

特集：腎障害における老化のかかわり

腎臓老化における Sirt1 の関与

Sirt1-mediated autophagy in aging kidney

久米真司*¹ 前川 聡*¹ 古家大祐*²

Shinji KUME, Hiroshi MAEGAWA, and Daisuke KOYA

はじめに

カロリー制限はさまざまな生物種において寿命延長をもたらす。哺乳類においては、動脈硬化や悪性疾患、腎病変など、加齢に伴い増加する疾患の発症予防効果を発揮する。これまで、新たな抗老化治療の可能性を見出すために、カロリー制限状態を模倣し、抗老化をもたらす分子機構の解明が進められてきた。近年、その候補として、ヒストン脱アセチル化酵素(Sirt1)、あるいは細胞内浄化機構であるオートファジーが同定された。その後、Sirt1 やオートファジーの各臓器における生理的役割が徐々に明らかとなり、これらの異常が老化関連疾患や糖代謝疾患の発症に関与し、その活性化による新規治療標的としての可能性が報告されている。われわれも Sirt1 依存的なオートファジーの活性調節が、カロリー制限による抗腎臓老化に必須であることを見出した。そこで本稿では、Sirt1-オートファジー経路の役割を中心に、カロリー制限による抗腎臓老化機構に関して概説する。

カロリー制限による抗腎臓老化

腎臓は老化に伴い機能障害を呈する臓器の一つである^{1,2)}。現在日本では、急速に進む高齢化を背景として、慢性腎臓病を有する患者人口が増加しており、加齢に伴う腎臓障害の発症機構ならびに抑制機構の解明が望まれている。腎臓老化の解剖学的特徴の一つとして腎萎縮が知られているが、その原因として、尿細管細胞における細胞死の増加が関与しているものと考えられている。さらにこの背景に

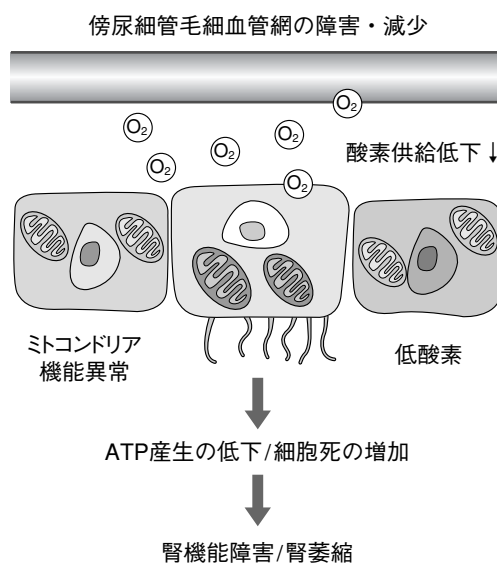


図 1 低酸素と腎臓老化

傍尿細管毛細血管網の減少は尿細管細胞への酸素供給を低下させ、尿細管細胞における低酸素を惹起する。低酸素に起因したミトコンドリア機能異常はその後の腎機能障害、腎萎縮をもたらす。

は、尿細管細胞を取り巻く傍尿細管毛細血管網の減少に起因した尿細管細胞への酸素供給の低下(低酸素)が関与していると考えられている³⁾。この尿細管細胞における低酸素は、ミトコンドリア異常に起因した酸化ストレスの増大、ATP産生の低下をもたらす。尿細管細胞の細胞死や機能障害を引き起こすことで、腎臓老化のみならず、糖尿病性腎症を含む多くの慢性腎臓病の進展にも関与している³⁾。よって、いかにして尿細管細胞を低酸素から保護していくのか、この分子機構の解明が腎臓老化を含む多くの腎疾患に対する新たな治療標的の解明につながるのではないかと考えられている(図 1)。

