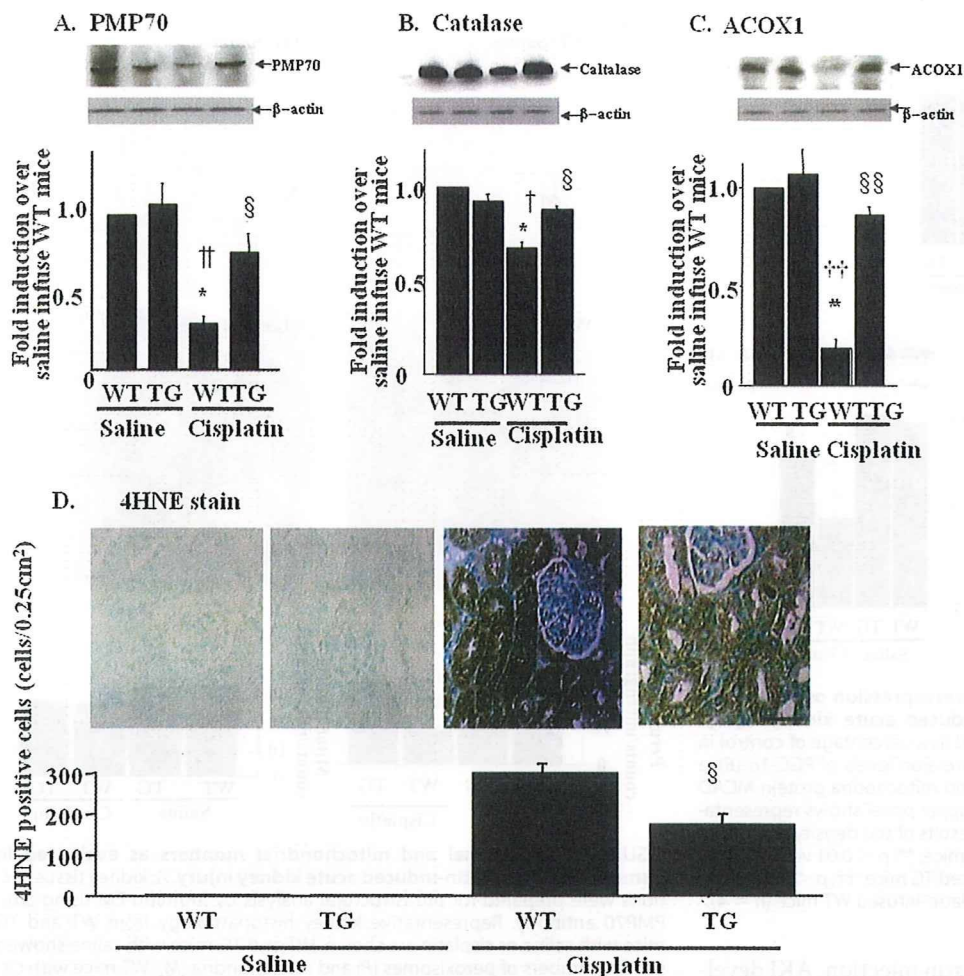


## Renal Sirt1 Protects against Acute Kidney Injury



**FIGURE 4. Effects of kidney-specific Sirt1 overexpression on peroxisome number and function and on local ROS production in cisplatin-induced acute kidney injury.** A–C, the expression levels of peroxisome protein, PMP-70 (A), catalase (B), and ACOX1 (C) are analyzed by immunoblotting using kidney lysates from WT and TG mice 3 days after saline or cisplatin injection. The bar graphs in the lower panels show the quantification of the band intensity. D, local ROS production is assayed by 4-HNE immunostaining. The staining is mainly observed in the proximal tubules in the kidney from WT mice with cisplatin treatment, but is attenuated in those from TG mice. Scale bar, 50  $\mu$ m. \*,  $p < 0.05$  versus saline-infused WT mice; \*\*,  $p < 0.01$  versus saline-infused WT mice; †,  $p < 0.05$  versus saline-infused TG mice; ††,  $p < 0.01$  versus saline-infused TG mice; §,  $p < 0.05$  versus cisplatin-infused WT mice; §§,  $p < 0.01$  versus cisplatin-infused WT mice ( $n = 4$ ).

**Tissue Culture**—HK2 cells were cultured as previously described (7). The expression plasmid containing Sirt1 cDNA (pcDNA3.1-Sirt1) and the control plasmid (pcDNA3.1) were transfected into HK-2 cells by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as described previously (7). Forty-eight hours after the transfection, the cells were used for the following experiments. Sirt1-transfected HK-2 cells were treated with or without cisplatin or I/R. Cisplatin was used at a dilution of 50  $\mu$ M for 24 h in Dulbecco's modified Eagle's medium. In *in vitro* I/R experiments, HK-2 cells (~80% confluent) were washed in glucose-free buffer (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.6 mM NaHCO<sub>3</sub>, and 5 mM HEPES, pH 7.2) and then incubated with 10 mM antimycin A plus 10 mM 2-deoxyglucose plus 1  $\mu$ M calcium ionophore (A23187) for 60 min (to induce ischemic injury *in vitro*). After this ischemic period, *in vitro* reperfusion was achieved by incubating cells in glucose-replete complete growth medium. Twelve hours later, the cells were harvested and subjected to the following study. The peroxisomal mass and the mitochondrial mass of

HK2 cells were determined with the aid of the fluorescent dyes: Organelle Lights Peroxi-GFP and Organelle Lights Mito-OFP (Molecular Probes, Eugene, OR), respectively, following the manufacturer's instructions. For microscopic analysis, the HK2 cells were stained with the fluorescent probes and observed with a confocal microscope (LSM 510; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). In apoptosis measurements, annexin V-fluorescein isothiocyanate in combination with propidium iodide was used to quantitatively determine the percentage of cells undergoing apoptosis, as described previously (7).

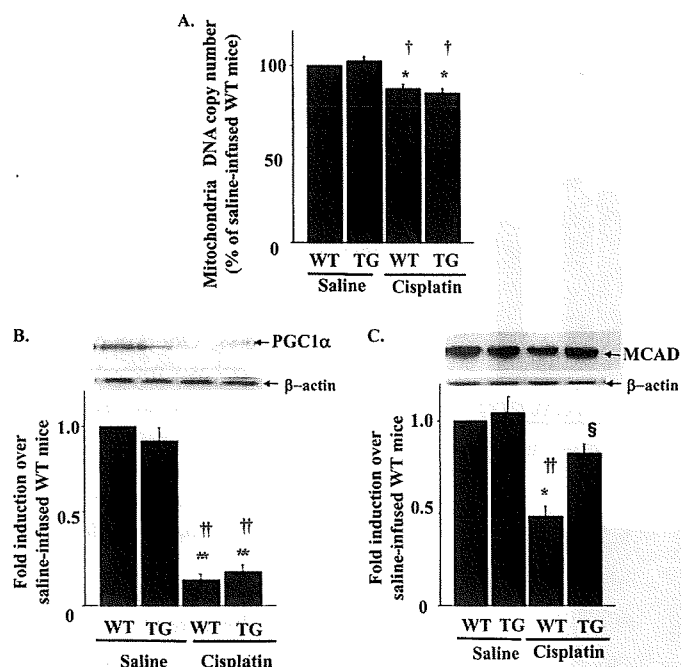
**Statistics**—The data were expressed as the means  $\pm$  S.E. The data were analyzed using one-way or two-way analysis of variance, as appropriate, followed by a Bonferroni's multiple comparison post hoc test.  $p$  values less than 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

**Generation of Renal Epithelium-specific Sirt1 TG Mice**—We generated TG mice with proximal tubule-specific overexpression of human Sirt1 by using Npt2 promoter (Fig. 1A). Positive TG mice were identified with PCR and confirmed by Southern blot (Fig. 1, B and C). We obtained two lines of TG mice, line 001 and line 104. The expression levels of Sirt1 in the kidney were

similar between the two lines, and both lines developed normally and appeared to have the same phenotype. We used line 001 for subsequent experiments and showed the data below for the line 001. Immunoblotting showed that the Sirt1 band of TG mice was broad and composed of one band for endogenous Sirt1 (100 kDa) and one for FLAG-tagged human Sirt1 (101kD) (Fig. 1D). The protein expression levels of Sirt1 in TG mice were increased as compared with those in WT mice (Fig. 1D). TG mice were phenotypically normal and fertile. The overexpression of human Sirt1 in the kidney and other tissues was confirmed by immunoblotting (Fig. 1E and supplemental Fig. S1). Immunohistochemistry showed that exogenous transgene was overexpressed especially in the nucleus of renal tubular cells. (Fig. 1F). Sirt1 was localized preferentially in the cortical area, mostly likely in proximal S1 and S2 segments. In contrast, immunohistochemistry for Sirt1 revealed only modest staining in the medullary segments, and there was less overlap with the AQP4-expressing S3 segment area (Fig. 1G).

## Renal Sirt1 Protects against Acute Kidney Injury

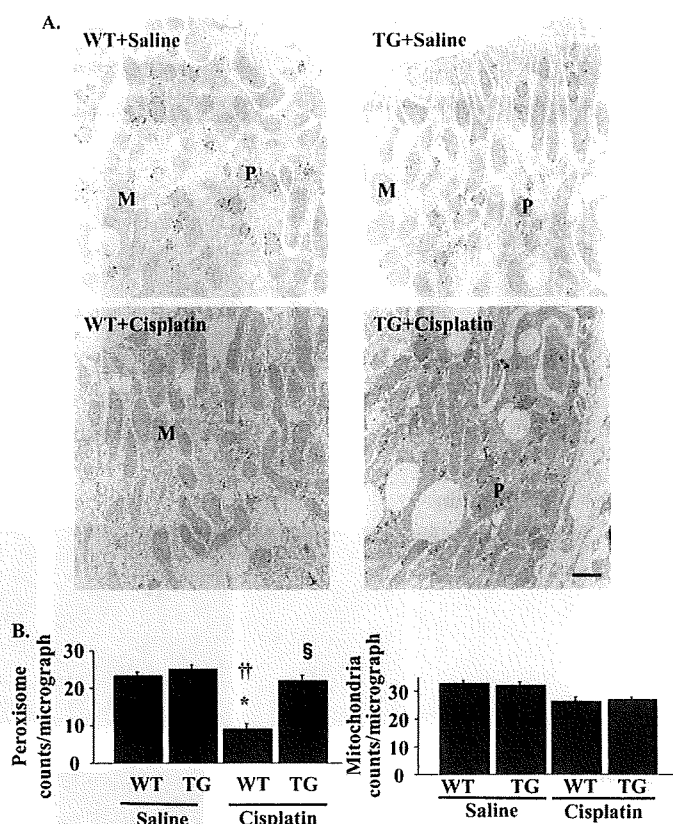


**FIGURE 5. Effects of kidney-specific Sirt1 overexpression on mitochondria number and function in cisplatin-induced acute kidney injury.** A, mitochondrial DNA copy number expressed as a percentage of control in kidney following cisplatin treatment. The expression levels of PGC-1 $\alpha$  (B), a main activator of mitochondria biogenesis, and mitochondria protein MCAD (C) were examined by immunoblotting. The upper panel shows representative blotting, and the lower panel shows the results of the density analysis of each blot. \*,  $p < 0.05$  versus saline-infused WT mice; \*\*,  $p < 0.01$  versus saline-infused WT mice; †,  $p < 0.05$  versus saline-infused TG mice; ††,  $p < 0.01$  versus saline-infused TG mice; S,  $p < 0.05$  versus cisplatin-infused WT mice ( $n = 4$ ).

**Cisplatin-induced AKI**—After cisplatin injection, AKI developed with elevations in both BUN ( $166 \pm 22$  mg/dl, versus  $21 \pm 6$  mg/dl,  $p < 0.01$ ) and serum creatinine levels ( $2.7 \pm 0.2$  mg/dl versus  $0.3 \pm 0.1$  mg/dl,  $p < 0.01$ ) with renal tubular damage (Fig. 2A). Furthermore, TUNEL staining showed marked tubular cell apoptosis, particularly in cortical segments (Fig. 2B, left panel), which were adjacent to the AQP4-stained S3 segment of proximal tubules (Fig. 2B, right panel) (22). These data indicated that the areas affected by cisplatin in our experiment were predominantly localized in the S1+S2 segments.

**Protective Effects of Sirt1 Overexpression on Cisplatin-induced AKI**—The renal protective role of Sirt1 in cisplatin-induced AKI was examined in TG mice. The injection of cisplatin provoked AKI in WT mice, but AKI was partially ameliorated in TG mice (BUN,  $83 \pm 10$  mg/dl; creatinine,  $1.6 \pm 0.4$  mg/dl; Fig. 3, A and B, respectively). Concordantly, the renal histological changes induced by cisplatin were rescued in TG mice as evaluated by the pathological scores (Fig. 3C). To determine the effects of Sirt1 overexpression on renal cell apoptosis, we performed TUNEL staining. No TUNEL-positive cells were detected in both WT mice and TG mice with saline injection (Fig. 3D). In WT mice, cisplatin treatment resulted in an increase in TUNEL-positive cells (Fig. 3D, arrows), which was ameliorated in TG mice (TUNEL-positive cells,  $35 \pm 3/\text{mm}^2$  versus  $18 \pm 3/\text{mm}^2$  for WT and TG mice, respectively).

