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

（様式９－３）

氏　　名	濵村　賢吾
論　文　名	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 Novel aggravation mechanism of renal functions mediated by molecular clocks working in kidney-liver-kidney axis in mice with chronic kidney disease
論文調査委員	主　査　薬学府　教授　大戸　茂弘 副　査　薬学府　教授　家入　一郎 副　査　薬学府　准教授　島添　隆雄 副　査　薬学府　准教授　小柳　悟

論文審査の結果の要旨

慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease:CKD)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。我が国における透析患者数は 30 万人に及び、その治療に関わる医療費の推計額は年間 1.4 兆円を超えている。この医療費高騰の原因は、現存のCKDへの治療が根本的治療ではなく、薬物による対症療法がメインであるためである。さらに CKD は、他の二次的疾患を併発することが多く、薬物治療費は増加の一途をたどっており、より有用な治療法の構築が望まれている。また近年、CKD 時に薬物代謝能が変容し、薬物動態が変化することが報告されている。そこで申請者は、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について検討した。また、肝臓の CYPs は多くの生理活性分子の合成、代謝に関わっており、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、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 の腎機能に関するバイオマーカーが数多く発見されているが、CKD 時における肝臓薬物代謝能を予測方法は構築されていない。これを解決するため、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 D-site binding protein (DBP)発現低下機構について検討した。

慢性腎臓病モデルマウス(5/6nephrectomy:5/6Nx)における肝臓 CYPs 発現低下機構の解明を、レチノール代謝に関わる因子であるCYP3A11、及びCYP26A1 に着目して検討した。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を解析した。その結果、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 群でみられた発現日内変動が消失していた。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、有意に低下していた。さらに、これらの発現低下は angiotensin II 受容体(*ATII R1α*)欠損マウス 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カスケードを

明らかとした。

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。しかし、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が、5/6Nx と時計遺伝子との関連を明らかにした。そこで、体内時計の本体を担う時計遺伝子である circadian locomotor output cycles kaput (*Clock*)変異マウスにて 5/6Nx を作製したところ、腎臓における過剰な TGF-β1 の発現亢進が起こらないために繊維化が抑制され、腎機能悪化が抑制されることを明らかとした。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 の発現が上昇すること、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にした。さらに、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、腎繊維化やアポトーシスが抑制されることで、腎機能悪化が抑えられることを明らかにした。

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にした。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。これを解決するため、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することで、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 群と差が見られないことが示唆された。しかしながら、血清エクソソーム中に含まれる DBP 量は減少していた。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。

本研究において、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 CKD 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にした。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。今後、時計遺伝子を介した腎機能悪化を抑制することで QOL 向上に寄与できるものと思われる。これらのことから、申請者は博士(創薬科学)の学位に値すると認める。