

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 (A₁)1 μ M を投与し senescence を誘導し、Ghr 同時投与の効果を検討した。また in vivo では A₁ (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> A₁ 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 AII 持続投与では Ghr は A₁ 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 A₁ 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 A₁ 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 A₁ 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 A₁ 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 A₁ 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 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。

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 による血圧上昇を有意に低下させた(図 1)。

次に Ghr による腎障害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 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 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 による腎障害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 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 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 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 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 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 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。そこでマッソントリクローム染色で腎組織の線維化を検討した。A 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 による活性酸素産生に關与する NADPH オキシダ-ゼの isoform である NOX1 と NOX4 は A 投与で上昇していた。またサブユニットである p22phox も A 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 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 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細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 sequestrant 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ク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 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 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。A 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 4 HNE 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 4 HNE 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 4 HNE 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 A 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 により誘導させた活性酸素発生を抑制し、A 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 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 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 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 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 投与による腎障害モデルにおいても A 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 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 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 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 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 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 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 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 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 の腎臓への効果が 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 A 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、水口斉、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

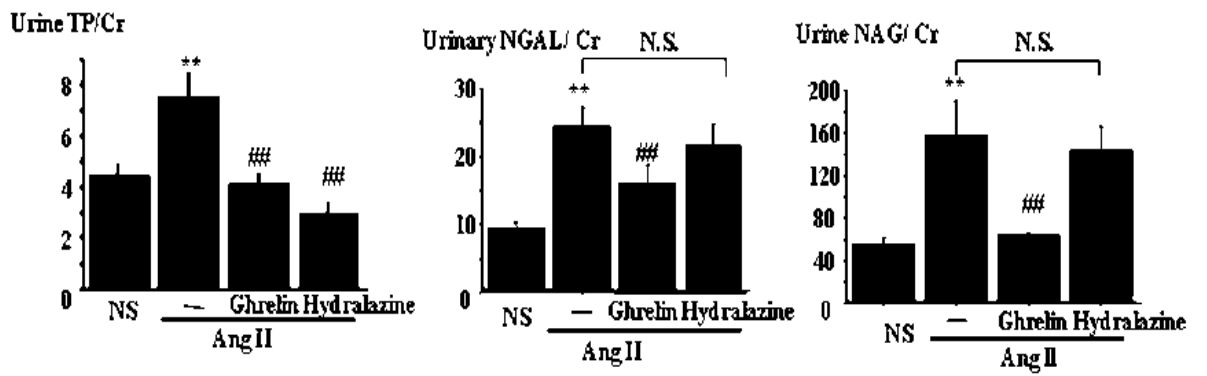
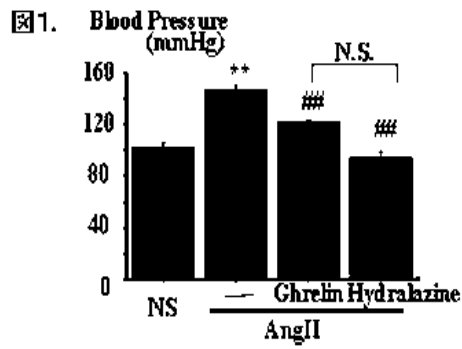


