

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890085

研究課題名（和文）肥満・加齢に関連した慢性腎臓病悪化進展因子の同定

研究課題名（英文） Identification of new therapeutic target for chronic kidney diseases

研究代表者

久米 真司 (KUME SHINJI)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：00452235

研究成果の概要（和文）：本研究は肥満や加齢に伴う腎疾患の予後悪化、特に腎予後を規定する尿蛋白の増加に起因した尿細管病変の悪化に関連する新規慢性腎臓病進展因子を同定し、その機能解析、臨床応用への可能性を検討する事を目的としている。これまでに実施した肥満や加齢に関連したマウス腎疾患モデルを用いた網羅的遺伝子解析から、近位尿細管細胞における炎症、線維化、細胞死を制御しうる慢性腎臓病関連遺伝子として Gene X 遺伝子を新たに同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

In glomerular diseases, reducing proteinuria is considered as a principal therapeutic target to improve renal outcomes.. Unfortunately, however, some patients develop treatment-resistant proteinuria, resulting in end stage renal disease. In these patients, protecting proximal tubular epithelial cells (PTECs) against proteinuria may be the next therapeutic target to improve renal outcomes. Obesity and aging are independent risk factors for a rapid decline in renal function in patients with glomerular diseases. Since the severity of proteinuria-induced tubulointerstitial lesions is correlated with renal outcomes, obesity and aging may exacerbate proteinuria-induced tubulointerstitial lesions. If so, identifying the molecular mechanisms underlying obesity- and aging-mediated PTEC vulnerability may lead to new therapy that improves renal outcome in patients with proteinuria. We thus tried to identify a new therapeutic candidate genes by using cDNA microarray analysis in the kidney samples from obese and aged mice with proteinuria. In this study, we have identified a new candidate gene involved in the mechanism underlying obesity- and aging-mediated worsening of proteinuria-induced tubulointerstitial lesion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科

キーワード：慢性腎臓病、肥満、老化

1. 研究開始当初の背景

現在わが国では、肥満者の増加や人口の高齢化を背景とした慢性腎臓病の増加に伴い、末期腎不全患者数は年々増加している。慢性腎臓病の主たる病態である糸球体疾患では、尿蛋白量の増加に伴う尿細管障害の進展がその後の腎機能低下を引き起こす原因となる。そこで、これまでの研究では「尿蛋白量の減少」を目指した糸球体病変の改善を目指した研究が進められてきた。その結果、種々の治療法が開発され、尿蛋白の減少、腎予後改善がもたらされるようになった。一方で、これらの治療によっても尿蛋白が減少せず、尿細管障害が進展し、末期腎不全に至る症例も未だ多く存在しており、これは今後解決すべき重要課題の一つと考えられている。

2. 研究の目的

「尿蛋白に対する尿細管細胞保護機構の解明」という新たな視点で研究を行うことで、既存の治療では尿蛋白を減少することができない症例に対する尿細管保護を目的とした新規治療標的の解明を目指すこととした。特に、肥満や加齢を背景とした尿細管病変増悪機構に着目し検討することで、これまでにない、より臨床的意義の高い治療標的分子機構の同定を試みることとした。

3. 研究の方法

1) 肥満ならびに加齢が蛋白尿の増加に伴う尿細管間質病変の進展に及ぼす影響を検討する。
16週齢の非肥満若年マウス、12週齢から4週間高脂肪食負荷を行った16週齢肥満マウス、24週齢の高齢マウスに対し、腹腔内アルブミン負荷を行い、尿蛋白に伴う腎尿細管間質病変モデルを惹起した。サクリファイス後に摘出した腎組織標本をHE染色にて評価した。

2) 病態モデル腎 cDNA を用いた cDNA microarray 解析。

実験 1) に使用されたマウス群の摘出腎から mRNA を抽出し、RT-PCR 法にて cDNA の作製を行った。この cDNA サンプルを使用してマウス遺伝子 40,000 遺伝子に対する網羅的遺伝子発現解析を行った。マイクロアレイはアジレント社マイクロアレイを使用した。16週齢の非肥満若年マウスにおける非病態群と病態群で 2 倍以上の変化を認め、さらに肥満マウスならびに加齢マウスの病態群で 2

倍以上の変化を示す遺伝子をデータ抽出した。

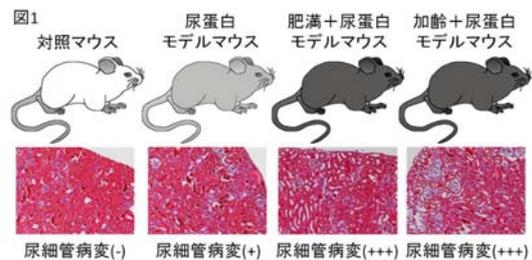
3) 培養近位尿細管細胞を用いた新規慢性腎臓病関連因子の探索。
実験 2) にて 40,000 個の遺伝子のうち、条件を満たす遺伝子が 57 種類存在した。培養近位尿細管細胞内に mRNA 発現を認めるか否かを PCR 法を用いて検討した。

