

201316005A

厚生労働科学研究費補助金

**難治性疾患等克服研究事業
(腎疾患対策研究事業)**

新規消化管ペプチドグレリンによる
慢性腎臓病新規治療戦略の確立

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 裕

平成26(2014)年5月

厚生労働科学研究費補助金

**難治性疾患等克服研究事業
(腎疾患対策研究事業)**

**新規消化管ペプチドグレリンによる
慢性腎臓病新規治療戦略の確立**

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 裕

平成26(2014)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

グレリンの腎保護作用を腎不全患者への応用

-----7

伊藤裕 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

II. 分担研究報告

1. グレリンの腎保護作用に関する研究

----- 17

徳山博文 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

脇野 修 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

2. 臨床試験「新規消化管ペプチドグレリンによる慢性腎臓病患者に対する投与」

-----33

中谷英章 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

脇野 修 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

3. グレリンの糖尿病性腎症に対する保護効果

-----39

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 脇野 修

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 47

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 51

I. 総括研究報告書

グレリンの腎保護作用を腎不全患者への応用

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 伊藤 裕

研究要旨 慢性腎臓病（CKD）でのエネルギー消耗性の病態である protein-energy wasting syndrome（PEW）の改善によりCKD患者の腎予後の改善を目指すのが本研究の目的である。申請者はこれまでPEWの原因となるインスリン抵抗性の研究を進め腎性インスリン抵抗性症候群（RIRs）の概念を提唱した。PEWでの全身の酸化ストレスの亢進の改善について、共同研究者が発見した(Nature 1999)消化管ペプチドであるグレリンに注目した。申請者はグレリンの慢性投与が腎臓の酸化ストレスレベルを低下させ慢性の腎障害を抑制すること、グレリン受容体欠損マウスでの解析で内因性のグレリンが腎臓の酸化ストレスレベルの調節に重要であることが明らかとしている（別添図4）。さらにグレリン臨床試験の実現のためのシステムづくりとプロトコール作成を行った。国内ですでにグレリンの臨床研究を施行している宮崎大学よりの情報を参考に独自の倫理審査（別添表1）および臨床試験プロトコールを作製した。グレリンは（株）ペプチド研究所から購入し、そして慶應義塾大学病院内に製剤化するシステムを薬剤部の協力のもと構築した（別添図5）。さらに投与量に関しては京都大学医学部探索医療センター・グレリン創薬プロジェクトにおいて、低容量投与群として1 μg/kg体重を、高容量投与群として5 μg/kg体重を投与していることより、腎機能との関連で3μg/kg体重を投与することとした。平成24年度には倫理委員会承諾ののち臨床試験を開始したい。まず10症例程度で安全性と有効性を確認する。基礎的検討ではグレリンの作用の標的であるミトコンドリアに注目し、その形態異常、機能異常をグレリン受容体欠損マウスを用い検討する。さらに糖尿病性腎症マウスを用い、グレリンの治療効果を検討した。本研究ではグレリン補充というCKDに対する新しい治療法の開発を推進する臨床に直結した研究プロジェクトである。しかも本研究の共同研究者の寒川らが発見した生理活性ペプチドを用いたtranslational researchでありわが国発の世界に誇る研究である。

A. 研究目的

平成 24 年度には倫理委員会承諾ののち臨床試験を開始したい。平成 25 年度は 10 症例程度で安全性と有効性を確認している。基礎的研究ではグレリンのミトコンドリア

を標的とした抗酸化作用の本態を明らかにする。グレリン受容体欠損マウスにおけるミトコンドリア形態、培養尿細管細胞を用いたミトコンドリアの融合、分裂の検討をおこなう。

B. 研究方法

Ghrelin の抗加齢抗老化のメカニズムを Ghrelin receptor の発現が証明されている in vivo(尿細管細胞株を用いた系)でも検討した。更に内因性 Ghrelin の AII 依存性腎障害抑制効果について Growth Hormone secretagogue receptor ノックアウトマウスを用いて検討した。

レプチン受容体異常により 2 型糖尿病様の状態となる db/db マウスと、コントロールとしての BKS.Cg-m+/+マウス(m/m マウス)を、7 週齢から 15 週齢にわたり、Ghr 群には Ghr を 100 μ g/kg/day を、生理食塩水群には同量の生理食塩水を連日腹腔注射し、4 群で糖尿病性腎症における Ghr の効果を検討した。さらに in vitro(ヒト尿細管細胞株)では、Ghr のミトコンドリアへの作用を Ghr 受容体の発現が証明されている尿細管の細胞株である Human kidney-2 細胞(HK-2 細胞)でも検討した。

ヒトへの応用に関しては CKD 患者に対するグレリン投与の効果を検討する。パイロット study としてグレリン投与群 10 名に対し、単群での薬剤投与による有効性と安全性の確認のための介入試験を施行する。

(別添表 2)

対象および実施場所、実施期間：年齢 20 歳以上の慢性腎臓病ステージ G4 および G5 の患者 (eGFR<30ml/min/1.73m²) で、透析導入されていない当院外来患者のうち、BMI 25 未満で除外基準に該当せず、本研究協力に同意した者で「患者説明文書」を用いて研究の主旨を説明し、「研究協力の同意書」に署名にて同意を取得する。実施期間は倫理委員会承認後より 7 カ月間で慶應

義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科 外来および病棟で行う。外来での対象患者のリクルートおよび説明は脇野、徳山で行い、病棟での投与の実際は脇野、徳山、中谷で行う。

投与方法：入院の上 10 日間連日朝食前と夕食前にグレリン 3 μ g/kg 体重に調製した注射液を生理食塩水に溶解し点滴静注する。有害事象がないことを確認の上、問題のない場合はその後外来にて 1 か月に 1 回グレリン 3 μ g/kg 体重に調製した注射液を生理食塩水に溶解し点滴静注する。(3 ヶ月間)。

