

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461223

研究課題名(和文)慢性腎臓病の進展に関わる新規NAD代謝酵素の同定ならびに機能解析

研究課題名(英文)Role of NAD metabolism in chronic kidney diseases

研究代表者

荒木 久澄 (Araki, Hisazumi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：00362369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病の進展に関わる脂肪酸による尿細管障害におけるNAD代謝の役割を検討した。脂肪酸結合アルブミン(FFA-alb)を投与した病態マウスの腎臓とFFA-albで刺激した培養近位尿細管細胞を用いてNAD代謝酵素のスクリーニングを行い、FFA-albにより遺伝子発現が上昇するNAD代謝酵素としてNNMTを新規同定した。NNMT過剰発現は代謝分子1-MNAの細胞内濃度を上昇させ、アポトーシスを抑制した。1-MNAの前駆置もアポトーシスを抑制した。更に、マウスにおいても1-MNAは腎保護効果を示した。NNMT活性増強および1-MNA投与は慢性腎臓病における新規治療標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Free fatty acid-bound albumin (FFA-albumin) is involved in the pathogenesis of proteinuric chronic kidney diseases (CKD). Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) metabolism has recently been focused as a novel therapeutic target for several modern diseases. This study was designed to identify a novel molecule in NAD metabolism to protect kidneys from lipotoxicity. Among 19 candidate enzymes involved in mammalian NAD metabolism, the mRNA expression level of nicotinamide n-methyltransferase (NNMT) was significantly increased in both the kidneys of FFA-albumin-overloaded mice and cultured cells stimulated with FFA-albumin. Overexpression of NNMT and 1-MNA, the metabolite of NNMT, inhibited FFA-albumin-induced cell death. Furthermore, oral administration of 1-MNA ameliorated kidney injury in FFA-albumin-overloaded mice. In conclusion, NNMT-derived 1-MNA can reduce renal lipotoxicity. Supplementation of 1-MNA may have potential as a new therapy in CKD patients with refractory proteinuria.

研究分野：腎臓内科

キーワード：慢性腎臓病 蛋白尿 脂肪毒性 NAD代謝

1. 研究開始当初の背景

糸球体疾患における尿蛋白の増加は、その後の尿細管間質病変の進展を伴う腎機能低下の原因となる。よって、治療抵抗性の尿蛋白持続症例に対する新たな治療法の確立を目指す上で、「尿中蛋白からの尿細管細胞保護機構の解明」が重要な研究課題の一つとなる。NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) は全ての真核生物が保有する電子伝達体であると共に、解糖系に存在する種々の酵素に対する補酵素としても働くなど、細胞内エネルギー代謝維持に不可欠な分子である。更に近年、飢餓状態における細胞内恒常性維持に重要な役割をもつ脱アセチル化酵素 Sirtuin や PARP といった酵素群の活性も NAD により制御されることが明らかとなり、細胞内エネルギー代謝における NAD の役割の解明を目指した研究が精力的進められている。しかし現在、哺乳類における NAD 代謝経路や NAD と各種疾患との関連には未だ不明な点が多く、本研究では、尿蛋白に伴う尿細管障害に関わりうる NAD 代謝酵素群の網羅的スクリーニングから同定した一酵素の NAD 代謝における生理的役割、ならびに慢性腎臓病の発症進展における役割の解明を目指すこととした。

2. 研究の目的

腎臓の糸球体性疾患で見られる蛋白尿は、尿細管障害を引き起こし、腎機能を低下させる主要な因子である。実臨床では、降圧薬などの薬物治療が蛋白尿を抑制し腎保護効果を示している。しかし、治療を行っても蛋白尿を抑制できず末期腎不全へ至る症例は未だ多く存在し、新たな治療法が期待されている。尿蛋白の成分であるアルブミンは血中で様々な分子と結合しており、糸球体で濾過されると結合した分子とともに近位尿細管で再吸収される。近年、糖尿病や肥満で見られる蛋白尿では、脂肪酸結合アルブミン (FFA-alb) の再吸収による酸化ストレスが近位尿細管細胞障害の原因と考えられ、新たな治療標的として着目されている。また、細胞内 Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 代謝がエネルギー代謝や細胞死と関連し、その代謝関連分子が病態を制御することが解明されつつある。しかし、FFA-alb の脂肪毒性による酸化ストレスと NAD 代謝との関連は明らかではない。そこで本研究では、FFA-alb による尿細管の酸化ストレスや細胞障害と関連する NAD 代謝関連分子が存在すると仮説を立て、脂肪毒性による近位尿細管障害に対する新たな治療戦略となり得る NAD 代謝関連分子の新規同定を試みた。

