

〈原著論文〉

マウス横紋筋融解症誘発性急性腎障害モデルにおけるNrf2活性化の意義の検討

内田 篤志, 長洲 一, 城所 研吾, 十川 裕史, 板野 精之,
春名 克祐, 佐藤 稔, 佐々木 環, 柏原 直樹

川崎医科大学腎臓・高血圧内科学

抄録 生体は親電子性物質, 活性酸素種によって生成される酸化ストレスから生体を保護する応答システムを有している. Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) -Nrf2 (NF-E2 related factor 2) システムがこの応答機構において重要な役割を果たす. 核内移行した Nrf2は転写因子として, NQO1, HO-1などの抗酸化遺伝子群の発現を制御する.

横紋筋融解症による急性腎障害 (AKI: Acute Kidney Injury) の機序として, 酸化ストレスが尿細管障害に大きく関与する. それ故, 横紋筋融解症誘発性 AKI においても Nrf2活性化による腎保護効果が期待される. 横紋筋融解症誘発性 AKI における Nrf2活性化の意義と治療標的としての可能性を検討した. ヒト近位尿細管上皮細胞 (hPTECs) を用い hemin 刺激に対する Nrf2活性化の意義を検討した. hemin 刺激により hPTECs における Nrf2関連抗酸化遺伝子群の上昇, 細胞障害を認めた. Nrf2-siRNA による Nrf2ノックダウン (KD) を行うことで hemin 刺激に対する抗酸化遺伝子群の発現上昇は抑制され, 細胞障害が有意に増悪した. 野生型マウス (WT), Nrf2欠損マウス (Nrf2KO) を用い, グリセロール筋注による横紋筋融解症モデルを作成した. (1) WT/Cont, (2) WT/横紋筋融解症 (RM), (3) Nrf2KO/Cont, (4) Nrf2KO/RM の4群で比較検討した. 結果は, WT/Cont に比べ WT/RM 群で腎機能障害, 尿細管障害, マクロファージ浸潤を認め, Nrf2KO/RM 群で有意に増悪した. 抗酸化遺伝子群の発現は Nrf2KO/RM 群で低下していた.

横紋筋融解症誘発性 AKI において, Nrf2活性化が腎保護効果を有する事が示された. 横紋筋融解症による AKI に対して, Nrf2活性化が新たな治療標的となり得ることが明らかとなった.

doi:10.11482/KMJ-J43(2)81 (平成29年8月30日受理)

キーワード: 活性酸素種, 尿細管障害, hemin

緒言

従来は, 急性発症し短時日で腎不全状態に至る病態を急性腎不全と呼称していた. 近年, より軽微な腎機能低下が, 必ずしも可逆的ではなく, 生体に重大な影響を与えることが判明し, 急性腎障害 (Acute Kidney Injury; AKI) と

いう新しい概念が誕生した. 複数の AKI の概念定義が存在したが, Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) によって統合され, 現在では, 48時間以内の血清 Creatinine (CRN) の0.3 mg/dl 以上の上昇, または基礎値の1.5倍以上の増加, または尿量が6時間以上にわたり

別刷請求先

内田 篤志

〒701-0192 倉敷市松島577

川崎医科大学腎臓・高血圧内科学

電話: 086 (462) 1111

ファックス: 086 (464) 1039

Eメール: utidatusi@gmail.com

0.5 ml/kg 以下、のいずれかを満たす病態と定義される¹⁾。

AKI は入院患者の13-18% が罹患するとされており、腎予後のみならず生命予後に関与することが判明し、その予防、早期発見および治療法の開発が望まれている²⁾。しかし、AKI に対する有効な予防、治療法は存在しない。

横紋筋融解症 (Rhabdomyolysis: RM) は AKI 発症の最も一般的な誘因の一つであり、外傷や薬剤などで引き起こされる^{3, 4)}。本邦においては近年、震災時の多発外傷による腎障害が報告されている。RM による腎障害の機序として、腎血管攣縮、円柱による尿細管閉塞、ミオグロビンによる直接的な尿細管細胞壊死などが報告されている⁵⁻⁷⁾。崩壊された筋組織から放出されるミオグロビンは Nitric Oxide の Scavenger であり、結果として腎血流を低下させる。同時にミオグロビン変性物から放出される活性酸素種により直接的に尿細管障害をきたす。このため酸化ストレスが尿細管細胞障害に重要であると想定されているが、有効な予防・治療法の開発はなされていない^{3, 4)}。

生体は食物、外来性異物等に含まれる親電子性物質、活性酸素種によって生成される酸化ストレスからタンパク、脂質、核酸・DNA を保護する応答システムを有している。Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) -Nrf2 (NF-E2 related factor 2) システムがこの応答機構において重要な役割を果たしている^{8, 9)}。Nrf2 は通常は Keap1 によりユビキチン化されプロテアソームによる分解制御を受ける¹⁰⁾。活性酸素種・親電子性物質に暴露されると Keap1 から解除され、核内移行し転写因子として作用し遺伝子上流のシス配列に抗酸化応答配列 ARE (antioxidant response element) を有する遺伝子群の発現が亢進する¹¹⁾。Nrf2 関連遺伝子群として heme oxygenase-1 (HO-1)、Glutamate Cysteine Ligase Modifier (GCLM)、NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 (NQO1) などの抗酸化遺伝子群が知られている¹²⁾。

Bardoxolone methyl (CDDD-methyl ester) は

Nrf2 活性化作用を示すことが知られ、当初抗癌剤として開発が進められていた。臨床治験の過程で糸球体濾過量を増大することが発見され、腎機能保持効果を有することが期待された。2 型糖尿性腎症を対象として第 II 相、第 III 相臨床試験が実施され、腎機能の改善作用が報告されている^{13, 14)}。動物実験では高血圧腎障害モデルにおいても腎保護効果が報告されている¹⁵⁾。

AKI においても虚血再灌流モデルやシスプラチン腎症モデルで Nrf2 活性化の腎保護作用が報告されている^{16, 17)}。AKI では尿細管細胞内でミトコンドリア障害が進行し、ミトコンドリア由来の活性酸素種が著明に増加し、この活性酸素種の蓄積が apoptosis を誘導し尿細管細胞死を起こす¹⁸⁾。

RM 誘発性 AKI の病態形成における Nrf2 活性化の意義、治療標的の可能性を検討した報告はない。Nrf2 欠損マウスを用いて RM 誘発性 AKI 発症機序における Nrf2 の意義について検討を行った。