图3. 4HNE staining

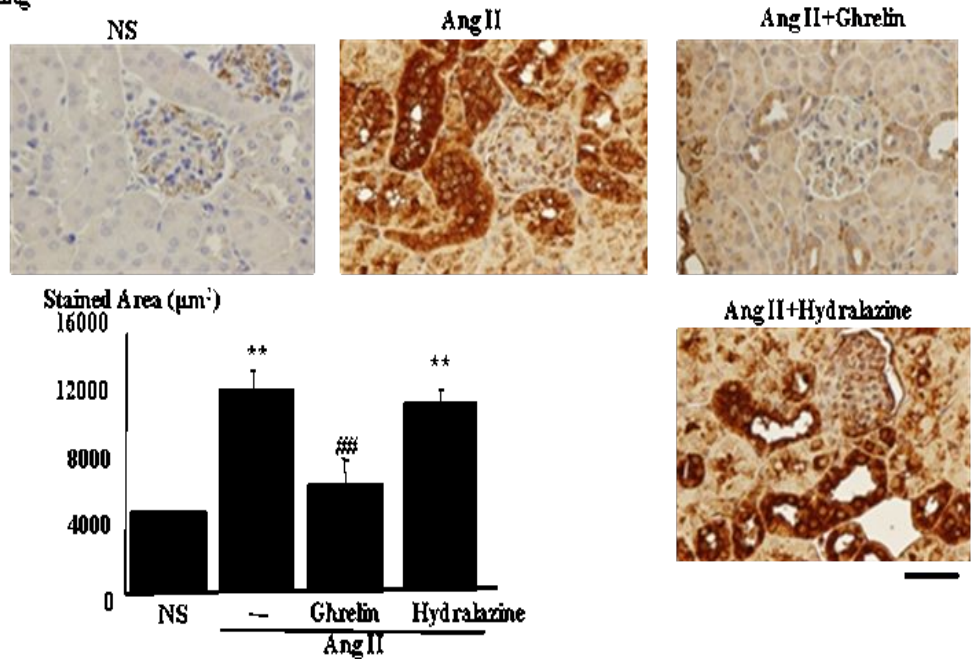


图4. SA-β Gal staining

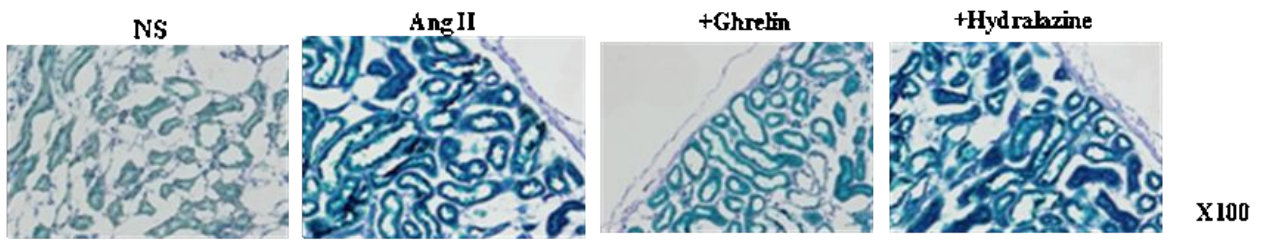


图5.

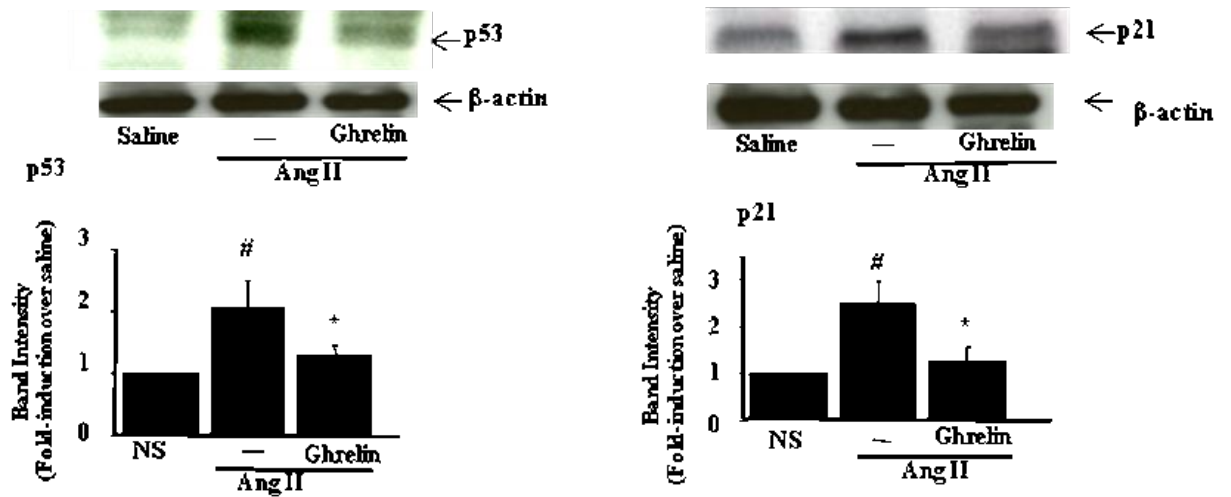


图6.

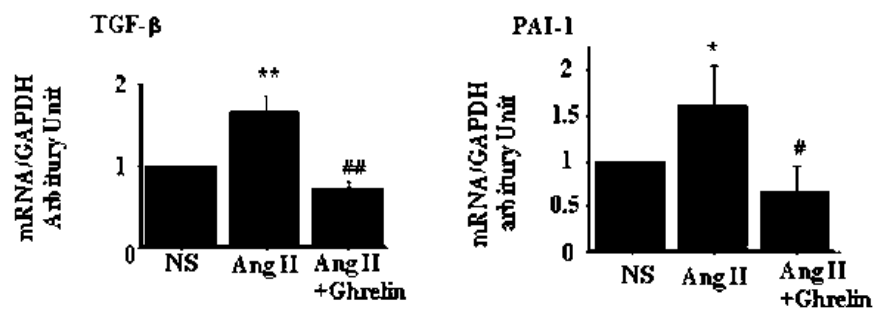


图7.

