

助成番号 0908

抗老化分子 SIRT1 による尿細管オートファジー改善を標的とした新たな食塩感受性高血圧治療戦略の構築

宇津 貴

滋賀医科大学内科学講座

概要 24ヶ月自由食餌下で飼育した加齢マウスでは、若年マウスに比し、尿アルブミン排泄が亢進、血中シスタチン C 濃度が上昇に加え、腎の繊維化が亢進するとともに酸化ストレスマーカーが亢進していた。これらの変化はカロリー制限を加えたマウスでは観察されなかった。そこで、加齢によって腎に異常なミトコンドリア蓄積が生じるか否かについて、電子顕微鏡を用いて検討したところ、若年マウスでは認めなかった膨化したミトコンドリアが加齢自由食餌下マウスでは増加していたが、カロリー制限を行った群では、その異常ミトコンドリアがほとんど観察されなかった。オートファゴゾームの形成指標である LC3II/LC3I の比は、加齢カロリー制限群でのみ高値を示した。この結果は、カロリー制限によって異常オルガネラの処理能が高まり細胞機能が維持されることを示唆していた。カロリー制限によって SIRT1 の発現は亢進するとともに、腎内の NAD 含量も増加することより、カロリー制限による腎の加齢変化抑制機構として、抗老化分子 SIRT1 による尿細管オートファジー改善が考えられた。そこで、次に培養近位尿細管細胞を用いた検討を行い、低酸素条件化培養にてオートファゴゾーム形成を観察した。低酸素下では、Bnip3、LC3II/LC3I 比の増加、すなわちオートファゴゾーム形成が亢進するが、その変化は自由食餌下加齢ラット血清を加えた尿細管細胞では、カロリー制限加齢ラット血清にて培養下尿細管細胞に比し、有意に小さくなっていた。しかし、Sirt1 の Si を行った培養尿細管細胞においては、この差は認めなかった。さらに、Sirt1^{+/+}-マウスを用いて検討したところ、カロリー制限によるミトコンドリア形態異常改善は認めなかった。以上より、カロリー制限が腎においてオートファジーを介した抗老化作用を発揮するには Sirt1 が不可欠ことが示された。

今回我々は新たに腎臓におけるオートファジーの役割を示した。加齢と血圧の食塩感受性には、密接な関連があり、その機序として加齢による腎機能障害が考えられている。今後、加齢動物モデルを用いて、血圧と食塩感受性の検討も進めていきたい。

1. 研究目的

メタボリック症候群 (MetS) は、心血管イベントの危険因子として広く知られている。われわれは、メタボリック症候群患者では血圧の食塩感受性が亢進していることを証明するとともに (Uzu T, *et al.* J Hypertens 2006, 文献 1, 図 A)、肥満における腎障害には全身および腎局所の脂肪毒性が関与している可能性を示した (Kume, *et al.* J Am Soc Nephrol 2007, 文献 2)。これらは、腎における Na 排泄障害の改善と全身および腎局所の脂質代謝の改善が、肥満やメタボリック症候群の腎障害の治療ターゲットになることを示唆している。食塩感受性高血圧は心血管リスク

であるとともに (Morimoto A, Uzu T, *et al.* Lancet 1997, 文献 3)、食塩制限が不十分であると血圧コントロールが困難となることが多い。そこで申請者らは、血圧の食塩感受性の視点から MetS における新たな治療戦略を構築するために、高脂肪食負荷を行った MetS モデルマウスを用いて食塩負荷を行った。その結果、高脂肪食負荷を行った MetS モデルマウスにおいて、圧利尿曲線の傾きが小さくなる。つまり血圧の食塩感受性が亢進することを報告した (Deji, *et al.* Am J Physiol Renal Physiol 2009, 文献 4, 図 B)。これらの結果から、MetS における食塩感受性の亢進機構の一つとして、腎臓内の脂肪蓄積によって腎障害が