3. 研究の方法

FFA-alb による近位尿細管障害と関連する NAD 代謝酵素の新規同定: FFA-alb を 11 日間腹腔内投与し尿細管障害を誘導した雄性 C57BL/6J マウスの腎臓、および FFA-alb で刺激したマウス培養近位尿細管細胞から cDNA を抽出し、NAD 代謝酵素 19 個の Real-time PCR 法を行い、FFA-alb 刺激により両者の遺伝子発現が同様に变化する酵素を同定した。また、同定した酵素の代謝分子の細胞内濃度を HPLC 法で測定し、同定酵素や尿細管細胞障害マーカー (MCP-1, Fibronectin, PAI-1) の遺伝子発現との相関関係を解析した。

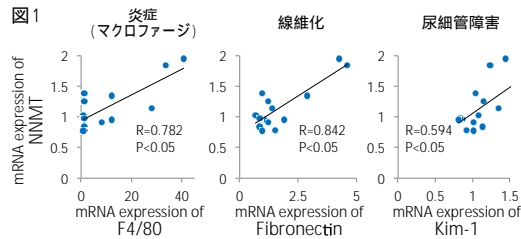
FFA-alb による近位尿細管障害における同定酵素の役割の検討: 培養近位尿細管細胞において、RNA 干渉法を用いて同定酵素遺伝子の発現を抑制し、FFA-alb によるアポトーシスへの影響を検討した。また、レトロウイルスを用いて同定酵素遺伝子の過剰発現培養細胞株を樹立し、FFA-alb による細胞死への影響を検討した。アポトーシスは Western Blot 法を用いて切断化 Caspase-3 および切断化 PARP の蛋白量を評価した。また、Annexin-V、Propidium Iodide を用いて FACS 法により細胞死を評価した。

同定酵素の代謝分子が FFA-alb による細胞死および酸化ストレスに及ぼす効果の検討: 培養近位尿細管細胞に脂肪酸刺激の 1 時間前に同定酵素の代謝分子を孵置し FFA-alb による細胞死への影響を Western Blot 法および FACS 法で評価した。また、細胞内 NAD および NADH 濃度の変化を HPLC 法で測定した。酸化ストレスへの影響は H2DCFDA、Mito Sox Red を用いて評価し、抗酸化酵素 MnSOD、HO-1 の遺伝子発現は Real-time PCR 法で測定した。

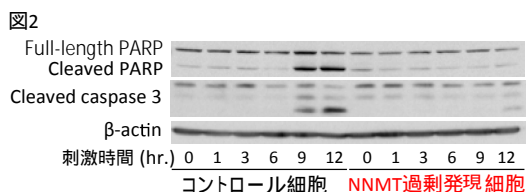
同定酵素の代謝分子がマウスにおける FFA-alb による腎障害に及ぼす効果の検討: FFA-alb を腹腔内投与し尿細管障害を誘導するモデルマウスにおいて、腹腔内投与 7 日より予防的に 1-MNA 含有水を与え、腎臓におけるアポトーシス (切断化 Caspase-3、TUNEL 染色)、ネクローシス (HE 染色)、炎症 (F4/80、MCP-1)、線維化 (Fibronectin、PAI-1)、酸化ストレス (4-HNE 染色) を評価した。また、FFA-alb の腹腔内投与 5 日目から治療的に 1-MNA 含有水を与え、腎障害 (アポトーシス、ネクローシス、酸化ストレス) の評価を行った。

4. 研究成果

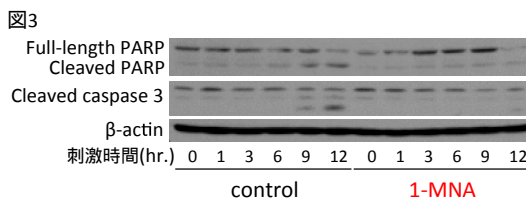
マウスの腎臓において、19個のNAD代謝酵素のうち5個の酵素で、FFA-alb刺激による遺伝子発現の有意な上昇を認めた。その中で、Nicotinamide n-methyltransferase (NNMT)のみが、培養近位尿細管細胞へのFFA-alb刺激においても同様に有意な上昇を認めた。また、NNMTの代謝分子である1-Methylnicotinamide (1-MNA)の細胞内濃度上昇を認め、NNMTや細胞障害マーカーの遺伝子発現と正相関を示した(図1)。



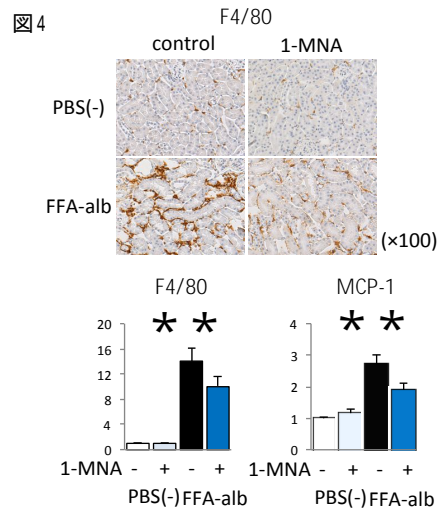
培養近位尿細管細胞において、NNMTの発現抑制は1-MNAの細胞内濃度を減少し、FFA-albによるアポトーシスを増悪した。また、NNMTの過剰発現は1-MNAの細胞内濃度を上昇させ、FFA-albによる細胞死を抑制した(図2)。