投与薬剤：グレリンはヒト合成グレリンの原末(純度 90%以上、TFA 塩、GMP グレード)を(株)ペプチド研究所から購入する。慶應義塾大学病院薬剤部でその純度を確認し、必要な場合はさらに再精製の過程を加える。薬剤部にてこれを秤量し、3.75% マンニトール溶液に溶解後、フィルターにて加圧濾過して無菌化し、バイアル詰めにし、製剤化する。ロットが異なるごとに薬剤部にて純度の確認を、エンドトキシン試験、無菌試験などの安全性確認試験を外部委託により行う。その後異物検査に合格したものにラベルを貼付し、施錠できる冷凍庫で-20 $^{\circ}$ Cで凍結保存する。

検討項目

登録時の検査項目

1. 身体計測：身長、体重、腹囲、上腕三頭筋囲、上腕三頭筋皮下脂肪厚
2. 検査：血液検査(1 回当たり末梢静脈血 15ml)、尿検査(1 回当たり 10ml)
3. 生理機能検査、画像検査：心電図、胸部レントゲン、心エコー

エンドポイント

一次エンドポイントは安全性の検証である。

グレリン投与による副作用（腸管運動亢進、腹部違和感、下痢、顔面紅潮、不眠）の発現率とする。

C. 研究結果

臨床試験の前段階としてヒトへの投与の安全性に関する検討が施行された。入院の上、1回のみ朝食前にシリンジポンプを用いて30分かけて点滴静注する。有害事象の報告は現在まで認められない。

動物実験に関しては、内因性 Ghrelin の AII 依存性腎障害抑制効果について Growth Hormone secretagogue receptor ノックアウトマウスを用いて検討した。GHSR ノックアウトマウスについて、GHSR の遺伝子上流にトランスクリプションブロッキングカセットを組み込んである total の GHSR ノックアウトマウスを用い、genotyping を行った。更に RT-PCR でノックアウトの確認をした。

WT と WT に AII500ng/kg/min を投与したものの、GHSR ノックアウトマウス (KO) と GHSR ノックアウトマウス (KO) に AII 500ng/kg/min を投与したものの4群を比較した。まず収縮期血圧では WT 群と KO 群で比較し、KO 群で有意に血圧が上昇していたのを認めた。その変化は AII 投与群でも同様のことが確認された。尿蛋白、尿細管障害のマーカーである NGAL、NAG は WT 群と KO 群で比較し、KO 群で有意な増加を認めた。AII 投与に関してはその差ははっきりしなかった。

腎皮質領域の老化反応を引き起こす酸化ストレスを 4HNE 染色で検討すると、WT 群と比較し、KO 群が強く染色されていた。また SA-β-GAL 染色は 4HNE 染色と同様に

WT 群と比較し、KO 群が強く染色されていた。内因性 Ghr が抗老化、抗酸化作用をもつことが確認された。最後に MT 染色で腎線維化を検討したが、KO 群で有意に腎線維化が認められた。また腎臓の近位尿細管領域の電顕所見で、ミトコンドリアは酸化ストレスを受けると変形伸展拡大することが報告されているが、KO 群で有意にミトコンドリアの変形、伸展を認めた。さらにミトコンドリアの数は GHSR ノックアウト群で有意に低下していた。GHSR ノックアウトマウスは WT と比較して老化の促進、線維化の亢進、酸化ストレスの上昇、腎機能障害の増悪が認められた。

最後に、腎近位尿細管特異的 Ghrelin レセプター発現マウスを用いた検討を行った。Floxed-GHSR 1(Ghrelin receptor)null マウスと NDRG (n-myc downstream regulated gene 1) Cre マウスを交配させると transcriptional blocking cassette(TBC)の両端の loxP が外れ、これらにより下流の GHSR 遺伝子が転写される。よって、近位尿細管のみ GHSR が発現するマウスが作成出来、近位尿細管特異的な Ghrelin の作用の検討が可能なる。具体的な実験方法は F1 同士を掛けあわせて得られた 12 週の Floxed-GHSR 1null/NDRG Cre マウスに 5 日間 Tamoxifen 1mg/mouse/day で腹腔内連日投与を行った。タモキシフェン投与群とタモキシフェン非投与群とで表現型を比較した。まず GHSR のレセプターの免疫染色を行ったところ、GHSR ノックアウト NDRGCre マウスでは近位尿細管の GHSR の回復を確認した。次に 16 週のタモキシフェン非投与群とタモキシフェン投与群の表現型を比較したが収縮期血圧と体重には変化は認められなかつ

た。次に生化学所見である血清 BUN と Cr はタモキシフェン非投与群とタモキシフェン投与群の両者に有意差は認められなかったが、尿蛋白と尿細管マーカーである NAG はタモキシフェン非投与群と比較しタモキシフェン投与群で有意に減少していた。さらに腎組織の所見を検討したところ、酸化ストレスマーカーである 4HNE 染色では近位尿細管領域を中心にタモキシフェン非投与群と比較しタモキシフェン投与群が有意に酸化ストレスが低下していた。しかし腎線維化は明らかな有意差を認められなかった。このことより Mitochondria の多く局在する近位尿細管領域の GHSR が Ghrelin を介した抗酸化ストレス作用に重要な役割を担っていることが示唆された。

肥満型糖尿病性腎症のモデルマウスである db/db マウスを用いた検討も行った。摂食量に関して、m/m マウスに比して、db/db マウスにおいて摂食量を増加させたが、Ghr 投与による長期的な摂食量増加は見られなかった。

体重に関して、m/m マウスに比して、db/db マウスでは体重は増加した。m/m マウスにおいてはグレリン投与による体重変化は認めなかったが、db/db マウスではグレリン投与により体重増加を認めた。

