

令和元年6月19日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09605

研究課題名(和文) マクロファージの代謝リプログラミングを標的とした腎疾患新規治療の開発

研究課題名(英文) Development of Novel Therapy for Renal Diseases Targeting Macrophage Metabolic Reprogramming

研究代表者

川上 貴久 (Kawakami, Takahisa)

杏林大学・医学部・学内講師

研究者番号：10722093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の代謝経路の一つである解糖系を阻害する2-デオキシグルコースの投与でマウスの両側腎虚血再灌流傷害が軽減されることが示された。これは同薬剤が尿細管細胞の脂肪酸の酸化やペントースリン酸回路を亢進し、ATPが増加するためである。また、Mint3という分子は、尿細管細胞でNF- κ Bの作用を亢進を介して抗アポトーシス作用をもつ分子の発現を増加させることで、慢性腎臓病における尿細管細胞のアポトーシスを抑制し、マウスの腎線維化を抑制するはたらきをもつことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病には根本的治療がなく、そのため透析導入などに繋がっている。そこで慢性腎臓病の進行に関わる炎症についてその機序の解明を目指し、主に二つのことを見出した。一つは、解糖系の阻害により腎尿細管細胞の代謝を変容させると、腎障害を軽減しうることである。二つめは、Mint3という分子がNF- κ Bを介してアポトーシスという細胞死を抑制することで、尿細管傷害を減弱し、慢性腎臓病の線維化を抑制することである。これらことから、マクロファージなどの炎症細胞だけでなく、炎症を惹起する尿細管細胞などの上皮細胞傷害も炎症に重要な役割と果たすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Treatment with 2-deoxyglucose, a glycolysis inhibitor, mitigated bilateral renal ischemia-reperfusion injury. It was because 2-deoxyglucose promoted beta oxidation of free fatty acids and pentose phosphate pathway in renal tubule cells, which resulted in an increase in intracellular ATP.

In addition, we showed that Mint3 mitigated fibrosis in murine chronic kidney disease by inducing anti-apoptotic molecules via NF- κ B up-regulation.

研究分野：腎臓内科学, innate immunity

キーワード：慢性腎臓病 炎症 尿細管細胞 解糖系 Mint3

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) とは、様々な原疾患によって腎臓の障害が慢性的に持続する病態である。その多くは腎機能障害を伴い、それがある閾値を超えると不可逆的に進行し、最終的には透析・腎移植などの腎代替療法が必要となる末期腎不全に至る。現在 CKD に対する決定的治療はなく、その研究・治療法の開発が急務である。

腎機能障害を伴う CKD は、尿細管間質病変を特徴とし、それが腎機能と高い相関を示すことから、この病変が CKD 治療の有望な標的となっている。病理学的には、尿細管の変性・萎縮、間質の炎症細胞増加、線維化などが認められるが、これらが起こる機序は複雑に絡み合い未解明な部分が多く、それを解明することで CKD 治療の展望が開ける可能性は高い。

基本的には、尿細管(上皮)細胞の傷害を契機に炎症が起こり線維化へ繋がると考えられており、この組織傷害においてマクロファージを中心とした慢性炎症が主体となっている。しかし、マクロファージを標的とした治療法は未だ実用化されていない。

そこで、申請者はマクロファージにおける代謝リプログラミングに着目した。マクロファージは多様性に富んだ細胞であり、例えば、組織の恒常性を維持する機能をもつ naïve な状態のものもあれば、炎症性・炎症抑制性のもも存在する。かつ可塑性に富んだ細胞でもあり、環境などに応じてそれらの状態を互いに遷移する性質をもつ。その遷移に代謝状態の変化、すなわち代謝リプログラミングが重要であることが最近注目されてきている (Cell Res.25:771, 2015)。

古くから、癌細胞は Warburg effect と呼ばれる代謝偏向状態にあることが知られていた。酸素が十分な状態でも酸化的リン酸化が抑制され、解糖系を中心に ATP が産生されるのである。炎症性マクロファージでも Warburg effect が認められ、逆に炎症抑制性マクロファージでは酸化的リン酸化が亢進していることが最近見出された (Nature. 493:346-55, 2013)。さらにこの代謝リプログラミングが各々の機能に重要であることも示されている。そこで前述のマクロファージの可塑性を踏まえ、解糖系を阻害し代謝偏向を是正することで代謝リプログラミングを起こし、炎症性マクロファージから炎症抑制性マクロファージに変換できるのではないかと考えられた。

一方、炎症性マクロファージが代謝偏向を起こす分子生物学的機構としては、通常低酸素状態で活性化される転写因子である hypoxia-inducible factor (HIF) が、低酸素非依存的に活性化されることが重要である。この現象に関与する分子として、Mint3 がある。この分子は HIF の活性化阻害因子である factor inhibiting HIF-1 (FIH) に結合して酸素が十分な状態でも HIF を活性化するが、特にマクロファージでその機能を発揮することが知られている。そして Mint3 ノックアウトマウスは LPS 全身投与モデルに耐性を示し、それ由来のマクロファージは解糖系による ATP 産生の低下を示す (J Biol Chem. 284:30350, 2009, J Biol Chem. 286:32542, 2011)。つまりこの分子は、マクロファージの代謝偏向を起こし炎症を誘導する作用があり、腎炎のマクロファージ代謝リプログラミングを標的とした治療応用への可能性が期待される。