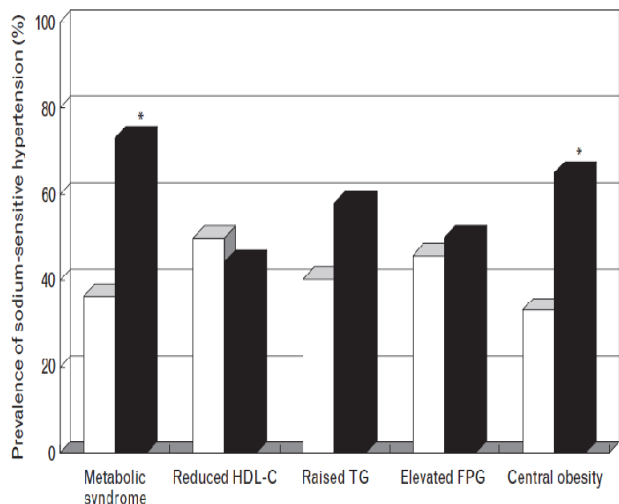


図 A. 本態性高血圧患者においてメタボリックシンドロームを有すると血圧の食塩感受性が亢進する。* $p < 0.05$ (文献 1 より)

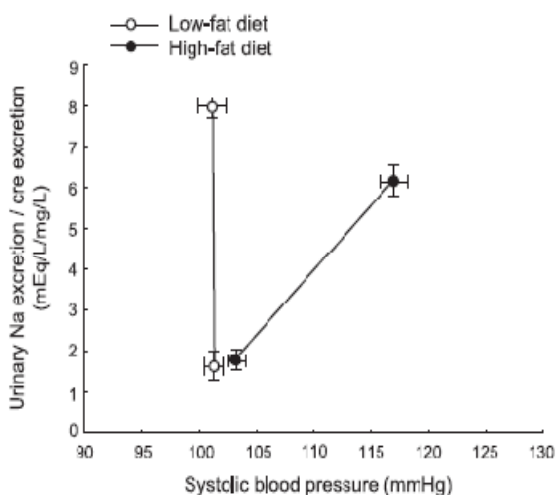


図 B. 高脂肪食負荷マウス(●)では通常食(○)に比し尿利尿曲線の傾きが低下している(文献 4 より)

生じる可能性が考えられる。

一方、我々は高脂肪食負荷によって、腎内で形態異常な Mito が増加することを観察したが、この変化はオートファジーが障害され異常オルガネラが増加する加齢マウスの腎と類似していた。カロリー制限は加齢を抑制することが報告されており、哺乳類では NAD 依存的デアセチラーゼ SIRT1 がその機構に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。そこで、MetS における腎障害を介した血圧食塩感受性の亢進に、ミトコンドリア酸化障害が関与していること、ミトコンドリア障害にオートファジーが関与

しているとの仮説を立てた。そこで、SIRT1 とオートファジーおよび Mito 異常について検討を行った。

2. 研究方法

1) 加齢によるミトコンドリア酸化障害に対するカロリー制限の効果

雄性 C57BL/6 マウスを食餌自由摂取下に飼育した。12ヶ月間後に、そのまま自由食餌を続ける群と、カロリー制限を行う群の 2 群に分けた。カロリー制限群の食餌量は、自由食餌群の 60% になるように調節を行った。食餌の摂取量は 2 週間ごとに測定した。食餌量の調節を開始後 12 ヶ月、すなわち 24 ヶ月齢のマウスについて、尿アルブミン排泄量、腎組織の検討を行うと共に、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の尿中排泄量および腎組織内含有量を測定した。カロリー制限が腎機能低下を抑制するか否かについて、腎機能マーカーにシスタチン C を用いて検討した。

2) 加齢によるミトコンドリア異常とカロリー制限の影響

老化に伴って生じたミトコンドリア酸化障害の機構として、ミトコンドリア DNA 変異が報告されている。そこで、加齢におけるミトコンドリア酸化障害に主に関わっているとされる D-17 deletion mutation と and 点突然変異について、自由食餌摂取およびカロリー制限下の加齢マウスおよび若年マウスにおける腎組織を用いて検討を行った。

3) 加齢によるミトコンドリア異常とオートファジーの障害

ミトコンドリアの形態について電子顕微鏡を用い観察を行った。またオートファジー小胞のマーカーとして、膜結合型 LC3-II と LC3-I の比、オートファジー小胞形成に関わる分子の発現に関する検討を行った。

4) カロリー制限による SirT1 の変化

24ヶ月齢の自由食餌およびカロリー制限を行ったマウスの SirT1 タンパク量とともに NAD 含有量、SirT1 のデアセチラーゼ標的タンパクの一つである FOXO3 に関し検討した。NAD 含有量は NAD/NADH 測定キット (BioVision) を用いた。