慢性腎障害抑制効果に関して、投与 8 週後の尿タンパクは db/db マウスにおいて Ghr 投与による変化は認めなかった。尿アルブミンは m/m マウスに比して db/db マウスで増加したが、Ghr 投与による変化は認めなかった。また、血清 BUN、Cr には 4 群で差を認めなかった。

腎組織での realtimePCR では、ミトコンドリアダイナミクスの因子である DRP1、Mfn2

の発現に有意差は認めなかった。

in vitro(ヒト尿細管細胞株)のデータ
ミトコンドリアダイナミクスに関する代表的な因子である DRP1 および Mfn2 において、realtimePCR でも western blotting でも、有意差を認めなかった。

D. 考案

消化管ホルモンである Ghr は腎臓において、ミトコンドリアの UCP2 の誘導を介し A II による活性酸素レベル上昇を低下させたことが示唆された。UCP2 はミトコンドリアの inner membrane に存在し intermembrane space の H^+ を matrix 側へ leak させる脱共役蛋白でありその結果、膜の電位勾配は低下し、活性酸素(ROS)の産出が低下する。UCP2 はミトコンドリアにおいて $O_2^{\cdot-}$ の産出を抑制する分子であり、細胞内の $O_2^{\cdot-}$ 、ROS のほとんどはミトコンドリア由来であるから UCP2 による $O_2^{\cdot-}$ 産出低下は極めて有効な抗酸化作用を有すると考えられた。実際、血管内皮細胞では P38MAP キナーゼを介した UCP2 の上昇により A II により誘導させた活性酸素発生を抑制し、A II 投与による血管内皮細胞の障害を抑制させたことが報告されている。我々の A II 投与による腎障害モデルやヒト近位尿細管細胞株 (HK-2 細胞) でも UCP2 の上昇を認め、これらの代償機構を確認した。更に Ghr 投与により UCP2 の上昇が誘導され腎組織障害を抑制した。A II 投与群のマウスは NS 投与群のマウスの UCP2 よりも発現が上昇していた為 Ghr、それ自身が UCP2 発現を上昇させ、A II 投与群の UCP2 上昇とは独立して働いたものと考えられた。

A IIによって誘導された ROS は病理組織学的にも腎の炎症や線維化に重要な役割を担っている。我々の A II 投与による腎障害モデルにおいても A II は NADPH オキシダーゼの腎臓での主な isoform である NOX1、NOX4 の発現を上昇させた。いままでにも A II は NOX1、NOX4、p47phox、p67phox、p22phox 等の様々な NADPH オキシダーゼのサブユニットの上昇を誘導した報告がある。そして今回 Ghr は NOX1、NOX4、p22phox の発現を低下させた。すなわち Ghr の有する抗酸化作用と考えられた。また NOX の発現は還元反応によって生じていると考えられた。また今回の A II 投与による腎障害モデルで PGC1 α の発現低下とミトコンドリア数は減少していたが Ghr は強力な抗酸化作用によりこれらの低下を軽減させた。また Ghr 投与により A II 投与したマウスの血圧は低下を認めた。これは以前に分離した血管内皮細胞で血管拡張作用による直接的作用であると報告があり、これによるものと考えられた。さらに視床孤束核に Ghr を投与すると血圧低下をみとめることより交感神経に作用して血圧低下が生じた報告もある。これについては GHSR ノックアウトマウス (KO) は WT より血圧高値であったことから内因性の Ghr が血圧低下作用を呈したことも示唆された。我々の実験のモデルは A II 投与のストレスに誘導させ発症させた老化モデルである。これらの老化細胞は炎症性サイトカインである TGF- β や PAI-1 を発現、分泌し、細胞周囲を変化させる。さらに、老化細胞は通常の細胞と比較し、易ストレス感受性になりアポトーシスを起こしやすくなる。老化関連機能障害の原因となるミトコンドリアの酸化障害もその一

つである。加齢マウスの組織ではミトコンドリア数が減少し、活性酸素の蓄積やエネルギーの産生低下等の機能障害を示すことが言われている。我々の A II 投与モデルではミトコンドリア数の減少を認め、それによる ROS の産生増加や近位尿細管領域の組織障害を起こしていた。また A II type1 受容体ノックアウトマウスは WT よりも長期間生存した報告がある。また WT で加齢に伴うミトコンドリアの絶対値密度の低下は A II type1 受容体の数に依存するといわれている。我々の GHSR null (KO) マウスでも腎機能低下や同様の变化を確認している。さらに KO マウスのミトコンドリアは WT と比較し、変形伸展拡大しているミトコンドリアが多く認められた。以前に加齢ラットの心筋のミトコンドリアでも同様のことが報告されている。拡大、延長したミトコンドリアはオートファジーをさせずに蓄積されたミトコンドリアであるといわれている。このことより、KO マウスの近位尿細管領域のミトコンドリアは老化の表現型を示していることは Ghr が腎機能、腎老化を制御していることが示唆された。以前の報告で Ghr はマウスの虚血再還流傷害急性腎不全において腎機能を向上させることがいわれている。その機序として Ghr による GH/IGF-1/ PI3K/Akt の経路が活性化したことがインスリンレセプター基質 II 欠損マウスで確認された。また詳細不明であるが尿細管細胞に抗アポトーシス作用を示したことがいわれている。他の報告では Ghr 投与により前駆炎症サイトカイン、特に TNF α の抑制により急性腎障害を引き起こす内毒素に対し保護的に働くこともいわれている。しかしこれらの報告では腎臓に直接影響し

