

54. 分子時計を基盤にした腎障害の機序解明と創薬

大戸 茂弘

Key words : 生体リズム, 分子時計, 臓器障害, 合併症

九州大学 大学院薬学研究院
薬剤学分野

緒言

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¹⁾。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²⁾。心血管系の転写因子が日内変動と脂肪代謝、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、 γ 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。しかし、障害を有する臓器が、他の臓器とどのようなコミュニケーションを行い、合併症を引き起こすのか不明である。

こうした状況の中で我々は、体内時計の分子機構を基盤にした創薬および適正使用を通して、時間生物学の実践的臨床応用への道を切り開くことを目的とし、研究を実施している¹⁻⁵⁾。これらの研究過程で、抗癌剤の効果の側面より癌関連遺伝子にリズムが認められ時計遺伝子により制御されていること、副作用の側面より薬を持続的に与えると生体や細胞の恒常性が破綻すること、必要なときにだけ薬を与えることで生体や細胞の恒常性の破綻を回避できることを明らかにした。最近、薬物活性リズムの体内時計の分子機構を解明し報告した。また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。こうした状況の中で、ある臓器を特異的に傷害したにもかかわらず、他の臓器の分子時計の制御機構が影響されることを見出した。生物学的にも、合併症の予防および治療といった点でも非常に興味深い所見であり、詳細な機序を解明し、合併症の予防薬および治療薬の開発を目指すに至った。

本邦での慢性腎臓病 (CKD) 患者は約 1,300 万人存在し成人人口の約 8 人に 1 人を占め、年々透析患者数は増加している状況である。このため、腎不全に至る前に腎障害を診断し、重症化を抑制する新規の診断法と治療法が望まれている。CKD は腎機能の低下のみならず、腎臓、肝臓、小腸の薬物代謝に関与するチトクローム P450 (CYP) やトランスポーターの発現を変化させ、薬物治療を困難とさせる。また CKD は心血管イベントや様々な精神神経疾患の合併症を引き起こすことが知られている。現在、基礎研究レベルで CKD 重症化の機構が解明されつつあるが、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、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。

方 法

1. 実験動物及びCKDモデルマウス (5/6 nephrectomy: 5/6Nx) の作製

自由摂食摂水, 明暗周期 (明期 7:00~19:00) 条件下で2週間飼育した ICR 雄性野生型マウスは, 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 (5/6Nx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, 血漿中クレアチニンのレベルおよび血漿中 TGF- β 1 のレベルを測定した. 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, 受容体およびその転写因子の発現量を測定した.

2. TGF- β 1 阻害剤の投与

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, 血漿中クレアチニンのレベルおよび血漿中 TGF- β 1 のレベルを測定した. 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, Real time-PCR 法を用いて薬物代謝酵素, 受容体およびその転写因子の発現量を測定した.

3. 腎機能評価方法

血清クレアチニン値 (SCr), 血中尿素窒素 (BUN) をプロトコールに従い測定することで評価した. 血漿中クレアチニンレベルの測定は, 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, 血漿中クレアチニンのレベルを測定した.

4. 血漿中 TGF- β 1 レベルの測定

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, 血漿中 TGF- β 1 のレベルを, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay により測定した.

5. 遺伝子発現解析

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, 及び培養細胞から, 各遺伝子のタンパク質発現量は western blotting 法にて測定した. 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 法によって定量した. 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 およびその転写因子の発現量を測定した. 内部標準は β -actin を使用した.

6. 統計解析

独立多群の比較には一元または二元配置分散分析 (one- or two-way ANOVA), および Tukey-Kramer test を用いた. 有意水準 $P < 0.05$ を有意な差とした.

結 果

1. 5/6Nx 後のマウス血漿中クレアチニン量の経時的変化

術後より血漿中のクレアチニンレベルは 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.

2. 5/6Nx 後のマウス血漿中 TGF- β 1 量の経時的変化

血漿中 TGF- β 1 量は 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.

