九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Novel aggravation mechanism of renal functions mediated by molecular clocks working in kidney-liver-kidney axis in mice with chronic kidney disease

濵村, 賢吾

https://hdl.handle.net/2324/1500658

出版情報：九州大学, 2014, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

KYUSHU UNIVERSITY

慢性腎臓病モデルマウスにおける分子時計機構の腎-肝-腎連関を介した新規腎機能悪化機序の解明

薬剤学分野　3PS12021R　濵村　賢吾

【序論】

慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease)、以下 CKD 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。現在、これら問題のポイントとして 2 点挙げられる。第一に、腎機能低下と肝臓 CYP3A4 の代謝能低下の因果関係が臨床レベルで認識されていないことである。第二に、CYP3A4 の発現量を回復させる有効な手法が確立されていないことである。したがって臨床現場では、副作用が出てから投与量を調整するという後ろ向きの投薬設計がなされているのが現状である。CKD 患者の代謝能力を超えた、薬物過剰な投与による副作用防止の観点からも、CKD 時における肝臓薬物代謝酵素 CYP3A4 発現量低下機構の解明が望まれている。

一方、ヒトを初めとする多くの哺乳動物には、概日周期で生体機能を制御する体内時計が備わっている。体内時計の本体は、時計遺伝子 *Clock*, *Bmal1*, *Per*, *Cry* が構築する転写/翻訳フィードバックループであり、D-site binding protein (DBP) に代表される時計出力遺伝子を介してさまざまな生体機能の概日リズムを制御している。時計出力遺伝子により制御される分子には、異物の代謝に関わる多くの代謝酵素が含まれている。そのため、薬物の効果や副作用も投薬時刻により変化することが報告されている。

本研究の第一章では、CKD モデルマウスを対象に、分子時計機構を基盤として肝臓薬物代謝酵素発現低下機構の解明を行った。また、肝臓の CYPs は多くの生理活性分子の合成、代謝に関わっている。そこで、CKD の病態に及ぼす肝臓薬物代謝酵素発現低下の影響を検討するため、第二章では CYPs の低下により過剰に蓄積されたレチノールに着目し腎機能に与える影響を評価した。これまでに、CKD の腎機能に関する予測分子（バイオマーカー）が数多く発見、報告されている。しかしながら、CKD 時における肝臓薬物代謝能を予測するマーカーの同定、また予測方法は構築されていない状況にある。この課題を解決するため、第三章では血清エクソソームを用いて、エクソソーム中に含まれる時計遺伝子 DBP 発現低下機構の解明を行なった。

【方法】

<u>実験動物及び CKD モデルマウス (5/6 nephrectomy; 5/6Nx) の作製;</u> ICR 雄性野生型マウス、ICR 雄性 Circadian locomotor output cycles kaput (*Clock*) mutant (*Clk/Clk*) マウス (C57BL/6J*Clockm1Jt/J*)、及び ICR 雄性 Inhibitor of DNA binding 2 (*Id2*) knockout [*Id2*(-/-)]マウスは、自由摂食・摂水、12 時間の明暗周期 (明期: 7:00-19:00) にて飼育した。野生型、*Clk/Clk* 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)として使用した。

<u>マウス肝臓初代培養細胞;</u> 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た。単離 4 時間後の細胞を各実験に使用した。

<u>レチノール欠損給餌群の作製;</u> 5/6Nx 手術 4 週後からレチノールを含まない餌(KBT オリエンタル社)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。

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。

腎機能評価方法; 血清クレアチニン値 (SCr)、血中尿素窒素 (BUN) を製品プロトコールに従い測定することで評価した。

エクソソーム抽出方法; マウス血清中エクソソームの抽出は ExoQuick™ exosome precipitation solution (System Biosciences 社)を用いた。培養細胞培地中エクソソームの抽出は ExoQuick-TC™ exosome precipitation solution を使用し、それぞれ製品プロトコールに従い単離した。

統計解析; 独立多群の比較には一元配置分散分析 (one-way ANOVA)、および Tukey's post-hoc tests を用いた。また、日内変動の解析には cosinor analysis を使用した。有意水準は 5%以下を有意な差とした。

【結果および考察】

1. CKD モデルマウスにおける肝 CYP3A11、CYP26A1 発現低下機構の解明

5/6Nx 肝臓における発現低下遺伝子の網羅的解析

まず、腎臓を 5/6 摘出することにより作成した CKD モデルマウス (5/6Nx)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。結果、5/6Nx 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 (**Fig. 1A**)。その中でも、レチノール代謝の変容に着目した。

A

Term	Count	P-Value	Benjamini
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	15	6.90E-12	9.30E-10
Drug metabolism	15	4.40E-11	2.90E-09
Retinol metabolism	9	2.90E-05	1.30E-03
Glutathione metabolism	8	3.60E-05	1.30E-03
Linoleic acid metabolism	7	1.70E-04	4.50E-03

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(**Fig. 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一つであることから、以降ではこの2つに着目した。

B

Gene Symbol	Zscore	ratio
Cyp3a11	-3.047	0.321
Cyp2c55	-3.007	0.150
Cyp2b13	-2.790	0.172
Cyp2c39	-2.410	0.357
Cyp3a41b	-2.305	0.373
Cyp26a1	-2.241	0.360
Cyp2c38	-2.227	0.435
Cyp3a16	-2.211	0.438
Cyp2c50	-2.000	0.557

Figure. 1 (A) Functional analysis of the decreased gene expression in the livers of 5/6Nx mice using the KEGG database on the DAVID system. (B) Decrease in the expression of genes involved in retinol metabolism in the 5/6Nx mouse liver.