*1 滋賀医科大学内科学講座 糖尿病腎臓神経内科

*2 金沢医科大学内科学講座 内分泌代謝制御学

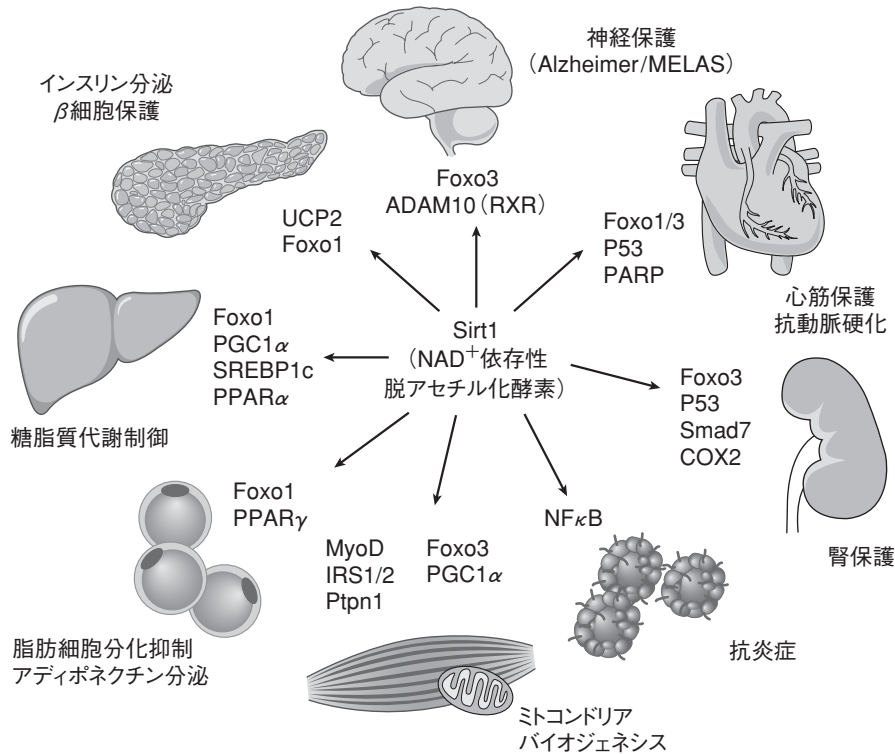


図 2 各臓器における Sirt1 の機能的役割

これまでのマウスを用いた検討から、Sirt1 が全身臓器において絶食条件下でのエネルギー制御を行っていることが明らかとなっている。また、その異常は老化や糖尿病関連疾患の発症に関与している。

カロリー制限により寿命が延長する。この事実は、1935年に McCay らの行ったラットを用いた研究結果により初めて示された⁴⁾。その後、カロリー制限と寿命延長、抗老化に関する研究が進められ、その効果はサル (*rhesus monkey*) といった高等な哺乳類においても確認された⁵⁾。近年、Silent information regulator 2 (mammalian homolog: *Sirt1*) が、カロリー制限による寿命延長に不可欠な抗老化分子として同定された⁶⁾。当初、Sirt1 は NAD⁺ 依存性ヒストン脱アセチル化酵素として同定されたが、その後、この分子は NAD⁺ 濃度を介した細胞内の代謝センサーとして働き、ヒストン以外の核内転写因子に対する脱アセチル化活性を介し、さまざまな臓器における代謝制御、ストレス応答をもたらすことが明らかとなってきた⁷⁾ (図 2)。一方、カロリー制限とミトコンドリアに関する研究から、ミトコンドリアバイオジェネシスならびにオートファジーといった、ミトコンドリア機能調節機構の異常が、加齢に伴う疾患の発症に関与することも示され始めている^{8,9)}。このように、カロリー制限にかかわる研究から見出されてきた分子、あるいは細胞内分子機構の異常は老化にかかわる疾患の原因として注目され、その活性化がさまざまな慢性疾患に対す

る新規治療標的となりうるのではないかと期待が高まっている。

われわれもマウスモデルを用いて、腎老化に対するカロリー制限の腎保護効果、その分子機構の解明を試みた¹⁰⁾。その結果、加齢に伴う腎での異常ミトコンドリア蓄積には、腎での低酸素状態に対するストレス応答性オートファジー活性の低下が関与し、この異常はカロリー制限により改善されること、またその背景には、抗老化分子 Sirt1 によるオートファジー制御が関与していることも明らかとなった。そこで本稿では、Sirt1-オートファジー経路の役割を中心に、カロリー制限による抗腎臓老化にかかわる分子機構に関し概説する。

カロリー制限と低酸素誘導性オートファジー

加齢 (24 カ月齢) マウスの近位尿細管細胞では、異常ミトコンドリア蓄積を伴う酸化ストレスの増大が認められ、酸化ストレスによるミトコンドリア DNA 変異の頻度は腎機能障害の程度 (血清シスタチン C の上昇) と強い正相関を示した。さらに、12 カ月齢から 12 カ月間のカロリー制限