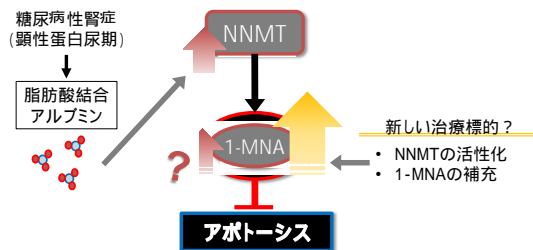
培養近位尿細管細胞において、1-MNAの前孵置はFFA-albによる細胞死および酸化ストレスを、細胞内NAD、NADH濃度や抗酸化酵素の発現に影響せず抑制した(図3)。



1-MNAの予防的な経口摂取は、マウスの腎臓においてFFA-albによる細胞死、炎症、線維化、酸化ストレスを抑制した。また、1-MNAの治療的投与においても、マウスの腎臓でFFA-albによる細胞死、酸化ストレスを抑制した(図4)。



FFA-albによる近位尿細管障害に関連するNAD代謝酵素として、障害時に遺伝子発現が上昇するNNMTを新規同定した。NNMTは1-MNAを産生し、細胞保護的に働いていることが考えられた。また、1-MNAはNADやNADHの細胞内濃度や抗酸化酵素に関与することなく、FFA-albによる近位尿細管細胞の酸化ストレスを抑制し細胞死を改善させた。さらに動物実験においても、1-MNAの経口摂取は細胞実験同様にFFA-albによる近位尿細管細胞の酸化ストレスならびに尿細管障害に対して予防効果および治療効果を認めた。以上から、1-MNAの補充は糖尿病や肥満で見られるFFA-albによる尿細管障害の新たな治療戦略となり得る可能性が示唆された。



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)

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) Tanaka Y, Kume S, Araki H, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki SI, Nakagawa F, Koya D, Haneda M, Maegawa H, Uzu T. 1-Methylnicotinamide ameliorates lipotoxicity-induced oxidative stress and cell death in kidney proximal tubular cells. Free Radic Biol Med. 89:831-41 (2015). 査読あり.
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.414

〔学会発表〕(計5件)

(1) 田中 裕紀, 久米 真司, 中澤 純, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 荒木 信一, 古家 大祐, 羽田 勝計, 宇津 貴, 前川 聡. NAD代謝関連酵素 Nicotinamide n-methyltransferase(NNMT)は糖尿病性腎症の脂肪酸結合アルブミンによる近位尿細管障害を抑制する. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会(2015年5月21日, 海峽メッセ下関, 山口県・下関市)

(2) 田中 裕紀, 久米 真司, 荒木 久澄, 一色 啓二, 荒木 信一, 古家 大祐, 羽田 勝計, 宇津 貴, 前川 聡. NAD代謝関連酵素 Nicotinamide n-methyltransferase(NNMT)は糖尿病における脂肪毒性に伴う近位尿細管細胞障害を抑制する. 第29回日本糖尿病合併症学会.(2014年10月3日, 都市センターホテル, 東京都・千代田区)

(3) 田中 裕紀, 久米 真司, 荒木 久澄, 一色 啓二, 荒木 信一, 古家 大祐, 羽田 勝計, 宇津 貴, 前川 聡. NAD代謝関連酵素 Nicotinamide n-methyltransferase(NNMT)は脂肪毒性に伴う近位尿細管細胞障害を抑制する. 第57回日本腎臓学会学術集会(2014年7月5日, パシフィコ横浜, 神奈川県・横浜市)

(4) Tanaka Y, Kume S, Araki H, Araki S-i, Koya D, Haneda M, Uzu T, Maegawa H. Nicotinamide n-methyltransferase (NNMT), an NAD metabolic enzyme, protects proximal tubular cells from lipotoxicity. ASN Kidney Week 2014. (2014年11月13日, The Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, USA)

(5) Tanaka Y, Kume S, Araki H, Isshiki K, Araki S-i, Koya D, Haneda M, Kashiwagi A, Uzu T, Maegawa H. Nicotinamide n-methyltransferase is a novel enzyme that protects proximal tubular cells from lipotoxicity-mediated apoptosis. 74th Scientific Sessions, American Diabetes Association. (2014年6月14日, The Moscone Center, San Francisco, USA.)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmed3/snai>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 久澄 (ARAKI, Hisazumi)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号: 362369

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

久米 真司 (KUME, Shinji)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号: 452235

(4) 研究協力者

田中 裕紀 (TANAKA, Yuki)