

腎臓の老化に対するカロリー制限の効果

北田 宗弘¹⁾ 久米 真司²⁾ 古家 大祐¹⁾

要約 カロリー制限は様々な生物種において寿命延長をもたらし、また哺乳類における老化関連疾患の発症を抑制する。これらカロリー制限の効果には、SIRT1 (NAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素) や細胞内浄化機構オートファジーを介した機序が関連していることが、様々な臓器において明らかとなってきた。そして、SIRT1あるいは、オートファジーの活性化を分子標的とした戦略が、新規の抗老化治療として期待されている。腎臓は、加齢に伴う老化により機能障害を呈する臓器の一つである。加齢マウスの腎臓では、SIRT1の活性低下とそれに伴うストレス応答としての低酸素誘導性オートファジーの機能の破綻が生じ、その結果ミトコンドリア機能異常が惹起される。一方、カロリー制限は、腎臓におけるSIRT1の活性化を保持することにより加齢マウスの腎臓でみられるこの低酸素誘導性オートファジーの破綻を回復し、低酸素に起因する腎尿細管細胞死を抑制することで腎保護効果を発揮する。

Key words : カロリー制限, 老化腎, SIRT1, 低酸素, オートファジー

(日老医誌 2013; 50:734-739)

はじめに

カロリー制限は、酵母などの下等生物から哺乳類まで様々な生物種において寿命延長効果をもたらし、また哺乳類においては、糖尿病、心血管疾患、動脈硬化、悪性疾患など、加齢に伴い増加する老化関連疾患の発症予防効果をも発揮する。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。その結果、その候補として、NAD⁺依存性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され、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、それらの活性化が新規の抗老化治療標的として注目されている。我々は、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、老化腎に対するカロリー制限の効果とその機構について概説する。

カロリー制限の寿命延長効果

1935年、MaCayらはラットへのカロリー制限が最大寿命を延長させることを報告した。それ以降、酵母・ハエ・線虫・マウス・ラットなど様々な実験動物においてカロリー制限の寿命延長・老化関連疾患の発症抑制効果が検証され、現在のところカロリー制限は実験的に唯一確立された“アンチエイジング法”として認識されている¹⁾。2009年、アカゲザルにおける20年にわたる長期的なカロリー制限(30%制限)の死亡率と老化関連疾患の発症に対する効果を観察した結果が報告された²⁾。それによると、通常量の餌を与えたサルが50%生存している時点で、カロリー制限をしたサルは80%も生存しており、さらに、カロリー制限したサルでは、通常食のサルと比べて糖尿病・悪性腫瘍・循環器系疾患・脳萎縮を含む老化関連疾患の発生率が有意に減少していた。また、カロリー制限したサルは見た目の毛並も良く若々しい。

ヒトに対して長期間のカロリー制限の寿命延長効果を、無作為比較臨床試験として行い検証することは困難である。しかし、ヒトに対するカロリー制限の意義を考える上で興味深い報告がいくつかなされている。カロリー制限が健康寿命を延長するとの予測のもと自主的にカロリー制限を行っている団体(The Caloric Restriction Optimal Nutrition Society)の会員を対象に、平均6年

The effects of calorie restriction on aging kidney

1) Munehiro Kitada, Daisuke Koya : 金沢医科大学糖尿病・内分泌内科学

2) Shinji Kume : 滋賀医科大学糖尿病・腎臓・神経内科

間にわたるカロリー制限 (1,800 kcal ; 通常食の 30% 制限にあたる) を行った群と通常食群の比較実験の結果が報告されている。CR 群では、体重・血圧・血中コレステロール・血糖値・インスリン値・CRP の有意な減少のみならず、頸動脈内膜中膜肥厚の改善も観察された³⁾。加えて、カロリー制限群では、通常食群と比べ左拡張機能 (心臓の加齢的变化の指標の一つ) が保持され、血中 TNF- α ・TGF- β 値も低値であった⁴⁾。以上より、ヒトに対するカロリー制限は、インスリン抵抗性・高血圧・脂質異常・心臓病・動脈硬化症・癌を含む老化関連疾患の発症を抑制する可能性があるが、寿命延長効果は不明である。

カロリー制限と SIRT1, オートファジー

カロリー制限はどのような機序で寿命延長効果を発揮するのか? Sir2 (Silent information regulator 2) が、酵母における栄養素 (グルコース) の制限と寿命の延長効果に関する研究において同定された⁵⁾⁶⁾。Sir2 のホモログは、サーチュインとして知られ、哺乳類では、7 種類のサーチュイン (SIRT1~7) が同定されている。その中で SIRT1 は、カロリー制限によりその発現と活性が様々な組織あるいは細胞において増加することが知られ、最も広く研究されている。SIRT1 は、栄養不足の状態を感知するセンサーの働きをする NAD⁺ 依存性脱アセチル化酵素である。SIRT1 は、標的分子としてヒストン、転写因子・コファクター (FOXO, NF-kB, PGC-1 α , p53 など) などを脱アセチル化して、その結果、DNA 損傷の修復・抗酸化ストレス、オートファジーの促進、ミトコンドリア・バイオジェネシス、抗炎症、抗アポトーシスを介して、糖脂質代謝やストレス抵抗性などの細胞機能の調節に重要な役割を果たしている (図 1)⁷⁾⁸⁾。実際、現在までに様々な実験動物モデルにおいて、SIRT1 の活性化によって老化関連疾患 (糖尿病、心血管疾患、腎臓病、炎症性疾患、神経変性疾患、認知症など) の発症抑制効果が明らかにされてきた。しかし、当初から期待されてきたカロリー制限の寿命延長効果が、主にこの SIRT1 を介した作用によるかどうかに関しては否定的な研究結果も報告されており⁹⁾、今のところ結論を得るには至っていない。

「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。細胞がストレス (アミノ酸飢餓、ER ストレス、酸化ストレス、低酸素、異常蛋白質・異常オルガネラの蓄積) に曝されると、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

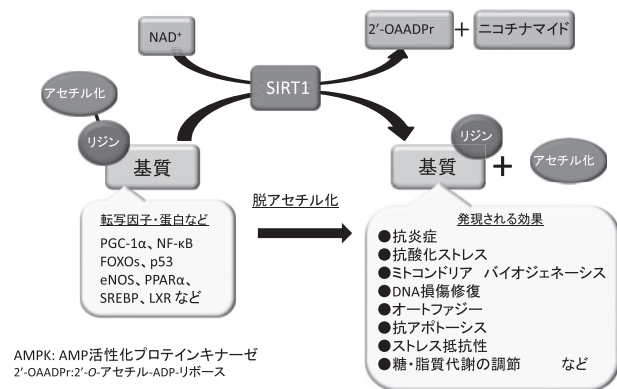


図 1 SIRT1 (NAD⁺依存性脱アセチル化酵素) は、多くの転写因子・蛋白の脱アセチル化を介して、細胞保護効果を発揮する。

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、ならびにストレス状態下での異常蛋白・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¹⁰⁾。したがって、オートファジーの機能低下は老化の促進あるいは、老化関連疾患の発症・進展に関与していると考えられている。

加齢腎に対するカロリー制限の効果

現在、日本は、急速に進む高齢化社会をむかえ、今後さらに慢性腎臓病を含む老化関連疾患の患者人口が増加することが予測される。腎臓は加齢に伴い機能障害を呈する臓器の一つであるとともに、加齢は糖尿病腎症を含む慢性腎臓病の発症・進展に対する危険因子の一つとして認識されている⁸⁾¹¹⁾¹²⁾。腎臓の老化の解剖学的特徴の一つとして、尿細管細胞萎縮が知られているが¹²⁾、その原因として、尿細管細胞における細胞死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¹³⁾。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し、尿細管細胞の細胞死や機能障害を引き起こす (図 2)¹³⁾。では、前述のごとく、カロリー制限は腎臓においても抗老化効果を発揮するのか? もしそうなら、いかなる機序を介するのか? その点を解決するために、我々はマウスモデルを用いて、腎臓の老化に対するカロリー制限の腎保護効果とその分子機構の解明を試みた¹⁴⁾。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

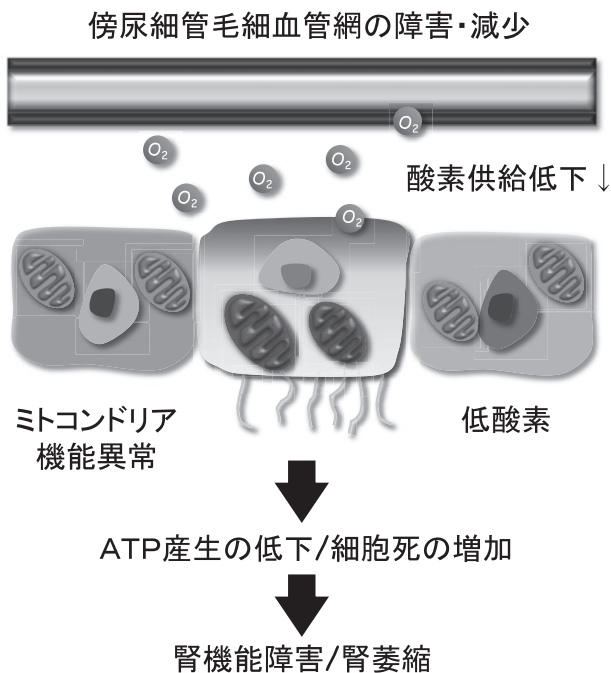
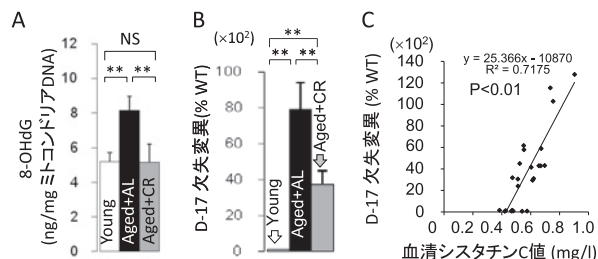


図2 傍尿細管毛細血管網の減少に起因した近位尿細管細胞への酸素供給の低下（低酸素）は細胞内機能障害や細胞死を惹起し、腎臓老化の一因となる。

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と強い正相関を示した (図3)。一方、12カ月齢から12カ月間に亘るカロリー制限 (40% 減量) を行うことで、これらの異常はすべて改善された (図3)。この結果は、尿細管細胞におけるミトコンドリア機能異



Young: 3ヶ月齢マウス腎
 Aged+AL: 自由摂取24ヶ月齢マウス腎
 Aged+CR: 12か月間カロリー制限した24ヶ月齢マウス腎

**p<0.05

図3 カロリー制限による加齢腎におけるミトコンドリア DNA 異常の改善効果：(A, B) 加齢腎でのミトコンドリア DNA における 8-OHdG 含量ならびに欠失変異は有意に増加し、12カ月間のカロリー制限により改善する。(C) ミトコンドリア遺伝子変異の頻度と血清シスチン C 値は正相関する。(文献9より改変)