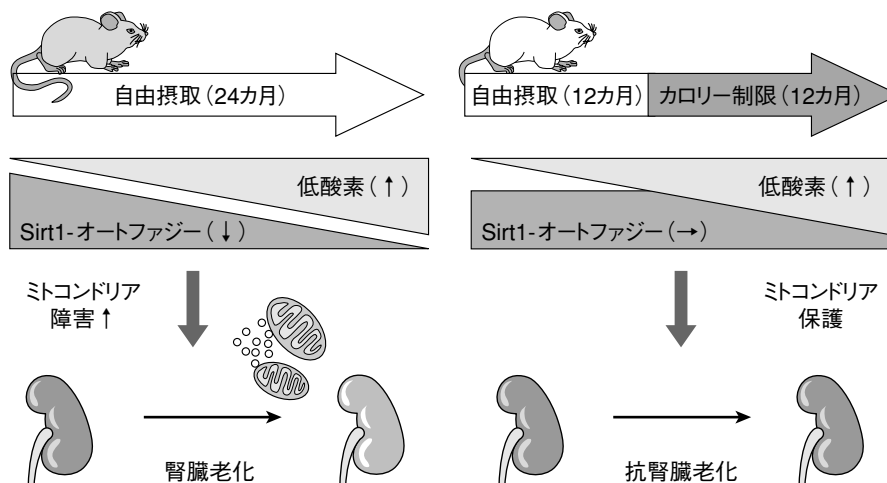


図 3 長期カロリー制限は腎臓老化を抑制しうる

加齢に伴う腎尿細管細胞における低酸素はミトコンドリア機能障害を引き起こす。その背景には Sirt1-オートファジー経路の活性低下が関与する。カロリー制限により Sirt1-オートファジーの活性が維持され、低酸素によるミトコンドリア障害、腎臓老化進展が抑制される。

を行うことで、これらの異常はすべて改善された。この結果は、尿細管細胞におけるミトコンドリア機能異常と腎機能障害との強い関連性を示しており、カロリー制限によるミトコンドリア異常の是正が、腎臓老化の治療標的となりうる可能性を示すものであった¹⁰⁾。

なぜ加齢マウスの腎臓において異常ミトコンドリアが蓄積したのか。「オートファジー」とは細胞内蛋白質やオルガネラの分解機構の一つである。細胞がある種のストレス(アミノ酸飢餓, 異常蛋白質・異常オルガネラの蓄積)に晒されると、細胞内にオートファゴソームが形成される。その後、分解標的分子を集積したオートファゴソームはリソソームと融合し標的分子とともに分解される。このように、オートファジーは飢餓時の細胞内栄養素のリサイクル、ならびに異常蛋白・オルガネラの除去といった細胞内恒常性維持、浄化機構としての役割を担っている¹¹⁾。つまり、われわれの検討で認めた加齢に伴う異常ミトコンドリア蓄積は、加齢腎における潜在的なオートファジー活性の低下を意味する。飢餓に加え、低酸素もオートファジーを惹起するストレスの一つとして知られている¹²⁾。われわれの検討では、加齢腎で低酸素状態が亢進するが、老化した腎尿細管細胞では低酸素刺激に対するオートファジー活性の低下が確認された。カロリー制限を加えたマウスにおいては、腎尿細管細胞での低酸素に対するオートファジー活性が保持され、異常ミトコンドリアの蓄積、腎機能障害は有意に改善を認めた。これらの結果は、加齢性腎病変の進展機構

の解明において、低酸素に対する近位尿細管細胞のオートファジー調節機構の解明が重要であることを示唆するものであった(図 3)。

Bnip3 蛋白は低酸素状態でのオートファジー惹起に不可欠な蛋白として知られているが¹²⁾、加齢腎尿細管細胞では、低酸素刺激下でも Bnip3 発現は有意に低下し、カロリー制限を行うことでこの発現量が回復することが明らかとなった。この結果は、近位尿細管細胞における Bnip3 発現調節が、腎臓の老化にかかわる分子機構として重要な位置を占めていることを示唆していた。

カロリー制限と Sirt1

加齢に伴う腎病変の進展機構ならびにカロリー制限による抑制機構における Sirt1 の関与を検討した。加齢マウス腎において、Sirt1 発現量は有意に減少していた。転写因子 Foxo3a は Sirt1 脱アセチル化活性の基質の一つである¹³⁾。加齢腎において、Foxo3a のアセチル化は亢進しており、発現量のみならず Sirt1 活性も加齢腎において有意に低下していることが示唆された。一方、加齢腎という老化臓器においても、カロリー制限により Sirt1 活性が増強しうることを確認された。

加齢腎で認められた Sirt1 の発現低下が腎病変に及ぼす影響を検討するため、Sirt1 ヘテロ欠損マウスにおける 12 カ月齢での腎病変を検討した。12 カ月齢のワイルドタイプ

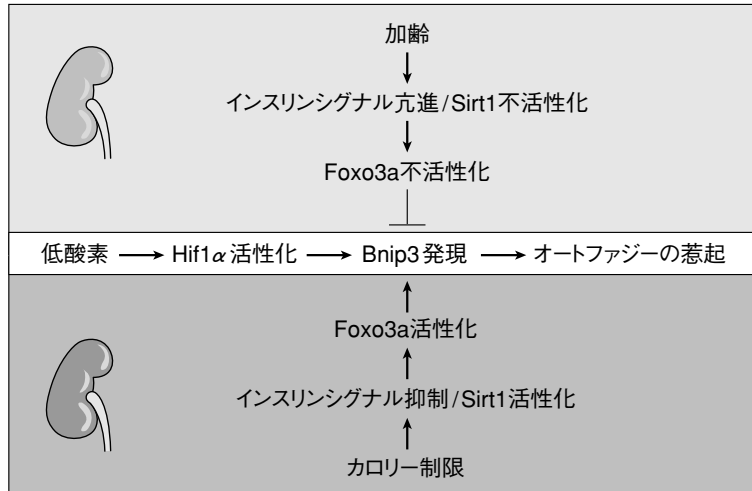


図 4 加齢に伴う Sirt1 活性の低下は加齢腎におけるストレス応答性オートファジー抑制をもたらす

加齢に伴うインスリンシグナルの過剰と Sirt1 不活性化が腎内ストレス応答性オートファジーを抑制する。カロリー制限により、インスリンシグナルを抑制し、Sirt1 を活性化することで低酸素を含むストレス応答性オートファジーを再活性化しうる。

マウスでは加齢に伴う変化は認めず、Sirt1 ヘテロ欠損マウスでは 12 カ月齢という早期から、24 カ月齢マウスと類似した加齢性腎病変を呈し、尿細管細胞における異常ミトコンドリアの蓄積、腎機能障害を認めていた。さらに、Sirt1 ヘテロ欠損マウスにカロリー制限を行ったが、加齢に伴うミトコンドリア異常、腎病変は改善されず、カロリー制限による加齢性腎病変の進展抑制効果には Sirt1 が不可欠であることが示された¹⁰⁾。

また、これらマウス腎尿細管細胞において、異常ミトコンドリア除去機構であるオートファジーの検討を行った結果、Sirt1 ヘテロ欠損マウスでは低酸素刺激に対するオートファジー活性が低下し、カロリー制限によっても回復を認めなかった。この結果から、加齢に伴うオートファジー活性低下に Sirt1 発現の低下が関与し、カロリー制限によるオートファジー活性の回復に Sirt1 が不可欠であることが示唆された¹⁰⁾。

Sirt1 と低酸素誘導性

われわれの検討でも示されたように、Bnip3 蛋白の発現誘導は低酸素刺激に伴うオートファジー誘導に不可欠である。そこで、Sirt1 が腎低酸素状態での Bnip3 発現誘導に関与しうるかを検討した。結果、12 カ月齢の Sirt1 ヘテロ欠損マウスの腎尿細管細胞において、低酸素に伴う Bnip3 発現は有意に減少し、その発現低下はカロリー制限によって

も回復を認めなかった。これらの結果は、腎低酸素条件下において、Bnip3 発現誘導に Sirt1 活性が不可欠であることを示している。

低酸素刺激に曝露された腎尿細管細胞において、脱アセチル化酵素 Sirt1 がいかに Bnip3 発現を調節し、オートファジーを誘導しうるのかを、培養近位尿細管細胞を用いて検討した。結果、腎における転写因子 Foxo3a の活性が、インスリンシグナルによるリン酸化と Sirt1 による脱アセチル化のバランスにより制御されており、その活性化が低酸素条件下での Bnip3 発現誘導に必須であることが明らかとなった。加齢で亢進する腎インスリンシグナルの亢進は、Foxo3a のリン酸化(不活性化)をもたらし、Bnip3 発現、低酸素条件下でのオートファジーを抑制する(図 4)。このオートファジーの抑制はミトコンドリア酸化ストレスの増大をもたらし、細胞死を誘導する。一方、カロリー制限を行い、インスリンシグナルが抑制され、Sirt1 が活性化した状況では、Foxo3a は脱リン酸化、脱アセチル化され、転写活性が増強する。結果、低酸素条件下での Bnip3 発現、オートファジー活性が増強し、酸化ストレス軽減につながるということが明らかとなった¹⁰⁾(図 4)。

Sirt3 と腎臓老化

レニン・アンジオテンシン系(RAS)は、生物が陸上生活を始めるにあたり獲得した体内ナトリウム量の調節機構で

あり、われわれが陸上で生活するためには不可欠な機構である。しかし一方で、過剰な RAS の活性化は高血圧や腎臓病、動脈硬化などのさまざまな疾患を引き起こす原因と考えられている。また、アンジオテンシン Type 1 受容体 (AT1R) 欠損マウスが野生型に比し長生きするという報告がなされ、RAS が寿命を制御している可能性が報告された¹⁴⁾。この報告のなかで、腎臓における Sirt3 発現の増強が、AT1R 欠損マウスにおける寿命延長に関与していたのではないかと考察されている¹⁴⁾。Sirt3 は Sirt1 から Sirt7 まで存在する哺乳類 sirtuin ホモログの一つで、ミトコンドリアに局在する NAD⁺ 依存性脱アセチル化酵素である。われわれも腎近位尿管細細胞における Sirt3 の腎保護機構を検討した結果、Sirt3 は尿蛋白や脂肪酸流入に伴う尿管細細胞障害に抑制的な効果を発揮しうることが明らかとなった¹⁵⁾。これらの結果は、核内に存在する Sirt1 に加え、ミトコンドリアに局在する Sirt3 もまた、カロリー制限による腎保護やミトコンドリア機能保護に関与している可能性を示唆しており、今後の治療標的としての可能性を期待させるものである。

おわりに

われわれの検討から、カロリー制限による Sirt1-オートファジー経路の活性化が腎臓老化に予防的に働くことが明らかとなった。これらの結果は、腎臓老化にかかわる分子機構の解明に一步近づいたのみならず、Sirt1-オートファジー経路の活性化によるミトコンドリア保護、酸化ストレス産生の減少を標的とした抗腎臓老化治療の可能性を示唆している。このように、Sirt1-オートファジー経路の重要性が明らかとなったものの、これらは、おそらくカロリー制限による腎保護機構の一端を担っているに過ぎない。長い進化の過程において、生物は飢餓という生命にとって最も危険なストレスに対抗するための機構を最も進化させ、そして保持してきたと思われる。Sirt1-オートファジー経路が腎臓においても保持されていることは、腎臓にもカロリー制限や絶食に応答する分子機構が備わっていることを示唆している。今後もカロリー制限に関連した腎保護機構やストレス応答機構を解明することで、新たな治療標的が見出されるのではないかと期待している。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G, Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 1-12.
2. Epstein M. Aging and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 1106-1122.
3. Mimura I, Nangaku M. The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6: 667-678.
4. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon ultimate body size. 1935. *Nutrition* 1989; 5: 155-171.
5. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 2009; 325: 201-204.
6. Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 2000; 289: 2126-2128.
7. Liang F, Kume S, Koya D. SIRT1 and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* 2009; 5: 367-373.
8. Lopez-Lluch G, Irueta PM, Navas P, de Cabo R. Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol* 2008; 43: 813-819.
9. Salminen A, Kaarniranta K. Regulation of the aging process by autophagy. *Trends Mol Med* 2009; 15: 217-224.
10. Kume S, Uzu T, Horiike K, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, Araki S, Sugimoto T, Haneda M, Kashiwagi A, Koya D. Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *J Clin Invest* 2010; 120: 1043-1055.
11. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007; 21: 2861-2873.
12. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 2008; 283: 10892-10903.
13. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004; 303: 2011-2015.
14. Benigni A, Corna D, Zoja C, Sonzogni A, Latini R, Salio M, Conti S, Rottoli D, Longaretti L, Cassis P, Morigi M, Coffman TM, Remuzzi G. Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 524-530.
15. Koyama T, Kume S, Koya D, Araki S, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sugimoto T, Haneda M, Sugaya T, Kashiwagi A, Maegawa H, Uzu T. SIRT3 attenuates palmitate-induced ROS production and inflammation in proximal tubular cells. *Free Radic Biol Med* 2011; 51: 1258-1267.