5) 加齢と SirT1 によるオートファジーの変化

我々が過去に報告した方法に基づき (Takaya K, *et al.* Am J Physiol Renal Physiol. 2003, 文献 5)、マウス近位尿細管細胞を用い、加齢の影響を検討した。尿細管細胞を、血清を除去した培養液にて 24 時間スタベーション後、加

齢自由食餌ラットあるいはカロリー制限ラットの血清を加え培養を行った。SirT1の影響を検討するために、SiSirt1を行った。

さらに、Sirt1^{+/-}マウスを用い、加齢における腎変化とカロリー制限の影響に関し、研究(1) - (3)と同様の検討を行った。

3. 研究結果

1) 加齢によるミトコンドリア酸化障害に対するカロリー制限の効果

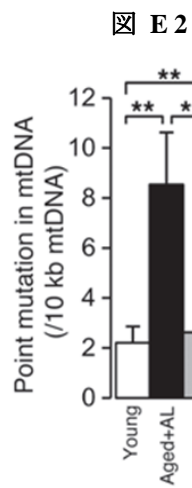
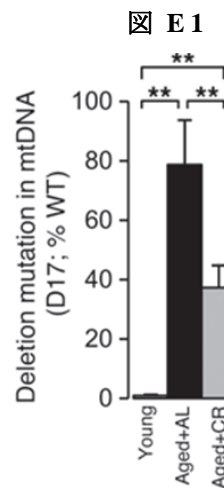
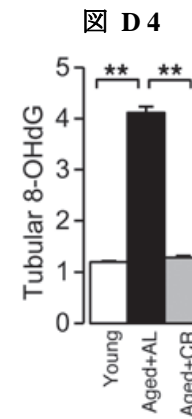
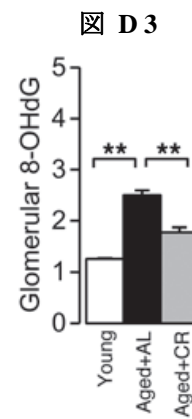
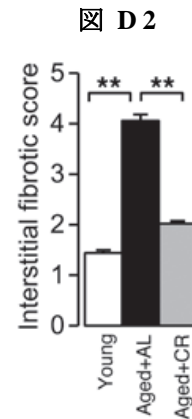
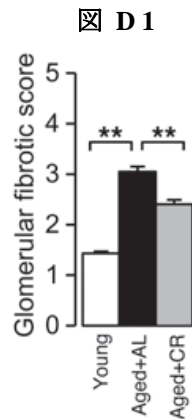
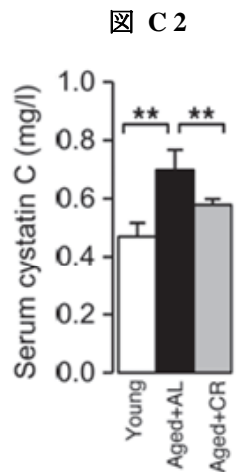
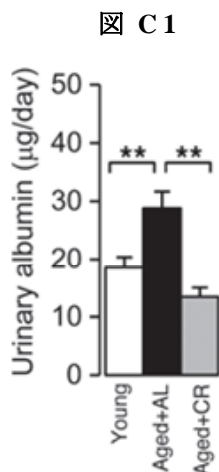
24ヶ月自由食餌下で飼育した加齢マウスでは、若年マウスに比し、尿アルブミン排泄が亢進し(図 C 1)、血中シスタチンC濃度が上昇していた(図 C 2)一方、カロリー制限を行った加齢マウスではこれらの変化を認めなかった。さらに、アザン染色を用いて定量化した、糸球体(図 D 1)および尿細管(図 D 2)の繊維性変化は、24ヶ月自由食餌下で飼育した加齢マウスにおいて、いずれも増加していたが、カロリー制限はこれらの変化を抑制していた。さらに、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の組織内増加も、自由食餌下加齢マウスのみでしか観察されなかった(図 D 3, 4)。尿中 8-OHdG 排泄も若年マウスに比し、自由食餌加齢マウスでは増加していたが、組織変化と同様に、カロリー制限を行った群では、月齢を重ねても尿中 8-OHdG 排泄は明らかな変化を認めなかった。