材料と方法

動物実験

10 週齢雄性 C57BL/6J マウス (野生型: WT)、および Nrf2 knock out (KO) マウス (Nrf2 KO/C57BL/6J) を使用した。マウスは、実験期間を通して室温 22 ± 2 °C、湿度 20~60%、照明時間 7~21 時のクリーンエアリア飼育室で飼育し、固形飼料 (MF, オリエンタル酵母工業, 東京) と水道水を自由摂取させた。本研究は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No. 16-045)、川崎医科大学動物実験指針に基づき行った。Nrf2KO マウスは東北大学医学系研究科山本雅之先生のご厚意により、理研より搬入した (組換え DNA 実験承認番号: 川換16-32)。RM は既報に則り作成した¹⁹⁾。50% グリセロール 5 ml/kg を左大腿に筋注して作成、対照群には同量の生理食塩水を筋注した。グリセロールおよび生理食塩水筋注の前後 24 時間ずつは絶水とした。上記手技により以下の 4 群 (n=8) に分け ((1) WT/Cont 群, (2) WT/RM 群, (3)

Nrf2KO/Cont 群, (4)Nrf2KO/RM 群), 筋注 3 日後に屠殺し血清および腎組織を評価した。

組織学的評価

屠殺したマウスの腎臓を摘出し, ホルマリン固定・パラフィン包埋した後, 4 μ m の薄切スライド標本を作製した²⁰⁾。尿管管間質障害の評価を行うため, Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。100倍の視野で1個体につきランダムに5-10か所撮影した。尿管管障害スコアは尿管管拡張, 尿管管上皮異形成, 尿管管円柱, 間質への炎症細胞浸潤を確認し, 撮影したそれぞれの箇所で, 0点: 異常なし, 1点: 1-25%の範囲に異常所見あり, 2点: 26-50%の範囲に異常所見あり, 3点: 51-75%の範囲に異常所見あり, 4点: 76-100%の範囲に異常所見あり, とスコア化した²¹⁾。スコアリングに関しては第3者が盲検的に評価した。

免疫学的解析

屠殺したマウスの腎臓を摘出し, ホルマリン固定・パラフィン包埋した後, 4 μ m の薄切スライド標本を作製した。免疫染色は以下の方法で酵素抗体法を用いて行った²²⁾。パラフィン切片をエタノールにて脱パラフィンし, マイクロウェーブ法による抗原賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックするため, 3% 過酸化水素加メタノールに15分間浸した。10 mM PBS (pH7.0) で洗浄後, 1次抗体を4℃で一晩反応させた。PBSにて洗浄後, 2次抗体としてシンプルステイン MAX-PO (NICHIREI BIOSCIENCES INC., Tokyo, JAPAN) を添加し, 25℃にて1時間反応させた。PBSで洗浄後, DAB 溶液 (NICHIREI BIOSCIENCES INC.) を添加し25℃にて5分間反応させ発色させた。1次抗体として F4/80抗体 (AbD Serotec, CA, USA), Kidney injury molecule-1 (Kim-1) 抗体 (R&Dsystems, MN, USA) をそれぞれ使用した。評価は, F4/80については400倍, Kim-1については100倍の視野で1切片につきランダムに5-10か所撮影し, BZ-II 画像解析アプリケーション

でセルカウントを行い陽性面積で評価した。

培養細胞実験

ヒト近位尿管上皮細胞 (hPTECs) を継代数 6-10にて使用した (Lonza, USA)。細胞は12-well プレートにて培養し, REGMTM BulletKitTM (Lonza) に5%の非働化した FBS, 100 IU/mL ペニシリン, 及び100 μ g/mL ストレプトマイシンを加えた培地で, 37℃, 5% CO₂条件下で増殖させた。また hemin (Sigma-Aldrich, MO, USA) 100 mM による薬剤処理を行い, 6時間反応させ抗酸化遺伝子群の発現を評価した。RMによる腎障害を *in vitro* で mimic するため, hemin 刺激を行った^{23, 24)}。また, hemin 刺激に対する Nrf2の役割を検討するため, Nrf2-siRNAにてNrf2をKDし, Control-siRNA と比較検討した。

ウエスタンブロット法

hPTECsの培地を除去し, Lysis Buffer (Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Rockford, IL, USA) に PhosSTOP EASYpack (Roche, Basel, Swiss), サンプルバッファー, β -メルカプトエタノールを配合) で細胞を可溶化し, 超音波破碎によりホモジナイズして, 可溶性細胞成分を抽出した。Blotting は既報の通り行った²⁵⁾。タンパク量10-30 μ g 相当の抽出液を200 V, 60分で電気泳動し, その後ニトロセルロースメンブレンに転写した。その後, 5% non-fat milk にて1時間ブロッキングし, 各種一次抗体で4℃, 一晩反応させ, 翌日対応した二次抗体液に反応させた。ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Bio-sciences Co., Bucks, UK) で反応させ, Chemiluminescenceにて撮影した。一次抗体は抗 Nrf2抗体 (Cell Signaling, Boston, MA, USA), 抗 GAPDH 抗体 (Merck Millipore, MA, USA) を使用し, 二次抗体は Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (GE Healthcare Bio-sciences Co.), Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked F (ab')₂ Fragment Donkey (GE Healthcare Bio-sciences Co.) を用いた。

リアルタイム RT-PCR 解析

細胞および組織からの RNA 抽出は以下の通り行った²⁶⁾。細胞の Total RNA は TRIzol Reagent (Life Technologies, Corp., Carlsbad, CA) を用いて抽出し, 1 μ g 量の mRNA を ReverTraAce[®] qPCR RT Master Mix (Toyobo Life Science, Osaka, Japan) にて逆転写反応させ, cDNA を作成した。引き続き, Real-time PCR (qPCR) は Taqman 法を用いて行った。プライマーおよびプローブは GenBank の nucleotides からダウンロードした mRNA sequence に基づき Primer 3 のオンラインソフトウェアで設計し, blast を用いてプライマーおよびプローブの相同性について確認した。Mixture は THUNDERBIRD[®] Probe qPCR Mix を使用し, AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Inc. Tokyo, Japan) で 50 サイクルの qPCR を行った。PCR 条件は 50°C 2 分, 95°C 10 分, 95°C 15 秒, 60°C 35 秒とした。遺伝子発現量の定量化のため, 内部コントロールとして 18srRNA を用い, コントロール群との比率で評価した。

