に検討する目的で、慢性腎不全モデルマウスの肝臓で、遺伝子発現変化の網羅的解析をマイクロアレイ法で行った。その結果、慢性腎不全モデルマウスの肝臓で、薬物代謝に関わる多くの遺伝子の発現量が低下することを明らかにした。その中でも、分化誘導に関わるレチノール代謝の変容に着目し、発現が低下したレチノール代謝関連遺伝子の詳細を調べると、全て CYPs であることが明らかとなった。それらの中で、CYP3A11 はヒトでは CYP3A4

に相当する分子種の 1 つであり、CYP26A1 はレチノール代謝の律速酵素の一つであることから、この 2 つに着目して検討を行った。慢性腎不全モデルマウスの CYP3A11 および CYP26A1 の発現低下は、angiotensin II 受容体阻害剤の投与で抑えられ、原因因子の一つとして TGF- β 1 の関与が示唆された。損傷部位である腎臓における過剰な TGF- β 1 の発現亢進が血液循環を介し肝臓に移行し、DBP の発現量が減少し、CYP3A11、及び CYP26A1 が減少することで、レチノールが代謝不全により過剰に蓄積することを明らかにした。肝臓の代謝機能の低下により上昇したレチノールが腎臓において、繊維化および炎症に関与することを明らかにした。これらの過程で、慢性腎不全時の炎症進行過程において、分化に関わる細胞周期を制御する因子が重要であることを明らかにした。そこで、慢性腎不全の治療薬として、細胞周期を制御する因子を標的とした siRNA および化合物の影響について検討したところ、種々の炎症症状が抑えられることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

(原著論文)

Katamune C, Koyanagi S, Shiromizu S, Matsunaga N, Shimba S, Shibata S, Ohdo S. Different roles of negative and positive components of the circadian clock in oncogene-induced neoplastic transformation. *J Biol Chem*. 2016 May 13;291(20):10541-10550. doi:10.1074/jbc.M115.706481.

Okazaki F, Matsunaga N, Okazaki H, Azuma H, Hamamura K, Tsuruta A, Tsurudome Y, Ogino T, Hara Y, Suzuki T, Hyodo K, Ishihara H, Kikuchi H, To H, Aramaki H, Koyanagi S, Ohdo S. Circadian clock in a mouse colon tumor regulates intracellular iron levels to promote tumor progression. *J Biol Chem*. 2016 Mar 25;291(13):7017-7028. doi:10.1074/jbc.M115.713412.

Hamamura K, Matsunaga N, Ikeda E, Kondo H, Ikeyama H, Tokushige K, Itcho K, Furuichi Y, Yoshida Y, Matsuda M, Yasuda K, Doi A, Yokota Y, Amamoto T, Aramaki H, Irino Y, Koyanagi S, Ohdo S. Alterations of hepatic metabolism in chronic kidney disease via D-box-binding protein aggravate the renal dysfunction. *J Biol Chem*. 2016 Mar 4;291(10):4913-4927. doi:10.1074/jbc.M115.696930.

Wada E, Koyanagi S, Kusunose N, Akamine T, Masui H, Hashimoto H, Matsunaga N, Ohdo S. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor-activity by bile acids causes circadian

changes in the intestinal expression of Octn1/Slc22a4 in mice. *Mol Pharmacol* 87(2), 314-322, 2015. doi:10.1124/mol.114.094979.

Okamura A, Koyanagi S, Dilxiat A, Kusunose N, Chen JJ, Matsunaga N, Shibata S, Ohdo S. Bile acid-regulated peroxisome proliferator-activated receptor- (PPAR) activity underlies circadian expression of intestinal peptide absorption transporter PepT1/Slc15a1. *J Biol Chem* 289(36), 25296-25305, 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.577023.

Matsunaga N, Itcho K, Hamamura K, Ikeda E, Ikeyama H, Furuichi Y, Watanabe M, Koyanagi S, Ohdo S. 24-hour rhythm of aquaporin-3 function in the epidermis is regulated by molecular clocks. *J Invest Dermatol* 134(6), 1636-1644, 2014. doi: 10.1038/jid.2014.13.