CYPs 転写因子発現量に対する腎障害の影響

5/6Nx 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 *Pxr*、*Car*、*Hnf1 α*、*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(**Fig. 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(**Fig. 2B**)。

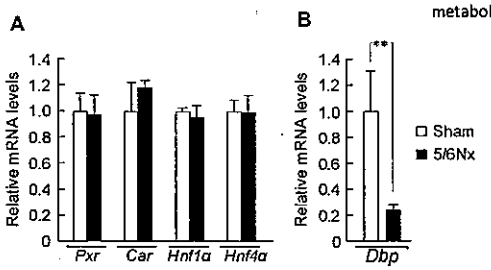

Figure. 2 (A, B) Expression profiles of the general transcription factors of *Cyps* (A) and *Dbp* (B) mRNA in the liver of Sham-operated and 5/6Nx mice at 13:00 after the second operation. Values are the means ± S.E.M. (n = 3–6). (B) **P < 0.01

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)によりリズミカルに制御されていることを明らかとした。

次に、5/6Nx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-operated 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(**Fig. 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(**Fig. 3B**)。

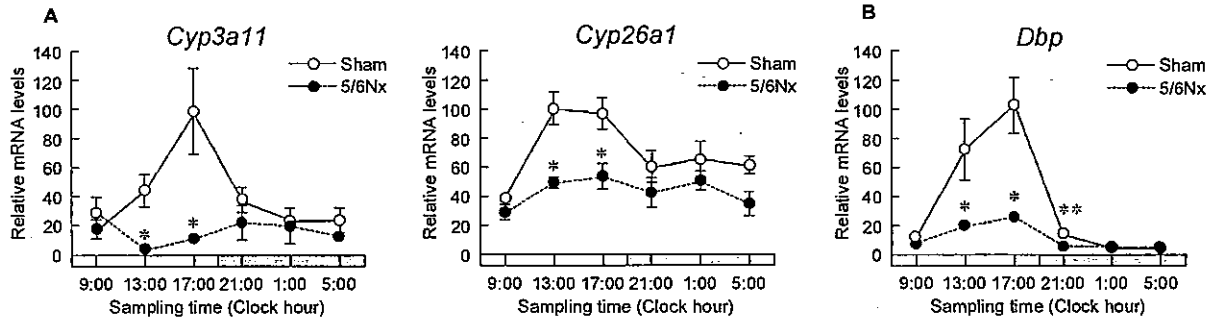

Figure. 3 (A, B) Temporal expression profiles of *Cyp3a11*, *Cyp26a1* (A) and *Dbp* (B) mRNA levels in the livers of Sham-operated and 5/6Nx mice. (*Cyp3a11* and *Cyp26a1* in sham-operated-mice; $P < 0.05$; cosinor analysis) (*Dbp* in sham-operated and 5/6Nx mice; $P < 0.05$; ANOVA, $P < 0.05$; cosinor analysis) Values are the means ± S.E.M. for all experiments (n = 3–6). (A, B) *$P < 0.05$; **$P < 0.01$ compared with the values at corresponding time points.

さらに、これらの発現低下は angiotensin II 受容体阻害剤と投与した 5/6Nx においては起こらず、原因因子transforming growth factor β1 (TGF-β1)を同定した。損傷部位である腎臓における過剰なTGF-β1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ことを同定した inhibitor of DNA binding 2 (*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、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。

2. CKDモデルマウスにおけるレチノールの肝-腎連関を介した新規腎機能悪化機構の解明

Clk/Clk マウス 5/6Nx における腎機能悪化抑制機構の解明

第一章にて5/6Nxと時計遺伝子との関連を明らかとした。そこで、体内時計の本体を担う時計遺伝子である*Clock* mutantマウスにて5/6Nxを作製したところ、血漿における過剰なTGF-β1の濃度亢進が起こらないことを明らかとした(**Fig. 4A**)。結果、繊維化が抑制され(**Fig. 4B**)、腎機能悪化が抑制されることが示唆された(**Fig. 4C**)。