LDH 活性の測定

LDH 活性の測定には LDH Cytotoxicity Detection Kit (TaKaRa BIO Inc., Shiga, Japan) を使用した²⁷⁾。hPTECs を 1.0×10^5 cells/well で 12-well プレートに播種し, 24 時間後に ALA, hemin 処理を行い, 6 時間反応させた。その後, 上清を回収し, 200 \times g, 5 分遠心し, 96-well プレートに 100 μ L ずつ分注し, LDH 反応液を各ウェルに 100 μ L ずつ添加し, 遮光して室温で 30 分間反応させた。その後, 490 nm の波長に対する吸光度を測定した。コントロールとして未処理群を用い, ポジティブコントロールとして Triton-X100 で処理した細胞を用いた。

siRNA トランスフェクション

hPTECs は 70%~80% confluent になるように 6-well プレートに播種し, Control-siRNA (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) および Nrf2-siRNA

(Santa Cruz Biotechnology) を 12.5 nM/well にて Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Life Technology, NY, USA) により siRNA の導入を行った。トランスフェクション後, 24 時間後に培地を新鮮な REBM 培地に交換し, 各種刺激を行った。Nrf2 の発現の Knock down (KD) の程度はウエスタンブロッティングにより評価した。

統計学的解析

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) で記した。多群間の比較は Turkey-Kramer の一元配置分散分析法を用い, $p < 0.05$ を有意差ありとした。統計検定には統計解析 Statcel Ver. 3 を使用した。

結果

尿管細胞における hemin 刺激に対する Nrf2 の役割

hPTECs では, hemin 刺激により Nrf2 蛋白発現が上昇し, その下流の抗酸化遺伝子群である NQO1, HO-1, GCLM の遺伝子発現量が増加した。Nrf2KD した hPTECs では, hemin 刺激によっても Nrf2 の発現は上昇せず, NQO1, HO-1, GCLM の発現上昇の程度も軽度であった (図 1 a-e)。また, 細胞上清を用いた LDH assay で細胞死を評価した。結果は hemin 刺激により細胞死は増加し Nrf2KD 細胞に対する hemin 刺激でさらに増加した (図 1 f)。

以上のことより, hPTECs において Nrf2 は NQO1, HO-1, GCLM といった抗酸化遺伝子群の発現を調節し, hemin 刺激に対して細胞保護的役割を持つことが示された。

In vivo における RM 誘発性 AKI に対する Nrf2 の役割

RM 誘発性 AKI に対する Nrf2 の役割, およびその機序の検討を行うため, WT および Nrf2KO マウスを用い, グリセロールの筋注による RM 誘発性 AKI モデルを作成した。WT/Cont, WT/RM, Nrf2KO/Cont, Nrf2KO/RM の

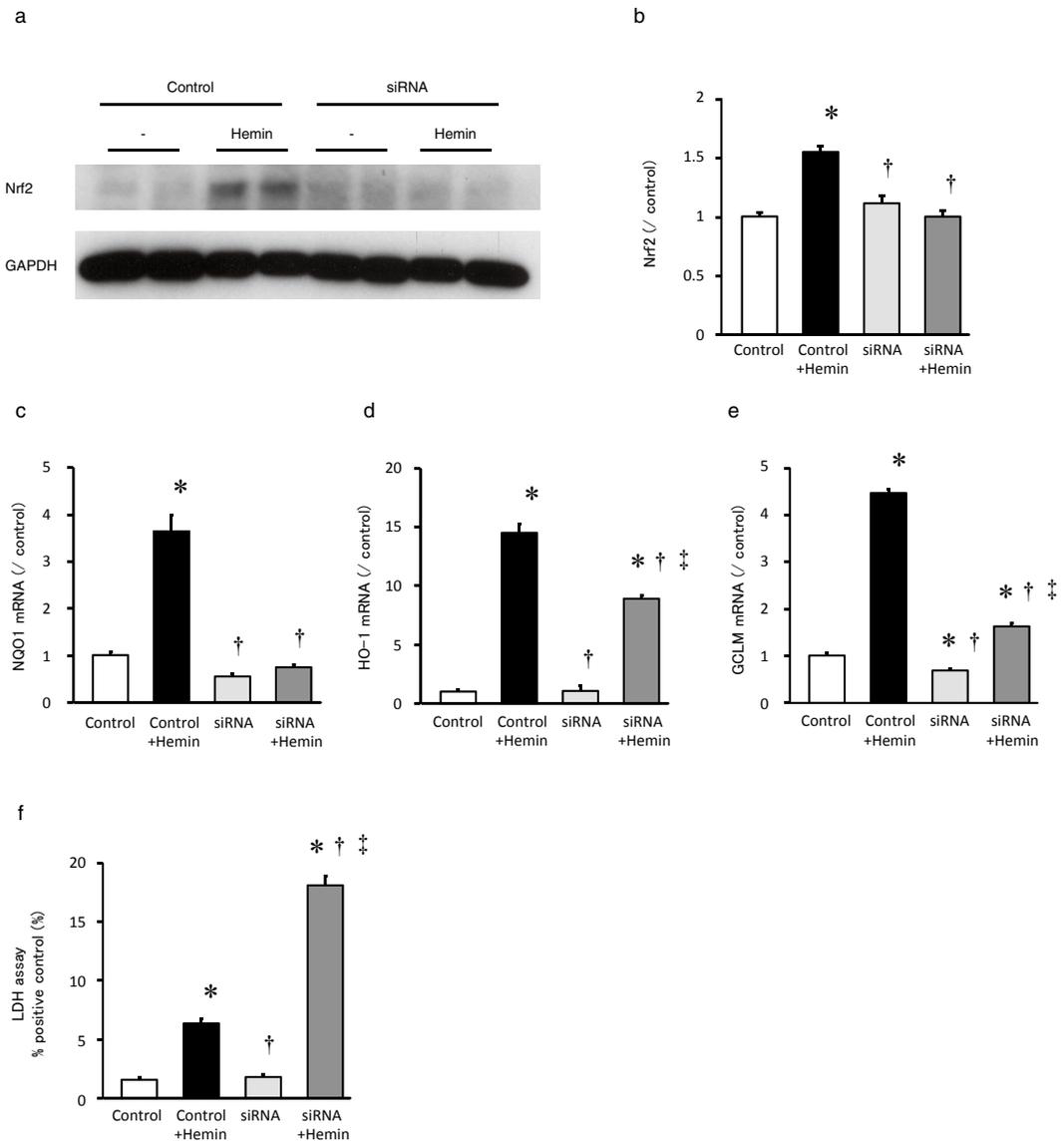


図1 ヒト近位尿管上皮細胞における hemin 刺激に対する Nrf2の細胞保護作用の評価

a. Nrf2の Western blot の画像. b. Nrf2の蛋白発現量. c. NQO1の mRNA 発現量. d. HO-1の mRNA 発現量. e. GCLM の mRNA 発現量. f. LDH assay での細胞障害度評価 Control 群 (white), Control+hemin 群 (black), Nrf2-siRNA 群 (light grey), Nrf2-siRNA+hemin 群 (dark grey) *: P < 0.05 vs control group †: P < 0.05 vs hemin group ‡: P < 0.05 vs Nrf2-siRNA group

