

## 論文の内容の要旨

論文題目      **The establishment of assay system of renal senescence  
and its regulation**

和訳              腎臓の老化の評価システムの確立とその調節

指導教員              藤田敏郎教授

東京大学 大学院 医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻（腎臓内科学）

氏名              池田洋一郎

生物は老化する。老化のメカニズムは、遺伝子異常、代謝産物としての活性酸素、異常タンパク蓄積などの説により説明されているが、どれも一元的に説明できるものではなく、またお互いに排他的でもない。この中で活性酸素による説は、活性酸素が多い状態で短命の生物が多いことから正しいと考えられている。逆に、活性酸素を除去することにより長寿になるかという命題については、未だ証明されたとはいえない。例えば、ビタミン C やビタミン E は強い抗酸化作用を示すが、それらで寿命が延びたという報告は皆無であり、また **catalase** を過剰発現させることでマウスの寿命が延長したという報告もあるが、追試は失敗している。これは活性酸素が細胞分裂や免疫反応に重要な働きを担っていることに起因すると説明されることもある。このように考えると、活性酸素が産生され、反応した後にできる副産物のうち、反応性の高いものを分解すれば長寿を導くことができる可能性があると考えられる。また、活性酸素の副産物は、最終的にタンパク質など生体構成成分を修飾し、さまざまな経路でその機能を低下させることが報告されているが、このような系では、反応経路の上流の、活性酸素により近い部位でその反応を阻害することで長寿を導くことができるとも考えられる。このような視点から私は **Advanced Glycation End products (AGEs)** に着目し、特に AGEs が産生される経路の上流で、より反応性の高い活性酸素による代謝産物を分解する系に着目した。これが **glyoxalase system** である。この系では **GSH** を補酵素とする **glyoxalase 1** と **glyoxalase 2** が、極めて反応性の高い **methylglyoxal** を **lactate** に分解する。これにより **methylglyoxal** による細胞障害、およびそれから派生する AGEs の蓄積を防ぐことができる。この系においては **glyoxalase 1** が律速段階になっていることが知られている。**glyoxalase 1** は加齢により減少することが示されており、活性酸素による副産物の除去能は加齢により減弱していくと考えられる。ここで私は **glyoxalase 1** を過剰発現させることで、老化現象は減弱し、長寿を導くことができるという仮説を立てた。

ヒトでは加齢に伴い腎機能が低下することが分かっている。腎機能が低下する病態は慢性腎臓病 **CKD** と称されるが、この中に進行性の腎疾患が含まれている一方、生涯にわたりそれ単独では末期腎不全にいたらない状

態も含まれている。加齢はその中のひとつと考えられる。進行性の腎疾患における、原疾患によらない共通の腎臓の形態学的な変化は尿細管萎縮と間質線維化によって代表されるが、老化の形態学的な変化については、これまであまり研究がなされてこなかったため、腎臓の老化とはどういうものかはっきりしていない。

このような背景を含め、前述の仮説を証明するため、私は腎臓の細胞あるいは腎臓そのものにおける老化を評価する方法を確立し、glyoxalase 1 の過剰発現あるいは発現減弱により、腎臓の老化がどのように調節を受けるか検討した。

#### 【腎臓の老化の評価系確立～in vitro～】

まず腎臓を構成する主要な構成細胞である、ヒト近位尿細管上皮細胞 (RPTECs) を用いて、継代培養しその phenotype を観察した。この細胞は primary culture であり、継代を繰り返すことにより分裂しにくくなっていく (replicative senescence) ため、継代回数が少ないときと多いときでその違いを見た。老化の評価は RPTECs においては形態学的な評価は困難であったので、senescence-associated  $\beta$  galactosidase (SABG) 染色および, cyclin-dependent kinase inhibitor (p53, p21, p16) の発現を mRNA, タンパクレベルにて評価した (タンパクは p53 のみ)。replicative senescence の状態では、抗 carboxyethyl lysine (CEL) 抗体を用いた免疫蛍光染色により、たしかに AGEs が蓄積していることが確認された。RPTECs の passage 3 と passage 10 を比較すると有意に後者で老化の phenotype が増加していた。加齢の研究は細胞をつかった実験であっても動物をつかったものであっても長期の時間を要することが問題であった。私は過去の報告を検討することで、etoposide が尿細管上皮細胞を老化状態に至らしめることを確認した。