以上より、加齢によって腎障害が生じること、またその腎障害に酸化ストレスが関与している可能性が示された。

2) 加齢によるミトコンドリア異常とカロリー制限の影響

若年、自由食餌下(AL)加齢、カロリー制限下加齢の三

つの群から得た、腎サンプルを用いて、加齢が及ぼすミトコンドリア異常を検討した。D-17 deletion mutation は、若年群では全く有しておらず、加齢群のみで観察されたが、この以上はカロリー制限で抑制された(図 E 1)。点突然変異も同様の結果であり。加齢によるミトコンドリア酸化異常に関係する異常がカロリー制限で抑制されることが示された。



さらに、D-17 deletion mutation と腎機能(シスタチン C)との間に有意な正の相関関係を認めた(図 F)ことより、加齢における腎機能障害機構として、異常ミトコンドリア増加に基づいた酸化ストレスの増大が考えられた。

3) 加齢によるミトコンドリア異常とオートファジーの障害

異常なオルガネラはオートファジーによって除去されるが、加齢によってその機構が障害され、異常オルガネラが蓄積していくことが加齢の1機構であることが知られている。

そこで、まず、加齢によって腎に異常なミトコンドリア蓄積が生じるか否かについて、電子顕微鏡を用いて検討した。その結果を 図 G に示す。若年マウスでは認めなかった膨化したミトコンドリアが加齢自由食餌下マウスでは増加していたが、カロリー制限を行った群では、その異常ミトコンドリアがほとんど観察されなかった。

オートファゴゾームの形成指標である LC3II/LC3I の比は、加齢カロリー制限群でのみ高値を示した(図 H)。この結果は、カロリー制限によって異常オルガネラの処理能が高まり細胞機能が維持されることを示唆している。

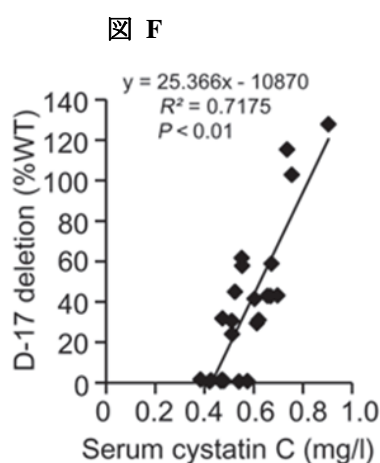
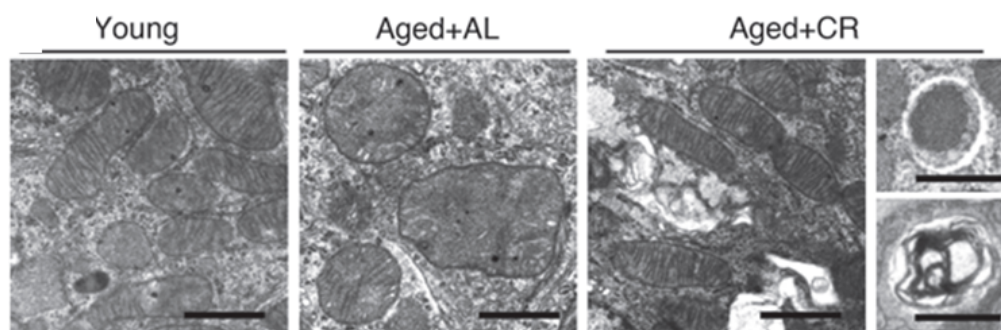