**Effects of Sirt1 Overexpression on Peroxisome Function in Cisplatin-induced AKI**—Cisplatin has been reported to decrease peroxisome number and impair its function (11), which con-

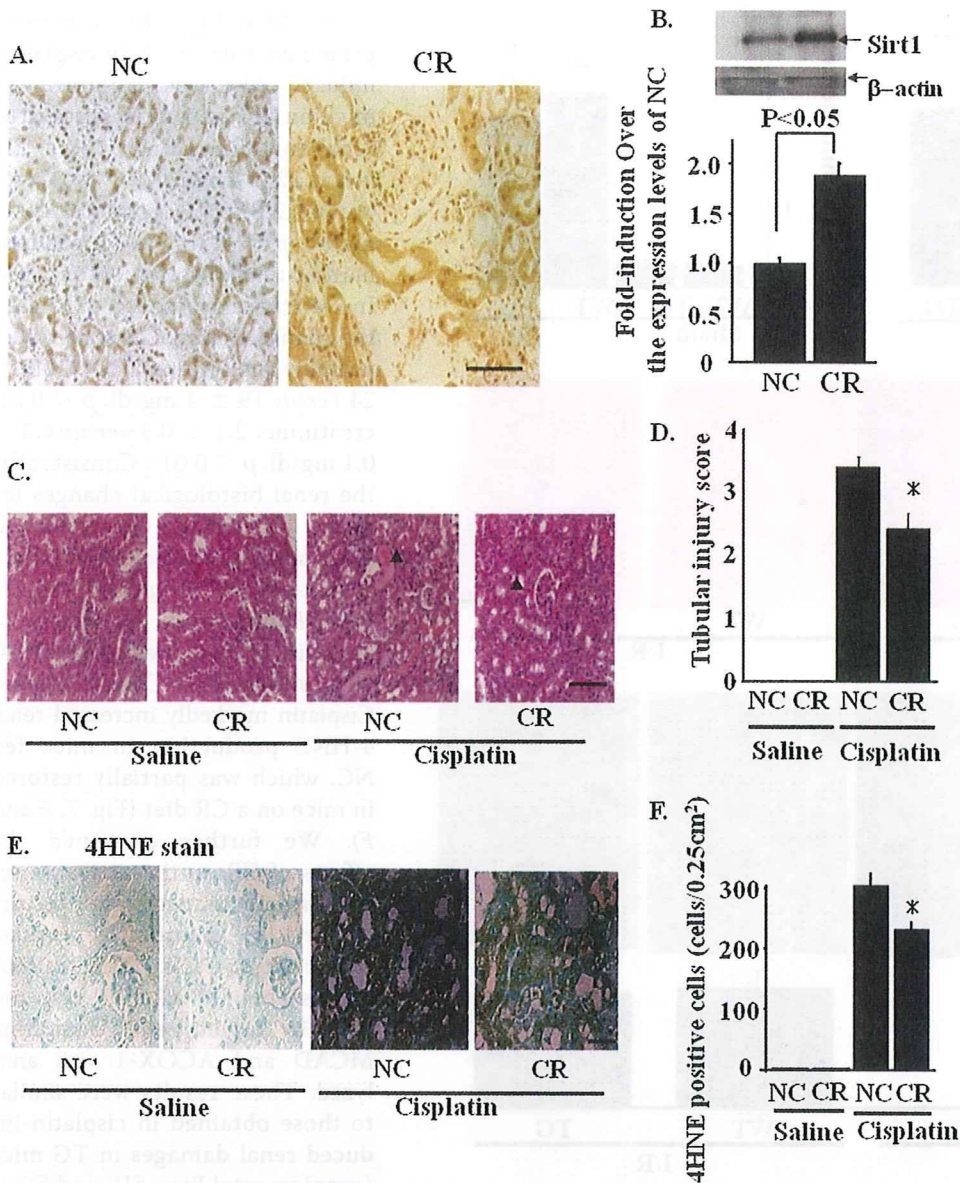


**FIGURE 6. Peroxisomal and mitochondrial numbers as evaluated in immuno-EM in cisplatin-induced acute kidney injury.** A, kidney tissue sections were prepared for ultrastructural analysis by immuno-EM using anti-PMP70 antibody. Representative kidney histopathology from WT and TG mice with saline or cisplatin are shown. WT and TG mice with saline showed similar numbers of peroxisomes (P) and mitochondria (M). WT mice with cisplatin showed decreased numbers of peroxisomes, which were alleviated in TG mice with cisplatin. Scale bar, 1  $\mu\text{m}$ . B, peroxisomal and mitochondrial number in the micrograph at the magnification of  $\times 12,800$  were calculated as described under "Experimental Procedures." \*,  $p < 0.05$  versus saline-infused WT mice; ††,  $p < 0.01$  versus saline-infused TG mice; S,  $p < 0.05$  versus cisplatin-infused WT mice ( $n = 8$ ).

tributes to the renal damage. To elucidate the role of Sirt1 in these changes, we examined the protein expression levels of PMP70, a marker for the number of peroxisome, as well as the levels of catalase and ACOX1, markers for peroxisomal function. As shown in Fig. 4A, cisplatin-treated mice exhibited  $\sim 70\%$  reduction in PMP70 protein, which were restored in TG mice. Similar results were obtained with the expression levels of catalase (Fig. 4B) and ACOX1 (Fig. 4C). Consistently, the formation of 4-HNE was enhanced in proximal tubules in WT mice after cisplatin treatment (Fig. 4D). These changes were attenuated in TG mice with cisplatin insults. These staining patterns were compatible with the results of pathological findings and TUNEL assay (Fig. 3, C and D, respectively).

**Effects of Sirt1 Overexpression on Mitochondrial Number and Function in Cisplatin-induced AKI**—As shown in Fig. 5A, cisplatin caused only a modest, albeit significant, decrease in mtDNA amounts (i.e. 13% reduction). Furthermore, the reduced mtDNA number was not restored in TG mice. The expression levels of PGC-1 $\alpha$ , a key molecule for mitochondria proliferation, were markedly decreased in cisplatin-treated mice and were not ameliorated in TG mice (Fig. 5B). Cisplatin has also been reported to reduce the pro-

## Renal Sirt1 Protects against Acute Kidney Injury



**FIGURE 7. Calorie restriction induced Sirt1 in the renal proximal tubules.** *A*, immunostaining with an anti-Sirt1 antibody shows increased Sirt1 staining in proximal tubules in mice on CR as compared with those in mice on NC. Scale bar, 50  $\mu$ m. *B*, immunoblotting showed that Sirt1 protein expression was increased in kidneys of mice under CR for three months. \*, *p* < 0.05 versus mice with NC (*n* = 4). *C* and *D*, effects of calorie restriction on cisplatin-induced acute kidney injury were examined as described under "Experimental Procedures." In mice on CR diet, the cisplatin-induced acute kidney injury was partially prevented, compared with that in mice on NC. Scale bar, 100  $\mu$ m. The arrowheads indicate the areas of cisplatin-induced tissue damages. *E* and *F*, immunostaining against 4-HNE, a toxic lipid peroxidation product generated by the local H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, was prominent in mice on NC, but was diminished in mice on CR. Scale bar, 50  $\mu$ m.

tein expression of MCAD, a rate-limiting enzyme in FAO in mitochondria. Similarly, a 52% decrease in MCAD expression was observed in WT mice compared with that in saline-injected mice (Fig. 5C). However, this alteration was partially reversed in TG mice.

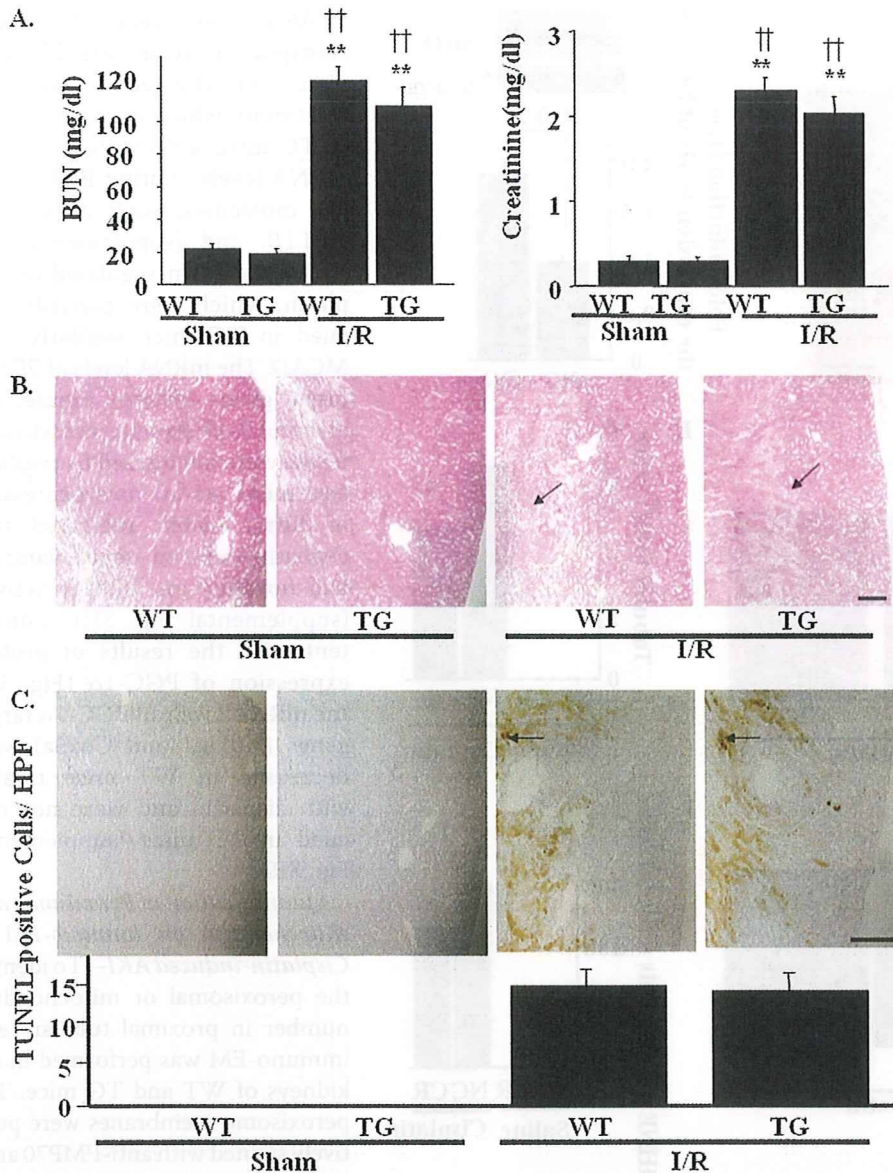
**Effects of Sirt1 Overexpression on the Activation of Downstream Transcription Factors**—Sirt1 regulates the activities of various transcription factors involved in mitochondrial and peroxisomal function, including PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , and PGC-1 $\alpha$ . The mRNA expressions of target genes of these molecules were examined by quantitative reverse transcription-PCR (supplemental Fig. SII). The mRNA levels of

PPAR $\alpha$  target genes, fatty acid transport proteins, and CYP4a10 were not affected by cisplatin treatment, which were not altered in TG mice, either. However, the mRNA levels of other PPAR $\alpha$  target molecules, such as CPT1 $\alpha$ , CPT1 $\beta$ , and (supplemental Fig. VA) were down-regulated by cisplatin, which were partially rescued in TG mice similarly with MCAD. The mRNA levels of PPAR $\gamma$  target genes, glycerol kinase, and glycerol-3-phosphate acetyltransferase were not altered by cisplatin treatment or by overexpression of Sirt1, which indicated that cisplatin-induced renal damages had no effect on PPAR $\gamma$  activity (supplemental Fig. SII). Consistent with the results of protein expression of PGC-1 $\alpha$  (Fig. 5B), the mRNA levels of PGC-1 $\alpha$  target genes (Atp5g1 and Cox5a) were decreased in WT mice treated with cisplatin and were not rescued in TG mice (supplemental Fig. SII).