ているか検討していない。Ghr 投与により尿中リチウムの排出を変化させずに尿中 Na の排出を増加させる。これは Ghr の遠位尿細管への直接的作用による Na 再吸収であるとさせる。我々の検討では GHSR の免疫染色で近位尿細管領域に染色性が高く、さらに近位尿細管細胞株である HK-2 細胞でも GHSR の mRNA の発現を認めている。今回 Ghr が尿細管障害を改善するか近位尿細管マーカーである尿中 NAG、NGAL を測定して検討した。さらに GHSR は近位尿細管で発現し、Ghr は腎臓で GHSR を介して腎保護効果を示すことが示唆された。また GHSR ノックアウト NDRGCre (タモキシフェン投与群) マウスでは尿蛋白と尿中 NAG はタモキシフェン非投与群と比較しタモキシフェン投与群で有意に減少し、さらに腎組織の所見では酸化ストレスマーカーである 4HNE 染色で近位尿細管領域を中心に有意に酸化ストレスが低下していたことより、GHSR は近位尿細管で発現し、Ghr は腎臓で GHSR を介して腎保護効果を示すことがさらに強く示唆された。また以前では Ghr による抗酸化効果については検討されておらず酸化ストレスは虚血再還流傷害急性腎不全において主要な要因とする報告があり、Ghr の急性腎障害における腎保護効果は ROS の減少の結果起こっていると考えられた。急性腎障害と同様に酸化ストレスは慢性腎臓病の様々な研究モデルの重要な発症メカニズムと考えられている。我々は Ghr の抗酸化作用は慢性腎障害においても有効であることを明らかにした。慢性腎臓病で顕著な体重減少は主な所見である。cachexia は慢性腎臓病により生じ、それらの患者の総 Ghr 濃度はアシル化 Ghr (活

性型 Ghr) の変化なく上昇していた。総 Ghr 濃度の上昇は Ghr が腎臓での排出、腎不全による蓄積により生じている可能性もあるが、活性型 Ghr の血中濃度の変化が認められないのは cachexia で臨床的に消費されている可能性が示唆された。いくつかの研究で慢性腎臓病や透析患者における Ghr の有益性を認めた。GHSR ノックアウトマウス (KO) は摂餌量や体重減少を示すことがいわれている。この KO の状態は慢性腎臓病の cachexia に類似している。最近の研究でこれらの Ghr の腎臓への効果か Ghr の体重増加、食欲亢進作用による Ghr の個体へのシステマティックな効果か区別できていない。しかしながら腎不全の進行は cachexia の増悪に密接に関係している。Ghr 投与は腎機能障害だけでなく慢性腎臓病の栄養失調の改善によって腎機能悪化を改善させる可能性が考えられる。

臨床応用については過去には健常者と透析患者における透析後の投与でのデータが報告されている。その一方で保存期腎不全でのグレリン投与の体内動態は明らかにされていなかったが、今回保存期腎不全患者に投与したところ、有害事象は認められず、安全性が確認できた。保存期腎不全患者と透析患者に対する安全性が確認できたことから腎機能低下患者に対して投与が可能と考えられた。

に直結した研究プロジェクトである。しかも共同研究者の寒川らが発見した生理活性ペプチドを用いた translational research でありわが国発の世界に誇る研究である。本研究で得られる新知見は学術的にも有意義なものであるのみならず、CKD による加齢健康障害を阻止する新治療を提示できる可能

性が高い。医療経済上も CKD 患者の透析移行の阻止、遅延を目指すものであり、その社会的貢献は極めて高い。

E. 結論

新規ペプチドグレリンの腎不全への適応をめざし基礎および臨床研究を継続している。肥満型の糖尿病性腎症に関しては動物実験では有効性は疑問視された。遺伝子欠損マウスの検討では近位尿細管の GHSR の機能の重要性が注目された。安全性が担保されれば有効性に関する研究を開始したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujimura K, **Wakino S**, Minakuchi H, Hasegawa K, Hosoya K, Komatsu M, Kaneko Y, Shinozuka K, Washida N, Kanda T, Tokuyama H, Hayashi K, Itoh H, Ghrelin Protects against Renal Damages Induced by Angiotensin-II via an Antioxidative Stress Mechanism in Mice. *PLoS One*. 2014 Apr 18;9(4):e94373.

2. 学会発表

Keiko Fujimura, **Shu Wakino**, Koichi Hayashi,

Hiroshi Itoh. Renal Protective Effects by rosuvastatin through the Amelioration of Intra-Renal vascular resistance. 46th **Annual Meeting & Scientific Exposition, American Society of Nephrology, 2013.**

藤村 慶子, 脇野 修, 山口 慎太郎, 細谷 浩司, 伊藤 裕, Ghrelin 受容体欠損マウスでは腎臓での老化反応が亢進する、第 13 回日本抗加齢医学会総会、2013 年