Oda M, Koyanagi S, Tsurudome Y, Kanemitsu T, Matsunaga N, Ohdo S. Renal circadian clock regulates the dosing-time dependency of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Mol Pharmacol* 85(5), 715-722, 2014. doi: 10.1124/mol.113.089805.

Okazaki H, Matsunaga N, Fujioka T, Okazaki F, Akagawa Y, Tsurudome Y, Ono M, Kuwano M, Koyanagi S, Ohdo S. Circadian regulation of mTOR by the ubiquitin pathway in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 74(2), 543-551, 2014. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3241.

(総説)

大戸茂弘. 体内時計を基盤にした時間薬理学. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 46(12), 837-845, 2015. 12月

大戸茂弘. 時間治療 現状と展望 生体リズムを基盤にした治療. 小児科臨床 68(9), 7-16, 2015. 9月

大戸茂弘, 小柳悟, 松永直哉. 生体リズムと治療. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 28(4), 3-11, 2013. 8月

[学会発表](計15件)

大戸茂弘. 特別講演2「患者に優しい生体リズムにマッチしたクロノセラピー」第48回日本薬剤師会学術大会(鹿児島) 2015年11月22日

大戸茂弘. 教育講演8「がんの時間薬理学を考えた効果的な緩和薬物治療」第9回日本緩和医療薬学会年会(横浜) 2015年10月4日

大戸茂弘. 時間薬理学 患者さんにやさしい時間治療. 第26回日本緑内障学会 招待講演(名古屋), 2015年9月12日

大戸茂弘. 時間制御による新たな創薬ストラテジ-, 日本薬剤学会 創立30周年記念シンポジウム 創薬・創剤の新たな方向性を探る, 日本薬剤学会第30年会(長崎) 2015年5月20日

大戸茂弘, 分子時計を基盤にした炎症およ

び癌に対する創薬、シンポジウム S04 グリーンファルマ研究の最前線～難治性疾患克服への挑戦～, 日本薬学会第135年会(神戸) 2015年3月26日

大戸茂弘. 講演1: からだの時計と薬、市民公開講座「時と睡眠と薬」第88回日本薬理学会年会(名古屋) 2015年3月21日

大戸茂弘. Chronopharmacology of antitumor drugs focused on biological clock Symposium 17 "Chronopharmacology - Present and Future" 第88回日本薬理学会年会(名古屋) 2015年3月19日

大戸茂弘 「時間薬理学と時間栄養学」第3回日本くすりと糖尿病学会学術集会、教育講演6, 2014年11月3日

Ohdo S. Chrono-drug and delivery system: Rhythm monitoring, disruption and manipulation ISSX-JSSX Symposium 3: Chronopharmacological strategy for drug discovery and evolution, Co-chairs: Shigehiro Ohdo, Damjana Rozman, 2014 October 20

大戸茂弘. 特別講演 「体内時計の分子機構を基盤にした創薬・育薬: 薬物輸送と薬物送達」創剤フォーラム(金沢) 第20回シンポジウム, 2014年9月19日

大戸茂弘. セッション4: 腫瘍克服のための新規製剤技術とその効果、「抗癌剤と時間薬理学」第51回 薬剤学懇談会研究討論会(沖縄) 2014年6月20日

大戸茂弘, 小柳悟, 松永直哉. Chronopharmacological aspects of transporters. 日本薬物動態学会 第28回年会(東京) 2013年10月9-11日

大戸茂弘, 小柳悟, 松永直哉, がん細胞の薬剤感受性の概日リズム制御メカニズムと投薬のタイミング. 第86回日本生化学会(横浜) 2013年9月11日

大戸茂弘. 生体リズムと医薬品 ランチョンセミナー 日本薬剤学会第28年会(名古屋) 2013年5月23-25日

大戸茂弘, 小柳悟, 松永直哉. 生体リズムにマッチしたクロノセラピー、特別企画シンポジウム2「患者に優しい投与方法」(オーガナイザー: 大戸茂弘, 辻将央). 日本薬剤学会第28年会(名古屋) 2013年5月23-25日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大戸茂弘 (Ohdo Shigehiro)
九州大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 00223884

(2) 研究分担者

小柳悟 (Koyanagi Satoru)
九州大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 60330932
松永直哉 (Matsunaga Naoya)
九州大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号: 10432915