**Quantification of Peroxisome and Mitochondria on Immuno-EM in Cisplatin-induced AKI**—To identify the peroxisomal or mitochondrial number in proximal tubular cells, immuno-EM was performed in the kidneys of WT and TG mice. The peroxisome membranes were positively stained with anti-PMP70 antibody, which allowed us to distinguish them from mitochondria. As shown in Fig. 6, both the number and the morphology of peroxisomes were not different between WT mice and TG mice with saline infusion. The insults with cisplatin reduced the number of peroxisomes in the kidney of WT mice and were

restored in TG mice (WT versus TG;  $9 \pm 3$  versus  $22 \pm 2$  counts/micrograph; Fig. 6B). These results were comparable with the results of the expression levels of PMP70. The size and shape of peroxisomes in WT mice treated with cisplatin also changed; they were small with a serrated or indented contour. These morphological deformities were not observed in TG mice (Fig. 6A). Both the number and the morphology of mitochondria were not different between WT mice and TG mice with saline infusion. The insults with cisplatin slightly decreased the number of mitochondria in WT mice and were not reversed in TG mice (WT versus TG;  $26 \pm 3$  versus  $27 \pm 2$  counts/micrograph; Fig. 6B).

## Renal Sirt1 Protects against Acute Kidney Injury



**FIGURE 8. Effects of kidney-specific Sirt1 overexpression on I/R-induced acute kidney injury.** WT or TG mice were assaulted by renal I/R as described under "Experimental Procedures." *A*, serum levels of BUN and creatinine were measured 24 h after I/R. *B*, pathological findings reveal extensive tubular damage with cast formation and many apoptotic bodies both in TG and WT mice. The arrows indicate the site of apoptotic bodies. Scale bar, 500  $\mu$ m. *C*, representative images of TUNEL assay show I/R-induced renal tubular cell apoptosis in WT mice. The arrows indicate TUNEL-positive cells in high power field ( $\times 400$ , HPF) with condensed or fragmented nuclei. Similar levels of apoptotic cells are observed in kidneys from TG mice after I/R. Scale bar, 500  $\mu$ m. \*\*,  $p < 0.01$  versus sham-operated WT mice; ††,  $p < 0.01$  versus sham-operated TG mice ( $n = 4$ ).

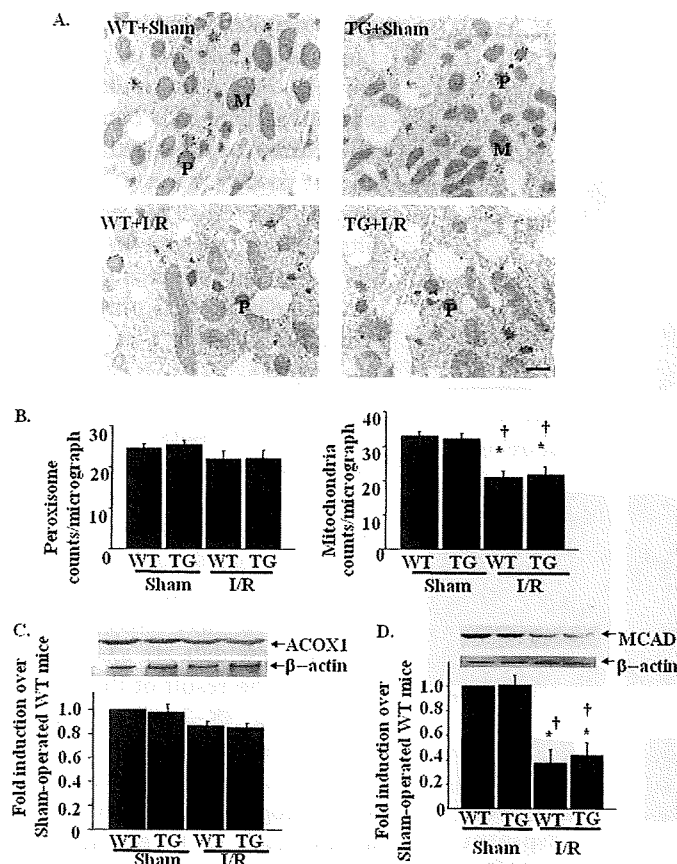
**Effects of Calorie Restriction on Sirt1 Expression and Cisplatin-induced AKI**—Because Sirt1 is an important factor that mediates the beneficial effects of calorie restriction (CR), we examined Sirt1 expression in the kidneys of mice on a 3-month CR diet. Immunohistochemistry in the kidneys in WT mice showed that there is clear nuclear staining in glomeruli and both nuclear and cytoplasmic staining in proximal tubules in WT mice. On the other hand, only faint expression of Sirt1 was detected in the distal tubules. As shown in the immunohistochemistry of the kidneys after CR (Fig. 7A), CR increases the Sirt1 expression in proximal tubules, whereas the Sirt1 expressions in glomeruli were not altered. Immunoblotting showed that renal Sirt1 expression was doubled in mice on CR as compared with that in mice fed normal

chow (NC) (Fig. 7B). The renal protective role of CR in cisplatin-induced AKI was examined. In mice on NC, cisplatin aggravated renal function (BUN;  $168 \pm 21$  versus  $22 \pm 4$  mg/dl,  $p < 0.01$ , creatinine;  $2.8 \pm 0.3$  versus  $0.3 \pm 0.1$  mg/dl,  $p < 0.01$ ) and produced marked renal histological changes. In contrast, in mice fed a CR diet, the changes in renal function were partially ameliorated (BUN,  $115 \pm 24$  versus  $19 \pm 4$  mg/dl,  $p < 0.01$ ; creatinine,  $2.1 \pm 0.3$  versus  $0.3 \pm 0.1$  mg/dl,  $p < 0.01$ ). Consistently, the renal histological changes induced by cisplatin were rescued significantly as compared with those in mice on NC (Fig. 7, C and D). Fig. 7E illustrates the effects of cisplatin on the production of 4-HNE in mice on NC and CR diets. Cisplatin markedly increased renal 4-HNE production in mice fed NC, which was partially restored in mice on a CR diet (Fig. 7, E and F). We further examined the effects of CR on the activation of downstream transcription factors of Sirt1 by quantitative reverse transcription-PCR. The mRNA expression of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , and PGC-1 $\alpha$  target genes, including MCAD and ACOX-1 was analyzed. These results were similar to those obtained in cisplatin-induced renal damages in TG mice (supplemental Figs. SIII and SIV).

**Effects of Renal I/R Injury in Sirt1-TG Mice**—We next examined the role of Sirt1 in renal I/R injury. Extensive tubular injuries were observed in WT kidneys 24 h after I/R.

Overexpression of Sirt1, however, failed to protect against I/R injury. Neither renal function, as assessed by BUN and serum creatinine (Fig. 8A), nor renal histological findings were alleviated in Sirt1-TG mice, as compared with WT mice (Fig. 8B). Fig. 8C shows the effects of Sirt1 on the apoptotic process induced by I/R-induced AKI. Thus, I/R-induced TUNEL-positive cells were observed predominantly in the medulla rather than in the renal cortex, *i.e.* preferentially in S3 segmental proximal tubules rather than in cortical proximal S1 or S2 segments. Kidneys in TG mice after I/R had nearly the same amount of TUNEL-positive cells as in WT mice ( $14.3 \pm 3.2$  versus  $13.7 \pm 3.8$  nuclei/high power field). In the immuno-EM, the number of peroxisomes was not affected by I/R, which were also unaltered in TG mice. On the other hand, the number of mitochondria was reduced by I/R, which was not ameliorated in TG

## Renal Sirt1 Protects against Acute Kidney Injury



**FIGURE 9. Effects of kidney-specific Sirt1 overexpression on peroxisomal and mitochondrial in I/R-induced acute kidney injury.** *A*, kidney tissue sections were prepared for ultrastructural analysis by immuno-EM using anti-PMP70 antibody. Representative kidney histopathology from WT and TG mice with saline or cisplatin are shown. WT and TG mice with saline showed similar numbers of peroxisomes (*P*) and mitochondria (*M*). WT mice with cisplatin showed decreased numbers of peroxisome, which were alleviated in TG mice with cisplatin. Scale bar, 1  $\mu$ m. *B*, peroxisomal and mitochondrial number in the micrograph at the magnification of  $\times 12,800$  were calculated as described under "Experimental Procedures." \*,  $p < 0.05$  versus saline-infused WT mice; ††,  $p < 0.01$  versus saline-infused TG mice; †,  $p < 0.05$  versus cisplatin-infused WT mice ( $n = 8$ ). *C* and *D*, the expression levels of peroxisome protein, ACOX1 (*C*), and mitochondria protein MCAD (*D*) were analyzed by immunoblotting using kidney lysates from WT and TG mice after I/R-induced acute kidney injury. \*,  $p < 0.05$  versus sham-operated WT mice; †,  $p < 0.05$  versus sham-operated TG mice ( $n = 4$ ).

mice (Fig. 9, *A* and *B*). Western blotting using an anti-ACOX-1 antibody and an anti-MCAD antibody in I/R-induced AKI models showed that the protein levels of ACOX-1 were not affected by I/R, which were also unaltered by TG mice (Fig. 9*C*). The protein levels of MCAD were decreased by I/R and were not ameliorated by TG mice (Fig. 9*D*). These data indicated that I/R mainly damaged mitochondria, which was resistant to the effects by Sirt1 overexpression.

**The Effects of Sirt1 Overexpression on Cisplatin or I/R-induced Cellular Damages in HK-2 Cells**—We examined the direct effects of cisplatin or I/R on peroxisomal or mitochondrial number in proximal tubular cells. We first confirmed that both 50  $\mu$ M cisplatin treatment for 24 and 12 h after I/R models caused cellular apoptosis to a similar extent, showing a similar percentage of the population of cells stained with annexin V, a marker of apoptotic changes (Fig. 10*A*). In the assay for peroxisomal number by Peroxi-GFP fluorescence, the expression of

Sirt1 prevented the decrease in peroxisome number induced by cisplatin treatment (Fig. 10*B*). However, in the assay for mitochondria number by Mito-OFP fluorescence, Sirt1 did not alter the reduction in mitochondria number induced by I/R (Fig. 10*C*). These results are consistent with the results in cisplatin-induced AKI as well as in I/R-induced AKI. The present results also suggest that Sirt1 overexpression results in cisplatin-induced peroxisomal number reduction directly.

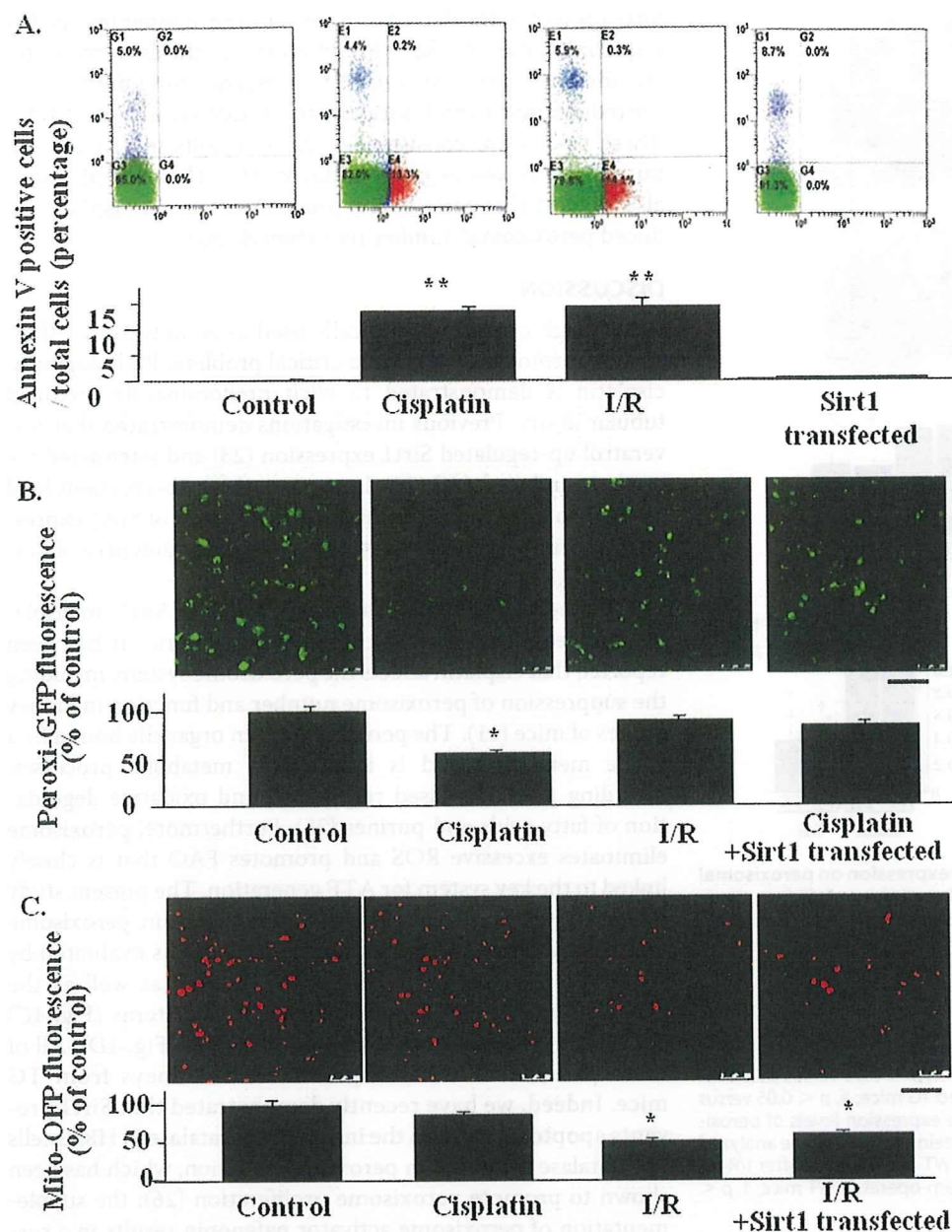
## DISCUSSION

Although cisplatin is clinically used as an anti-cancer therapy, nephrotoxicity remains a critical problem. Pathologically, cisplatin is demonstrated to elicit predominantly proximal tubular injury. Previous investigations demonstrated that resveratrol up-regulated Sirt1 expression (23) and attenuated the cisplatin-induced AKI (24). In concert, these observations lend support to the hypothesis that the modulation of Sirt1 expression constitutes a molecular tool for the prevention of cisplatin-induced AKI.