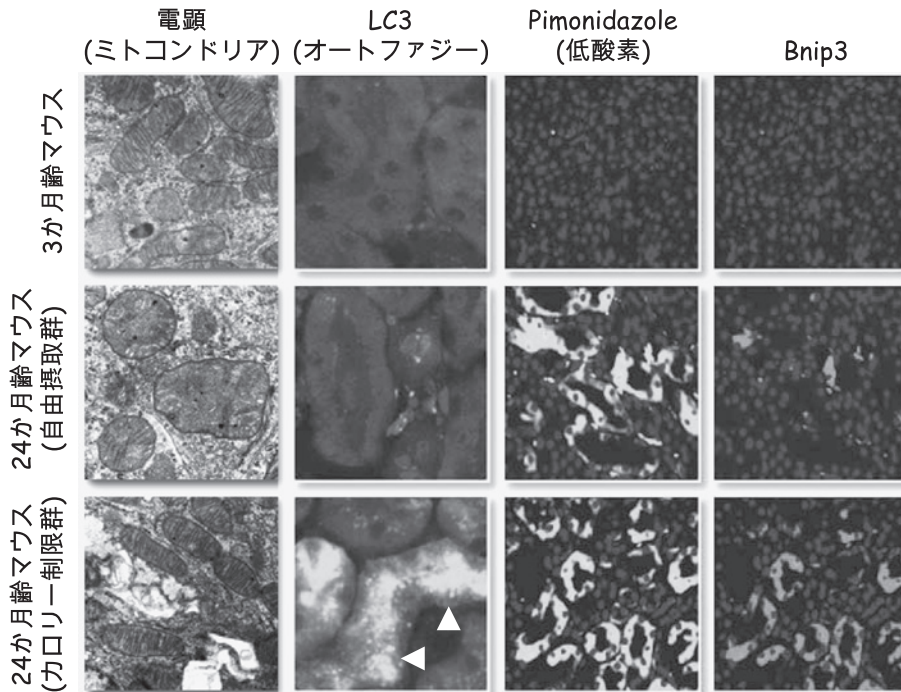


図4 カロリー制限による加齢腎におけるオートファジーの活性化：若年マウス腎尿細管細胞では低酸素も認めず、ミトコンドリア障害は生じない (上段)。加齢マウス腎尿細管では低酸素状態での Bnip3 発現、オートファジー活性が低下し、異常ミトコンドリアが蓄積する (中段)。12カ月間のカロリー制限により加齢マウス腎尿細管細胞においても、低酸素状態での Bnip3 発現、オートファジー活性は保たれ、ミトコンドリア形態は保持される (下段)。矢頭：点状シグナルはオートファゴゾーム形成を示す。(文献9より改変)

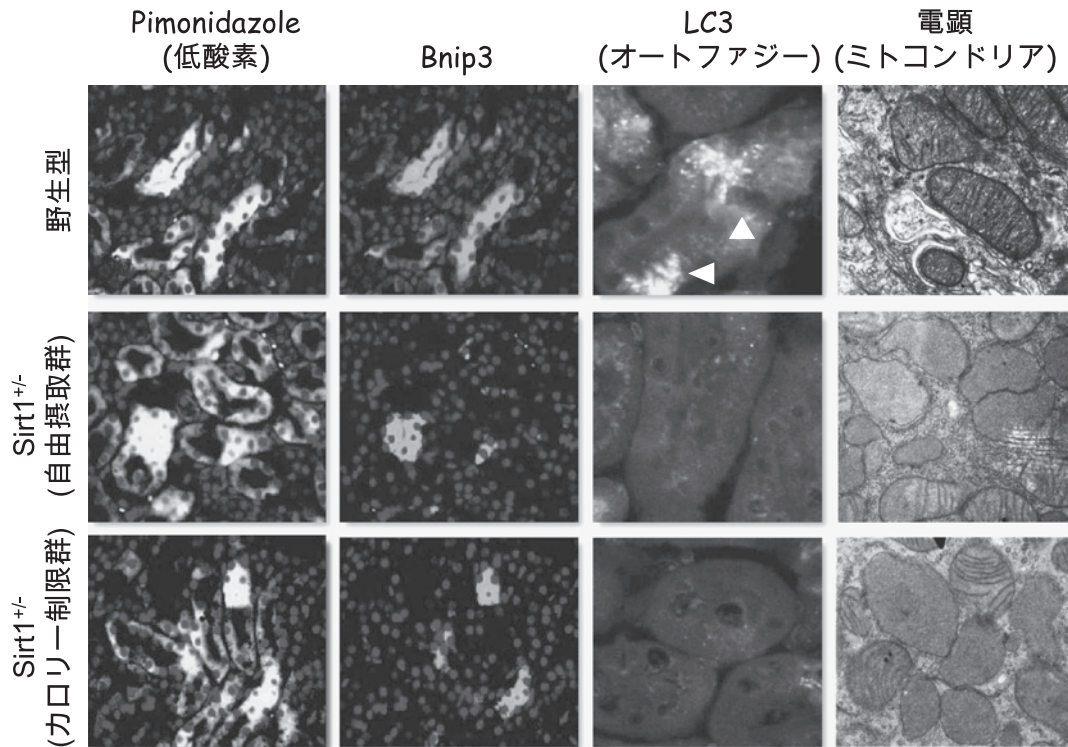


図5 カロリー制限によるオートファジー活性化における SIRT1 の役割：12 か月齢野生型マウス腎尿細管細胞では低酸素に対する Bnip3 発現，オートファジー活性が保持され，ミトコンドリア障害は生じない（上段）。12 か月齢 Sirt1 へテロノックアウトマウス（Sirt1^{+/-}）腎尿細管では低酸素状態での Bnip3 発現，オートファジー活性が低下し，異常ミトコンドリアが蓄積する（中段）。6 か月間のカロリー制限によっても，Sirt1^{+/-}腎尿細管細胞では低酸素状態での Bnip3 発現，オートファジー活性は回復しない（下段）。矢頭：点状シグナルはオートファゴゾーム形成を示す。（文献9より改変）