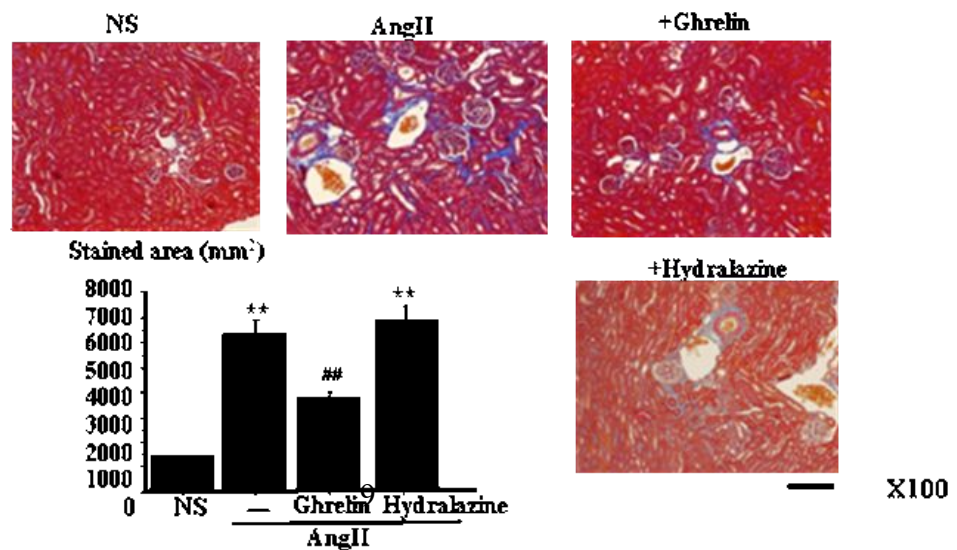
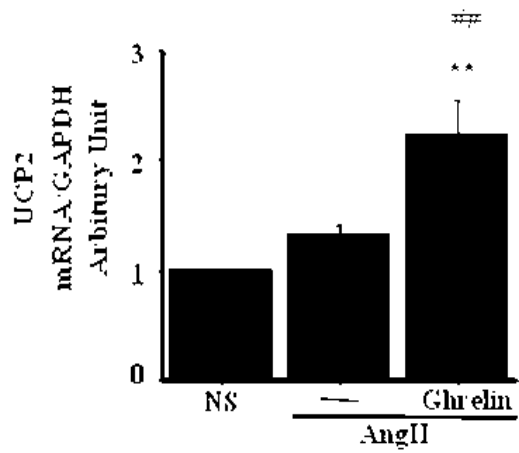


図8. UCP2



catalase

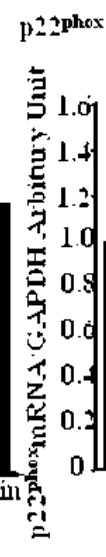
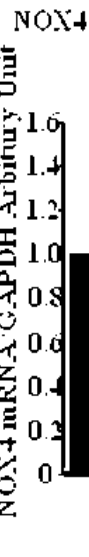
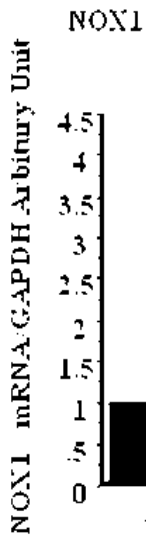
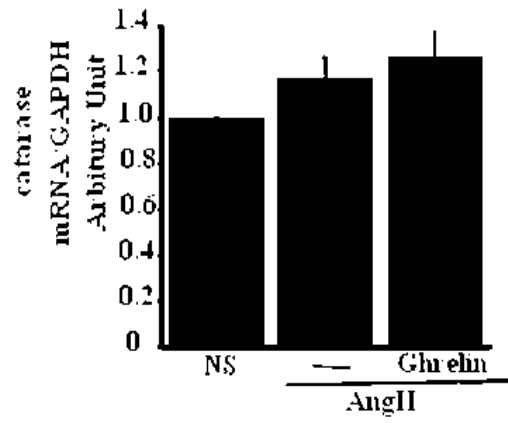
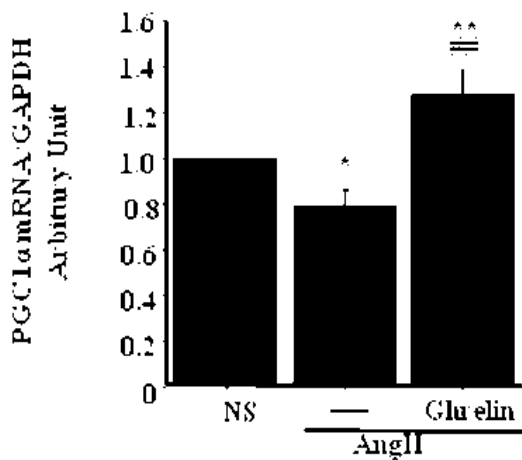
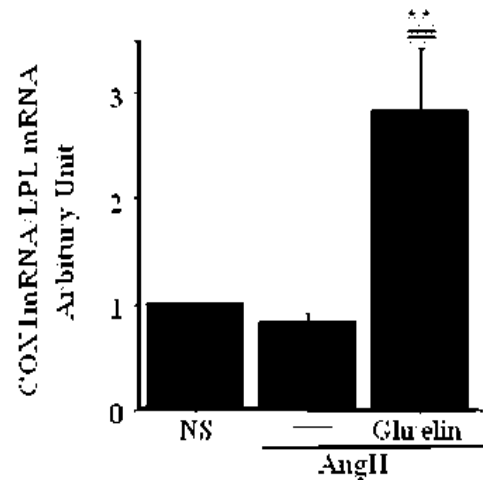