The mechanism for the protective action of Sirt1 on cisplatin-induced AKI has not been assessed hitherto. It has been reported that cisplatin affects the peroxisome system, including the suppression of peroxisome number and function in kidney tissues of mice (11). The peroxisome is an organelle bound by a single membrane and is involved in metabolic processes, including peroxide-based respiration and oxidative degradation of fatty acids and purines (25). Furthermore, peroxisome eliminates excessive ROS and promotes FAO that is closely linked to the key system for ATP generation. The present study demonstrates that cisplatin causes a decrease in peroxisome number (*i.e.* PMP70; Fig. 4*A*) whose function as evaluated by a reduction in catalase expression (Fig. 4*B*) as well as the expression of ACOX1, a member of FAO systems (Fig. 4*C*) and the subsequent accumulation of 4-HNE (Fig. 4*D*). All of these parameters are well preserved in kidneys from TG mice. Indeed, we have recently demonstrated that Sirt1 prevents apoptosis through the induction of catalase in HK-2 cells (7). Catalase is located in peroxisome fraction, which has been shown to promote peroxisome proliferation (26); the supplementation of peroxisome activator nafenopin results in a sustained increase in the number of peroxisomes with concomitant increases in catalase activity (27). Increased catalase therefore may eliminate  $H_2O_2$  within peroxisome, which possibly leads to the mitigation of the damages to peroxisome. Therefore, it appears that the protective effects of Sirt1 on the peroxisome enzyme are partially secondary to the induction of catalase and/or its resultant peroxisome proliferation. In concert, our study reveals that peroxisome is an important intracellular target organelle for Sirt1.

Mitochondria are important organelles for the maintenance of vital function. It has been reported that mitochondria are altered in both number and function in cisplatin-induced AKI (12). In AKI, the elevated ROS level within mitochondria is deleterious to the cell because of their ability to induce lipid peroxidation, protein oxidation, and DNA damage. The increased ROS also damages mitochondria, which subsequently produces excessive ROS (28). In the present study, cisplatin injection reduces both mitochondrial DNA copy number

## Renal Sirt1 Protects against Acute Kidney Injury



**FIGURE 10. Effects of Sirt1 overexpression on peroxisome and mitochondria mass in HK-2 cells.** *A*, apoptosis was determined by FACS. Each graph for FACS represents the population of the cells stained with annexin V (*x* axis) and propidium iodide (*y* axis) (upper panel). A bar graph summarizing the FACS results are shown in the lower panel. The data are the means  $\pm$  S.E. \*,  $p < 0.05$  versus control. All of experiments were conducted three times using different cultures. *B* and *C*, representative confocal laser scanning microscopic images of Peroxi-GFP, for the assessment of peroxisome number (*B*) and Mito-OFP, for the assessment of mitochondrial number (*C*), in HK2 cells with or without cisplatin treatment or I/R model. The bar graph under each microscopic image represents the quantification of the average pixel intensity of Peroxi-GFP (*B*) or Mito-OFP (*C*). \*,  $p < 0.05$  versus untreated control cells ( $n = 4$ ). Scale bars, 50  $\mu$ m.

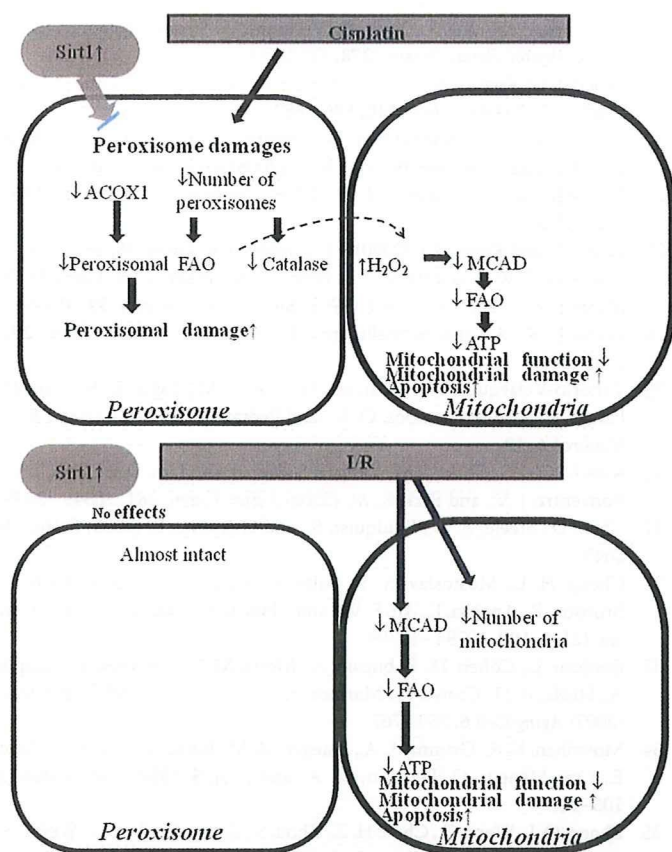
and PGC-1 $\alpha$ , a principle regulator for mitochondria biogenesis (Fig. 5, *A* and *B*). Nevertheless, TG mice did not exhibit the reversal of mitochondrial DNA copy number or PGC-1 $\alpha$  expression. Alternatively, whereas cisplatin down-regulated the expression of mitochondria enzyme, MCAD, Sirt1 overexpression restored the MCAD expression, thus suggesting that mitochondria function was partially recovered by Sirt1 overexpression (Fig. 5*C*). Furthermore, as shown in 4-HNE staining (Fig. 4*D*), overexpression of catalase is capable of reducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in peroxisome, which would diminish the cellular ROS

and subsequently restore the mitochondrial  $\beta$ -oxidation enzyme system (Fig. 5*C*), with resultant ATP generation (Fig. 10). Because our cell culture study revealed that Sirt1 did not modify the mitochondrial number directly, the reversal of mitochondrial enzyme in TG mice was a secondary effect of the reduction in cellular ROS through the activation of the Sirt1-catalase system (Fig. 11).

The results of immuno-EM supported these results. Cisplatin induced the reduction in the number and morphological deformities of peroxisomes, which were reversed by Sirt1 overexpression. These changes *in vivo* are due to the direct effect of cisplatin and Sirt1 overexpression because these data are also consistent with the result of the *in vitro* study using HK-2 cells. However, the precise mechanism for the protective effect of Sirt1 on the morphological changes of peroxisomes needs to be examined. In contrast, mitochondrial number on immuno-EM was not altered with cisplatin, whereas mtDNA copy number was slightly changed, and PGC1 $\alpha$  was remarkably reduced with cisplatin. This may suggest that the early biochemical changes such as PGC-1 $\alpha$ , which preceded the morphological alterations (*i.e.* mtDNA copy number and mitochondria number observed on EM) were detected earlier in this model. Moreover, neither mtDNA copy number nor PGC1 $\alpha$  were affected by Sirt1 overexpression.

Renal I/R injury is also a serious problem among AKI. Previous studies documented that peroxisome number and/or function were damaged in the kidneys of mice undergoing I/R injury (13). In the present study, however, we failed to demonstrate a beneficial effect of Sirt1 on the development of AKI when induced by I/R injury (Fig. 8, *A* and *B*). The reason for this observation is most likely explained by the difference in the affected cellular organelles between by the cisplatin insults and by I/R injury. Cisplatin mainly damaged peroxisomes as evident in immuno-EM (Fig. 6), whereas I/R did not affect peroxisomes much but damaged mitochondria predominantly (Fig. 9). Because Sirt1 rescues renal tubular damages mainly through the restoration of peroxisome number and function, Sirt1 may not be able to rescue

## Renal Sirt1 Protects against Acute Kidney Injury



**FIGURE 11. Schematic diagram illustrating the effects of cisplatin on peroxisome and mitochondria function and the protective role of Sirt1.** Cisplatin decreased the number of peroxisomes resulting in a decrease in FAO activity and catalase expression. Sirt1 overexpression maintained peroxisome and alleviates the cisplatin-induced acute kidney injury. I/R caused mitochondrial insult, which lead to decreasing the number of mitochondria and a concomitant decrease in the expression levels of mitochondrial enzymes. Sirt1 overexpression could not rescue I/R-induced damages because Sirt1 had no effects on mitochondria number and function.

the damage caused by I/R because I/R may not affect peroxisomes much. These selective effects by Sirt1 were also confirmed by our *in vitro* experiments (Fig. 10). We next examined the molecular mechanisms for the preservation of the number and function of peroxisome. We previously demonstrated that, in HK-2 cells, overexpression of Sirt1 protects against oxidative stress-induced cellular apoptosis by FoxO3a-mediated up-regulation of catalase (7). This was effective in cisplatin-induced renal ROS increase but might not be efficient in the renal survival in I/R-induced ROS production. In I/R-induced AKI, the expressions of catalase were not altered, nor were they altered in TG mice (data not shown). These data implied that other ROS scavengers such as glutathione peroxidase and superoxide dismutase, but not catalase, might play an important role in eliminating excessive ROS produced by I/R-induced AKI. In fact, the renal protective effects of these two ROS scavengers against I/R-induced renal damages have already been reported in the previous paper (29, 30). To explore the molecular mechanism for the renal protective effects by Sirt1, we next investigated the effects on PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activity. Although several target genes of PPAR $\gamma$ , including glycerol kinase and glycerol-3-phosphate acetyltransferase, were not altered (supplemental Fig. SII), several PPAR $\alpha$  target

genes, including ACOX1, MCAD (both Figs. 4 and 5), CPT1 $\alpha$ , and CPT1 $\beta$  (supplemental Fig. SVA), were restored by Sirt1 overexpression. However, these changes were not observed in I/R-induced renal damages (supplemental Fig. SVB). These results implied that the renal protective effects by Sirt1 might not conferred mainly by the activation of PPAR $\alpha$ .

Although the current study shows the role of Sirt1 in AKI induced by cisplatin and/or I/R injury in Sirt1-TG mice, the ability to manipulate this factor and modify the course of AKI is undetermined. CR is applied as a widespread useful tool for Sirt1 up-regulation (31). In the present study, we have demonstrated that CR elevates Sirt1 protein expression in proximal tubules, particularly in cortical segments (1.8-fold increase; Fig. 7B). In this setting, renal pathological changes as well as lipid peroxidation products were significantly suppressed, compared with those observed in mice on NC (Fig. 7, D and F). However, further investigations are required to establish the clinical relevance of CR in the prevention of AKI.

The whole body Sirt1 knock-out mice showed early postnatal lethality and exhibited heart and retinal developmental defects (32). TG mice overexpressing Sirt1 in the whole body exhibited similar phenotypes as calorie-restricted mice, including lower body weight, reduction of fat mass, lower level of total blood cholesterol, and improved glucose tolerance (33). As for conditional knock-out mice for Sirt1, liver-specific knock-out mice showed improved glucose tolerance (34). As for conditional TG mice, the results of pancreatic-specific (34), endothelial cell-specific (35), and cardiac muscle-specific (6) mice have shown that Sirt1 overexpression in each tissue exerted organ-protective effects. Despite these studies, the phenotypes of knock-out or TG mice specifically targeted in the kidney have not been reported thus far. The present study is the first investigation that elucidated the function of Sirt1 in kidney *in vivo*.

In conclusion, we have demonstrated that renal Sirt1 exerts protective action on AKI, possibly because of the preservation of peroxisome functions. These effects contributed substantially to the elimination of excessive ROS and to the recovery from mitochondria dysfunction. Our results provide firm evidence that the modalities modulating Sirt1 activity constitute attractive candidates for the treatment of peroxisome dysfunction-related AKI.

## REFERENCES

- Guarente, L. (2000) *Genes Dev.* **14**, 1021–1026
- Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and Gu, W. (2001) *Cell* **107**, 137–148
- Nemoto, S., Fergusson, M. M., and Finkel, T. (2004) *Science* **306**, 2105–2108
- Wiggins, J. E., Goyal, M., Sanden, S. K., Wharram, B. L., Shedden, K. A., Misk, D. E., Kuick, R. D., and Wiggins, R. C. (2005) *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2953–2966
- Giovannini, L., Migliori, M., Longoni, B. M., Das, D. K., Bertelli, A. A., Panichi, V., Filippi, C., and Bertelli, A. (2001) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **37**, 262–270
- Alcendor, R. R., Gao, S., Zhai, P., Zablocki, D., Holle, E., Yu, X., Tian, B., Wagner, T., Vatner, S. F., and Sadoshima, J. (2007) *Circ. Res.* **100**, 1512–1521
- Hasegawa, K., Wakino, S., Yoshioka, K., Tatematsu, S., Hara, Y., Minakuchi, H., Washida, N., Tokuyama, H., Hayashi, K., and Itoh, H. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**, 51–56
- Brezniceanu, M. L., Liu, F., Wei, C. C., Chénier, I., Godin, N., Zhang, S. L.,

## Renal Sirt1 Protects against Acute Kidney Injury

- Filep, J. G., Ingelfinger, J. R., and Chan, J. S. (2008) *Diabetes* **57**, 451–459
9. Purushotham, A., Schug, T. T., Xu, Q., Surapureddi, S., Guo, X., and Li, X. (2009) *Cell Metab.* **9**, 327–338
10. Elliott, P. J., and Jirousek, M. (2008) *Curr. Opin. Investig. Drugs* **9**, 371–378
11. Negishi, K., Noiri, E., Sugaya, T., Li, S., Megyesi, J., Nagothu, K., and Portilla, D. (2007) *Kidney Int.* **72**, 348–358
12. Santos, N. A., Catão, C. S., Martins, N. M., Curti, C., Bianchi, M. L., and Santos, A. C. (2007) *Arch. Toxicol.* **81**, 495–504
13. Gulati, S., Singh, A. K., Irazu, C., Orak, J., Rajagopalan, P. R., Fitts, C. T., and Singh, I. (1992) (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **295**, 90–100
14. Plotnikov, E. Y., Kazachenko, A. V., Vyssokikh, M. Y., Vasileva, A. K., Tcvirkun, D. V., Isaev, N. K., Kirpatovsky, V. I., and Zorov, D. B. (2007) *Kidney Int.* **72**, 1493–1502
15. Nisoli, E., Tonello, C., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Falcone, S., Valerio, A., Cantoni, O., Clementi, E., Moncada, S., and Carruba, M. O. (2005) *Science* **310**, 314–317
16. Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S. E., Mostoslavsky, R., Cohen, H. Y., Hu, L. S., Cheng, H. L., Jedrychowski, M. P., Gygi, S. P., Sinclair, D. A., Alt, F. W., and Greenberg, M. E. (2004) *Science* **303**, 2011–2015
17. Rosenber, T., Shachaf, C., Tzokerman, M., and Skorecki, K. (2007) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **292**, F1617–F1625
18. Hasegawa, K., and Nakatsuji, N. (2002) *FEBS Lett.* **520**, 47–52
19. Wakino, S., Kintscher, U., Liu, Z., Kim, S., Yin, F., Ohba, M., Kuroki, T., Schönthal, A. H., Hsueh, W. A., and Law, R. E. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 47650–47657
20. Vicari, A. P., Figueroa, D. J., Hedrick, J. A., Foster, J. S., Singh, K. P., Menon, S., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Bacon, K. B., and Zlotnik, A. (1997) *Immunity* **7**, 291–301
21. Hashiguchi, N., Kojidani, T., Imanaka, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Baumgart, E., Yokota, S., Tsukamoto, T., and Osumi, T. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 711–722
22. van Hoek, A. N., Ma, T., Yang, B., Verkman, A. S., and Brown, D. (2000) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **278**, F310–F316
23. Wood, J. G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S. L., Tatar, M., and Sinclair, D. (2004) *Nature* **430**, 686–689
24. Do Amaral, C., Francescato, H. D., Coimbra, T. M., Costa, R. S., Darin, J. D., Antunes, L. M., and Bianchi, M. L. (2008) *Arch. Toxicol.* **82**, 363–370
25. Schrader, M., and Fahimi, H. D. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1755–1766
26. Zhou, Z., and Kang, Y. J. (2000) *J. Histochem. Cytochem.* **48**, 585–594
27. Lawrence, J. W., Foxworthy, P. S., Perry, D. N., Jensen, C. B., Giera, D. D., Meador, V. P., and Eacho, P. I. (1995) *Biochem. Pharmacol.* **49**, 915–919
28. Rasbach, K. A., and Schnellmann, R. G. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 2355–2362
29. Tenorio-Velázquez, V. M., Barrera, D., Franco, M., Tapia, E., Hernández-Pando, R., Medina-Campos, O. N., and Pedraza-Chaverri, J. (2005) *BMC Nephrol.* **6**, 12
30. Kim, J., Kil, I. S., Seok, Y. M., Yang, E. S., Kim, D. K., Lim, D. G., Park, J. W., Bonventre, J. V., and Park, K. M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 20349–20356
31. Chen, D., Steele, A. D., Lindquist, S., and Guarente, L. (2005) *Science* **9**, 1641
32. Cheng, H. L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J. P., Gu, Y., Patel, P., Bronson, R., Appella, E., Alt, F. W., and Chua, K. F. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 10794–10799
33. Bordone, L., Cohen, D., Robinson, A., Motta, M. C., van Veen, E., Czopik, A., Steele, A. D., Crowe, H., Marmor, S., Luo, J., Gu, W., and Guarente, L. (2007) *Aging Cell* **6**, 759–767
34. Moynihan, K. A., Grimm, A. A., Plueger, M. M., Bernal-Mizrachi, E., Ford, E., Cras-Méneur, C., Permutt, M. A., and Imai, S. (2005) *Cell Metab.* **2**, 105–117
35. Zhang, Q. J., Wang, Z., Chen, H. Z., Zhou, S., Zheng, W., Liu, G., Wei, Y. S., Cai, H., Liu, D. P., and Liang, C. C. (2008) *Cardiovasc. Res.* **80**, 191–199




EXPERIMENTAL MEDICINE

# 実験医学

月刊

別刷

 羊土社

〒101-0052

東京都千代田区神田小川町2-5-1 神田三和ビル

TEL : 03-5282-1211 (代表) FAX : 03-5282-1212

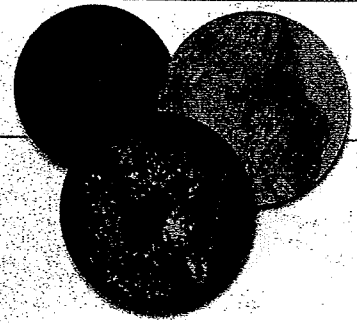
E-mail : eigyo@yodosha.co.jp

URL : <http://www.yodosha.co.jp/>

# 難治疾患 ②

## —未解明の研究課題と治療への挑戦

連載監修／加藤茂明（東京大学分子細胞生物学研究所）



### メタボリックドミノと心腎連関 「腎性インスリン抵抗性症候群」の意義

脇野 修, 伊藤 裕

**心** 血管疾患 (CVD) のリスクファクターとしてメタボリックシンドローム (MS) および慢性腎臓病 (CKD) の意義が重視されている。MSでは腹部肥満を基盤に高血圧, 耐糖能異常, 脂質代謝異常が重積, 連鎖し, われわれの提唱する「メタボリックドミノ」の効果でCVD発症を引き起こす。CKDでは腎機能低下, eGFRの低下を基盤とし心腎連関によりCVD発症を引き起こす。その2つの共通の基盤病態として内分泌代謝系の変調, すなわちインスリン抵抗性とホルモン/サイトカイン, 特にレニン・アンジオテンシン系の亢進が中心的意義を有する。CKDにおけるインスリン抵抗性は「腎性インスリン抵抗性症候群 (Renal Insulin Resistance syndrome: RIRs)」として, MS, CKDの病態の進展に深くかかわっていると考えられ, その発生機序および責任分子群の同定が今後重要である。

#### はじめに

メタボリックシンドローム (metabolic syndrome: MS) は内臓肥満を基盤とし, 高血圧, 耐糖能異常, 脂質代謝異常を合併した病態であり, 心血管系疾患 (cardiovascular disease: CVD) のリスクファクターの1つである。近年食生活の西洋化, 運動量の少ない生活様式などを背景にその罹患率の高さと増加が世界的に問題視されている。MSの診断基準としては1998年のWHOの修正基準, 2001年のNCEP-ATP III (National Cholesterol Education Program's Third Adult Treatment Panel Report) における基準が示されたが, 前者は内臓脂肪, 肥満に重点を置いているのに対し, 後者はインスリン抵抗性に重点を置いた診断基準となっている。日本ではMS発症の最上流に肥満をおくという考え方をもとに'03年に診断基準が示さ

れた (表1①)。日本人の5人に1人はMSであると推定され, MSは国家的な最重要臨床課題となった。

一方新たなCVDのリスクとして腎機能障害の存在も注目されてきている。腎機能の低下は早期の段階であっても (微量アルブミン尿の段階), すでにCVDのリスクとなることが多くの疫学データで証明されるようになってきた。そのようななかで腎機能の評価, 主としてGFR値に関して見直しがなされ, 慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) の概念がNKF (National Kidney Foundation) より提唱され, GFR値および尿タンパク質でCKDをステージ分類し, 重症度を評価することが推奨されている (表1②, ③)<sup>1)</sup>。CVDの発症予防と維持透析患者増加の抑制をめざす目的で, CKDの重要性が社会的にも強調されている。

MS, CKDの2大CVDリスク疾患の罹患人口は日本

"Metabolic domino" and cardiorenal syndrome—significance of "renal insulin resistance syndrome (RIRs)"  
Shu Wakino/Hiroshi Itoh: Division of Endocrinology, Metabolism, and Nephrology, Department of Internal Medicine, Keio University (慶應義塾大学腎臓内分泌代謝内科)

表1 メタボリックシンドロームおよび慢性腎臓病

①メタボリックシンドロームの診断基準		③慢性腎臓病 (CKD) の重症度分類	
1) 腹腔内脂肪蓄積	ウェスト 男性 $\geq 85$ cm 周囲径 女性 $\geq 90$ cm	ステージ	重症度の説明
内臓脂肪面積	男女とも $\geq 100$ cm <sup>2</sup> に相当	0	リスクの増大 (CKDには至っていない)
上記(1)に加え以下(2)~(4)のいずれか2項目以上(男女とも)		1	腎障害 (+) GFRは正常または亢進
高トリグリセリド血症	TG $\geq 150$ mg/dL	2	腎障害
2) かつ/または		3	腎障害
低HDL-コレステロール血症	HDL-C $< 40$ mg/dL	4	腎障害
収縮期血圧	$\geq 130$ mmHg	5	腎不全
3) かつ/または		5D	透析期
拡張期血圧	$\geq 85$ mmHg		
4) 空腹時高血糖	$\geq 110$ mg/dL		
②慢性腎臓病 (CKD) の定義			
以下の(1)か(2)のどちらかを満足する場合			
1) 腎障害 (kidney damage) が3カ月以上継続する			
一腎障害とは腎臓の形態的または機能的な異常を指し、GFR低下の有無を問わない			
一腎障害の診断は、			
・病理学的診断または			
・腎障害マーカーによって行う (このマーカーとしては血液または尿検査、または画像診断がある)			
2) GFR $< 60$ mL/分/1.73 m <sup>2</sup> が3カ月以上継続する。この場合腎障害の有無を問わない			
			eGFR (換算GFR) 値 (mL/分/1.73 m <sup>2</sup> )
			CKD危険因子が存在する (糖尿病, 高血圧など) ( $\geq 90$ )
			$\geq 90$
			GFR 軽度低下 60~89
			GFR 中等度低下 30~59
			GFR 高度低下 15~29
			$< 15$
			透析

においても非常に多く、'05年の推計でMSは予備軍も含め1,960万人、CKDはeGFR (換算GFR) が60 mL/分未満のステージ3以上で2,137万人と報告されている。日本人の3人に1人がCVDで死亡することを考えると、MS、CKDの病態解明、治療戦略の確立は基礎、臨床医学の両面において最重要の課題である。本稿ではMS、CKD 2つの疾患の基盤病態につき述べるとともにわれわれの提唱する新たな疾患概念「腎性インスリン抵抗性症候群 (Renal Insulin Resistant syndrome: RIRs)」(概念図) につき説明する。

## 背景1—メタボリックドミノ

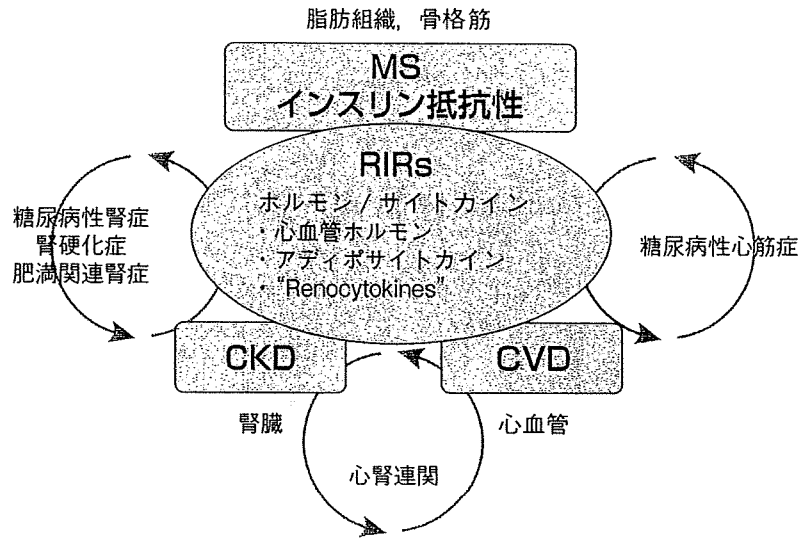
われわれは、MSが内臓肥満より発症し、心筋梗塞、脳卒中といったCVDへ至る過程を一連の流れとして捉えた「メタボリックドミノ」の概念を提唱し、MSを単なるリスクと捉えるのみでは不十分であり、予後を見据えた治療戦略の構築と病因解明の重要性を強調している (図1)。この概念はMSにおいてはリスクファクターの重積、流れ、連鎖がCVD発症において重要であることを示している。特に注目すべき点はメタボリッ

クドミノの進展とともにCKDの発症、進展も認められることである (図1)。古くより肥満そのものが腎機能障害の原因となることが指摘されており、肥満関連腎症といわれているが、井関らはBMIと末期腎不全の発症について100,000人の日本人の集団につき17年間観察を続けた結果、BMIが増加するにつれて末期腎不全に移行するリスクが男性において高くなることを示している<sup>2)</sup>。10,096名の非糖尿病患者からなるARIC研究 (Atherosclerosis Risk In Communities Study) においては、9年の観察期間でMSの存在 (NCEP-ATP IIIの定義による) でCKD発症 (eGFRが60 mL/分未満) のリスクが1.43倍と報告されている<sup>3)</sup>。

## 背景2—心腎連関とRIRs

CKDがCVDのリスクになるという事実は1998年ごろより指摘されるようになった。NKFは、透析患者のCVDによる死亡が正常者の10~30倍高いことを報告している<sup>1)</sup>。Goらは100万人のコホートをを用い2.8年の観察でCVDイベントハザード比がeGFRが45~59 mL/分以下で1.4倍、30~44で2.0倍、15~29で2.8

●概念図● CKD, MS, CVD と RIRs



倍, 15以下で3.4倍となると報告した<sup>4)</sup>。わが国においても久山町研究において同様の関連が示されている。

このCKDにより動脈硬化をはじめ, 冠動脈疾患, 心不全といった心血管疾患が引き起こされる現象は「心腎連関」とよばれている。われわれは心腎連関を引き起こすCKDの基盤病態としてRIRsに注目している。RIRsとはCKDでは早期においてもすでにインスリン抵抗性が認められるという病態である。BeckerらはCKDのステージ1の段階でもHOMA指数で算出したインスリン抵抗状態がすでに上昇していることを報告している<sup>5)</sup>。われわれもCKD患者200名を用いた検討において同様な結果を得ている。RIRsの発症機序として活性型ビタミンDの欠乏, 腎性貧血, 尿毒素物質, TNF $\alpha$ , IL-6, レプチンといったサイトカインの上昇などが報告されているが詳細は不明である。

RIRsの臨床的意義については, インスリン抵抗性が高インスリン血症を介しCVDを引き起こすこと, すなわち心腎連関の原因となる可能性があげられる<sup>6)</sup>。さらにインスリン抵抗性はそれ自身がCKDのリスクになることも指摘される。インスリン抵抗性に伴う高インスリン血症が腎臓においてレニン・アンジオテンシン系(RAS)を活性化させることやインスリン抵抗性が

腎臓内の微小炎症を引き起こすことなどがその原因と考えられる。メタボリックドミノの観点からはMSの下流でCKDが発症するとRIRsを介しCVDの発症が加速化することが推測される。メタボリックドミノの加速因子としてのRIRsの重要性が指摘できる。

## MSおよびCKDの基盤病態

### ① RASの亢進

これまで説明したインスリン抵抗性をはじめ, MSおよびCKDには共通の病態基盤が存在する。この病態の解明は両疾患およびCVD発症予防の治療戦略上重要である。その1つが前記のRASの亢進である。多くの疫学データによりRASの抑制がCKDの進行を抑制することを示す(RENAAL試験)とともに, RASの抑制が糖尿病の新規発症を抑制すること(VALUE試験サブ解析), 高血圧の発症を抑制すること(TROPHY試験)が示され, RASの亢進がMSの病態にも早期より関与することが示唆されている。

われわれは自然発症高血圧ラット(SHR)を用い, 高血圧発症前のCritical PeriodでのRASの抑制により, その後の高血圧の発症が予防されることを報告し, 高血圧発症におけるRAS活性化の意義と血圧上昇に対

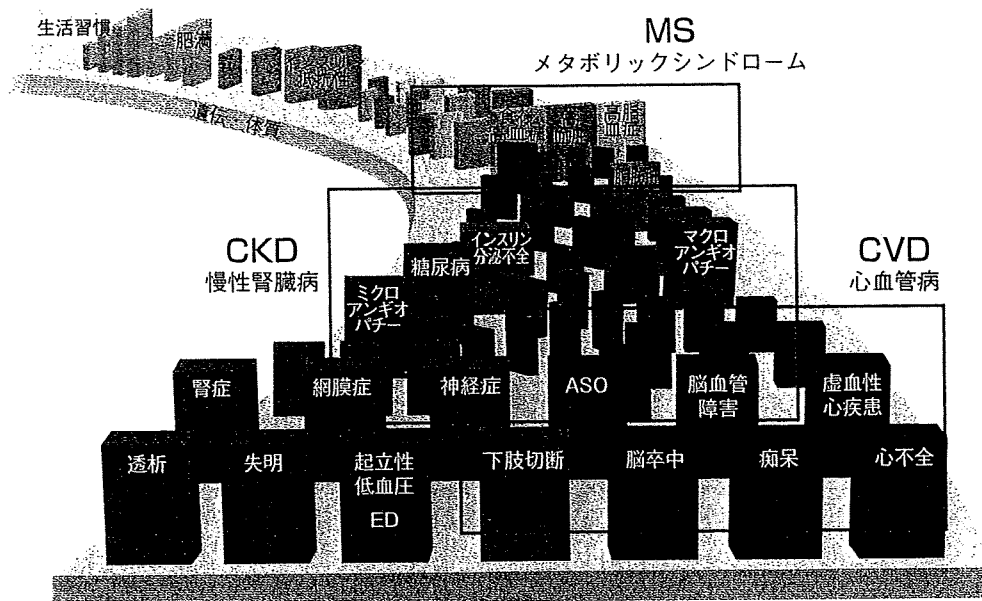


図1 メタボリックドミノ

する早期介入の重要性を指摘した(図2)<sup>7)</sup>。さらにわれわれは最近アンジオテンシンⅡが細胞のエネルギー代謝の主座であるミトコンドリアの機能を低下させることを報告した(図3)<sup>8)</sup>。RASの活性化によるミトコンドリア機能低下はエネルギー代謝異常の原因となり、インスリン抵抗性、糖尿病発症に関与すると考えられる。CKDにおけるRASの活性化はRIRsの原因となる重要な病態であると推測される。興味深いことにわれわれの検討では、CKDで高アルドステロン血症が認められ、血中アルドステロン値はCKDにおいてインスリン抵抗性の独立した規定因子であることが明らかとなった。

## ② Rho/Rho キナーゼ経路の活性化

さらにMS、CKDの共通の細胞内シグナル経路としてわれわれは高血圧発症に重要なRho/Rhoキナーゼ経路に注目している<sup>9)</sup>。日本のMSは欧米の糖尿病優位なタイプと異なり、高血圧合併の頻度が高い。このことは高血圧発症にかかわる因子がメタボリックドミノの上流に位置しうる可能性を示している。前述のRAS活性化はその代表であるが、RASにより活性化する低分子Gタンパク質Rhoおよびその下流の機能タンパク質であるRhoキナーゼは血管のカルシウム感受性制御に基づく収縮弛緩の調節のみならず、さまざまな細胞

機能にかかわり、種々の病態においてこの系の活性の異常が報告されている。

われわれはRhoキナーゼの活性化が高血圧に伴うCKDの発症進展に関与する<sup>10)</sup>のみならずインスリン抵抗性の発症に深くかかわることを報告した。さらに、インスリン抵抗性改善薬として臨床応用されているPPAR $\gamma$ リガンドの作用の一部はRho/Rhoキナーゼ経路の阻害に関与することを報告した<sup>11)</sup>。またRhoキナーゼ阻害薬が肥満ラットの体重増加を抑制し、インスリン抵抗性を改善することも報告した(図4)<sup>12)</sup>。すなわち肥満ラットであるObese-ZuckerラットにRhoキナーゼ阻害薬を長期間投与すると、脂肪組織における脂肪細胞のサイズが減少すること、脂肪組織(精巣上体脂肪および腸間膜脂肪)の重量が低下すること、脂肪組織におけるインスリン抵抗性を惹起するアディポサイトカインであるTNF $\alpha$ の発現が低下することを明らかにした<sup>12)</sup>。

これまでMS、CKDの共通の基盤病態として臓器内(脂肪組織および腎組織)の微小炎症、それに伴う酸化ストレスの亢進、交感神経系の亢進などが指摘されているが、インスリン抵抗性、RAS活性化、Rho/Rhoキナーゼ経路の活性化の関与が考えられる。

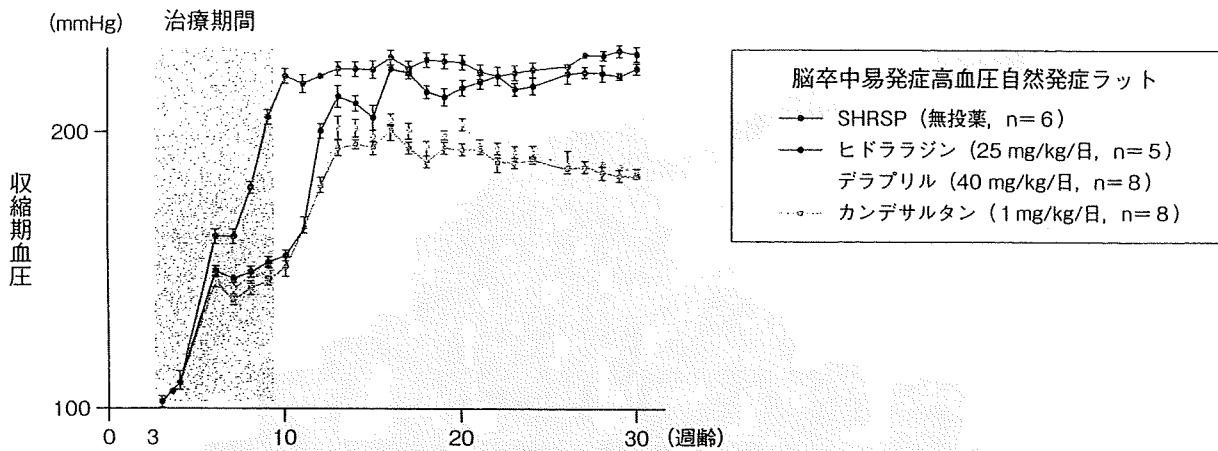


図2 高血圧発症前におけるRASの抑制による高血圧の発症予防  
16週以降においてデラプリル群、カンデサルタン群は他の2群に比べて有意に低下 ( $p < 0.01$ ). mean±SEM (文献7より引用)

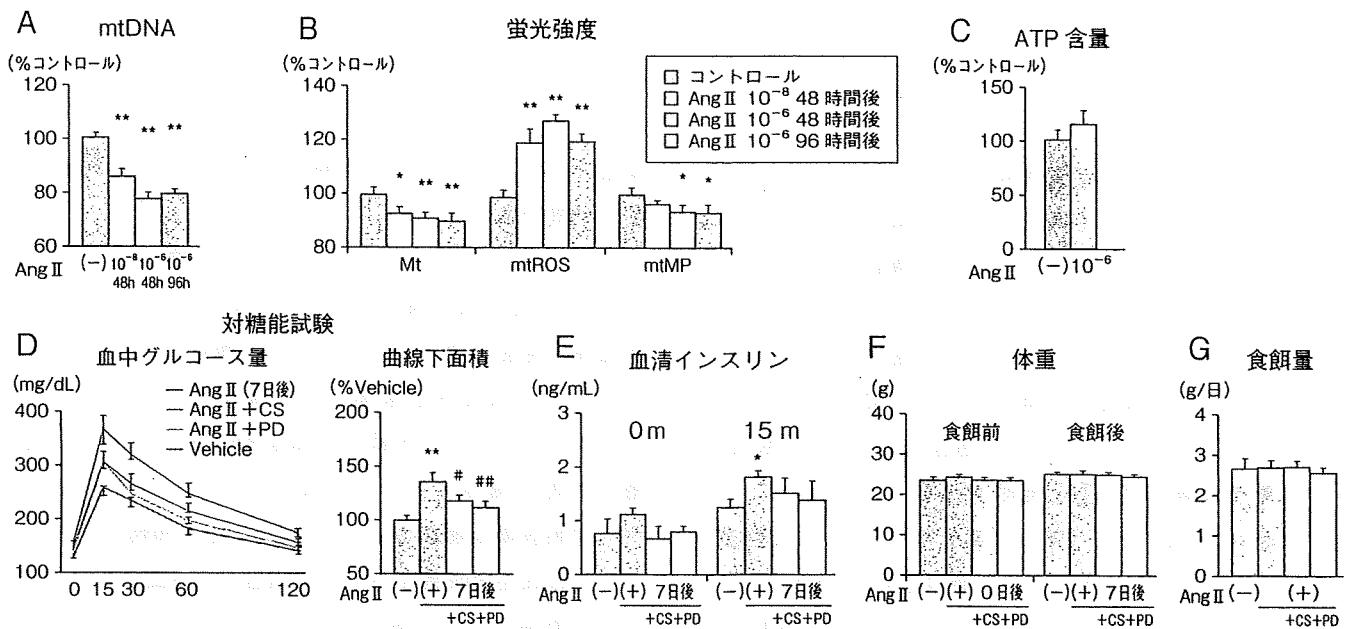


図3 アンジオテンシンIIのミトコンドリア生合成、糖代謝に対する影響  
筋肉細胞 (C2C12細胞) においてアンジオテンシンII (Ang II) はミトコンドリアの数を減少させ (A), ミトコンドリア由来の活性酸素 (mtROS) の産生 (B) を上昇させた。マウスに対するアンジオテンシンII持続注入により、糖代謝異常 (D), インスリン抵抗性 (E) が引き起こされた。体重 (F), 食餌量 (G) は変化なかった。CS, PDはAng II受容体拮抗薬 (文献8より引用)

## 臨床応用・治療の現状と課題

メタボリックドミノが発しているメッセージの1つが治療戦略の明確化である。メタボリックドミノに示されるようにMSの最上流は内臓肥満であると考えられている。これまで単なるリスクの集積 (マルチプルリスクファクター症候群) として捉えられていた耐糖

能異常、高血圧症、高脂血症の根幹に内臓脂肪の量的、質的異常が存在し、最初のドミノとして存在している。このため、メタボリックドミノの流れをつくる病態に対する治療が今後心血管事故予防の中心となっていくと思われる。CKDにおいてもRIRsをはじめとする基盤病態に対する早期介入が重要である。インスリン抵抗性改善薬、RAS阻害薬の早期介入、Rho/Rhoキナー

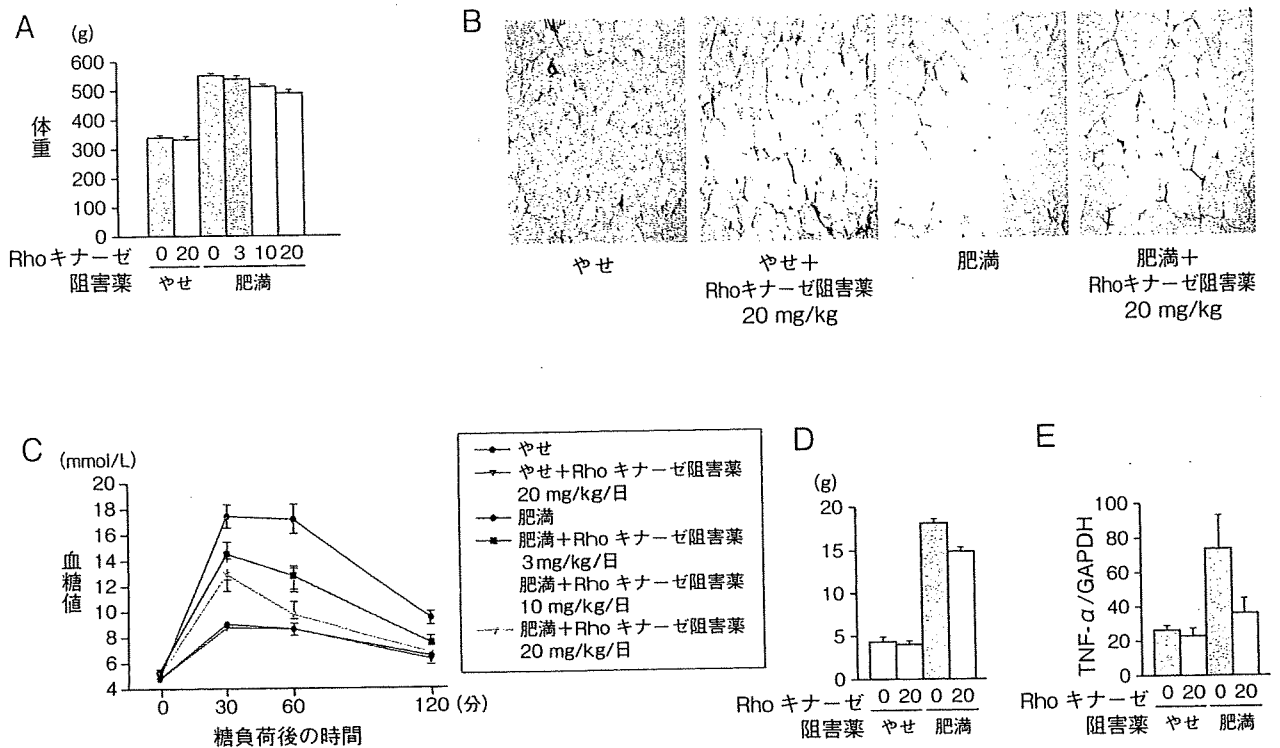


図4 Rhoキナーゼ阻害薬の肥満に対する効果

A) 肥満ラットの体重増加に対するRhoキナーゼ阻害薬の効果, B) 脂肪組織に対するRhoキナーゼ阻害薬の効果, C) Rhoキナーゼ阻害薬の糖代謝に対する効果 (OGTTでの検討), D) 精巢上体脂肪重量, E) TNF $\alpha$ 発現 (A, C~Eは文献12より引用, Bは文献12より転載)

ゼ経路阻害薬の臨床応用がMS, CKD 2大疾患の発症, 進展阻止の治療戦略として期待される。

その一方でMS, CKDの病態の差異についても注意が必要である。近年疫学的にRE (Reverse Epidemiology) の概念が提唱されている。REはCKDステージ5Dの維持血液透析患者において提唱され, 維持血液透析患者においては健常人 (general population) と心血管リスクファクターが逆の結果を示すというものである<sup>13)</sup>。たとえば血圧は低いほど一般健常人やMSの患者においてはCVD発症は低くなるが, 維持血液透析患者では血圧が低いほど死亡率が高い。また, 肥満においてもBMIが高いほど心血管事故が多いはずであるが, 維持血液透析患者においてはBMIが高いほど生存率が高い<sup>14)</sup>。ステージ3~5のCKDにおいてもREが認められるという報告もある<sup>14)</sup>。CKD, 特にメタボリックドミノの下流ではMSや健常人と違う強いリスクファクター, 病態の存在が示唆され, その同定と治療戦略の確立も今後重要となってくると思われる。

## 遺伝子・分子レベルの知見と課題 —アディポサイトカインと心腎関連因子

MSからCVDへの流れであるメタボリックドミノ, CKDからCVDへのつながりを示す心腎関連において, それを仲介するさまざまなメディエーターが報告されている。MSでは脂肪組織より分泌されるアディポサイトカインであり, CKDでは腎不全により生じる尿毒症に関連する因子, Uremia-related risk factorである。Uremia-related risk factorは心腎関連因子とも捉えられる。現在まで多くの因子がアディポサイトカインおよび心腎関連因子として報告されている (表2, 表3)<sup>15)</sup>。

われわれはMSとCKDに共通のメディエーターとして内因性の一酸化窒素合成酵素 (NOS) の阻害物質ADMA (asymmetric dimethylarginine) に注目している。ADMAは翻訳後修飾でメチル化されたタンパク質の分解の際に生成される物質で, アルギニンのメチ

表2 アディポサイトカイン

アディポサイトカイン	機能
LPL : lipoprotein lipase	脂質代謝
HSL : hormone-sensitive lipase	脂質代謝
Perilipin	脂質代謝
aP2 : adipocyte lipid binding protein	脂質代謝
CETP : Cholesterylester-transfer protein	脂質代謝
RBP : retinol-binding protein	脂質代謝
IL-6 : interleukine-6	向炎症, 動脈硬化, インスリン抵抗性
TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$	向炎症, 動脈硬化, インスリン抵抗性
ASP : acylation stimulating protein	免疫ストレスに対する反応
Metallothionein	免疫ストレスに対する反応
Angiotensinogen	血管作用, 高血圧
PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1	血管作用, 凝固反応
Adiponectin	炎症惹起, 動脈硬化, インスリン抵抗性
CRP : C-reactive protein	向炎症, 動脈硬化, インスリン抵抗性
IGF-1 : insulin-like growth factor	脂質代謝, インスリン抵抗性
TGF- $\beta$ : transforming growth factor-beta	細胞接着, 細胞遊走, 細胞増殖, 細胞分化
Monobutyrin	微小血管拡張
Uncoupling proteins	エネルギー代謝, 熱産生
Leptin	摂食抑制, 繁殖, 血管新生, 免疫機能, インスリン抵抗性
Resistin	抗炎症, インスリン抵抗性
Apelin	血管作用, インスリン抵抗性
Visfatin	インスリン抵抗性

表3 心腎連関因子

機能	リスクファクターもしくはマーカー
炎症	IL-6, IL-18, S-albumin, WBC (white blood cell count), fibrinogen, hyaluronan, MPO (myeloperoxidase), CRP, PTX3 (pentraxin-3)
酸化ストレス	MPO, plasmalogens, oxidized-LDL, AOPP (advanced oxidation protein products)
内皮障害	PTX3, ADMA (asymmetric dimethylarginine), tHcys (homocystine), U-alb (urinary albumin excretion), VCAM (vascular cell adhesion molecule)
タンパク質・エネルギー栄養障害	S-albumin, S-creatinine, prealbumin,
交感神経活性化	Norepinephrine
凝固・線溶異常	Fibrinogen
インスリン抵抗性	HOMA (homestasis model assessment)
血管石灰化	PO4, Ca, PTH, fetuin-A, OPG (osteoprotegerin), OPN (osteopontin)
尿毒素	S-creatinine, P-cresol
体液過剰	NT-pro-BNP (N-terminal pro-brain natriuretic peptide), troponin-T
潜在性甲状腺機能低下症	fT3 (free triiodothyronine), T3
アディポサイトカイン	Leptin, visfatin, adiponectin
貧血	Hemoglobin

文献15より改変

ル化分子である(図5)。ADMAはアルギニンより一酸化窒素(NO)を合成する酵素であるNO合成酵素(NOS)の阻害物質として働く。CKD, 糖尿病, 高血圧といった病態においてADMAの血中レベルが上昇し, その血管障害に関与することが報告されている。

ADMAは生体内でDDAH (dimethylarginine dim-

ethylaminohydrolase) 1およびDDAH2により代謝, 分解される。われわれは腎不全モデル動物において心臓の冠状動脈における内皮依存性の血管拡張反応が低下していること, そしてその低下に血中ADMAレベルの上昇が相関することを証明した<sup>16)</sup>。そしてADMAの上昇にはCKDの状態での血管におけるDDAH2の発