藤村慶子、脇野修、水口齊、長谷川一宏 林晃一、伊藤裕 消化管ペプチド Ghrelin の腎保護作用、日本臨床分子医学会、2014 年

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II.分担研究報告書

グレリンの腎保護作用に関する研究

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 徳山 博文

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 脇野 修

研究要旨 <背景>成長ホルモン放出促進受容体の内因性リガンドとして発見されたグレリン(Ghr)はミトコンドリア由来の活性酸素(ROS)を減少させることにより酸化ストレスを示す。今回我々はグレリンの腎保護効果について検討した。<方法>in vitro では腎近位尿細管細胞 HK-2 細胞にアンジオテンシン II(A II)1 μ M を投与し scencence を誘導し、Ghr 同時投与の効果を検討した。また in vivo では A II (1000ng/kg/min) を 2 週間持続投与したマウス C57BL/6 mice に対し、Ghr (100 μ g/kg/day) を 2 週間連日腹腔投与し、Ghr の効果を検討した。さらに Ghr 受容体欠損(GHSR null)マウスを用いた検討も行った。また Ghr 受容体欠損(GHSR null)マウスと NDRG Cre マウスの交配によりタモキシフェン (Tam) 投与で近位尿細管特異的に GHSR が回復するマウスを作成し表現型を解析した。<結果> A II 投与により HK-2 細胞の SA β -gal 活性の上昇、細胞周期抑制因子 p53、p21 および炎症性サイトカインである TGF- β 、PAI-1 の発現誘導が認められ、細胞老化、組織線維化が確認され、Ghr はこれらを抑制した。マウス A II 持続投与では Ghr は A II による尿蛋白増加、尿細管マーカー (NGAL、NAG) の上昇、腎臓の SA β -gal 染色等の老化変化を抑制した。4HNE 染色において Ghr は A II による腎尿細管間質の酸化ストレス上昇を低下させた。Ghr 投与によりミトコンドリア (Mit) 由来の酸化ストレスを抑制する UCP2 の発現が増加し、PGC1 α の上昇により、Mit 数は増加した。Ghr は A II による組織線維化を抑制した。また GHSR null マウスでは WT マウスと比較して A II 投与による尿蛋白増加、尿細管障害増悪を認め、腎臓の SA β -gal 染色等の老化変化や 4HNE 染色における酸化ストレス上昇の増悪を認めた。またミトコンドリアの電顕写真では GHSR null マウスでは WT マウスと比較してミトコンドリアの伸長が認められ、GHSR null マウスの A II 投与群でさらに増強されていた。NDRG Cre マウスとの交配によるマウスの Tam 非投与群と比較し Tam 投与群が有意に近位尿細管における酸化ストレスの低下、尿蛋白と尿中 NAG の減少が認められた。[結論]Ghr は腎臓において、Mit の UCP2 の誘導を介し A II による活性酸素レベル上昇を低下させた。このことより内因性の Ghr/GHSR が尿細管の活性酸素産生調節、腎機能維持において重要であることが示唆された。Conditional Knock-out mice のデータを考慮すると近位尿細管の GHSR の腎酸化ストレスへの寄与が示唆された。

A. 研究目的

グレリンとはラットとヒトの胃で発見されたペプチドホルモンで、GH 分泌促進受容体を介して GH 分泌を誘起させるホルモンである。グレリンは摂食行動の生理的信号物質であり、成長ホルモンの分泌と摂食を増進して成長を制御する。従ってその分泌は栄養状態やエネルギーバランスの変化に依存して生じる。グレリンは胃及び脳内の視床下部弓状核のニューロンで産生され、またグレリン受容体は脳のさまざまな部位で発現している。その一方でグレリン、グレリン受容体は腎臓にも発現が認められているが腎臓での働きについては不明な点が多い。一方慢性腎臓病でグレリンの血中レベルは上昇すると報告されており、原因として腎臓からの clearance の低下、CKD での低栄養状態に対する反応、腎臓における分解の低下、胃以外の臓器での産生の亢進などがその機序として想定されている。グレリンの腎での作用についてはマウスの虚血再還流傷害急性腎不全において腎機能を向上させることが報告されており、我々は新規代謝調節ホルモン、グレリンの慢性腎臓病に対する腎保護作用、抗酸化作用について *in vitro* および *in vivo* で検討した。

B. 研究方法

in vivo(マウス)での検討

16 週齢マウス C57BL/6 mice に A II をオスモティックミニポンプで持続静注し、4 週間飼育する。飼育開始 2 週間後よりグレリン群にはグレリンを 100 μ g/kg/day を連日腹腔注射した。ARB 群ではイルベサルタンを 50mg/kg/day を混餌で投与した。次に Ghrelin の降圧作用による効果を除外する目的で同等に降圧して Hydralazine 250mg/dl 投

与群との比較を検討した。さらに、Ghrelin の抗加齢抗老化のメカニズムを Ghrelin receptor の発現が証明されている *in vivo*(尿細管細胞株を用いた系)でも検討した。更に内因性 Ghrelin の AII 依存性腎臓病抑制効果について Growth Hormone secretagogue receptor ノックアウトマウスを用いて検討した。

C. 研究結果

In vivo(マウス)のデータ

まず収縮期血圧は、Ghrelin は A II による血圧上昇を有意に低下させた (図 1)。

次に Ghr による腎臓病抑制効果に関しては、尿細管障害のマーカーである尿中 NAGL および NAG は A II 投与で有意に増加したが、これらの尿細管障害を Ghr は有意に抑制した。しかし、ヒドララジン投与では抑制は出来なかった。また、尿蛋白は A II 投与で増加し、Ghr、ヒドララジン投与で有意に抑制された。以上より Ghr で認められた尿細管保護作用は降圧に依存せず、その一方で尿蛋白抑制効果は降圧に依存すると考えられた(図 2)。A II による腎臓病の要因の一つに酸化ストレスの上昇が知られている。そこで腎組織の酸化ストレスのレベルを 4HNE 染色で検討した。A II で腎皮質において 4HNE 染色が上昇し、Ghr がこれを顕著に抑制していたのを認め、この作用はヒドララジンによる降圧で認められなかった(図 3)。すなわち Ghr による抗酸化作用も血圧非依存性に働いていることが分かった。さらに、この抗酸化作用が腎老化反応抑制効果につながるかどうか検討した。腎皮質領域の SA- β -GAL 染色では、A II 投与群で染色が強く認められ、Ghrelin 投与群で染色が低下しているのを認めた。A II 投与によ

る細胞老化を、Ghrelin 投与により抑制されたのが示唆された。またヒドララジンによる降圧は A II による組織の老化を抑えることは出来なかった (図 4)。老化関連因子である p53、p21 についても検討したが、A II により p53 の発現が誘導され、この誘導を Ghr は有意に抑制した。同様の結果が p21 についても認められた(図 5)。

次に老化細胞が発現する TGF- β と PAI-1 の発現調節を RT-PCR 法で検討したが、A II 投与により発現誘導された TGF- β 、PAI-1 両者とも Ghr 投与群で抑制されていた(図 6)。

TGF- β 及び PAI-1 は組織の線維化に関わるサイトカインであることが知られている。そこでマツソントリクローム染色で腎組織の線維化を検討した。A II 投与群で NS 群と比較し有意に間質に強い線維化の亢進が認められ、Ghr 投与群で有意に線維化が低下していた。しかし、ヒドララジン投与群では線維化の低下を認めなかった(図 7)。