#### 【ヒト腎生検標本を用いた腎臓の老化の組織学的解析】

モデル動物での老化の評価を行う前に、モデル動物の腎臓とヒトの腎臓では老化のパターンが異なる可能性があるため、ヒトの腎生検標本にて老化の組織学的な変化について検討した。健常人の腎組織は入手困難であるため、当科入院の患者で腎生検を行った症例のうち、腎障害の程度の軽度な症例に限定して (具体的には eGFR>60mg/min/1.73m<sup>2</sup> (CKD stage1~2) かつ尿タンパク $\leq$ 1g/day), その組織における年齢とともに変化する形態学的変化を検討した。結果として加齢に伴い間質肥厚 (interstitial thickening) が増加することがわかった。これは慢性腎不全時に認められる尿細管の萎縮・脱落を伴うびまん性間質線維化とは異なり、尿細管が保たれていながら尿細管細胞の基底膜と尿細管周囲毛細血管 (peritubular capillary) によって構成される間質のみが肥厚するというものである。この変化は加齢とともに増加し、強い相関があることがわかった。

#### 【腎臓の老化の評価系の確立～in vivo～】

野生型ラットを用いて短期飼育した群と長期飼育した群で、加齢の変化を検討した。過去の報告および予備実験から、14ヶ月を長期飼育群として評価し、短期飼育群は10週齢とした。長期飼育群ではたしかに CEL によるタンパク修飾を見る実験から AGEs が蓄積していることが確認された。前述のような腎臓における形態学的変化および、SABG 染色, p53, p21, p16 の mRNA およびタンパクレベル (タンパクは p53 と p16 のみ) にて評価した。ラットの腎臓においてもヒト腎生検で認められた間質肥厚 (interstitial thickening) が老化時に認められ、さらに腎皮質の SABG 染色でも加齢により陽性領域が増加した。また p53, p21, p16 の mRNA すべてが有意に増加し、また p53 と p16 タンパクも加齢により増加していた。

#### 【glyoxalase 1 の増減による加齢変化への影響～in vitro～】

前述の RPTECs および etoposide を用いた評価系にて、glyoxalase 1 を overexpression あるいは knockdown することで加齢の phenotype に影響が出るかを検討した。GLO1 の overexpression によって etoposide による RPTECs の老化の phenotype を抑制することができ、また siRNA による knockdown によりその老化の phenotype が増強した。

#### 【glyoxalase 1 の増減による加齢変化への影響～in vivo～】

glyoxalase 1 の transgenic rat (GLO1-Tg rat) を作成し、老化現象が glyoxalase 1 の overexpression によ

りどのように変化するか検討した。GLO1-Tg rat は同齡の野生型の約 6 倍の GLO1 活性を有しており、野生型では加齡により減少していたにもかかわらず、GLO1-Tg rat は加齡により GLO1 活性は減弱しなかった。また野生型では加齡により蓄積が確認された CEL によって検出される AGEs は、GLO1-Tg rat では同齡の野生型よりも著明に減少していた。加齡に影響を与えうる体重あたりの摂食量に有意差はなかった。血圧にも有意差は認められず、同齡の群間では体重にも有意差を認めなかった。腎機能の評価として血清クレアチニンを測定すると、野生型では、若年群に対して高齢群は約 1.5 倍で有意差が認められた。それに対して、GLO1-Tg では若年群に対して高齢群に有意差は認めなかった。尿タンパクも同様の傾向があり、野生型では高齢群で有意に増加しているが、GLO1-Tg では若年群と高齢群で有意差が認められなかった。GLO1 活性は GSH 量に依存するため、腎臓での GSH も測定したが、加齡による有意な減少は認められなかった。また腎内 SOD 活性を測定すると、群間で有意差は認められなかった。GLO1-Tg では加齡による間質肥厚が減弱し、SABG 染色陽性面積が減少し、p53, p21, p16 の mRNA レベル増加が抑制され、また p53, p16 タンパク量増加も抑制されていた。

#### 【結論】

我々は腎臓における老化を評価する系を確立し、極めて反応性の高い AGE 前駆体の消去に重要な glyoxalase 1 は尿細管細胞を用いた *in vitro* の実験でも、腎皮質を評価した *in vivo* の実験でも細胞あるいは臓器の老化現象を減少させる作用をもつことを示した。