4) 新規慢性腎臓病関連因子 GeneX の腎臓内発現分布の検討。
13 種類の遺伝子のうち 4 種類はすでに既報の尿細管障害因子であったため、残り 9 種類の遺伝子をクローニングしレトロウイルスベクターを作製した。その後、作成した各遺伝子に対するレトロウイルスを培養近位尿細管細胞に感染させ、各遺伝子の過剰発現細胞株を樹立した。さらに、各遺伝子過剰発現細胞に対して尿蛋白類似刺激を行い、尿蛋白刺激により惹起される炎症反応、細胞死における各遺伝子の発現増強が及ぼす影響を検討した。

5) GeneX にコードされた蛋白に対する抗体を作製し、実験 1) で作成された腎組織サンプルを用いた免疫染色ならびにウェスタンブロット法にて新規慢性腎臓病関連分子の発現変化を確認した。

4. 研究成果

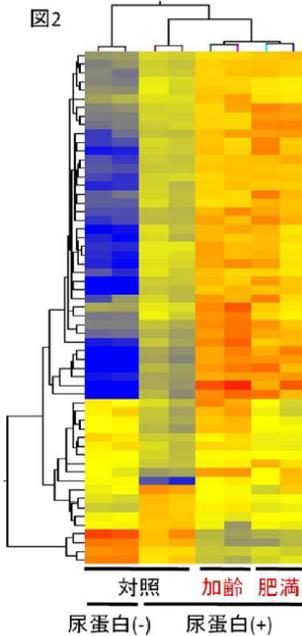
1) 肥満ならびに加齢が蛋白尿に及ぼす影響検討。
腹腔内アルブミン連日注入により作成した尿蛋白モデルを用いた検討で、非肥満若年マウスに比し、肥満及び 24 ヶ月齢(加齢)マウスでは、尿蛋白による腎尿細管病変が顕著に増悪した(図 1)。



2) DNA microarray を用いた新規慢性腎臓病関連因子の探索

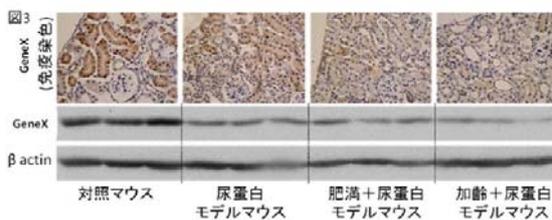
実験 1) で作成されたマウス 4 群の摘出腎から作成した cDNA を用い DNA Microarray 行った結果、肥満と加齢に共通した尿細管病変増悪関連遺伝子として 57 遺伝子のスクリー

ニングに成功した (図 2)。その中で、13 遺伝子が近位尿細管細胞に特異的に発現する遺伝子であること、また 4 遺伝子は既報の尿細管病変進展関連遺伝子であることが確認された。しかし、残り 9 遺伝子に関しては腎疾患との関連は報告されていなかったため、培養近位尿細管細胞を用いこれら 9 遺伝子の機能解析を行った。



3) 候補遺伝子 9 遺伝子の過剰発現レトロウイルスならびに siRNA を作製し、培養近位尿細管細胞に感染、遺伝子導入し、尿蛋白刺激により惹起される細胞障害に対し各遺伝子の発現変化が及ぼす影響を検討した。結果、9 遺伝子中の 1 遺伝子 GeneX の発現変化が細胞障害に影響を及ぼすことが明らかとなり、GeneX 遺伝子が肥満や加齢による尿蛋白関連尿細管障害の増悪に関わる新規遺伝子である可能性が示された。

4) 新規慢性腎臓病関連因子としての可能性を示した GeneX に対する抗体を作製し、蛋白発現レベルにおいても腎障害モデルにおいて GeneX の発現が変化するかを検討した。Microarray の結果は GeneX が病態の進展と共に低下することを示していたが、その変化同様に蛋白発現レベルにおいても、病態の悪化と共に GeneX 由来の蛋白発現の減少が確認された (図 3)。



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 10 件)

1. Kume S, Kitada M, Kanasaki K, Maegawa H, Koya D. Anti-aging molecule, Sirt1: a

novel therapeutic target for diabetic nephropathy. Arch Pharm Res. 2013 Feb;36(2):230-236. 査読有り
doi: 10.1007/s12272-013-0019-4.

2. Kitada M, Kume S, Takeda-Watanabe A, Kanasaki K, Koya D. Sirtuins and renal diseases: relationship with aging and diabetic nephropathy. Clin Sci (Lond). 2013 Feb 1;124(3):153-64. 査読有り
doi: 10.1042/CS20120190.