2. 研究の目的

(1) 解糖系を遮断する 2-deoxyglucose (2DG) が腎の sterile inflammation に与える影響とその機序を明らかにする。

(2) HIF の活性化を介してマクロファージの代謝リプログラミングを起こすと報告されている Mint3 について、そのノックアウトマウスを用いて腎疾患モデルを作成し、Mint3 が腎間質の炎症に与える影響とその機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 解糖系阻害薬である 2DG がマウス両側虚血再灌流傷害モデルで腎傷害・炎症に与える影響とその機序を解析した。

(2) Mint3 ノックアウト (KO) マウスを用いて片側腎虚血再灌流傷害モデルを作成し、Mint3 が腎傷害・炎症に与える影響とその機序を解析した。

4. 研究成果

(1) 解糖系阻害薬である 2DG がマウス両側腎虚血再灌流傷害モデルに与える効果の解明

マウスマクロファージ株化培養細胞である RAW264.7 を用い、5 mM の 2DG または vehicle で 3 時間処理した後、100 ng/mL の LPS で刺激したときの炎症性サイトカインの mRNA 発現を qRT-PCR で解析した。LPS 刺激 3・6 時間後で解析したところ、いずれの時間でも IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 の発現は増加したが、2DG により IL-1 β の発現は抑制され、TNF- α の発現は不変、IL-6 の発現はさらに増加した。

8 週令の C57BL/6 の雄マウスを用い、虚血を起こす 24 時間前に 500 mg/kg の 2DG または vehicle を腹腔内投与し、虚血時間 30 分の両側腎虚血再灌流傷害を惹起した。主要アウトカムである血清クレアチニンは虚血 1 日後で vehicle 群で 1.4 \pm 0.4 mg/dL、2DG 群で 0.9 \pm 0.1 mg/dL (p<0.05) となり、2DG 群で傷害が有意に減弱しており、尿細管傷害の組織学的評価、Kim-1 の mRNA 発現でも同様に 2DG による保護効果が示された。

しかし、腎の IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 の mRNA 発現は有意差を認めず、また F4/80 の免疫染色によるマクロファージの評価でも差を認めなかった。

そこで当初想定していたマクロファージへの効果ではなく、2DG の尿細管細胞に対する効果を評価することとした。2DG 投与 24 時間後（傷害なし）の腎を用いたウエスタンブロットで、2DG 投与群ではリン酸化 AMPK が減少を認め、ATP の増加の関与が示唆された。また、AMPK の活性化でオートファジーが亢進することが知られているので、それを LC3-II と p62 のウエスタンブロットで評価したが変化しておらず、オートファジーの関与は否定的であった。

ATP 増加の機序を探るため、代謝に関与する分子の発現を腎の qRT-PCR で評価した。2DG が抑制する解糖系関連の Glut1, Hk などの発現は差を認めなかったが、脂質代謝・ β 酸化に関与する Ppara, Cpt1a, Cpt2, Acox1, Acox2 の発現は 2DG 投与群で有意に増加していた。これに関連して、食餌量、血糖値、血清中性脂肪には差を認めなかったが、血中の遊離脂肪酸は 2DG 投与群で有意に増加していた。また、ペントースリン酸回路に関与する G6pd, Nqo1, Gpx1, Gpx4 の発現も 2DG 群で有意な増加を認めた。

ヒト近位尿細管細胞の株化培養細胞である HK-2 を用い酸化ストレスに対する 2DG の保護作用を検討した。5 mM の 2DG または vehicle で 6 時間前処置した後で 4 mM の過酸化水素で 4 時間刺激したときの細胞傷害を LDH アッセイで評価したところ、2DG は有意に傷害を軽減させることが示された。

これらのことから、2DG は尿細管細胞の脂質代謝・ β 酸化、ペントースリン酸回路を活性化させることで細胞内 ATP を増加させるなどし、虚血再灌流による尿細管細胞傷害自体を減弱させることで、腎虚血再灌流傷害を軽減させる作用を持つことが明らかとなった。

(2) Mint3 が片側腎虚血再灌流傷害後の慢性腎臓病に与える効果の解明

9-10 週令の雄の Mint3 KO マウスとその同胞である野生型マウスをコントロールとして用い、片側腎虚血細管再灌流傷害 (uIRI) モデルを作成した。急性期である虚血 1 日後では尿細管傷害の組織学的評価、Kim-1 の mRNA 発現に有意差を認めなかったが、虚血 7 日後の線維化を評価したところ、シリウスレッド染色による線維化、SMA の免疫染色による線維産生細胞である myofibroblast がいずれも KO 群で増加しており、CD31 の免疫染色による内皮細胞の評価で傍尿細管毛細血管を評価したところ、KO 群で毛細血管の減少を認めた。これらから Mint3 KO は急性期の傷害に影響は与えないが、慢性期の影響で腎線維化を増悪させることが明らかとなった。