4 群間による比較検討を行った. 結果は, WT/Cont に比較し WT/RM では血清 CRN および BUN の上昇を認め, RM により腎機能障害が起こることが示された. その程度は, WT/RM

に比較し Nrf2KO/RM で有意に増悪していた (図 2 a, b). 組織障害を検査するため HE 染色で尿管の構築変化および壊死を評価した. WT/RM では主に皮髄境界から髄質外層部にか

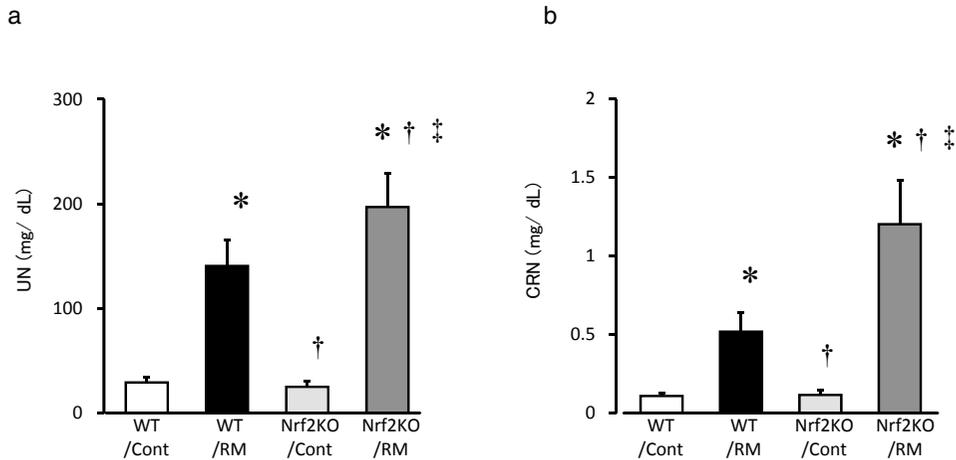


図2 Nrf2KO マウスを用いた横紋筋融解症による腎機能障害の評価

a. 血清 UN. b. 血清 CRN WT/Cont 群 (white), WT/RM 群 (black), Nrf2KO/Cont 群 (light grey), Nrf2KO/RM 群 (dark grey) * : P < 0.05 vs WT/Cont group † : P < 0.05 vs WT/RM group ‡ : P < 0.05 vs Nrf2KO/Cont group

けて、ほぼ全ての尿細管で cast の形成および尿細管の拡張を認め (◁), 一部で尿細管上皮の脱落 (◀), 間質への細胞の浸潤も認めた。この尿細管細胞の障害の程度は Nrf2KO/RM でより顕著であった (図 3 a-c)。また尿細管障害マーカーとして、障害近位尿細管細胞に発現する Kim-1 染色での確認を行った。HE 染色の結果と同様、WT/RM で皮髄境界中心に染色性を認め、尿細管障害があることが示された。Nrf2KO/RM では WT/RM に比べ Kim-1 陽性面積は有意に増加していた (図 3 d, e)。これらの結果から RM 誘発性 AKI において、Nrf2 欠損状態では尿細管細胞障害の増悪をきたすことが示された。

マクロファージの浸潤, および炎症性サイトカイン

腎組織へのマクロファージ浸潤の程度を F4/80 染色で評価した。WT/RM では WT/Cont に比べ、間質へのマクロファージ浸潤が有意に増加していた。Nrf2KO/RM では WT/RM に比較し F4/80 陽性細胞数の有意な増加を認めた (図 4 a, b)。また腎組織における TNF α , MCP-1, IL-1 β などの炎症性サイトカインの mRNA

レベルを qPCR で評価した。TNF α , MCP-1 に関しては WT/Cont に比較し WT/RM で遺伝子発現は上昇しており、Nrf2KO/RM ではさらに有意に上昇していた (図 4 c, d)。IL-1 β においては、WT/RM では有意な上昇を認めなかったが、Nrf2KO/RM では Nrf2KO/Cont に比較し有意な発現上昇を認めた (図 4 e)。以上のことから Nrf2 活性化が RM 誘発性 AKI における炎症性サイトカインに対して抑制的に制御している可能性が示唆された。

抗酸化遺伝子群の発現および酸化ストレス

Nrf2 依存的抗酸化遺伝子である NQO1, HO-1 の mRNA レベルは、Nrf2KO/RM ではその発現上昇は認めず WT/RM に比較し低値であった (図 5 a, b)。酸化ストレスの評価のため尿中 8-OHdG を測定した。WT/RM では WT/Cont に比べ増加しており、RM 誘発性 AKI において活性酸素種の増大が重要であることが示された。また Nrf2KO/RM では WT/RM に比較しさらに著明に増加していた (図 5 c)。これらの結果から Nrf2 活性の上昇は抗酸化遺伝子群の発現上昇を介して酸化ストレスを抑制し RM における腎障害の軽減をきたすことが示唆された。