常と腎機能障害との強い関連性を示唆し，カロリー制限によるミトコンドリア機能異常の是正が，腎臓老化の治療標的となりえる可能性を示すものであった。

腎臓におけるカロリー制限と低酸素誘導性オートファジー

なぜ，加齢マウスの腎臓において異常なミトコンドリアが蓄積したのか？「オートファジー」は前述のように，飢餓時の細胞内栄養素のリサイクルおよび，ストレス状態下での異常蛋白・ミトコンドリアを含む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が，加齢に伴う異常ミトコンドリア蓄積は，潜在的なオートファジー活性の低下を示唆している。低酸素状態では，ミトコンドリアを標的としたオートファジーが亢進する。我々の検討では，加齢腎では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（図4）¹⁴。一方で，カロリー制限され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（図4）¹⁴。これらの結果は，加齢における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。これらに関わる分子機構についても検討したところ，Bnip3 蛋白の増強は低酸素状態でのオートファジー惹起に不可欠であるとされているが，加齢腎尿細管細胞では低酸素刺激下でも Bnip3 発現は増強せず，カロリー制限を行うことで，この機構が回復する事が明らかとなった（図4）¹⁴。この結果は，近位尿細管細胞における Bnip3 発現調節が，加齢腎に関わる分子機構として重要な位置を占めていること示唆していた。

腎臓におけるカロリー制限と 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いて，SIRT1 が関与しているか否か

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が、加齢腎において、FOXO3a のアセチル化は亢進しており、実際に SIRT1 活性が加齢腎で低下していることが証明された¹⁴⁾。一方、加齢腎においても、カロリー制限により SIRT1 活性が回復することも確認された¹⁴⁾。

加齢腎で認められた SIRT1 の活性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腎病変を呈し、尿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 (図 5)¹⁴⁾。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 (図 5)¹⁴⁾。また、これらマウス腎尿管細胞において、異常ミトコンドリア除去機構である低酸素刺激に対するオートファジーは、SIRT1 ヘテロ欠損マウスでは低下しており、カロリー制限によっても回復を認めなかった (図 5)。この結果から、加齢に伴うオートファジーの破綻に 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に回復に SIRT1 が不可欠であることが示唆された。

腎臓における SIRT1 と低酸素誘導性オートファジー

前述のように、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。その結果、12 カ月齢の SIRT1 ヘテロ欠損マウスの腎尿管細胞において、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 (図 5)¹⁴⁾。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管細胞において、脱アセチル化酵素 SIRT1 が如何に Bnip3 発現を調節しオートファジーを誘導しうるのかを、培養近位尿管細胞を用い検討した。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

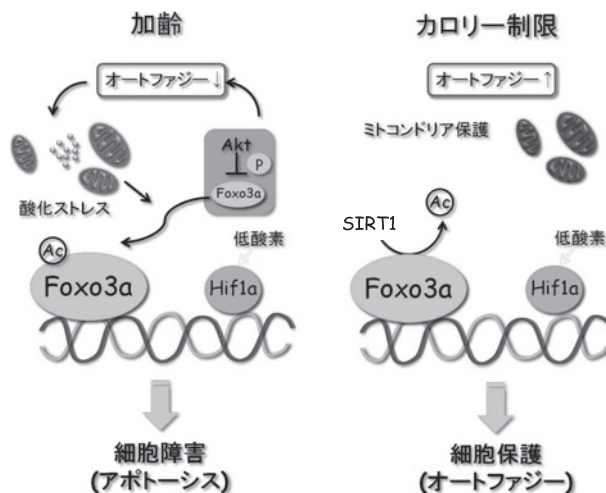


図 6 老化腎におけるオートファジー抑制分子機構 (左図): 過剰なインスリンシグナルは転写因子 Foxo3a の核内移行を抑制し、オートファジー活性を抑制する。結果生じた酸化ストレスにより活性化され、アセチル化された Foxo3a はアポトーシス誘導遺伝子発現を誘導し、細胞死をもたらす。カロリー制限によるオートファジー活性化機構 (右図): カロリー制限下では Foxo3a は核内に局在し、SIRT1 による脱アセチル化を受け、オートファジー関連遺伝子、細胞周期制御遺伝子の発現を誘導し、細胞修復・保護をもたらす。