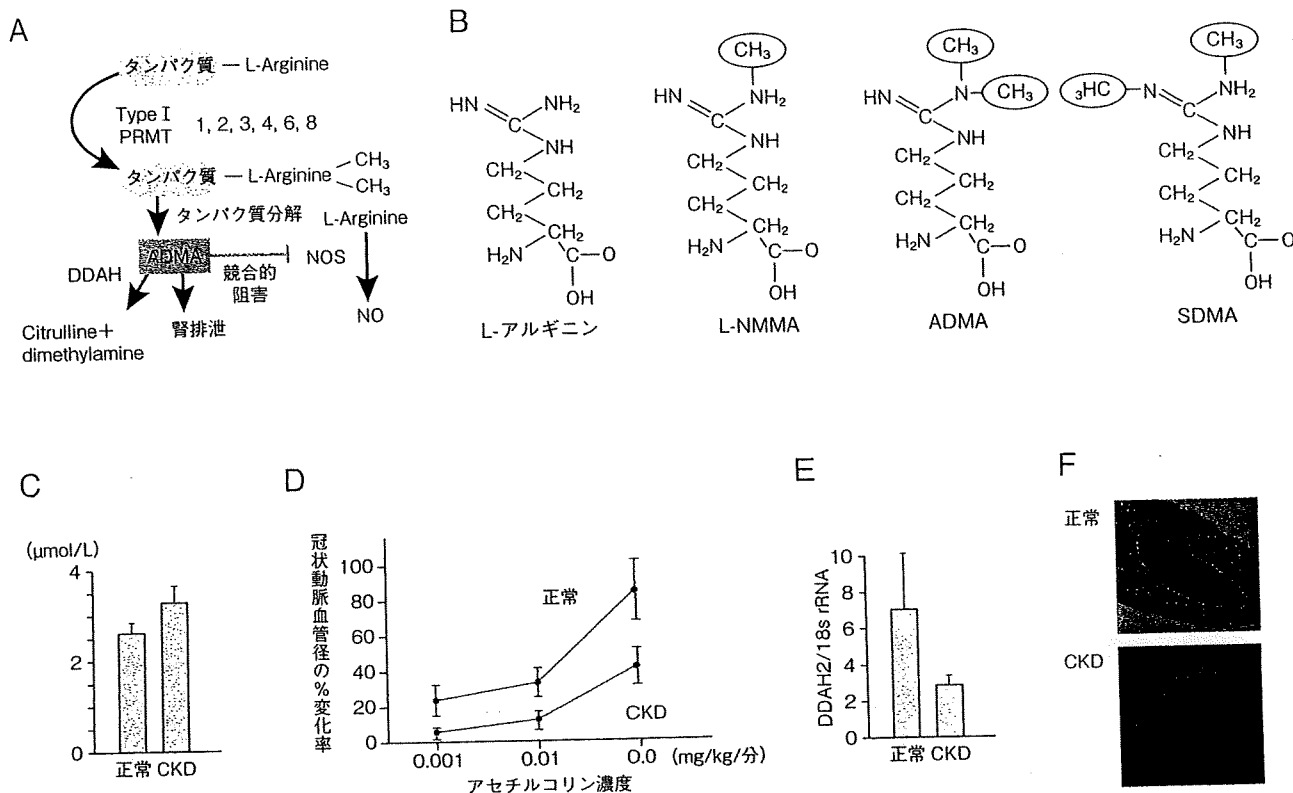


図5 ADMAの代謝経路，構造とCKDにおけるADMAの意義  
 A) ADMAの代謝経路，B) ADMAの構造とさまざまなメチルアルギニン化合物，C) CKDモデル犬（5/6腎摘モデル）におけるADMAの血中濃度，D) アセチルコリン投与後の冠血管拡張反応（CKDモデル犬での検討），E) DDAH2の冠状動脈におけるmRNA発現，F) DDAH2の冠状動脈における発現（蛍光免疫染色）。PRMT：protein arginine N-methyltransferase，DDAH：dimethylarginine dimethylaminohydrolase，ADMA：asymmetric dimethylarginine（内因性NOS阻害物質）（A～Eは文献16より改変，Fは文献16より転載）

現レベルの低下がかかわることを証明した（図5）。逆にCKDで低下するDDAH2の過剰発現マウスではアンジオテンシンIIによる心血管線維化が抑制された<sup>17)</sup>。

さらにADMAがインスリン抵抗性に関与する可能性を示唆するデータも報告されている。インスリン抵抗性を有する肥満者にインスリン抵抗性改善薬であるロシグリタゾン投与したところ，インスリン抵抗性が改善されたのみならず，血中ADMAレベルが低下することが報告された。われわれはその機序を検討し，インスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾンがDDAH2の腎臓での発現を誘導し，ADMAを低下させることを報告した<sup>18)</sup>。またDDAH2過剰発現マウスにおける，インスリン抵抗性について現在検討中である。

CKDでADMAが上昇する機序としてADMAの合成にかかわる酵素であるPRMT（protein arginine N-methyltransferase）の腎臓での発現の亢進，腎臓に

おけるメチル化反応の亢進も報告されており，CKDでのエピジェネティクス異常が考えられる。エピジェネティクスはDNAやヒストンタンパク質のメチル化，アセチル化，リン酸化，ユビキチン化といった分子修飾により遺伝子発現あるいはタンパク質機能が変化する現象である。CKDにおいてはメチル化反応阻害物質であるS-adenosylmethionineの蓄積が認められ，DNAのメチル化，修復機構に異常があることが考えられている<sup>15)</sup>。このようなエピジェネティクス異常に伴う心腎連関因子の変化もメタボリックドミノ，心腎連関の病態の理解において今後重要なテーマになると考えられる。

## 今後の展望

MSとCKDそしてCVDの共通の病態として心血管ホルモン（例えばRAS，NO，Na利尿ホルモン），アディポサイトカインなどの液性因子の異常が存在し，

RIRsで認められるインスリン抵抗性が惹起される(概念図)。今後の展望の1つはその基盤病態のさらなる解明である。MS, CKDの基盤病態としてRIRsやRASの活性がいつ異常をきたすのか, またそれらのさらに上流にあるものは何かの解明は未だ十分とはいえない。

次にMS, CKDとCVDをつなぐ新たなメディエーターの同定である。CKDにおいてはREで解説したようにCKD固有の因子を探索する必要があると思われる。ここで心腎関連因子を考える際の新しい視点として腎臓が内分泌臓器であるという点を指摘したい。腎尿細管あるいは間質細胞は糖, 脂質代謝の盛んな細胞でありインスリンの標的ともなる。全身の代謝の変化に反応して, 内分泌因子を産生, 分泌し尿細管周囲の血管(peritubular capillary vessels)を介し局所のみならず全身に影響を与えうる。古典的にはエリスロポイエチン, Ca代謝ホルモンである活性型ビタミンDが知られている。この考えはCKDの進行により産生分泌が変化する“renocytokine”の存在を想定するもので, MSにおけるアディポサイトカインに相当する。“renocytokine”がRIRsのメディエーターとなっている可能性も考えられる。

MSおよびCKDの研究はその罹患数の多さ, 死亡率の高さを考えると多くの患者を救う可能性があり, 基礎, 臨床が連携し解明すべき重要な研究課題であると思われる。

文献

- 1) Levey, A. S. et al. : Am. J. Kidney Dis., 32 : 853-906, 1998
- 2) Iseki, K. et al. : Kidney Int., 65 : 1870-1876, 2004
- 3) Kurella, M. et al. : J. Am. Soc. Nephrol., 16 : 2134-2140, 2005
- 4) Go, A. S. et al. : N. Engl. J. Med., 23 : 1296-1305, 2004
- 5) Becker, B. et al. : J. Am. Soc. Nephrol., 16 : 1091-1098, 2005
- 6) El-Atat, F. A. et al. : J. Am. Soc. Nephrol., 15 : 2816-2827, 2004
- 7) Nakaya, H. et al. : J. Am. Soc. Nephrol., 12 : 659-666, 2001
- 8) Mitsuishi, M. et al. : Diabetes, 58 : 710-717, 2009
- 9) Uehata, M. et al. : Nature, 389 : 990-994, 1997
- 10) Kanda, T. et al. : Kidney Int., 64 : 2009-2019, 2003
- 11) Wakino, S. et al. : Circ. Res., 95 : e45-e55, 2004
- 12) Kanda, T. et al. : FASEB J., 20 : 169-171, 2006
- 13) Guize, L. et al. : Arch. Cardiovas. Dis., 101 : 577-583, 2008
- 14) Kovesdy, C. P. et al. : Semin. Dial., 20 : 566-569, 2007
- 15) Stenvinkel, P. et al. : Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 3 : 505-521, 2008
- 16) Tatematsu, S. et al. : J. Am. Soc. Nephrol., 18 : 741-749, 2007
- 17) Hasegawa, K. et al. : Circ. Res., 101 : e2-e10, 2007
- 18) Wakino, S. et al. : Hypertens. Res., 28 : 255-262, 2005

■筆頭著者プロフィール

脇野 修: 1990年, 慶應義塾大学医学部卒業。医学博士。'98年よりUCLA, Division of Endocrinology, Diabetes and Hypertensionへ留学, 2007年より慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科講師, 慢性腎臓病, メタボリックシンドロームの病態解明, 新規治療法の開発をめざしている。

学会などでも注目の概念が基礎からわかる!

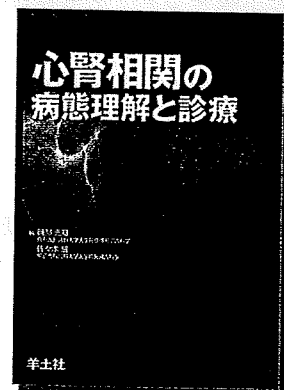
発行 羊土社

# 心腎相関の病態理解と診療

編/磯部 光章(東京医科歯科大学大学院循環制御内科学)  
佐々木 成(東京医科歯科大学大学院腎臓内科学)

心疾患・腎疾患を, 新しい視点から統合的に治療する!

- ✦各領域の第一人者が, 臨床試験や経験に基づく知識と戦略を詳しく解説
- ✦高血圧・慢性腎臓病(CKD)・メタボリックシンドローム・糖尿病など, 生活習慣病の診療にも活かせる内容
- ✦専門医はもちろん, 一般医家や若手医師にも最適の書



■ 定価(本体5,800円+税)  
■ B5判 ■ 292頁  
■ ISBN978-4-7581-0642-9

# Medical Practice

2009 vol.26 no.10

腎疾患の实地臨床へのアプローチ

その3

实地医家のための最新の腎臓病学

## CKDの病態と医療連携のすすめかた

末期腎不全の治療方針と医療連携を含む

脇野 修・伊藤 裕

東京 文光堂 本郷

## 腎疾患の実地臨床へのアプローチ

### その3

## 実地医家のための最新の腎臓病学

# CKDの病態と医療連携のすすめかた

## 末期腎不全の治療方針と医療連携を含む

脇野 修・伊藤 裕

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科/わきの・しゅう いたう・ひろし

### はじめに

近年新たな心血管事故のリスクとして腎機能障害の存在が注目されてきている。腎機能の低下はそれが早期の段階であっても(例えば微量アルブミンの段階),すでに心血管障害(CVD)のリスクとなっていることが多くの疫学データで証明されるようになってきた。その中で腎機能の評価,主としてGFR値に関して見直しがなされ,慢性腎臓病 chronic kidney disease (CKD)の概念がNational Kidney Foundation (NKF)より提唱された。そしてGFR値および尿蛋白でCKDをステージ分類し,重症度を評価することが推奨されCKDの各ステージごとに治療の目的,生活習慣改善などの方針が示されている。本稿では各ステージでの治療方針をまず述べたあと,特に一般開業医,実地医家が診療することの多い生活習慣病,メタボリックシンドローム(Mets),糖尿病,高血圧,脂質異常症とCKDの関連について腎臓内科医,糖尿病専門医への連携のポイントなどを述べたいと思う。最後に末期腎不全の治療方針と医療連携について述べたいと思う。

### CKD各ステージでの診療計画<sup>1)</sup>

まず腎機能正常( $GFR \geq 90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ )かつ検尿などに異常を認めない全く正常な状態であるがCKDのリスクファクター(表1)を有する場合は定期的な尿検査を実施し,尿検査異常を見逃

さないようにする。次に腎機能正常( $GFR \geq 90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ , ステージ1)または軽度低下( $90 > GFR \geq 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ , ステージ2)で,GFRではCKDの定義は満たさないが蛋白尿や形態上腎障害を伴うCKDである。この場合は腎生検の適応になる狭義の腎疾患(糸球体腎炎,間質性腎炎,血管炎,膠原病などによる腎障害)によるCKDとそれ以外の主として生活習慣病や加齢に伴うCKDとを鑑別する。前者は早急に腎臓専門医に紹介して診断を確定し,治療を開始しなければならない。特に日本人に多いといわれているIgA腎症においては早期における扁桃+ステロイドパルス療法がその後の予後を改善させる可能性が指摘されており早期の診断が重要である。後者では検尿異常が持続しても直ちに腎生検の適応とはならず,かかりつけ医を中心に経過観察を継続させる。生活習慣病に対する介入を行いつつ腎機能保持,CVDのリスク軽減を目指した治療を進める。次に腎機能中等度低下( $60 > GFR \geq 30 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ , ステージ3)では末期腎不全への進行速度およびCVDのリスクが有意に高まることを留意し腎臓専門医に紹介し,連携して診療にあたる。腎機能高度低下( $30 > GFR \geq 15 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ , ステージ4)ではCKD特有の合併症(貧血,二次性副甲状腺機能亢進症,アシドーシス,高カリウム血症)が顕著になり,腎移植,腹膜透析,血液透析の準備も必要であり腎臓専門医に管理を委ねる。この時期は腎障害をきたす可