図 G



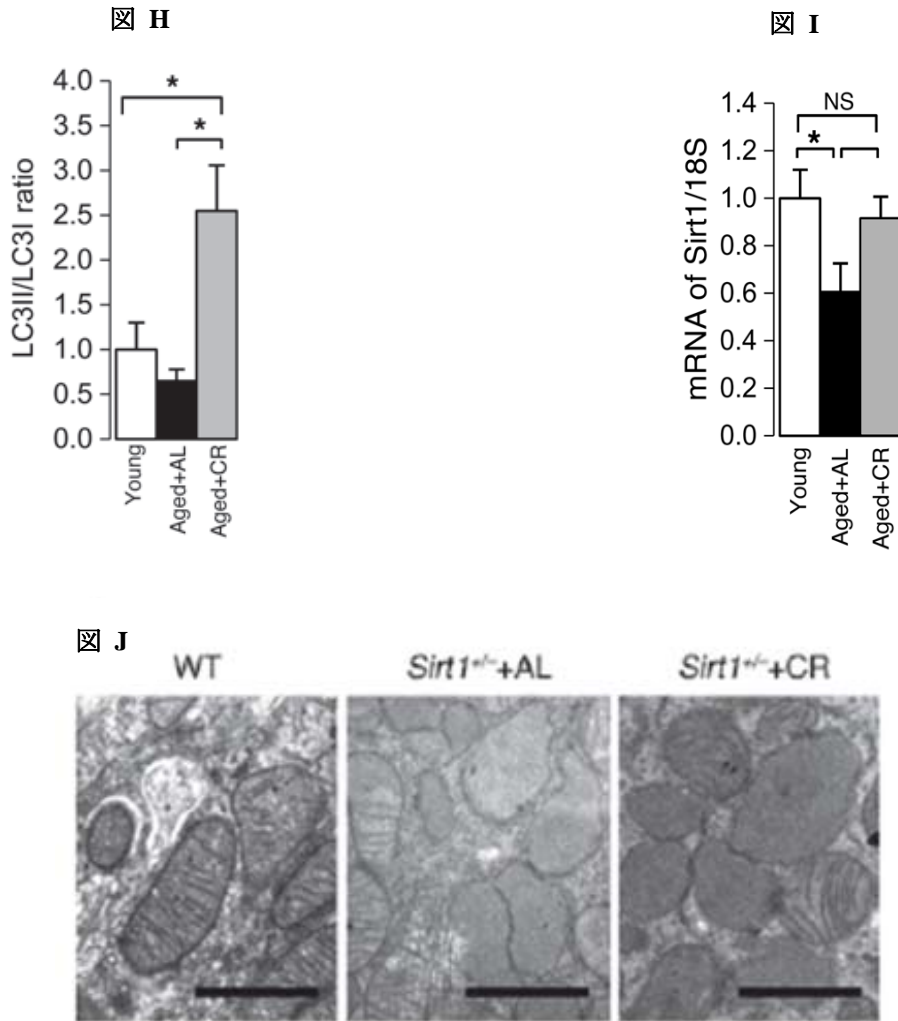
4) カロリー制限によるSirT1の変化

SIRT1 がカロリー制限によって腎内で変化を生じるか否かの検討を行った。結果を(図 I)に示す。カロリー制限によって SIRT1 の発現は亢進するとともに、腎内の NAD 含量も増加した。SirT1 は NAD 依存的にデアセチラーゼ活性を発揮するため、加齢マウスでは SirT1 活性が低下していること、カロリー制限によって低下した SirT1 活性が回復することが示めされた。

さらに、SirT1 の発現増加がミトコンドリアオートファジーや腎機能にどのような影響を与えるかについて検討したところ、腎機能の指標であるシスタチン C は SirT1/18S 比と有意な負の相関関係($R^2 = 0.54$, $p < 0.01$)、ミトコンドリアの DNA 変異である D-17 deletion と有意な負の相関関係($R^2 = 0.53$, $p < 0.01$)を示した。

5) 加齢とSirT1の変化

カロリー制限によって SirT1 が増加し、その増加がオートファジーを介してミトコンドリア機能維持に働くことをより詳細に検討するため、まず、培養近位尿細管細胞を用いた検討を行った。低酸素条件化培養にてオートファゴゾーム形成を観察した。低酸素下では、Bnip3、LC3II/LC3I 比の増加、すなわちオートファゴゾーム形成が亢進するが、その変化は自由食餌育下加齢ラット血清を加えた尿細管細胞では、カロリー制限加齢ラット血清にて培養下尿細管細胞に比し、有意に小さくなっていた。しかし、Sirt1 の Si を行った培養尿細管細胞においては、この差は認めなかった。さらに、Sirt1^{+/-}マウスを用い検討したところ、カロリー制限によるミトコンドリア形態異常改善は認めなかった。以上より、カロリー制限が腎においてオートファジーを介した抗老化作用を発揮するには Sirt1 が不可欠なことが示された(図 J)。