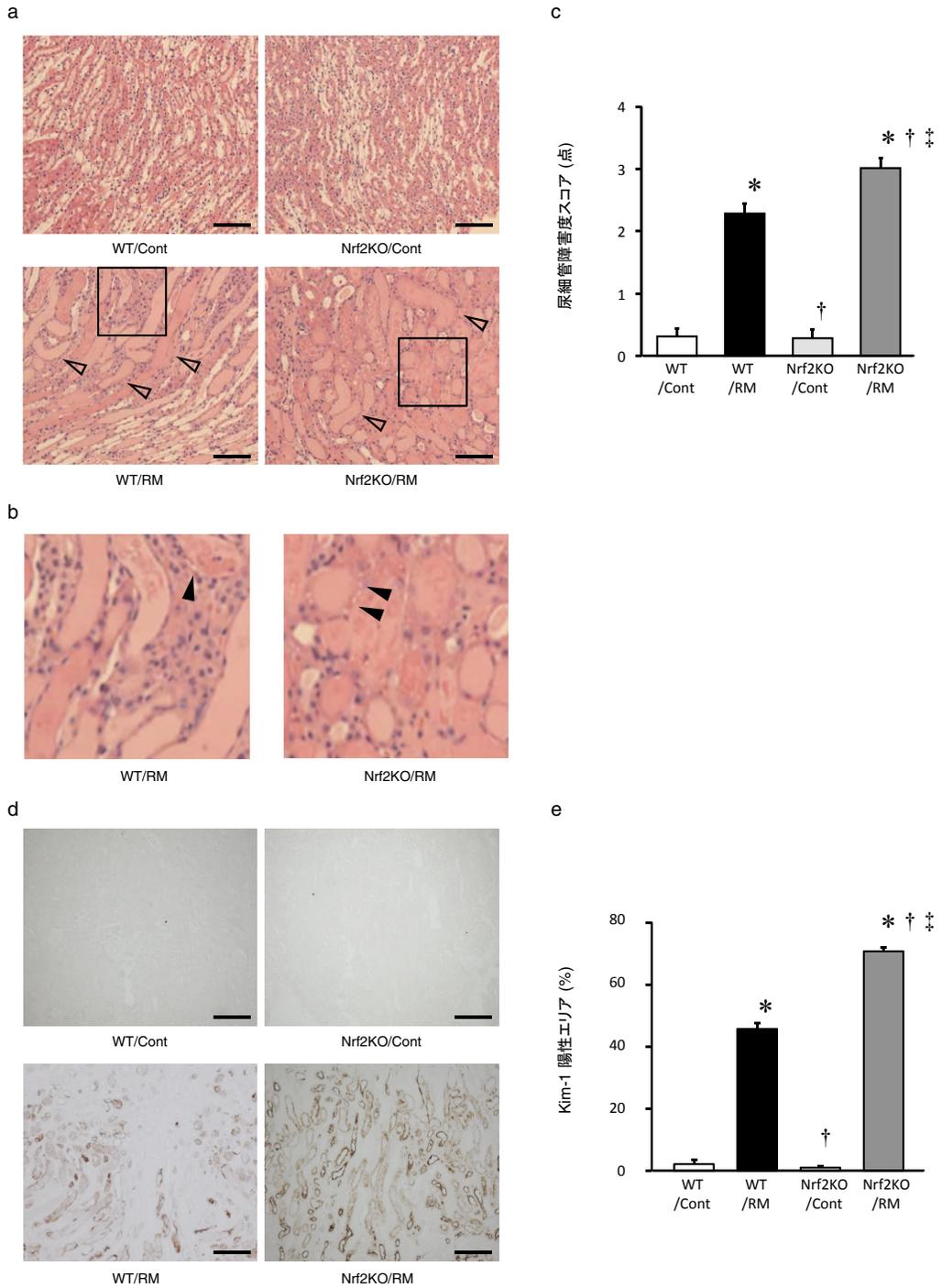


図3 Nrf2KO マウスを用いた横紋筋融解症による尿管障害の評価

a. 尿管の HE 染色. Bar=100 μ m. \triangleleft : 円柱および尿管の拡張. b. a で示した WT/RM 群, Nrf2KO/RM 群の枠部の拡大画像. \blacktriangleleft : 尿管上皮の脱落. c. 尿管障害スコア. d. 尿管の Kim-1 染色. Bar=100 μ m. e. Kim-1 陽性エリア WT/Cont 群 (white), WT/RM 群 (black), Nrf2KO/Cont 群 (light grey), Nrf2KO/RM 群 (dark grey) * : P < 0.05 vs WT/Cont group † : P < 0.05 vs WT/RM group ‡ : P < 0.05 vs Nrf2KO/Cont group

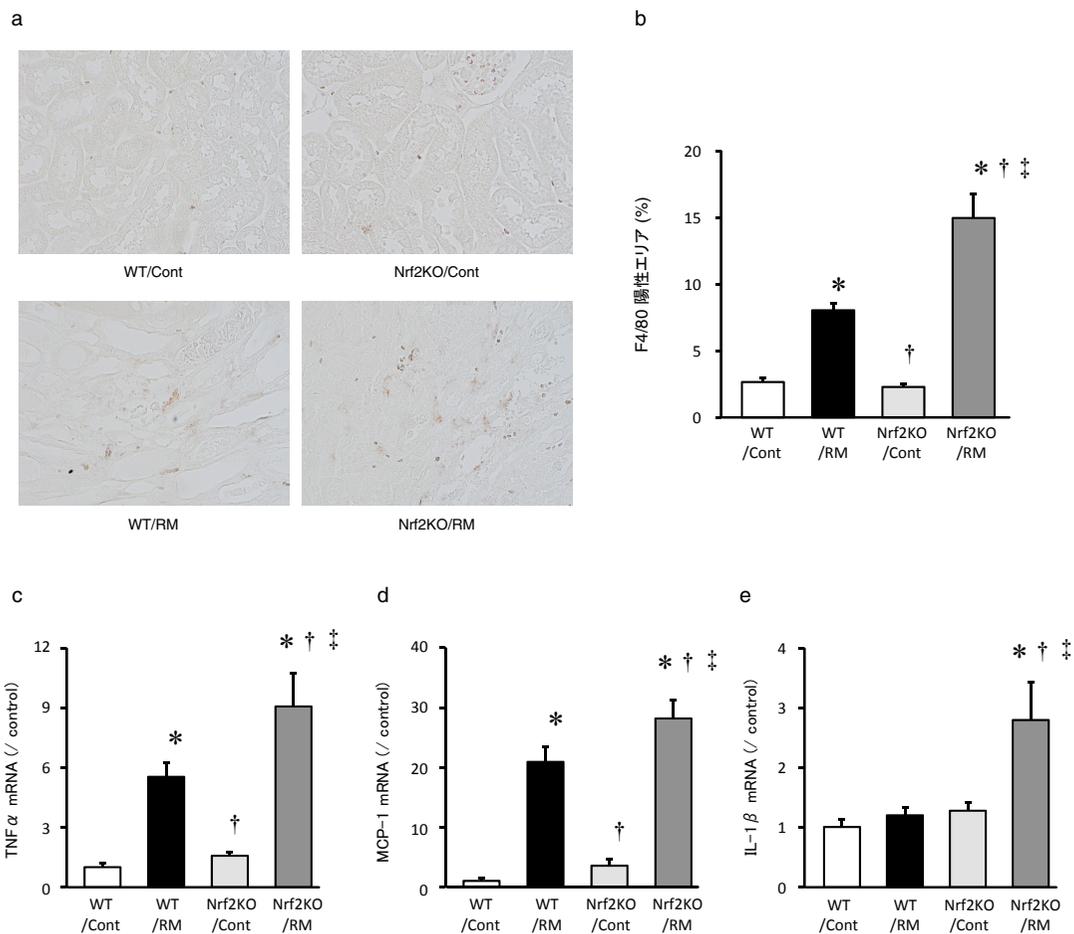


図4 Nrf2KO マウスを用いた横紋筋融解症による炎症の評価

a. 尿細管の F4/80 染色. Bar=20 μ m. b. F4/80 陽性エリア. c. 腎組織の TNF α の mRNA 発現量. d. 腎組織の MCP-1 の mRNA 発現量. e. 腎組織の IL-1 β の mRNA 発現量. WT/Cont 群 (white), WT/RM 群 (black), Nrf2KO/Cont 群 (light grey), Nrf2KO/RM 群 (dark grey) * : P < 0.05 vs WT/Cont group † : P < 0.05 vs WT/RM group ‡ : P < 0.05 vs Nrf2KO/Cont group

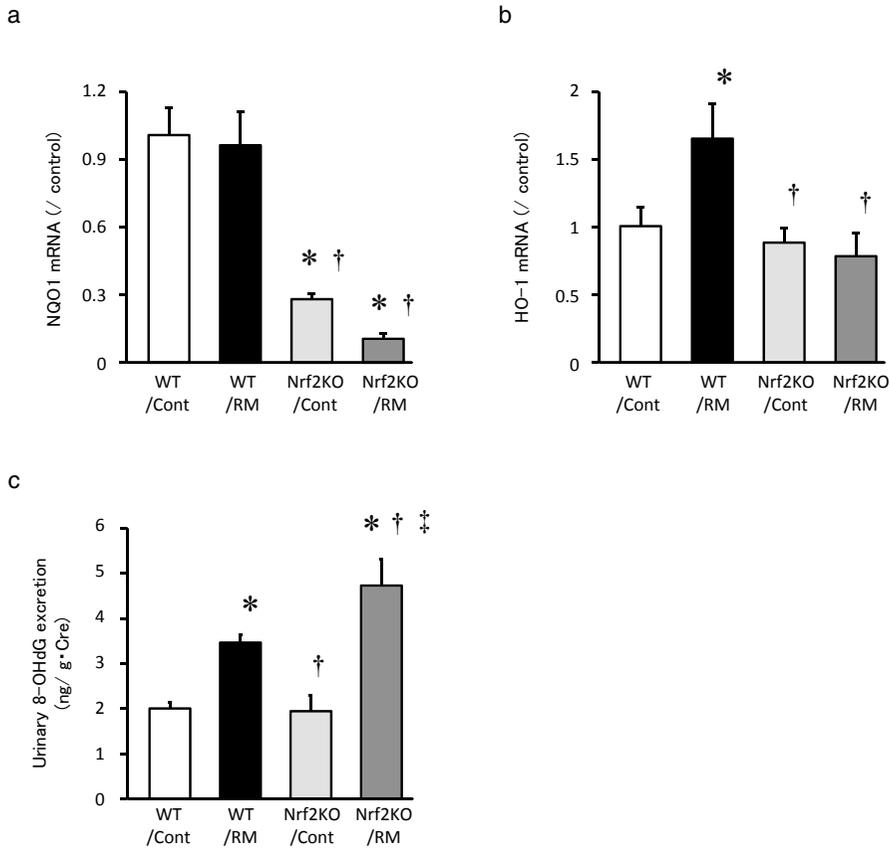


図5 Nrf2KO マウスを用いた横紋筋融解症による抗酸化遺伝子群, 酸化ストレスの評価

a. 腎組織のNQO1のmRNA 発現量. b. 腎組織のHO-1のmRNA 発現量. c. 尿中8-OHdG排泄量. WT/Cont群 (white), WT/RM群 (black), Nrf2KO/Cont群 (light grey), Nrf2KO/RM群 (dark grey) * : P < 0.05 vs WT/Cont group † : P < 0.05 vs WT/RM group ‡ : P < 0.05 vs Nrf2KO/Cont group

考 察

RM 誘発性 AKI モデルを作成し病態形成における Nrf2 活性化の意義について検討を行った。In vitro で hemin 刺激によって近位尿管細胞障害の制御に Nrf2 関連抗酸化遺伝子群の働きが重要であることが示された。また, siRNA により Nrf2 を KD することで抗酸化遺伝子群の発現が低下し, 結果として尿管細胞の細胞死が増加することを確認した。In vivo では WT マウスに比較し Nrf2KO マウスに RM を発症させることで腎内における炎症細胞 (マクロファージ) 浸潤の著明な増加と尿管障害を認め, 結果として腎機能障害の増悪をきたした。その機

序として抗酸化遺伝子群の発現低下の関与が示唆された。特に NQO1 の変化が顕著であり, 従来言われている HO-1 の関与は部分的であることが示された。

AKI 発症および進展における活性酸素種の意義に関しては多く報告がある。ミトコンドリア由来の活性酸素種の増加が apoptosis を誘導し尿管細胞障害をきたすことが報告されている²⁸⁾。また HO-1 活性化薬より活性酸素が消去され AKI 発症進展を抑制することが複数の AKI モデルで報告されている^{29, 30)}。これらの事実から酸化ストレス制御が AKI 発症進展抑制に重要であることが理解されているが, 未だ

有効な治療薬は開発されていない。この理由として少量の活性酸素種が、酸化ストレスとしてのみならず細胞内シグナル伝達物質としても機能しており、一律に抑制することが治療効果に結びつかないのではないかと推測される。Nrf2の活性化は多くの抗酸化遺伝子群発現に関与しており抗酸化能の増強による治療効果が想定される。