近年 Ghr の抗酸化作用に関しては明らかになっており、Ghr は神経細胞において、ミトコンドリアの脱共役蛋白である UCP2 の発現を上昇させ、その結果ミトコンドリアの膜電位を低下させ O₂ の産生が抑制された。その結果ミトコンドリア数の増加が認められた報告がされている。そこで我々は Ghr は抗酸化作用を介して組織保護に働くことが示唆され、その分子メカニズムを検討した。抗酸化の鍵分子である UCP2 の mRNA 発現は Ghr 投与した腎臓で有意に上昇していた。また、catalase の発現は 3 群間で有意差を認めなかった。さらに A II による活性酸素産生に関与する NADPH オキシダ-ゼの isoform である NOX1 と NOX4 は A II 投与で上昇していた。またサブユニットである p22phox も A II 投与で上昇していた。これらを Ghr は有意に低下させた(図 8)。

さらに mitochondria 生合成の鍵分子である PGC1 α の発現は A II で低下し、Ghr で有意に増加し、その結果、Ghr 投与のマウスにおいては mitochondria の数が増加していた(図 9)。

以上 2 つの効果より、Ghr は UCP2 の発現上昇を介しミトコンドリア維持効果をきたしこれが組織保護効果を示したと考えられた。

Ghr は A II により誘導された酸化ストレスの上昇、老化反応、組織障害を抑制した。更に加齢関連のサイトカインである TGF- β および PAI-1 の発現を抑制し、抗線維化作用を示した。また Ghr は UCP2、PGC1 α の発現を誘導し、抗酸化作用、mitochondria の維持効果を示した。これが Ghr の腎障害保護作用、腎の老化反応抑制を引き起こしたと考えられた。これらの Ghr の作用は血圧非依存性であり尿管細胞への直接効果と考えられた。

GHSR ノックアウトマウスでの検討

さらに内因性 Ghrelin の AII 依存性腎障害抑制効果について Growth Hormone sequestrin receptor ノックアウトマウスを用いて検討した。GHSR ノックアウトマウスについて、GHSR の遺伝子上流にトランスクリプションブロッキングカセットを組み込んである total の GHSR ノックアウトマウスを用い、genotyping を行った。更に RT-PCR でノックアウトの確認をした(図 10)。WT と WT に AII500ng/kg/min を投与したものの、GHSR ノックアウトマウス (KO) と GHSR ノックアウトマウス (KO) に A II 500ng/kg/min を投与したものの 4 群を比較した。まず収縮期血圧では WT 群と KO 群で比較し、KO 群で有意に血圧が上昇していたのを認めた(図 11)。その変化は A II 投与群でも同様のことが確認された。尿蛋白、尿管障害のマーカーである NGAL、NAG は WT

群と KO 群で比較し、KO 群で有意な増加を認めた。AII 投与に関してはその差ははっきりしなかった(図 12)。

腎皮質領域の老化反応を引き起こす酸化ストレスを 4HNE 染色で検討すると、WT 群に比較し、KO 群が強く染色されていた(図 13)。また SA- β -GAL 染色は 4HNE 染色と同様に WT 群に比較し、KO 群が強く染色されていた(図 14)。内因性 Ghr が抗老化、抗酸化作用をもつことが確認された。最後に MT 染色で腎線維化を検討したが、KO 群で有意に腎線維化が認められた(図 15)。また腎臓の近位尿細管領域の電顕所見で、ミトコンドリアは酸化ストレスを受けると変形伸展拡大することが報告されているが、KO 群で有意にミトコンドリアの変形、伸展を認めた。さらにミトコンドリアの数は GHSR ノックアウト群で有意に低下していた(図 16)。GHSR ノックアウトマウスは WT と比較して老化の促進、線維化の亢進、酸化ストレスの上昇、腎機能障害の増悪が認められた。

腎近位尿細管特異的 Ghrelin レセプター発現マウスを用いた検討

最後に、腎近位尿細管特異的 Ghrelin レセプター発現マウスを用いた検討を行った。Flox⁻GHSR1(Ghrelin receptor)null マウス と NDRG (n-myc downstream regulated gene 1) Cre マウスを交配させると transcriptional blocking cassette(TBC)の両端の loxP が外れ、これらにより下流の GHSR 遺伝子が転写される。よって、近位尿細管のみ GHSR が発現するマウスが作成出来、近位尿細管特異的な Ghrelin の作用の検討が可能なる。具体的な実験方法は F1 同士をかけあわせて得られた 12 週の Flox⁻GHSR1null/NDRG Cre マウスに 5

日間 Tamoxifen 1mg/mouse/day で腹腔内連日投与を行った。タモキシフェン投与群とタモキシフェン非投与群とで表現型を比較した。まず GHSR のレセプターの免疫染色を行ったところ、GHSR ノックアウト NDRGCre マウスでは近位尿細管の GHSR の回復を確認した(図 17)。次に 16 週のタモキシフェン非投与群とタモキシフェン投与群の表現型を比較したが収縮期血圧と体重には変化は認められなかった(図 18、19)。次に生化学所見である血清 BUN と Cr はタモキシフェン非投与群とタモキシフェン投与群の両者に有意差は認められなかったが(図 20、21)、尿蛋白と尿細管マーカーである NAG はタモキシフェン非投与群と比較しタモキシフェン投与群で有意に減少していた(図 22、23)。さらに腎組織の所見を検討したところ、酸化ストレスマーカーである 4HNE 染色では近位尿細管領域を中心にタモキシフェン非投与群と比較しタモキシフェン投与群が有意に酸化ストレスが低下していた(図 24)。しかし腎線維化は明らかな有意差を認められなかった(図 25)。このことより Mitochondria の多く局在する近位尿細管領域の GHSR が Ghrelin を介した抗酸化ストレス作用に重要な役割を担っていることが示唆された。