4. 考察

肥満・メタボリック症候群は心血管合併症のみではなく腎に関しても危険因子と考えられている。また、腎が障害されると、心血管合併症の危険が増大することが明らかになり、慢性腎臓病(CKD)＝心血管リスクとの概念が定着している。しかし、つまり、肥満・メタボリック症候群の心血管リスク増大の一因に腎の要素が関与していると考えられる。しかし、肥満・メタボリック症候群による腎障害の発症・進展機構は明らかにされていない。我々の今回の検討によって肥満を呈する糖尿病やメタボリック候群に伴う慢性腎疾患には、全身の代謝状態のみではなく腎局所においてオートファジー障害に基づく細胞障害が関与していることが示された。

近年、オートファジーが各臓器における様々な生理作用や病態形成に関与しうるとの報告がなされている。今回

我々は新たに腎臓におけるオートファジーの役割を示した。今後、これらの知見を元に、Sirt1- オートファジー経路と慢性腎臓病進展への関わりを検討し、本経路の活性化を標的とした新たな慢性腎臓病治療の可能性を確立したいと考えている。加齢と血圧の食塩感受性には、密接な関連があり、その機序として加齢による腎機能障害が考えられている。今後、加齢動物モデルを用いて、血圧と食塩感受性の検討も進めていきたい。

文献

- 1) Uzu T, Kimura G, Yamauchi A, *et al.* Enhanced sodium sensitivity and disturbed circadian rhythm of blood pressure in essential hypertension. *J Hypertens.* 2006; 24:1627-1632.
- 2) Kume S, Uzu T, Araki S, *et al.* Role of altered renal lipid

- metabolism in the development of renal injury induced by a high-fat diet. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 2715-2723.
- 3) Morimoto A, Uzu T, Fujii T, *et al.* Sodium sensitivity and cardiovascular events in patients with essential hypertension. *Lancet.* 1997; 350:1734-1737.
- 4) Deji N, Kume S, Araki S, *et al.* Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 296: F118-26.
- 5) Takaya K, Koya D, Isono M, *et al.* Involvement of ERK pathway in albumin-induced MCP-1 expression in mouse proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 284:F1037-F1045.

No. 0908

A New Strategy for the Treatment of Salt Sensitive Hypertension: Targeting for Normalization of Autophagy in the Renal Tubular Cells by an Antiaging Protein, SIRT1

Takashi Uzu

Shiga University of Medical Science

Summary

The kidney is a typical target organ of age-associated tissue damage, and the increased incidence of chronic kidney disease in the elderly is a health problem worldwide. However, there is little or no information on the mechanisms underlying age-associated kidney damage. Aging is also one of the important determinants of salt sensitivity of blood pressure. Thus, studies designed to determine the mechanisms on the aging could help formulate interventions that delay the onset and/or progression of CKD and reduce the salt sensitivity of blood pressure in elderly patients. Caloric restriction (CR) significantly inhibited age-associated increases in the renal dysfunction marker serum cystatin C, 24-hour urinary albumin excretion, and fibrotic changes in glomerular and interstitial lesions, with significantly reduced urinary excretion of the oxidative stress marker 8-OHdG. EM analysis showed accumulation of senescent mitochondria in PTCs of ad libitum-fed (AL) mice, which exhibited swelling and disintegration of cristae. In contrast to PTCs of AL mice, those of CR mice showed normal mitochondrial morphology with numerous auto (lyso) phagosomes. Sirt1 activity was decreased in the aged kidney and enhanced by long-term CR. Furthermore, Sirt1 mRNA expression levels correlated negatively with serum cystatin C levels and prevalence of D-17, which suggests that Sirt1 is associated with age-associated kidney dysfunction. Sirt1^{+/-} AL mice showed damaged mitochondria, higher levels of urinary 8-OHdG excretion, and higher prevalence of point mutation of mtDNA in the kidney; additionally, CR failed to suppress these abnormalities. These results suggest that Sirt1 in the kidney is essential for the CR-mediated enhancement of hypoxia-associated mitochondria oxidative damage *in vivo*. The present study demonstrated that mitochondrial damage in aged kidney is associated with Sirt1 deficiency and that Sirt1 promotes cell adaptation to hypoxia through autophagy in aged kidney.