

令和元年6月14日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09612

研究課題名(和文)腎臓における細胞内糖鎖修飾の役割 生理的役割から糖尿病性腎症の病態形成まで

研究課題名(英文)Role of renal protein O-GlcNAcylation

研究代表者

金崎 雅美 (Kanasaki, Masami)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：30402720

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)：蛋白翻訳後修飾の一つO-GlcNAc修飾は細胞内栄養センサーとして働く細胞内蛋白に対する翻訳後修飾である。近年、この翻訳後修飾の各臓器における生理的役割や、代謝疾患の病態形成における役割が明らかとされてきている。本研究では、O-GlcNAc修飾の腎臓での生理的役割ならびに糖尿病性腎症発症進展における役割を明らかとすることを目的とした。O-GlcNAc修飾を細胞特異的に欠損するマウスを用いた検討から、O-GlcNAc修飾はポドサイトの生後直後の成熟に必要であること、近位尿細管細胞における脂肪酸に依存したATP合成に不可欠であり、糖尿病性腎症の進展予防にも不可欠であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は糖尿病性腎症に対する新規治療標的の開発を細胞内O-GlcNAc修飾に着目し行うものである。これまで明らかとされてこなかった腎臓におけるO-GlcNAc修飾の生理的役割の解明、更には、腎症進展機構との関連性が示された。本成果は新規腎症治療標的の開発につながるのみならず、腎臓におけるO-GlcNAc修飾に関する網羅的な知見は今後の腎臓領域の研究の発展にも寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：O-linked N-acetylglucosamine modification (O-GlcNAcylation) is a post-translational modification of intracellular proteins, serving as a nutrient sensor. Growing evidence has demonstrated its physiological and pathological importance in various mammalian tissues. This study examined the physiological role of O-GlcNAcylation in function and development in podocyte and proximal tubular cells. We have first confirmed that O-GlcNAcylation is necessary for maturation of podocyte foot processes, particularly after birth. In addition, we have found that protein O-GlcNAcylation is essential for renal lipolysis during prolonged fasting and offers PTECs significant protection against lipotoxicity in diabetes.

研究分野：腎臓

キーワード：糖尿病性腎症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は高血糖に起因した細胞内代謝障害に伴い生じる進行性の腎疾患であり、我が国における透析導入現疾患の第1位であることから、新たな治療標的となりうる病態解明が望まれている。本研究は細胞内蛋白に対する翻訳後修飾 O-GlcNAc 糖鎖修飾に着目し、糖尿病性腎症治療標的の解明を目指すものである。

蛋白の翻訳後修飾は細胞内外に存在する酵素や転写因子の機能制御に不可欠な過程であり、その異常は種々の疾患の原因となる。腎症でもリン酸化やアセチル化、メチル化などを介した蛋白の機能異常が病態形成に深く関与している。よって、その生理的機能意義の解明ならびにその異常と病態との関連を解明することが、新たな糖尿病性腎症治療標的の解明には不可欠となる。糖尿病では高血糖が持続する結果、細胞内外の蛋白に対する非酵素学的な糖化修飾反応 (Advanced glycation end products の生成)が生じるが、その過剰な産生は糖尿病性腎症病態の中心的役割を担うとされている。また、細胞膜表面に存在する蛋白に対する酵素学的な糖鎖修飾は細胞の機能維持に重要であり、その異常と糖尿病性腎症との関連も示唆されている。このように、翻訳後修飾の一つである広義の糖鎖修飾は、細胞外蛋白に対する修飾が主と考えられてきた。しかし近年、細胞質や核に存在する細胞内蛋白にも酵素学的な糖鎖修飾が生じることが明らかとされた。