D. 考察

消化管ホルモンである Ghr は腎臓において、ミトコンドリアの UCP2 の誘導を介し AII による活性酸素レベル上昇を低下させたことが示唆された。UCP2 はミトコンドリアの inner membrane に存在し intermembrane space の H⁺を matrix 側へ leak させる脱共役蛋白でありその結果、膜の電位勾配は低下し、活性酸素(ROS)の産出が低下する。UCP2 はミトコンドリアにおいて O²⁻の産出を抑

制する分子であり、細胞内の O_2^- 、ROS のほとんどはミトコンドリア由来であるから UCP2 による O_2^- 産出低下は極めて有効な抗酸化作用を有すると考えられた。実際、血管内皮細胞では P38MAP キナーゼを介した UCP2 の上昇により A II により誘導させた活性酸素発生を抑制し、A II 投与による血管内皮細胞の障害を抑制させたことが報告されている。我々の A II 投与による腎障害モデルやヒト近位尿細管細胞株 (HK-2 細胞) でも UCP2 の上昇を認め、これらの代償機構を確認した。更に Ghr 投与により UCP2 の上昇が誘導され腎組織障害を抑制した。A II 投与群のマウスは NS 投与群のマウスの UCP2 よりも発現が上昇していた為 Ghr、それ自体が UCP2 発現を上昇させ、A II 投与群の UCP2 上昇とは独立して働いたものと考えられた。

A II によって誘導された ROS は病理組織学的にも腎の炎症や線維化に重要な役割を担っている。我々の A II 投与による腎障害モデルにおいても A II は NADPH オキシダ-ゼの腎臓での主な isoform である NOX1、NOX4 の発現を上昇させた。いままでにも A II は NOX1、NOX4、p47phox、p67phox、p22phox 等の様々な NADPH オキシダ-ゼのサブユニットの上昇を誘導した報告がある。そして今回 Ghr は NOX1、NOX4、p22phox の発現を低下させた。すなわち Ghr の有する抗酸化作用と考えられた。また NOX の発現は還元反応によって生じていると考えられた。また今回の A II 投与による腎障害モデルで PGC1 α の発現低下とミトコンドリア数は減少していたが Ghr は強力な抗酸化作用によりこれらの低下を軽減させた。また Ghr 投与により A II 投与したマウスの血圧は低下を認めた。これは以前に分離した血管内皮細胞で血管拡張作用による直接的作用であると報告があり、こ

れによるものと考えられた。さらに視床孤束核に Ghr を投与すると血圧低下をみとめることより交感神経に作用して血圧低下が生じた報告もある。これについては GHSR ノックアウトマウス (KO) は WT より血圧高値であったことから内因性の Ghr が血圧低下作用を呈したことも示唆された。我々の実験のモデルは A II 投与のストレスに誘導させ発症させた老化モデルである。これらの老化細胞は炎症性サイトカインである TGF- β や PAI-1 を発現、分泌し、細胞周囲を変化させる。さらに、老化細胞は通常の細胞と比較し、易ストレス感受性になりアポトーシスを起こしやすくなる。老化関連機能障害の原因となるミトコンドリアの酸化障害もその一つである。加齢マウスの組織ではミトコンドリア数が減少し、活性酸素の蓄積やエネルギーの産生低下等の機能障害を示すことが言われている。我々の A II 投与モデルではミトコンドリア数の減少を認め、それによる ROS の産生増加や近位尿細管領域の組織障害を起こしていた。また A II type1 受容体ノックアウトマウスは WT よりも長期間生存した報告がある。また WT で加齢に伴うミトコンドリアの絶対値密度の低下は A II type1 受容体の数に依存するといわれている。我々の GHSR null (KO) マウスでも腎機能低下や同様の变化を確認している。さらに KO マウスのミトコンドリアは WT と比較し、変形伸展拡大しているミトコンドリアが多く認められた。以前に加齢ラットの心筋のミトコンドリアでも同様のことが報告されている。拡大、延長したミトコンドリアはオートファジーをさせずに蓄積されたミトコンドリアであるといわれている。このことより、KO マウスの近位尿細管領域のミトコンドリアは老化の表現型を示していることは Ghr が腎機能、腎老化を制御している

ことが示唆された。以前の報告で Ghr はマウスの虚血再還流傷害急性腎不全において腎機能を向上させることがいわれている。その機序として Ghr による GH/IGF-1/ PI3K/Akt の経路が活性化されたことがインスリンレセプター基質 II 欠損マウスで確認された。また詳細不明であるが尿細管細胞に抗アポトーシス作用を示したことがいわれている。他の報告では Ghr 投与により前駆炎症サイトカイン、特に TNF α の抑制により急性腎障害を引き起こす内毒素に対し保護的に働くこともいわれている。しかしこれらの報告では腎臓に直接影響しているか検討していない。Ghr 投与により尿中リチウムの排出を変化させずに尿中 Na の排出を増加させる。これは Ghr の遠位尿細管への直接的な作用による Na 再吸収であるとさせる。我々の検討では GHSR の免疫染色で近位尿細管領域に染色性が高く、さらに近位尿細管細胞株である HK-2 細胞でも GHSR の mRNA の発現を認めている。今回 Ghr が尿細管障害を改善するか近位尿細管マーカーである尿中 NAG、NGAL を測定して検討した。さらに GHSR は近位尿細管で発現し、Ghr は腎臓で GHSR を介して腎保護効果を示すことが示唆された。また GHSR ノックアウト NDRGCre (タモキシフェン投与群) マウスでは尿蛋白と尿中 NAG はタモキシフェン非投与群と比較しタモキシフェン投与群で有意に減少し、さらに腎組織の所見では酸化ストレスマーカーである 4HNE 染色で近位尿細管領域を中心に有意に酸化ストレスが低下していたことより、GHSR は近位尿細管で発現し、Ghr は腎臓で GHSR を介して腎保護効果を示すことがさらに強く示唆された。また以前では Ghr による抗酸化効果については検討されておらず酸化ストレスは虚血再還流傷害急性腎不全において主要な要因とする報