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。このオートファジーの破綻は、ミトコンドリア酸化ストレスの増大をもたらす。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、低酸素条件下でのオートファジー機構が保持され、細胞保護分子に対する転写活性が増強する (図 6)。

おわりに

加齢腎では、SIRT1 の低下が、腎尿管細胞における低酸素応答性オートファジーの減弱に寄与することでミトコンドリア機能異常を生じている可能性がある。カロリー制限による SIRT1-オートファジー経路の活性化は、腎臓の老化に対して抑制的に働き得る (図 7)。これらの結果は、腎臓の老化に関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戦略が、加齢腎に対する治療の可能性

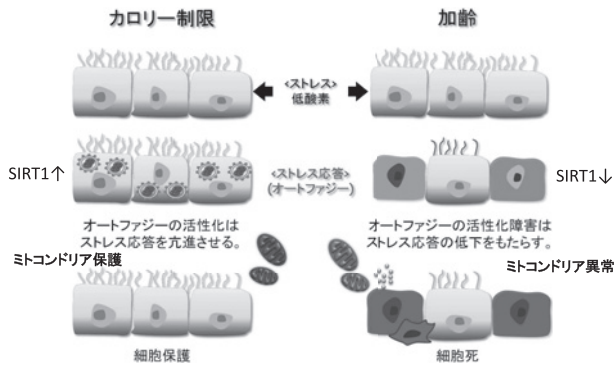


図7 低酸素に対し腎尿細管細胞はストレス応答としてオートファジーを惹起するが、老化腎では、オートファジー活性が低下し、低酸素刺激に対する細胞の脆弱性が亢進する。老化腎ではSIRT1の活性低下がオートファジー機能の低下に寄与しているが、カロリー制限は、SIRT1～オートファジー機能を保持することにより、低酸素に対するストレス応答を回復する。

を示唆している。しかし、この経路は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対し最も危険なストレスに対抗するための機構を進化させ、そして保持してきた。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、腎臓においても絶食応答機構が十分に備わっている事を示唆している。SIRT1やオートファジーの他にも、AMPK α やmTORといった栄養に関連したシグナルが腎臓にも存在し、各種病態に関与することが報告されつつある。本稿で登場した分子や分子機構の他にも、腎臓には栄養応答機構がまだまだ多く存在しており、その探索は加齢腎のみならず、増加し続ける慢性腎臓病に対する新規治療標的の開発に繋がるのではないかと期待している。

参考文献

- 1) Fontana L, Partridge L, Longo VD: Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science* 2010; 328 (5976): 321–326.
- 2) Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK,

Kosmatka KJ, Beasley TM, et al: Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 2009; 325 (5937): 201–204.

- 3) Fontana L, Meyer TE, Klein S, Holloszy JO: Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101 (17): 6659–6663.
- 4) Meyer TE, Kovacs SJ, Ehsani AA, Klein S, Holloszy JO, Fontana L: Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47 (2): 398–402.
- 5) Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L: Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 2000; 403 (6771): 795–800.
- 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 (5487): 2126–2128.
- 7) Guarente L, Franklin H: Epstein Lecture: Sirtuins, aging, and medicine. *N Engl J Med* 2011; 364 (23): 2235–2244.
- 8) Kitada M, Kume S, Takeda-Watanabe A, Kanasaki K, Koya D: Sirtuins and renal diseases: relationship with aging and diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)* 2013; 124 (3): 153–164.
- 9) Burnett C, Valentini S, Cabreiro F, Goss M, Somogyvari M, Piper MD, et al: Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature* 2011; 477 (7365): 482–485.
- 10) Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ: Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451 (7182): 1069–1075.
- 11) Epstein M: Aging and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7 (8): 1106–1122.
- 12) 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): 1–12.
- 13) Mimura I, Nangaku M: The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6 (11): 667–678.
- 14) Kume S, Uzu T, Horiike K, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, Araki S, et al: Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *J Clin Invest* 2010; 120 (4): 1043–1055.