糖尿病性腎症に対してNrf2活性化薬による腎保護効果が報告されている³¹⁾。逆にNrf2欠損マウスに糖尿病モデルを作成することで腎症の発症、進展が有意に促進することが報告されている³²⁾。その機序にNrf2依存的抗酸化遺伝子群の発現上昇が関与することが示されている³³⁾。一方で臨床研究においてもNrf2活性化薬が近年注目され、Nrf2活性化薬であるBardoxoloneによるGFR増加作用が報告されている¹⁴⁾。GFR低下により原尿の産生が低下すると尿細管管腔の流速が低下し、結果として円柱形成が促進されcast nephropathyをきたす。現在RM誘発性AKIでは補液によるGFR維持が唯一の治療法となっている^{3, 4)}。

本研究では抗酸化遺伝子群の発現上昇が尿細管障害を抑制することが示された。In vitroではNrf2をKDすることでNQO1が特に強く抑制されており、NQO1の発現調節はNrf2に依存することが判明した。一方でHO-1の発現抑制は部分的でありNrf2非依存的経路が存在することが示された。実際、既報ではHO-1は転写因子Bach1による制御も受けることが知られており、近位尿細管細胞においてもこの経路を介し発現が維持された可能性がある^{34, 35)}。

AKIの病態形成に炎症が関与することも判明している。横紋筋融解症モデル腎では、炎症細胞浸潤、特にマクロファージ浸潤が増加していた。マクロファージ欠損モデルでは虚血再灌流モデルにおける腎障害が改善することが報告されている³⁶⁾。また、これらの炎症細胞浸潤にはサイトカイン、ケモカインの発現が重要であり³⁷⁾、Nrf2KO/RMではWT/RMに比較し、これらの炎症関連遺伝子群の発現も上

昇していた。Nrf2はNF- κ Bによる炎症性サイトカインの発現に対して抑制的に制御することが近年報告されている。Nrf2は転写因子としてanti-redox element (ARE)に結合し抗酸化遺伝子群の発現を制御する³⁸⁾。しかしNrf2によるNF- κ B関連炎症抑制作用はAREを介さず、またNF- κ B binding siteにも直接的に競合しない³⁹⁾。Nrf2による炎症抑制作用機序は未だ十分には解明されていない。

結 語

Nrf2欠損マウスにおいてはRM誘発性AKIが増悪した。その機序として抗酸化遺伝子群発現低下による酸化ストレス増強による尿細管細胞障害の増大が関与するものと考えられた。一方で炎症細胞浸潤への関与も示され、複合的な機序を介してNrf2活性化がAKI進展抑制に重要であることが示された。Nrf2活性化はAKI治療の標的となり得ることが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご協力頂いた教職員並びに研究補助員、Nrf2欠損マウスを御提供いただいた東北大学医学系研究科、山本雅之先生に深謝申し上げます。なお、本研究は川崎医大プロジェクト研究費(28大-2)、および平成27-29年度科学研究費補助金基盤(B)(15H04838)の援助により行われた。

引用文献

- 1) Khwaja A: KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron Clin Pract* 120: c179-c184, 2012
- 2) Joannidis M, Metnitz PG: Epidemiology and natural history of acute renal failure in the ICU. *Crit Care Clin* 21: 239-249, 2005
- 3) Panizo N, Rubio-Navarro A, Amaro-Villalobos JM, Egado J, Moreno JA: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches to Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury. *Kidney Blood Press Res* 40: 520-532, 2015
- 4) Zutt R, van der Kooij AJ, Linthorst GE, Wanders RJ, de Visser M: Rhabdomyolysis: review of the literature. *Neuromuscul Disord* 24: 651-659, 2014
- 5) Bosch X, Poch E, Grau JM: Rhabdomyolysis and acute

- kidney injury. *N Engl J Med* 361: 62-72, 2009
- 6) Shi Y, Xu L, Tang J, *et al.*: Inhibition of HDAC6 protects against rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 312: F502-F515, 2017
 - 7) Geng X, Wang Y, Hong Q, Yang J, Zheng W, Zhang G, Cai G, Chen X, Wu D: Differences in gene expression profiles and signaling pathways in rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Int J Clin Exp Pathol* 8: 14087-14098, 2015
 - 8) Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M: Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* 16: 123-140, 2011
 - 9) Itoh K, Mimura J, Yamamoto M: Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. *Antioxid Redox Signal* 13: 1665-1678, 2010
 - 10) Watai Y, Kobayashi A, Nagase H, Mizukami M, McEvoy J, Singer JD, Itoh K, Yamamoto M: Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1. *Genes Cells* 12: 1163-1178, 2007
 - 11) Mahmoud AM, Hussein OE, Hozayen WG, Abd El-Twab SM: Methotrexate hepatotoxicity is associated with oxidative stress, and down-regulation of PPAR γ and Nrf2: Protective effect of 18 β -Glycyrrhetic acid. *Chem Biol Interact* 270: 59-72, 2017
 - 12) Hayes JD, McMahon M: NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci* 34: 176-188, 2009
 - 13) de Zeeuw D, Akizawa T, Audhya P, *et al.*: Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease. *N Engl J Med* 369: 2492-2503, 2013
 - 14) Pergola PE, Raskin P, Toto RD, *et al.*: Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 365: 327-336, 2011
 - 15) Javkhedkar AA, Quiroz Y, Rodriguez-Iturbe B, Vaziri ND, Lokhandwala MF, Bandy AA: Resveratrol restored Nrf2 function, reduced renal inflammation, and mitigated hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308: R840-R846, 2015
 - 16) Liu M, Grigoryev DN, Crow MT, Haas M, Yamamoto M, Reddy SP, Rabb H: Transcription factor Nrf2 is protective during ischemic and nephrotoxic acute kidney injury in mice. *Kidney Int* 76: 277-285, 2009
 - 17) Liu M, Reddy NM, Higbee EM, Potteti HR, Noel S, Racusen L, Kensler TW, Sporn MB, Reddy SP, Rabb H: The Nrf2 triterpenoid activator, CDDO-imidazolide, protects kidneys from ischemia-reperfusion injury in mice. *Kidney Int* 85: 134-141, 2014
 - 18) Linkermann A, Chen G, Dong G, Kunzendorf U, Krautwald S, Dong Z: Regulated cell death in AKI. *J Am Soc Nephrol* 25: 2689-2701, 2014
 - 19) Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, Dhawan R: Animal models of acute renal failure. *Pharmacol Rep* 64: 31-44, 2012
 - 20) Nagasu H, Satoh M, Kiyokage E, Kidokoro K, Toida K, Channon KM, Kanwar YS, Sasaki T, Kashihara N: Activation of endothelial NAD(P)H oxidase accelerates early glomerular injury in diabetic mice. *Lab Invest* 96: 25-36, 2016
 - 21) Satoh M, Kidokoro K, Ozeki M, Nagasu H, Nishi Y, Ihoriya C, Fujimoto S, Sasaki T, Kashihara N: Angiostatin production increases in response to decreased nitric oxide in aging rat kidney. *Lab Invest* 93: 334-343, 2013
 - 22) Kadoya H, Satoh M, Haruna Y, Sasaki T, Kashihara N: Klotho attenuates renal hypertrophy and glomerular injury in Ins2Akita diabetic mice. *Clin Exp Nephrol* 20: 671-678, 2016
 - 23) Gonzalez-Michaca L, Farrugia G, Croatt AJ, Alam J, Nath KA: Heme: a determinant of life and death in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F370-F377, 2004
 - 24) Wei Q, Hill WD, Su Y, Huang S, Dong Z: Heme oxygenase-1 induction contributes to renoprotection by G-CSF during rhabdomyolysis-associated acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 301: F162-F170, 2011
 - 25) Satoh M, Nagasu H, Morita Y, Yamaguchi TP, Kanwar YS, Kashihara N: Klotho protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 303: F1641-F1651, 2012
 - 26) Satoh M, Fujimoto S, Horike H, Ozeki M, Nagasu H, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N: Mitochondrial damage-induced impairment of angiogenesis in the aging rat kidney. *Lab Invest* 91: 190-202, 2011
 - 27) Itano S, Satoh M, Kadoya H, Sogawa Y, Uchida A, Sasaki T, Kashihara N: Colchicine attenuates renal fibrosis in a murine unilateral ureteral obstruction model. *Mol Med Rep* 15: 4169-4175, 2017
 - 28) dos Santos NA, Carvalho Rodrigues MA, Martins NM, dos Santos AC: Cisplatin-induced nephrotoxicity and