3. Kume S, Uzu T, Maegawa H, Koya D. Autophagy: a novel therapeutic target for kidney diseases. Clin Exp Nephrol. 2012 Sep 13. 査読有り
doi: 10.1007/s10157-012-0695-2.

4. Huber TB, Edelstein CL, Hartleben B, Inoki K, Jiang M, Koya D, Kume S, Lieberthal W, Pallet N, Quiroga A, Ravichandran K, Susztak K, Yoshida S, Dong Z. Emerging role of autophagy in kidney function, diseases and aging. Autophagy. 2012 Jun 13;8(7). 査読有り
doi: 10.4161/auto.19821.

5. Kume S, Thomas MC, Koya D. Nutrient sensing, autophagy, and diabetic nephropathy. Diabetes. 2012 Jan;61(1):23-9. 査読有り
doi: 10.2337/db11-0555.

6. Tanaka Y, Kume S, Kitada M, Kanasaki K, Uzu T, Maegawa H, Koya D. Autophagy as a therapeutic target in diabetic nephropathy. Exp Diabetes Res. 2012;2012:628978. 査読有り
doi: 10.1155/2012/628978.

7. Yang X, Kume S, Tanaka Y, Isshiki K, Araki S, Chin-Kanasaki M, Sugimoto T, Koya D, Haneda M, Sugaya T, Li D, Han P, Nishio Y, Kashiwagi A, Maegawa H, Uzu T. GW501516, a PPAR δ agonist, ameliorates tubulointerstitial inflammation in proteinuric kidney disease via inhibition of TAK1-NF κ B pathway in mice. PLoS One. 2011;6(9):e25271. 査読有り
doi: 10.1371/journal.pone.0025271.

8. Koyama T, Kume S, Koya D, Araki S, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sugimoto T, Haneda M, Sugaya T, Kashiwagi A, Maegawa H, Uzu T. SIRT3 attenuates palmitate-induced ROS production and inflammation in proximal tubular cells.

Free Radic Biol Med. 2011 Sep 15;51(6):1258-67. 査読有り
doi: 0.1016/j.freeradbiomed.2011.05.028.

9. Tanaka Y, Kume S, Araki S, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sakaguchi M, Sugimoto T, Koya D, Haneda M, Kashiwagi A, Maegawa H, Uzu T. Fenofibrate, a PPAR α agonist, has renoprotective effects in mice by enhancing renal lipolysis. *Kidney Int.* 2011;79(8):871-82. 査読有り
doi: 10.1038/ki.2010.530.

10. Kitada M, Kume S, Imaizumi N, Koya D. Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1-independent pathway. *Diabetes.* 2011;60(2):634-43. 査読有り doi: 10.2337/db10-0386.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Kume S. Autophagy deficiency in obese and aging mice exacerbates proteinuria-associated renal tubulointerstitial lesion. 71th Scientific Sessions (2011) in SanDiego (American Diabetes Association).

2. Kume S. Autophagy in diabetic nephropathy. The 20th Summer Symposium & Workshop (2011) in Seoul (Korea Diabetes Association)

3. 久米真司: 第 12 回日本抗加齢医学会総会 (横浜: 2012 年 6 月)

4. 久米真司: 第 55 回日本腎臓学会学術総会 (横浜: 2012 年 6 月)

5. 久米真司: 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会(横浜: 2012 年 5 月)

6. 久米真司, 古家大祐, 前川聡: 肥満・メタボリックシンドロームと慢性炎症 腎脂肪毒性と慢性炎症; 第 32 回日本肥満学会 (兵庫: 2011 年 9 月) シンポジウム

7. 久米真司: 基礎研究から臨床への応用 慢性腎臓病とオートファジー; 第 41 回 日本腎臓学会西部学術大会 (徳島: 2011 年 8 月) シンポジウム

8. 久米真司: カロリー制限による加齢腎病変の保護作用; 第 11 回日本抗加齢医学会総会 (京都: 2011 年 5 月) シンポジウム

〔図書〕(計 3 件)

1. 久米真司, 古家大祐, 前川聡: 腎臓におけるオートファジーの制御と病態への関与 Annual Review 腎臓 2012 巻 Page58-64 (2012)

2. 久米真司, 前川聡, 古家大祐: カロリー制限による腎保護効果における抗老化分子 Sirt1- オートファジー経路の意義; *Adiposcience* (2011) 7 巻 4 号 Page299-306

3. 久米真司, 前川聡, 古家大祐: Sirt1 とカロリー制限; Annual Review 2011 (2011) Page52-58

〔その他〕ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmed3/snai/kenkyu3/supervisorydr.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久米 真司 (Kume Shinji)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号: 00452235

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: