

Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <概要>

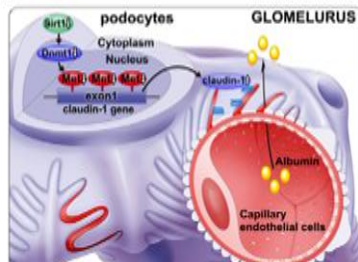
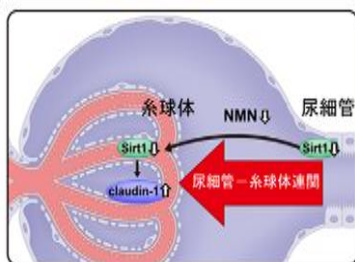
所 属	慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科
氏 名	長谷川 一宏
研究テーマ	近位尿細管 Sirt1 によるポドサイト機能制御機構の解明 —糖尿病性腎症発症における検討

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

背景

NAD 依存性脱アセチル化酵素 Sirt1(サーチュイン)は、カロリー制限で発現が上昇し、長寿や臓器保護に重要な役割を果たす。我々は、腎臓では近位尿細管 Sirt1 が重要であり、In Vitro の系で細胞保護作用を報告し(長谷川ら、BBRC 2008)、続いて生体意義を解明する為、近位尿細管特異的 Sirt1 過剰(Transgenic:Tg)発現マウス・(長谷川ら、JBC 2010)・欠損マウス(Conditional Knockout; CKO)を作製した。更に、我々は、高血圧・腎炎・糖尿病等の病態の異なる腎障害をマウスに惹起し、Sirt1 発現変化が最も顕著であった**糖尿病性腎症**に着目した。Sirt1 は、通常は近位尿細管と足細胞(ポドサイト、糸球体の構成細胞)の双方に発現するが、糖尿病では、まず近位尿細管 Sirt1 が低下し、その結果 Sirt1 由来のニコチン酸代謝産物の Nicotinamide Mono Nucleotide(NMN)の分泌が減少した。NMNの減少で足細胞 Sirt1 も低下し、Epigenetic 制御で本来足細胞に発現していない tight junction の構成分子の Claudin1 の発現が上昇し、足細胞の癒合を引き起こし、蛋白尿が出現する事を報告した(長谷川一宏、Nature Medicine 2013)。これらは Tg マウスで増悪し、CKO マウスで増悪を認めた。この研究で、尿細管から糸球体への尿流と逆行する情報伝達経路(尿細管・糸球体連関と名付けた)を発見した。更に「細胞間連関のメディエーター」として「炎症関連分子」がこれまで注目されてきたが、細胞内ニコチン酸代謝の変化に基づく「細胞代謝産物」(当研究では NMN)をメディエーターとして初めて同定した。更に、Epigenetic 制御による糸球体バリア機能の変化を示し、腎細胞へのストレス刺激の反復(当研究では高糖負荷)により、**エピジェネティクス**の変化で障害が固着する「**病変の不可逆性**」を腎障害で初めて解明した。

上記の成果を下記に論文報告した。その後、Nat Rev Nephrology の Review Article・新聞掲載・医療ニュースサイトで取り上げられた。更に、アジア太平洋腎臓会議 2014 年にて YIA を受賞した。



長谷川一宏、脇野修、林晃一、Leonard Guarente、伊藤裕ら  
Renal tubular Sirt1 attenuates diabetic albuminuria by epigenetically suppressing Claudin-1 overexpression in podocytes.  
Nat Med. 2013 Nov;19(11):1496-504. (News and Views でも取り上げられた)

第 14 回 2014 年 5 月 14-17 日  
アジア太平洋腎臓学会 YIA

[新聞掲載]  
2013 年 10 月 23 日 7 面 日経産業新聞 朝刊  
2013 年 10 月 22 日 3 面 読売新聞 夕刊  
[取り上げられた Review Article]



Nature Review Nephrology 2013 Dec;9(12):696 等

上記の背景をもとに、以下に述べる研究を今後遂行する研究計画を立案した。

**目的:尿細管 Sirt1 の低下のメカニズムの解明**

最近我々は Sirt1(Sirtuin 1)の糖尿病性腎症における意義を報告した(Nat Med 2013)。今回 SglT2 阻害剤が Sirt1 に及ぼす影響と腎局所の作用を検討する計画を立案した。近位尿細管細胞を Cell Insert 底面に培養し、上層:Cell Insert(細胞の Apical=尿管腔側)と下層;6 穴 Dish(Basolateral=血管腔側)に、Normal (NG)と High Glucose (HG)を組み合わせる培養し、SglT2 発現がどちらの刺激(Polarity)に依存するか検討した。続いて db/db マウスに SglT2 阻害剤を投与し、8 週後に解析した。その結果、上層を NG, HG、下層を NG,HG とした 4 通りで、下層が HG の際に SglT2 上昇と Sirt1 低下を認め、血管腔側 HG(In vivo の血糖上昇に相当)が重要と分かった。更に In vivo でも、db/db の血糖上昇による SglT2 上昇・Sirt1 低下を SglT2 阻害剤が抑制した。HG による SglT2 発現増加の原因と Sirt1 低下が及ぼす下流の標的分子変化を解析し、実臨床での糖尿病性腎症の先制医療の新規治療標的としての可能性を見出したいと考えた。

我々は糖尿病性腎症早期に血糖上昇が糖輸送体 SglT2(sodium glucose cotransporter 2)の発現亢進(図 1)を介し、Sirt1 を低下させる(図 2)事、又、SglT2 阻害剤がこれらを抑制し、全身の血糖低下のみならず、腎局所 Sirt1 低下を抑制する事を見出した。従って、第一に、高糖負荷が SglT2 の発現亢進を来すメカニズムの同定を行ない、第二に、Sirt1 が低下した結果、その下流で生じる分子変化を同定し、NMN 低下が糸球体に波及する「尿細管・糸球体連関の破綻」のみならず、そもそも尿細管自身へ影響が生じるか明らかにした。

我々は、当研究で、SglT2-Sirt1 の経路の上流と下流の詳細を解明したい。既に開始している予備検討で、高糖負荷により尿細管頂側に発現する SglT2 発現が亢進(図 1)し、尿細管細胞内への糖取り込みが増加し、(細胞内高糖が NAD 低下をもたらし、Sirt1 発現が低下すると、Sirt1 下流の Forkhead family などの転写因子(FoxO や FoxA)活性も低下し、FoxO や FoxA は逆に Sirt1 の上流から転写活性を制御している為、結果として Sirt1 の転写と蛋白発現も低下する既報がある)Sirt1 発現が低下する事を明らかにした(図 2)。又、マイクロアレイやその後の確認実験で、Sirt1 低下の下流の分子変化としては、糖新生経路律速酵素である PEPCCK(phosphoenolpyruvate carboxykinase)、G6Pase(glucose-6-phosphatase)の発現が上昇していた(図 3)。すなわち近位尿細管においては、SglT2 を介した糖の取り込みのみならず、糖新生により新たに産生された糖の二者が Sirt1 低下を持続させる悪循環シグナルが存在すると考察した。一方、SglT2 阻害薬は糖取り込みを抑制するだけでなく、Sirt1 を保持する事で、糖新生を抑制する double effect を発揮し得る可能性を見出した。

SglT2-Sirt1 連関に介入し、新規の糖尿病性腎症の制御方法の開発と先制医療の実践を行ないたい。又、我々は SglT2, Sirt1 の蛍光免疫染色、免疫電顕等のプロトコルをヒト、マウス、培養細胞含め(図 4)確立済みである。Sirt1 解析法を習熟している我々が、当研究を遂行する意義は高いと考え、更に研究を遂行した。

図 1. 糖尿病性腎症で SglT2 上昇

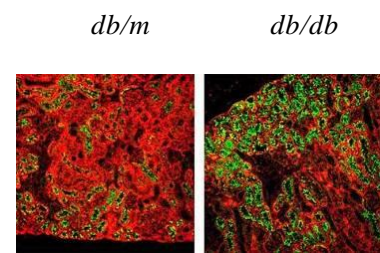


図 2. SglT2 阻害剤が Sirt1 を保持

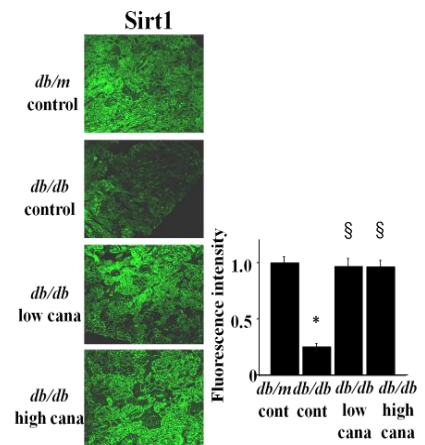


図 3. SglT2 阻害剤が糖新生抑制

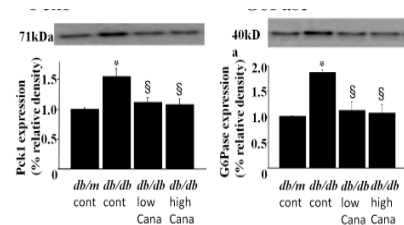
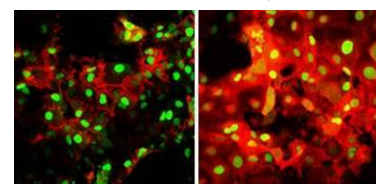


図 4. 尿細管細胞 SglT2 免疫



Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科
氏 名	長谷川 一宏
研究テーマ	近位尿細管 SIRT1 によるポドサイト機能制御機構の解明 —糖尿病性腎症発症における検討

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

概要・目的: SglT2 を介し尿管腔から流入する糖と Sirt1 低下自身による尿細管での糖新生亢進とが、糖を常時上昇させる悪循環の存在を明らかにするとともに、この悪循環を SglT2 阻害剤が阻止し、腎と尿細管保護を来す詳細なメカニズムを解明した。方法は、特に SglT2-Sirt1-糖新生酵素の動態を、Cell insert を用いた 2 chamber system において上層を尿管腔に、下層を血管腔に想定した培養系を構築し、血管腔側からの高糖負荷時に SglT2 発現が亢進するメカニズム(SglT2 上昇の機序)を解明した。さらに、Sirt1 低下が糖新生酵素の発現を亢進させる機序を(Sirt1 低下の下流)を解析した。今後は、SglT2 上昇・Sirt1 低下が実験動物に留まらず、ヒト糖尿病性腎症でも重要な腎生検で検討し、「糖尿病性腎症早期の発症マーカー」としての意義を確立し、先制医療を実践したい。

方法・結果

SIRT1 低下の下流の解析

予備検討を既に開始しており、db/db, db/m マウス(control)の 8 週齢オスに SGLT2 阻害薬 Canagliflozin (Cana)を投与した(図 5)。28 年度においてはこの Sirt1 低下が腎糖新生酵素の発現(G6Pase, PEPCCK)を亢進する機序を解明したい。

図 5. SglT2 阻害剤投与

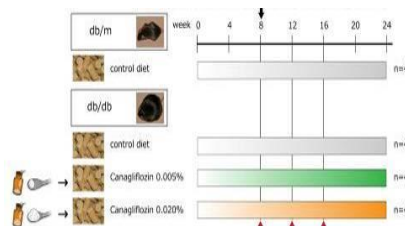


図 6. Sirt1 と糖新生

Sirt1-related gluconeogenesis regulator

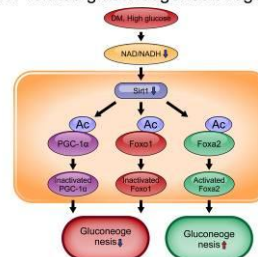
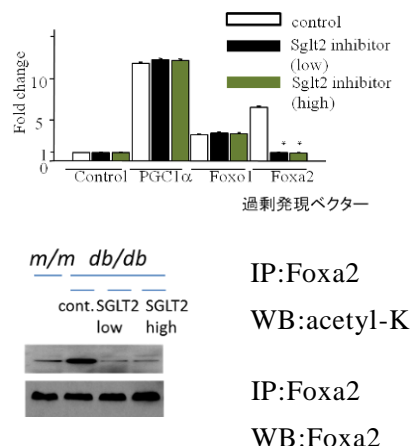


図 7. Sirt1 ↓ ⇒ Foxa2 アセチル化



既報では、PGC-1α・Foxo1 アセチル化は糖新生抑制を来し、Foxa2 アセチル化は糖新生を亢進する(Cell Metablism 2013)事が報告されている(図 6)。既に開始した予備検討で培養近位尿細管細胞で、G6Pase promoter の luciferase ベクターと PGC1α、Foxo1、Foxa2 各ベクターを過剰発現し、SglT2 阻害剤を投与した。いずれのベクターでも G6Pase の転写活性上昇を認めたが、重要な事に SglT2 阻害剤では Foxa2 でのみ G6Pase 活性上昇が抑制され(図 7 上)、SglT2 阻害剤が Sirt1 保持を介し、Foxa2 の転写活性を抑制する可能性を見出している。実際に、db/db では Foxa2 のアセチル化も亢進し、SglT2 阻害剤投与で抑制される事を確認している(図 7 下)。

今後は、まず Foxa2 ベクターを過剰発現した際に、G6Pase と PEPCCK 発現が上昇し、SglT2 阻害剤の投与では両者が低下するかを検討する。次に、ChIP assay で、Foxa2 過剰発現にて G6Pase・PEPCCK promoter 領域への結合活性が上昇し、SglT2 阻害剤でその結合が阻害されるか解析する。

また、Sirt1 と Foxa2 が互いに結合しているか確認するため、両者のベクターを過剰発現し、免疫沈降等を行い、Sirt1 が Foxa2 と直接結合し、脱アセチル化することを検討解析する予定である。Canagliflozin が有効に且つ特異的に SglT2 を阻害できるかについては、事前に十分予備検討を重ねているが、他の SglT2 阻害剤や siRNA、CRISPR の使用も併用し、検討を行なう。

### SglT2 上昇の上流の解析

本年度は、血管腔側の高糖刺激が尿管腔側での SglT2 発現を上昇させる際に、高糖刺激をどこが感知し、SglT2 発現上昇を来すのか、検討を進めたい。我々は図 8 に示す double chamber system の培養系を使用した予備検討を開始した。6 穴 Dish に Cell Insert を組み合わせ、底面で細胞を培養し、上層を尿管腔細胞の尿管腔側、下層を血管腔側とみなし、Normal Glucose(NG)・High Glucose(HG)の medium を組み合わせて近位尿管細胞(Polarity を保った primary culture の細胞)を培養する。SglT2 発現上昇刺激の高糖負荷の polarity の存在について、その詳細を検討する。

既に予備検討により、血管腔側での高糖刺激を Glut2 が感知し、importin- $\alpha$ 1 により HNF-1 $\alpha$  が核内に輸送され、SglT2 の転写・発現増加に寄与する経路を同定している(図 9)。Glut2 は通常 apical $\Rightarrow$ basolateral への糖輸送体であるが、一時的に basolateral (血管腔側)の高糖が生じる状態、すなわち糖尿病初期にまず高「血糖」を来す段階では、Glut2 を逆流した糖そのものが SglT2 上昇を来す刺激シグナルになる新規の病態メカニズムである。その後、尿管の再吸収能を超える血糖域に達すると、高血糖のみならず高「尿糖」を生ずる経過をたどるが、血中・尿中とも高糖になり濃度勾配が無いにも関わらず、SglT2 発現亢進が続く機序を上層下層を HG とした際の分子変化の解析等で、検討していきたい。

図 8. 糖刺激の検討

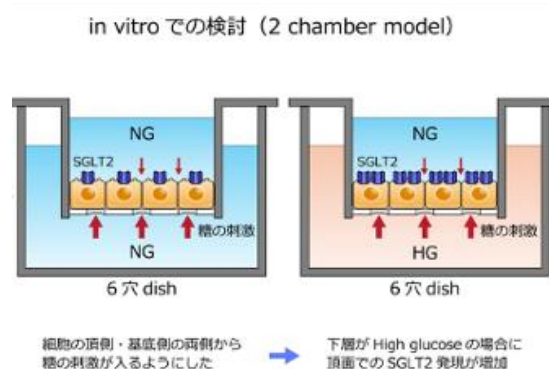
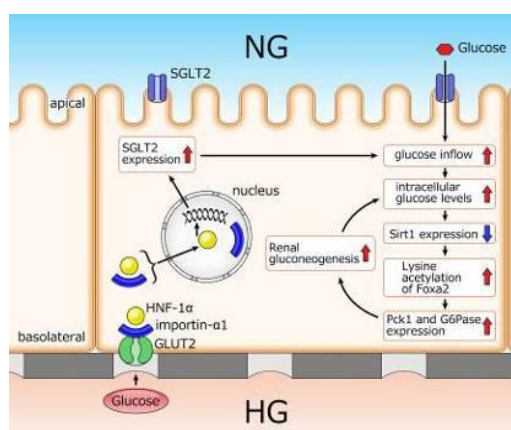


図 9. SglT2 上昇の要因と影響

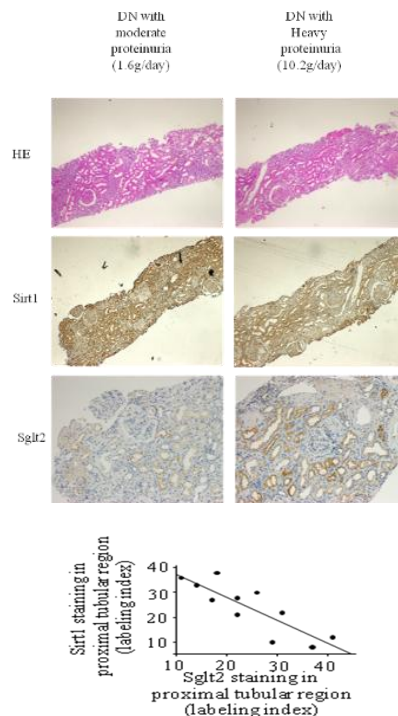


目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

**ヒト腎生検による解析**

今回の結果より、我々は、ヒト腎 SglT2 上昇、Sirt1 低下を超早期糖尿病腎症バイオマーカーとして確立し、NMN 補充療法を展開したいと考える。既に倫理委員会の承認・患者への口頭・文書による同意を得て、30 検体の DN(対照:正常)の予備検討を開始している。SglT2,Sirt1 抗体を用いたヒト検体における免疫染色のプロトコールを確立し、施行した(染色例を図 10 に提示)。その結果尿細管 SglT2 上昇と Sirt1 低下が相関し、ヒトでも重要性が示唆される結果を得た。今後は SglT2 上昇の上流分子、アセチル化 Foxa2 等の Sirt1 低下の下流の分子の発現や臨床データとの相関を検討したい。

図 10. ヒト腎生検



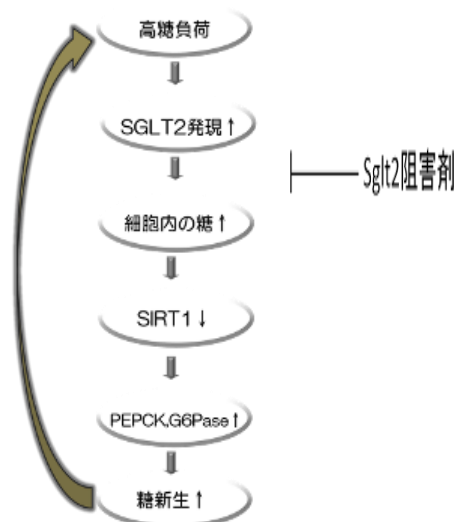
SglT2 上昇と Sirt1 低

下がヒトでも相関

図 11. 結果の概要

**考察と今後の課題**

我々は、当研究で、SglT2-Sirt1 の経路の上流と下流の詳細を解明した(図 11)。今後の課題として、SglT2-Sirt1 関連に介入し、新規の糖尿病性腎症の制御方法の開発と先制医療の実践を行ないたい。



今後、更に詳細なメカニズムを同定する事で、SglT2 以外にも直接治療標的となる分子を同定できる可能性がある

**Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—  
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>**

所 属	慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科
氏 名	長谷川 一宏

**1. 論文発表実績**

- ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。
- ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。
- ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。
- ・ 国内外雑誌を問わない。
- ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。
- ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。

**① <論文 PDF 添付あり>**

1	Wakino S, <u>Hasegawa K</u> , Itoh H. Sirtuin and metabolic kidney disease. <b>Kidney Int. 2015 Oct;88(4):691-8. 査読有り (impact factor 8.5)</b>
2	<u>Hasegawa K</u> , Wakino S, Simic P, Sakamaki Y, Minakuchi H, Fujimura K, Hosoya K, Komatsu M, Kaneko Y, Kanda T, Kubota E, Tokuyama H, Hayashi K, Guarente L, Itoh H. Renal tubular Sirt1 attenuates diabetic albuminuria by epigenetically suppressing Claudin-1 overexpression in podocytes. <b>Nat Med. 2013. 19(11):1496-504. 査読有り (impact factor 24.3)</b>
3	<u>Hasegawa K</u> , Wakino S, Kimoto M, Minakuchi H, Fujimura K, Hosoya K, Komatsu M, Kaneko Y, Kanda T, Tokuyama H, Hayashi K, Itoh H. The hydrolase DDAH2 enhances pancreatic insulin secretion by transcriptional regulation of secretagogin through a Sirt1-dependent mechanism in mice. <b>FASEB J. 2013. 27:2301-15. 査読有り (impact factor 5.7)</b>

**② <論文 PDF 添付なし>**

1	
2	
3	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。</li> <li>・ 国内外を問わない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	投稿済み 2014年7月掲載	『DIABETES UPDATE』3巻3号(2014年7月号)掲載 海外文献紹介への原稿 株式会社メディカルレビュー社
2	投稿済み 2014年7月掲載	脳心血管抗加齢研究会機関誌「Anti-aging Science」7月号 掲載 Anti-Aging の Key Molecule の解説 株式会社メディカルレビュー社
3	招聘講演 2014年7月11日	第32回内分泌代謝学セミナー 長谷川一宏 「尿細管一系球体連関:近位尿細管特異的 Sirt1 遺伝子改変マウス」
4		
3. 投稿、発表予定(投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		