図9. PGC1α



ミトコンドリア数



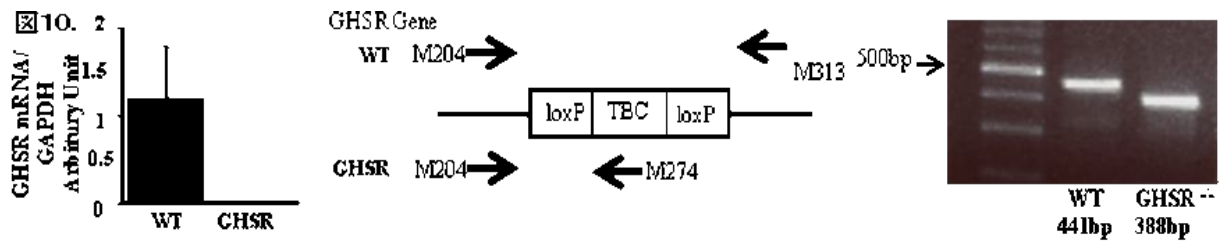


图11. Blood Pressure (mmHg)

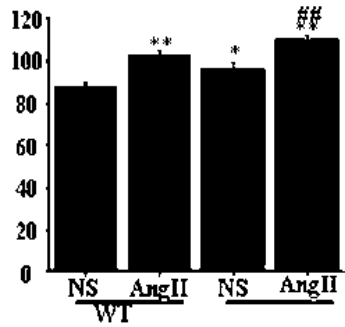
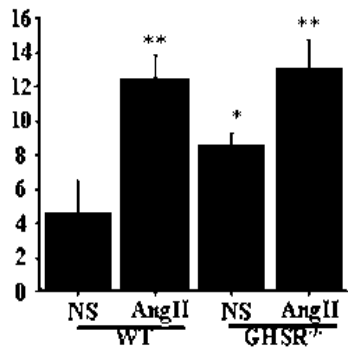
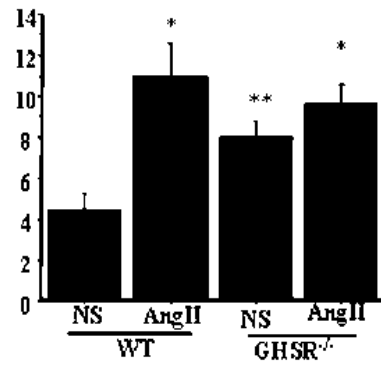


图12. Urinary TP/Cr



Urinary NA GL/Cr



Urinary NAG/Cr

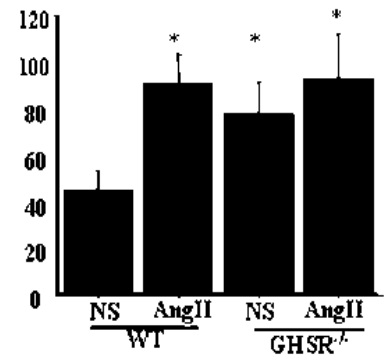


图13. 4HNE染色

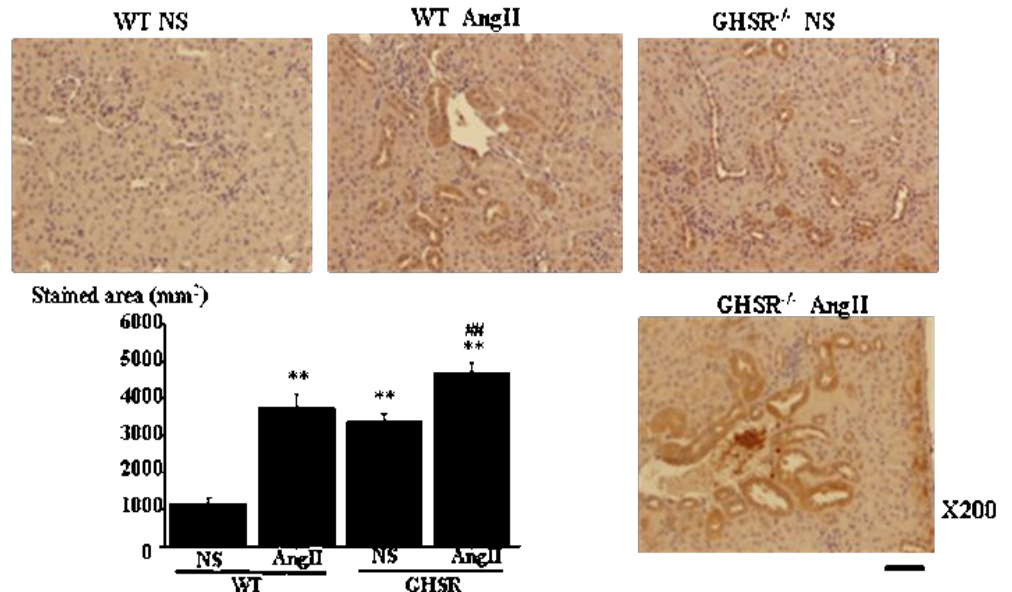
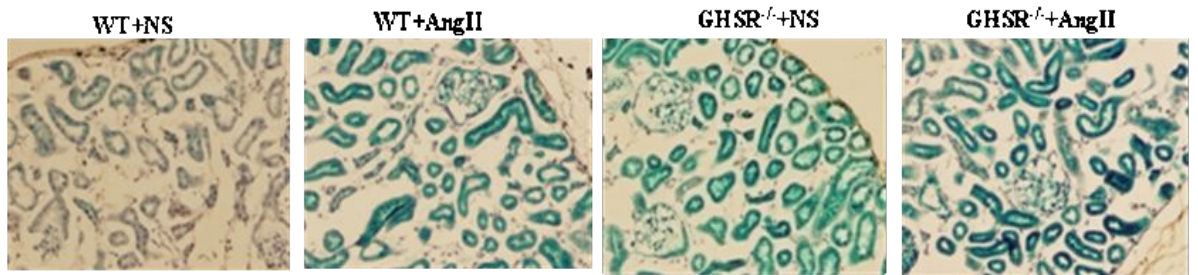
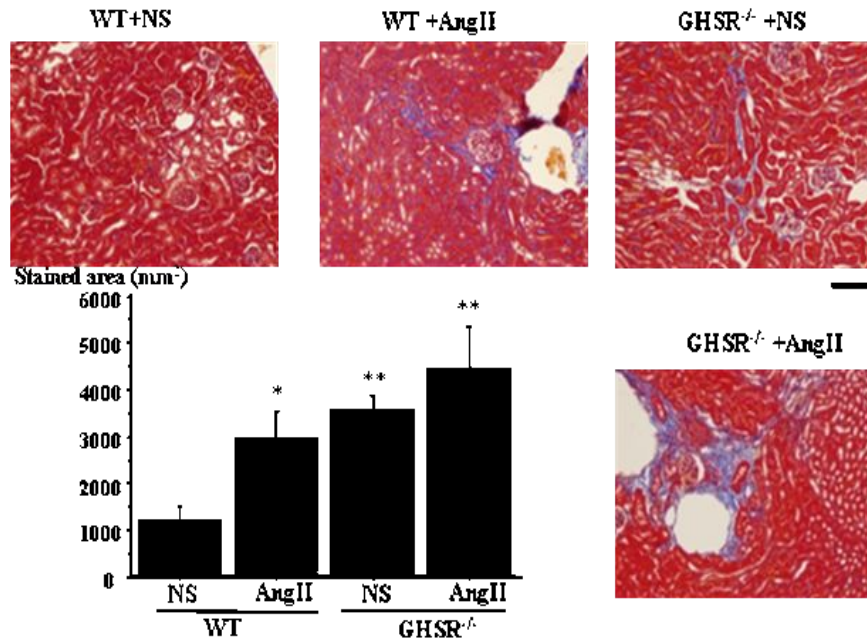


図14. SA-β Gal staining



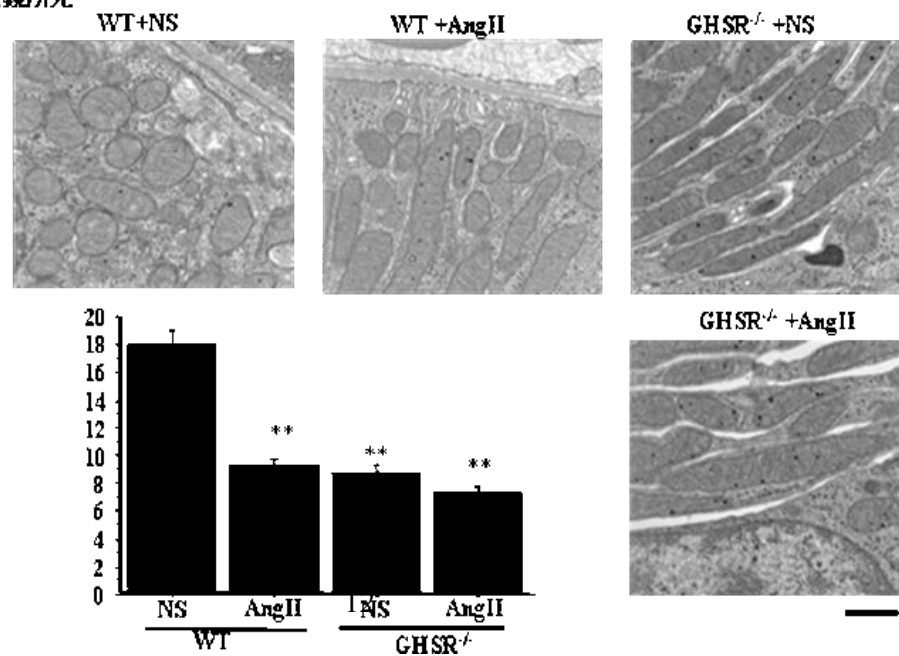
X200

図15. Masson Tricrome staining



X100

図16. 電子顕微鏡所見



X18400

図17. GHSR の免疫染色

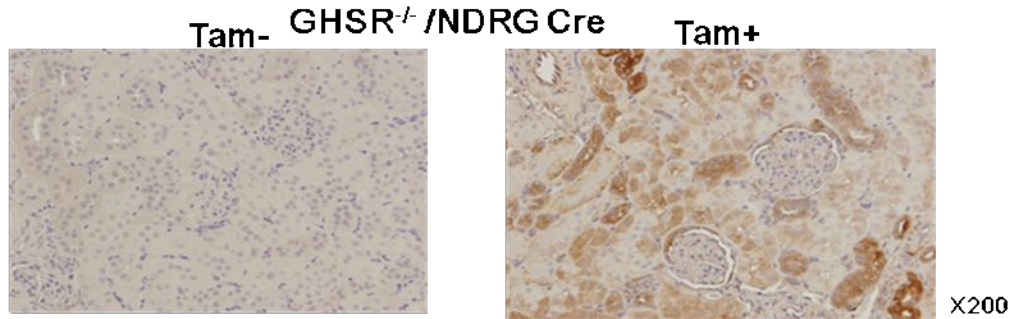


図18. 収縮期血圧

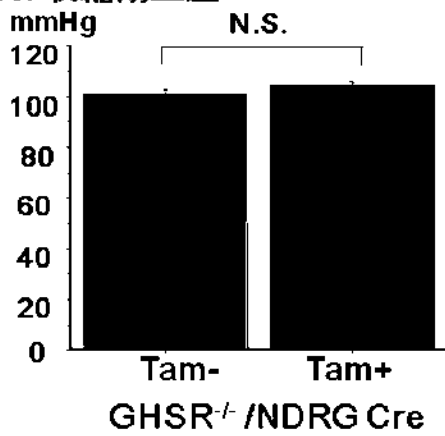


図19. 体重

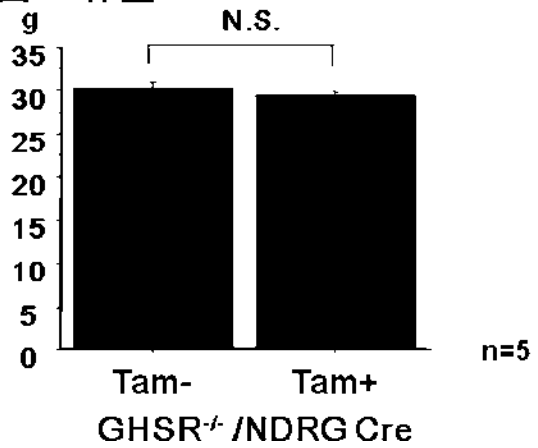


図20. 血清BUN

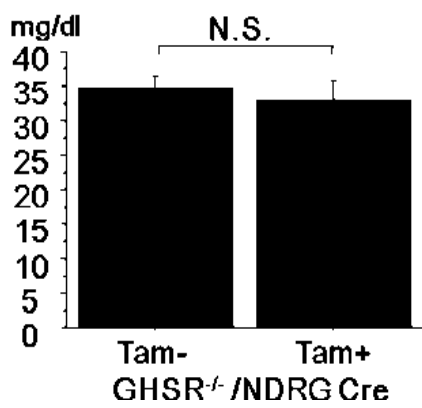


図21. 血清Cr

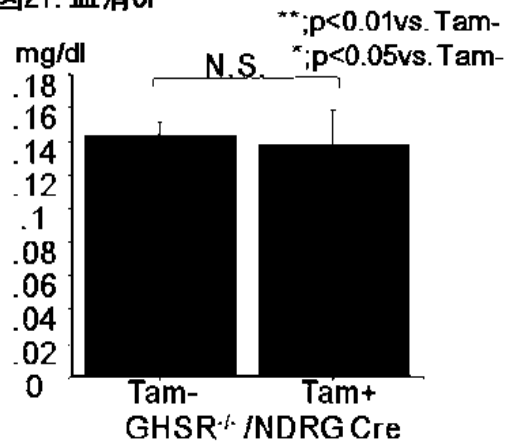


图22. 尿 TP/Cr

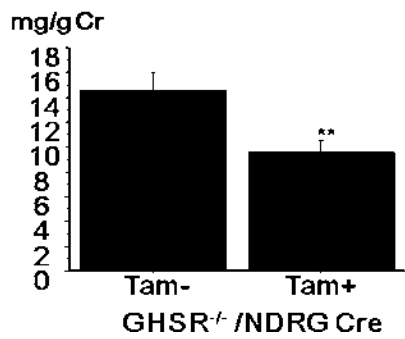


图23. 尿 NAG/Cr

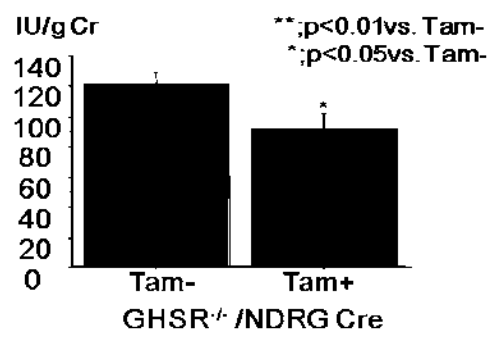


图24. 4HNE 染色

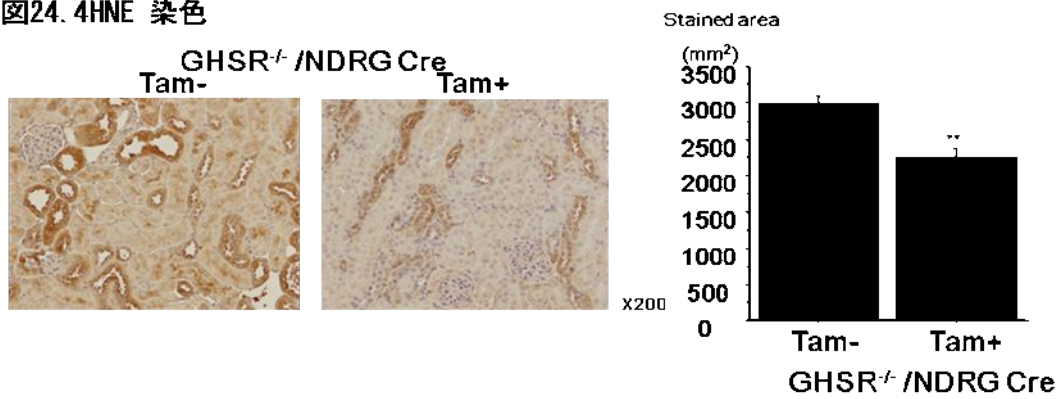