告があり、Ghr の急性腎障害における腎保護効果は ROS の減少の結果起こっていると考えられた。急性腎障害と同様に酸化ストレスは慢性腎臓病の様々な研究モデルの重要な発症メカニズムと考えられている。

我々は Ghr の抗酸化作用は慢性腎障害においても有効であることを明らかにした。慢性腎臓病で顕著な体重減少は主な所見である。cachexia は慢性腎臓病により生じ、それらの患者の総 Ghr 濃度はアシル化 Ghr (活性型 Ghr) の変化なく上昇していた。総 Ghr 濃度の上昇は Ghr が腎臓での排出、腎不全による蓄積により生じている可能性もあるが、活性型 Ghr の血中濃度の変化が認められないのは cachexia で臨床的に消費されている可能性が示唆された。いくつかの研究で慢性腎臓病や透析患者における Ghr の有益性を認めた。GHSR ノックアウトマウス(KO)は摂餌量や体重減少を示すことがいわれている。この KO の状態は慢性腎臓病の cachexia に類似している。最近の研究でこれらの Ghr の腎臓への効果か Ghr の体重増加、食欲亢進作用による Ghr の個体へのシステムティックな効果か区別できていない。しかしながら腎不全の進行は cachexia の増悪に密接に関係している。Ghr 投与は腎機能障害だけでなく慢性腎臓病の栄養失調の改善によって腎機能悪化を改善させる可能性が考えられる。

E. 結論

我々はグレリンが腎組織での酸化ストレス発生を抑制することにより AII により誘導された腎障害を改善させたことを明らかにした。Ghr はミトコンドリアで脱共役蛋白である UCP2 を誘導させ、ミトコンドリアの膜電位を低下させ、ミトコンドリア由来の ROS の発生を抑制したと考えら

れた。GHSR ノックアウトマウスは WT と比較して線維化、加齢変化を認め、酸化ストレスの上昇による腎機能障害を認めた。これは Ghr/GHSR 経路が腎臓において活性酸素産生調節に重要な役割を担っていることが示唆された。さらに GHSR^{-/-}/NDRG Cre マウスでの結果では酸化ストレスの低下、尿細管障害の改善、尿蛋白の減少を認めたことから、mitochondria の多く局在する近位尿細管が Ghrelin の腎組織保護作用に重要な役割を担っていることが示唆された。我々の研究結果より Ghr は腎不全進行に対しての新規治療戦略となりうると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujimura K, **Wakino S**, Minakuchi H, Hasegawa K, Hosoya K, Komatsu M, Kaneko Y, Shinozuka K, Washida N, Kanda T, Tokuyama H, Hayashi K, Itoh H, Ghrelin Protects against Renal Damages Induced by Angiotensin-II via an Antioxidative Stress Mechanism in Mice. PLoS One. 2014 Apr 18;9(4):e94373

2. 学会発表

Keiko Fujimura, **Shu Wakino**, Koichi Hayashi, Hiroshi Itoh. Renal Protective Effects by rosvastatin through the Amelioration of Intra-Renal vascular resistance. 46th **Annual Meeting & Scientific Exposition, American Society of Nephrology, 2013.**

藤村 慶子, 脇野 修, 山口 慎太郎, 細谷 浩司, 伊藤 裕, Ghrelin 受容体欠損マウスでは腎臓での老化反応が亢進する、第 13 回日本抗加齢医学会総会、2013 年

藤村慶子、脇野修、水口齊、長谷川一宏
林晃一、伊藤裕 消化管ペプチド Ghrelin の腎保護作用、日本臨床分子医学会、2014 年

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

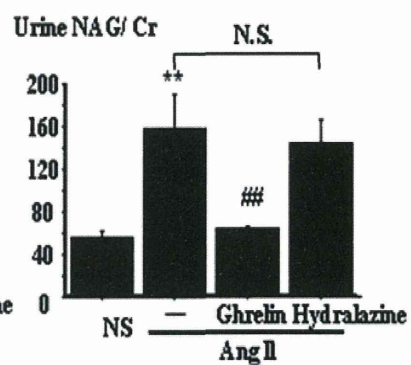
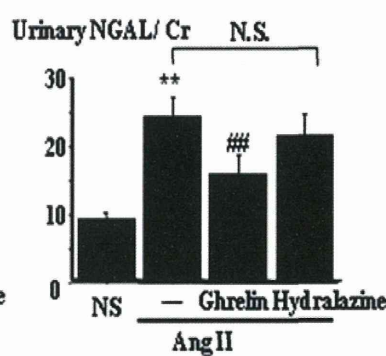
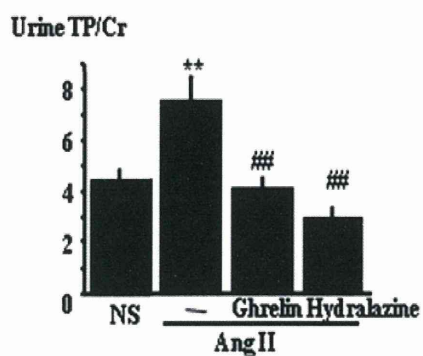
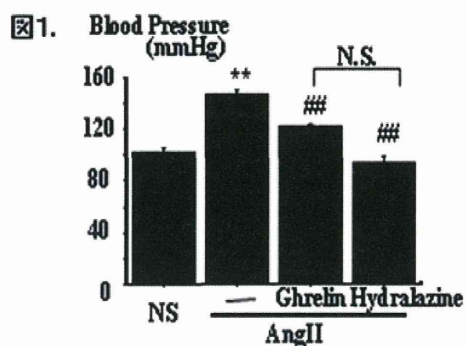


图3. 4HNE staining