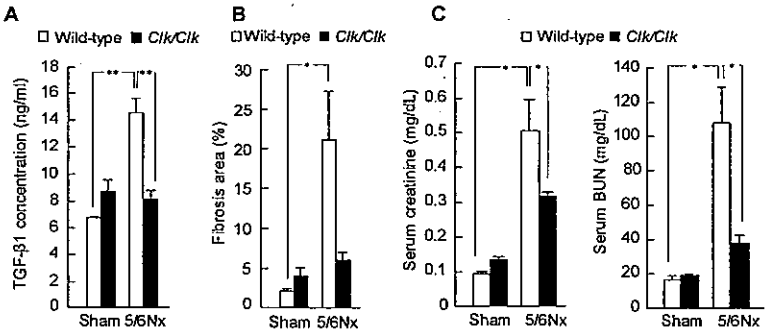

Figure. 4 (A) Plasma TGF-β1 in sham-operated and 5/6Nx wild-type or *Clk/Clk* mice. (B) Quantitative analysis of interstitial fibrosis by light microscopy of sham-operated and 5/6Nx mice at 8 weeks after the second operation in wild-type or *Clk/Clk* mice. (C) Serum creatinine and BUN in sham-operated and 5/6Nx wild-type or *Clk/Clk* mice. Values are the means ± S.E.M. for all experiments (n = 3–6). *$P < 0.05$, **$P < 0.01$.

さらに、野生型 5/6Nx の腎臓において、レチノールが stimulated by retinoic acid 6 (*Stra6*)や signal transducers and activators of transcription 5 (*Stat5*)の発現上昇を介し、CLOCKの発現を上昇されること、及びCLOCK の上昇により腎臓におけるTGF-β1の発現亢進が起こる機構を明らかとした。

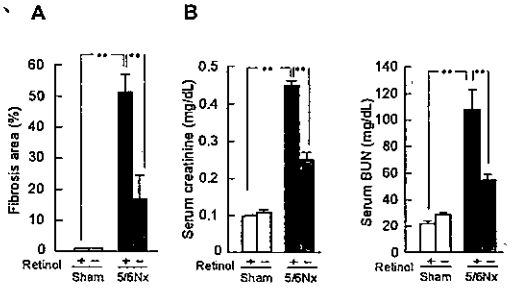

Figure. 5 (A) Quantitative analysis of interstitial fibrosis by light microscopy in response to retinol-free feeding. (B) Concentration profiles of serum creatinine and BUN of wild-type Sham-operated and 5/6Nx mice with retinol-free feeding. Values are the means ± S.E.M. for all experiments (n = 3–6). *$P < 0.05$, **$P < 0.01$.

5/6Nx における腎機能悪化に及ぼすレチノールの影響の検討

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(**Fig. 5A**)、腎機能悪化が抑えられることを明らかとした(**Fig. 5B**)。

3. CKD モデルマウスにおける血清エクソソーム中 DBP 発現低下機構の解明

血清エクソソーム中 DBP 発現日内変動に対する 5/6Nx の影響

第一章にて 5/6Nx の肝臓における CYP3A11、及び CYP26A1 発現低下機構に時計遺伝子 DBP が関与することを明らかとした。しかしながら、CKD 時における肝臓薬物代謝能を予測することは困難である。この課題を解決するため、第三章では血清エクソソームに着目し、エクソソーム中に含まれる時計遺伝子 DBP 発現低下機構の解明を行なうことで、代謝能マーカーとしての有用性を評価した。エクソソームは体液に含まれる直径 40-150nm の脂質二重膜である。野生型 5/6Nx の血清よりエクソソームを回収したところ、エクソソーム量には日内変動が認めらないこと、及び存在量は Sham-operated 群と差が見られないことが示唆された。しかしながら、DBP 量は減少していた(**Fig. 6**)。

さらに、肝臓由来のエクソソームを Asialoglycoprotein receptor 1 (ASGPR1) 抗体を用いた免疫沈降法にて回収したところ、肝臓での DBP 低下がエクソソームに反映されることが示唆された。

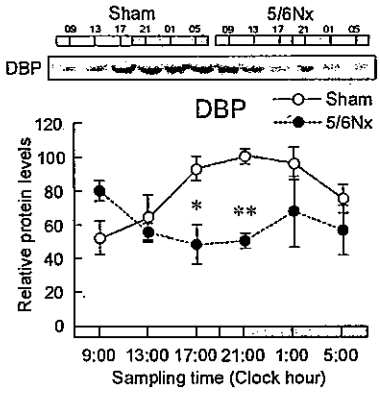

Figure. 6 Temporal expression profiles of DBP in exosomes of sham-operated and 5/6Nx mice (DBP in sham-operated mice; $P < 0.05$; ANOVA). Values are the means ± S.E.M. for all experiments (n = 3). *$P < 0.05$; **$P < 0.01$ compared with the values at the corresponding time points.

【総括】

本研究の CKD モデルマウスの肝臓を用いた検討で、TGF-β1 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。さらに、腎障害時におけるレチノールの影響をして、過剰に蓄積されたレチノールが、腎線維化を介し腎機能悪化に寄与することを明らかとしました。TGF-β1 が、腎臓にて発現が上昇していることを踏まえると、TGF-β1 による、腎-肝連関、レチノールによる肝-腎連関を組み合わせて、腎-肝-腎連関が腎障害時には生じており、その過程で時計遺伝子 DBP が関与していることを明らかとした。

さらに、肝臓 DBP の低下は血清エクソソームに反映できることから、CKD 時の肝臓薬物代謝能低下を予測するマーカーとして血清エクソソーム中の時計遺伝子が有用になりうる可能性があ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およ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。