3. 5/6Nx マウス肝臓における発現低下遺伝子の網羅的解析

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 (図 1A)。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 (図 1B)。なかでも、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 1 つであることから、以降ではこの 2 つに着目した。

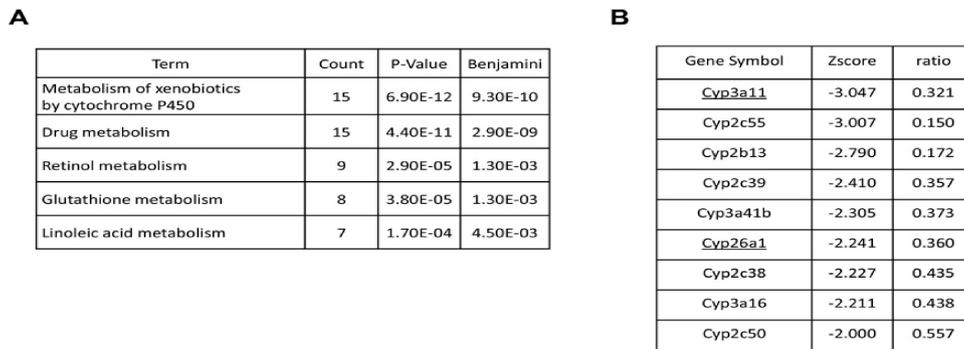


図 1. 5/6Nx マウスおよび正常マウス肝臓を対象としたマイクロアレイ解析。

A) 正常マウスと比較し 5/6Nx マウスにおいて減少した遺伝子カテゴリー。解析はオンラインソフトウェア DAVID を使用した。B) 5/6Nx マウス肝臓において変化したレチノール代謝関連遺伝子。正常マウスと比較し 5/6Nx マウスにおいて減少したレチノール代謝関連遺伝子名を示す。解析はオンラインソフトウェア DAVID を使用した。

4. CYPs 転写因子発現量に対する腎障害の影響

5/6Nx マウスにおける肝 CYP3A11, CYP26A1 発現低下機構の解明のため、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 α), hepatocyte nuclear factor 4 (Hnf4 α) 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 (図 2A)。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ることを見出した (図 2B)。

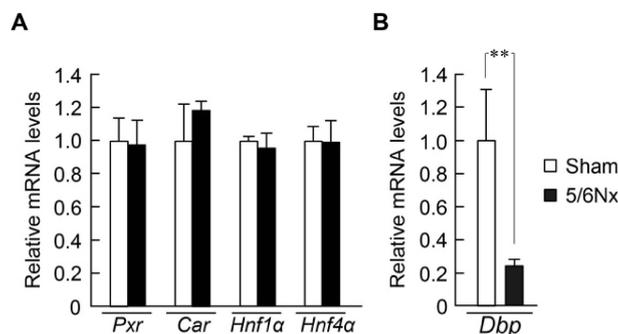


図 2. 5/6Nx マウスおよび正常マウス肝臓の転写因子発現量。

A) 正常マウスおよび 5/6Nx マウス肝臓の転写因子群の発現量。mean \pm S.E.M. (n=3-6)。B) 正常マウスおよび 5/6Nx マウス肝臓の時計遺伝子 Dbp の発現量。mean \pm S.E.M. (n=3-6)。**P < 0.01 (Tukey-Kramer test)。

5. Cyp3a11, Cyp26a1 発現リズムの制御機構解析

ヒト CYP3A4 発現に日周リズムが存在することは明らかとされているが、マウス CYP3A11, 及び CYP26A1 発現では不明であった。そこで正常時における Cyp3a11, Cyp26a1 遺伝子の発現日内変動制御機構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 D-site binding protein (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とした。

次に、5/6Nx マウス肝臓における Cyp3a11, Cyp26a1 mRNA 発現量の日内変動を測定したところ、5/6Nx マウスでは有意に発現量が減少しており、Sham 群でみられた発現日内変動が消失していることを見出した (図 3A)。また、CYP3A11, 及び 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、有意に低下していることを見出した (図 3B)。

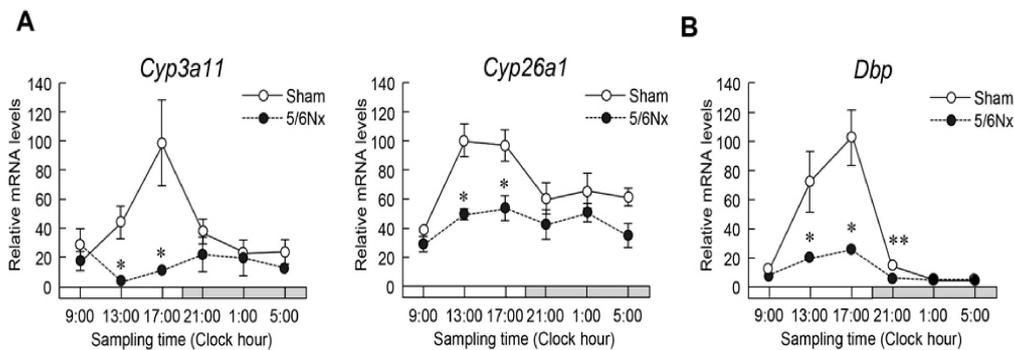


図 3. 5/6Nx マウスおよび正常マウス肝臓の Cyp3a11, Cyp26a1 および Dbp 発現リズム。

A) 正常マウスおよび 5/6Nx マウス肝臓の Cyp3a11 および Cyp26a1 の発現リズム. mean ± S.E.M. (n=3-6). $P < 0.05$ (ANOVA), * $P < 0.05$ vs sham (Tukey-Kramer test). B) 正常マウスおよび 5/6Nx マウス肝臓の時計遺伝子 Dbp の発現リズム. mean ± S.E.M. (n=3-6). $P < 0.05$ (ANOVA), ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs sham (Tukey-Kramer test).

さらに、これらの発現低下は angiotensin II 受容体阻害剤を投与した 5/6Nx マウスにおいては起こらず、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、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とした。

6. 5/6Nx マウスの血漿中クレアチニンおよび TGF- β 1 量に及ぼす TGF- β 1 阻害剤の影響

5/6Nx マウスの血漿中クレアチニンおよび TGF- β 1 量に及ぼす TGF- β 1 阻害剤 14 日間投与後の影響を検討した結果、血漿中のクレアチニン量および TGF- β 1 の量は 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とした。

7. 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

5/6Nx マウスの肝薬物代謝酵素 Cyp およびその転写因子の発現量に及ぼす TGF- β 1 阻害剤の影響を検討した。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。

考 察

本研究結果より、術後より血漿中のクレアチニンレベルは 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。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。血漿中 TGF- β 1 は Sham マウス群と比較し 5/6Nx 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 マウスの肝薬物代謝酵素および転写因子発現量は、Sham マウス群と比較し有意に低下した。本研究結果より、腎不全時には、肝薬物代謝酵素およびその転写制御因子の発現低下による肝薬物代謝機能障害が生じることを明らかにした。

5/6Nx マウスの血漿中クレアチニンおよび TGF- β 1 の量に及ぼす TGF- β 1 阻害剤 14 日間投与後の影響を検討した結果、血漿中のクレアチニン量および TGF- β 1 の量は 5/6Nx マウスの 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、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とした。また、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、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。本研究結果より、腎不全時の肝薬物代謝機能障害の発症機構として TGF- β 1 が原因であることが示された。

本研究の CKD モデルマウスの肝臓を用いた検討で、TGF- β 1 が、時計遺伝子で転写促進因子の DBP の発現を低下させること、また、DBP の低下により下流遺伝子である CYP3A11, および CYP26A1 の発現が低下し、結果レチノールが代謝不全により過剰に蓄積されることが示唆された。

近年、体内時計の異常は様々な疾患の発症や病態の進行に影響を及ぼすことが報告されている。加えて、体内時計は分子機構の解析が進んでいる。本研究で明らかとした、CKD 誘発性の肝臓薬物代謝酵素発現低下機構及び、腎機能悪化に及ぼす肝臓薬物代謝酵素低下の影響解明は、CKD 時における病態解明及び創薬ターゲットになりうるだけでなく、他の疾患領域においても応用可能であると期待できる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学大学院薬学研究院薬剤学分野の松永直哉および小柳 悟である。最後に本研究にご支援を賜りました。上原記念生命科学財団に深く感謝します。

文 献

- 1) Ohdo, S. : Chronotherapeutic strategy: Rhythm monitoring, manipulation and disruption. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62** : 859-875, 2010.
- 2) Ohdo, S., Koyanagi, S. & Matsunaga, N. : Chronopharmacological strategies: Intra- and inter-individual variability of molecular clock. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62** : 885-897, 2010.
- 3) 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** : 715-722, 2014.
- 4) 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** : 543-551, 2014.
- 5) 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** : 1636-1644, 2014.