- targets of nephroprotection: an update. *Arch Toxicol* 86: 1233-1250, 2012
- 29) Terada Y, Inoue K, Matsumoto T, *et al.*: 5-Aminolevulinic acid protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising the anticancer efficiency of cisplatin in rats in vitro and in vivo. *PLoS One* 8: e80850, 2013
- 30) Hou J, Cai S, Kitajima Y, Fujino M, Ito H, Takahashi K, Abe F, Tanaka T, Ding Q, Li XK: 5-Aminolevulinic acid combined with ferrous iron induces carbon monoxide generation in mouse kidneys and protects from renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F1149-F1157, 2013
- 31) Chin MP, Reisman SA, Bakris GL, *et al.*: Mechanisms contributing to adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus and stage 4 chronic kidney disease treated with bardoxolone methyl. *Am J Nephrol* 39: 499-508, 2014
- 32) Negi G, Kumar A, Sharma SS: Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF- κ B and Nrf2 cascades. *J Pineal Res* 50: 124-131, 2011
- 33) Zheng H, Whitman SA, Wu W, Wondrak GT, Wong PK, Fang D, Zhang DD: Therapeutic potential of Nrf2 activators in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes* 60: 3055-3066, 2011
- 34) Sun J, Hoshino H, Takaku K, *et al.*: Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* 21: 5216-5224, 2002
- 35) Fuse Y, Nakajima H, Nakajima-Takagi Y, Nakajima O, Kobayashi M: Heme-mediated inhibition of Bach1 regulates the liver specificity and transience of the Nrf2-dependent induction of zebrafish heme oxygenase 1. *Genes Cells* 20: 590-600, 2015
- 36) Belliere J, Casemayou A, Ducasse L, *et al.*: Specific macrophage subtypes influence the progression of rhabdomyolysis-induced kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 26: 1363-1377, 2015
- 37) Ginhoux F, Jung S: Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14: 392-404, 2014
- 38) Suzuki T, Yamamoto M: Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic Biol Med* 88: 93-100, 2015
- 39) Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, *et al.*: Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun* 7: 11624, 2016

〈Regular Article〉

The role of Nrf2 activation in mouse rhabdomyolysis-induced acute kidney injury model

Atsushi UCHIDA, Hajime NAGASU, Kengo KIDOKORO,
Yuji SOGAWA, Seiji ITANO, Yoshisuke HARUNA, Minoru SATOH,
Tamaki SASAKI, Naoki KASHIHARA

Department of Nephrology and Hypertension, Kawasaki Medical School

ABSTRACT Cells are equipped with cytoprotective systems against oxidative stress caused by reactive oxygen species and electrophilic stress. The Keap1-Nrf2 pathway plays a central role in such mechanisms against oxidative and xenobiotic damage. Nrf2, as a transcription factor, activates a series of genes including NQO1 and HO-1.

As the mechanism of acute kidney injury (AKI) due to rhabdomyolysis, renal tubule injury due to oxidative stress is the major component of the pathology. Therefore, in rhabdomyolysis-induced AKI, reno-protective effect of Nrf2 activation is expected. In the present study, the role of Nrf2 activation in rhabdomyolysis-induced AKI was investigated. In vitro, human proximal tubular epithelial cells (hPTECs) were used to determine the significance of Nrf2 for hemin stimulation. Hemin stimulation revealed elevation of Nrf2-related antioxidant gene group and cytotoxicity. Nrf2 knockdown (KD) with Nrf2-siRNA suppressed the rise of the expression of the antioxidant genes against hemin stimulation, and the cell damage was significantly exacerbated. A model of rhabdomyolysis by glycerol intramuscular injection was also prepared in vivo using wild type mice (WT) and Nrf2-deficient mice (Nrf2 KO). These mice were of the C57BL/6J background. We divided them into four groups: (1) WT/Cont, (2) WT/rhabdomyolysis (RM), (3) Nrf2 KO/Cont, and (4) Nrf2 KO/RM. Renal dysfunction and macrophage infiltration occurred more often in the WT/RM than in the WT/Cont, and it significantly worsened in the Nrf2 KO/RM group compared to the WT/RM. The expression of the antioxidant gene group was suppressed more in the Nrf2 KO/RM group compared with the WT/RM.

These results indicate that Nrf2 activation exerts reno-protective effect in rhabdomyolysis-induced AKI. Nrf2 activation may be a new therapeutic target for rhabdomyolysis-induced AKI.

(Accepted on August 30, 2017)

Key words : **Reactive oxygen species, Tubular injury, Hemin**

Corresponding author

Atsushi Uchida

Department of Nephrology and Hypertension, Kawasaki
Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192,
Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 464 1039

E-mail : utidatusi@gmail.com