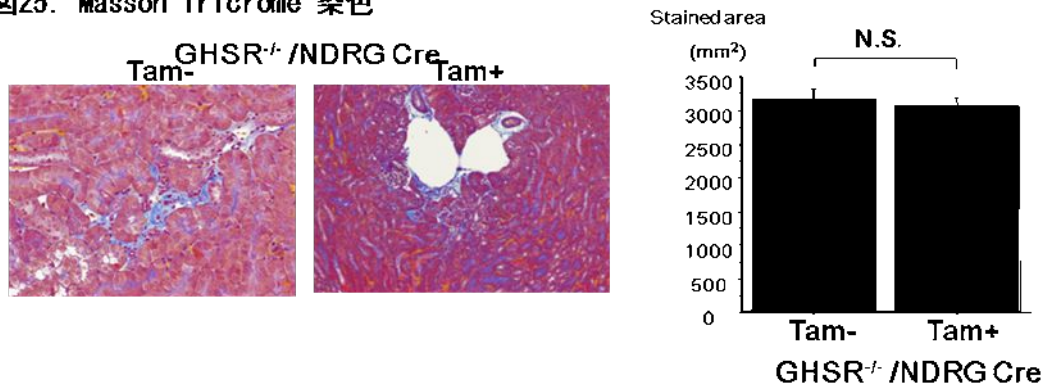


图25. Masson Tricrome 染色



GHSR^{+/-}; GHSR-null mice

GHSR^{+/-}/NDRG Cre; GHSR-null/NDRG Cre mice
*p < 0.01 vs. Tam-

图24. 4HNE 染色

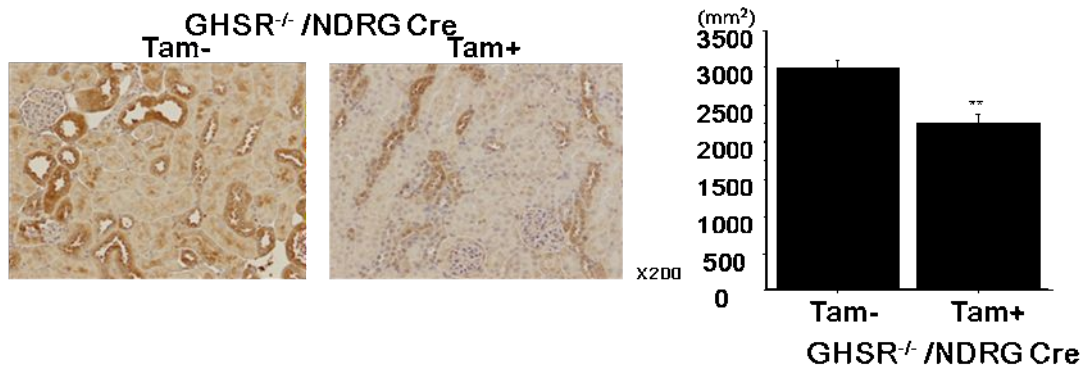
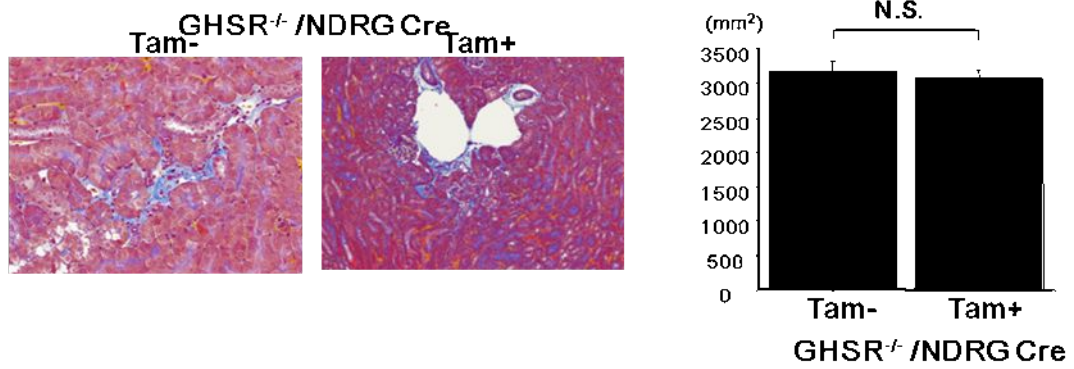


图25. Masson Tricrome 染色



**p<0.01vs. Tam-