マクロファージにおける Mint3 の作用を想定していたので、LysmCre を用いてマクロファージ特異的 Mint3 KO マウスを作成し、と同様の解析を行ったが、予想外に線維化などに差を認めなかった。

そこで腎における Mint3 の発現部位を免疫染色で確認した。染色の妥当性は野生型と KO との比較で確認できた。腎において Mint3 は尿細管細胞での発現が強く主であり、マクロファージ、内皮細胞、線維芽細胞などが存在する間質では弱い発現を認めるにとどまった。実際に、uIRI 慢性期の尿細管細胞のアポトーシスを活性化カスパーゼ 3 の免疫染色と TUNEL 染色で評価するといずれも Mint3 KO で有意に増加していることが示された。の結果と併せ、Mint3 KO マウスの腎線維化増悪作用は尿細管細胞での効果によるものであることが示唆された。

その機序を解明するため、マウス近位尿細管細胞の株化培養細胞である MCT を用いた Mint3 の機能解析のため siRNA を用いてノックダウン (KD) し、アポトーシスは Annexin V と 7-AAD の二重染色によるフローサイトメトリーで評価した。慢性腎臓病の進展要因である低酸素状態に MCT をおくとアポトーシスは増加し、Mint3 KD でそれが増悪することが確認され、と同様の所見が得られた。Mint3 は FIH 抑制を介して HIF を活性化することが報告されており、その関与を確かめるべく、Mint3 KD の効果が FIH KD で消失するか確認したところ、全く影響を認めなかった。さらに低酸素下において HIF で誘導されることがよく知られている VEGF, GLUT1, HK2 などの mRNA 発現を測定したが、Mint3 KD, FIH KD のいずれでも変化を認めなかった。よってこの現象に FIH/HIF 経路は関与していないことが示された。

の結果を受け、炎症を誘導する作用が最も知られているが、抗アポトーシス作用も有する転写因子 NF- κ B に着目した NF- κ B は p50, p65 などの 5 つの分子が 2 量体を形成して作用し、通常は転写を活性化させるが、p50 は転写活性化作用をもつ領域を欠いており、p50 どちらの 2 量体は逆に転写活性を抑制することが知られている。NF- κ B を活性化させる主要経路である I- κ B のリン酸化、核内の p65 をウエスタンブロットで評価したが Mint3 KD による変化は認められなかった。ところが、核内の p50 は Mint3 KD で著明に増加しており、これは mRNA レベルでの増加によるものであることが分かった。一方で他の NF- κ B である p65, RelB, c-Rel, p52(p100) の mRNA の変化は認められなかった。すなわち、Mint3 の NF- κ B に対する作用は p50 特異的であることが明らかとなった。

実際に NF- κ B で発現が増加する抗アポトーシス作用のある分子の mRNA 発現を調べたところ、TRAF1, cIAP2, GADD45 β , A20 の発現は Mint3 KD で低下していた。

以上より、Mint3 KO/KD により、尿細管細胞で抑制性の NF- κ B である p50 が増加し、NF- κ B の標的である抗アポトーシス作用のある分子の発現が減少することで、片側腎虚血再灌流傷害後慢性期の低酸素による尿細管細胞のアポトーシスが増加し、線維化が増悪することが示された。逆に言うと、Mint3 は尿細管細胞で抑制性の NF- κ B である p50 の発現を減少させることで、NF- κ B の標的である抗アポトーシス作用のある分子の発現を増加させ、慢性腎臓病の低酸素による尿細管細胞のアポトーシスを抑制し上皮細胞傷害を軽減することで、線維化などの慢性腎臓病の進展を抑制する作用があることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

那須かほり, 川上貴久, 篠原明成, 南学正臣. Mint3 は尿細管細胞の NF- κ B 作用亢進によるアポトーシス抑制を介して虚血再灌流傷害後の腎線維化を軽減する. 第 62 回日本腎臓学会学術総会, 2019 年

篠原明成, 川上貴久, 南学正臣. 2-デオキシグルコース (2DG) は近位尿細管のエネルギー代謝を変化させ, 虚血再灌流障害を軽減する. 第 60 回日本腎臓学会学術総会, 2017 年.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 南学 正臣

ローマ字氏名: Masaomi Nangaku

所属研究機関名: 東京大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 90311620

研究分担者氏名: 稲城 玲子

ローマ字氏名: Reiko Inagi

所属研究機関名: 東京大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 特任教授

研究者番号 (8 桁): 50232509

研究分担者氏名: 田中 哲洋

ローマ字氏名: Tetsuhiro Tanaka

所属研究機関名: 東京大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 講師

研究者番号 (8 桁): 90508079

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 篠原 明成

ローマ字氏名: Akinari Shinohara

研究協力者氏名: 那須 かほり

ローマ字氏名: Kahori Nasu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。