この細胞内糖鎖修飾は O-GlcNAc 修飾とよばれ、解糖系側副路を介してできた修飾基質 UDP-GlcNAc が、蛋白の Ser、Thr 残基に付加される修飾であり、O-GlcNAc 転移酵素により付加され、O-GlcNAc 分解酵素(OGA)により除去される。糖尿病性腎症の腎組織では O-GlcNAc 修飾が亢進しているとの知見があるのみならず、現在、O-GlcNAc の修飾の異常が、糖尿病や癌、アルツハイマー病などの疾患と密接に関連していることが明らかにされつつあり、種々の組織で、O-GlcNAc 修飾が担う細胞機能の詳細な解明が待たれている。しかしこれまで腎症との関連のみならず、腎臓における生理的な機能解析はほぼ皆無の状況である。

腎臓を含む各臓器における蛋白 O-GlcNAc 修飾の生理的役割が解明されていない理由として、全身 OGT 欠損マウスが胚細胞期致死の表現形をとるため、全身 OGT 欠損マウスでの検討が不可能であったことが挙げられる。そこで、腎臓における O-GlcNAc 修飾の機能解析には OGT あるいは OGA 遺伝子に対する細胞特異的遺伝子欠損マウスを用いた検討が不可欠となる。そこで我々はまず、ポドサイト特異的、あるいは近位尿細管細胞特異的 Cre 発現マウスと OGT-flox マウスとの交配をそれぞれ行い、糸球体ならびに近位尿細管細胞特異的 OGT 欠損マウスを作製し表現系を検討した。結果、糸球体特異的 OGT 欠損マウスではポドサイト特異的な O-GlcNAc 修飾の欠損が確認され、生後 8 週頃より高度な蛋白尿を呈し、足突起の構造異常を呈した。また、近位尿細管細胞特異的 OGT 欠損マウスは生後 12 週齢よりアルブミンの再吸収不良などの機能障害を呈した。この結果は、細胞内蛋白に対する O-GlcNAc 修飾が腎構成細胞の機能維持に重要な役割を果たしていることを示しており、本研究の課題を解明することが腎臓の新規機能制御機構の解明に寄与する可能性を示している。一方で、OGT の機能抑制による全般的な O-GlcNAc 修飾の抑制は腎症治療の標的とならず、O-GlcNAc 修飾を標的とした腎症治療標的の解明には、腎症特異的な O-GlcNAc 修飾標的蛋白の同定が必要であるという問題も新たに提起された。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は O-GlcNAc 修飾を標的とした糖尿病性腎症に対する新規治療標的の解明を目指すことにある。しかしこれまで、腎臓における O-GlcNAc 修飾の役割は全く明らかとされていない。よって本研究ではまず、遺伝子改変マウスを用いた検討、特に、O-GlcNAc 修飾の Loss-of-function が腎臓の機能維持にどの程度関与するかを明らかとする。さらに、O-GlcNAc 修飾を受ける細胞内蛋白は数百以上存在すると想定されており、その中で、ポドサイトならびに近位尿細管細胞の機能維持に不可欠な O-GlcNAc 修飾標的蛋白の同定、糖尿病状態により O-GlcNAc 修飾が亢進する蛋白の同定、機能解析を行うことで、本研究の今後の発展への基礎情報を獲得する。具体的には以下の検討を行う。

1) 先天的な OGT 欠損に加え、タモキシフェン誘導性 Cre 発現マウスを使用し、成体での OGT 発現の欠損が、先天的欠損マウスと同様にポドサイト障害や尿細管機能障害を引き起こすかを検討する。

2) 各遺伝子改変マウスからポドサイトあるいは近位尿細管細胞における Omics 解析を行い細胞内 O-GlcNAc 修飾によって制御をうける細胞内機能を同定する。

3. 研究の方法

ポドサイト特異的 OGT 欠損マウスを用いたポドサイト O-GlcNAc 修飾の役割の解明。
近位尿細管細胞特異的 OGT 欠損マウスを用いた近位尿細管細胞 O-GlcNAc 修飾の役割の解明。
各種遺伝子改変マウスからの腎サンプルを用いたプロテオミクスによる O-GlcNAc 修飾の腎臓における機能解析。
糖尿病モデルでの O-GlcNAc 修飾の役割の解明

4. 研究成果

ポドサイト特異的 OGT 欠損マウスを用いたポドサイト O-GlcNAc 修飾の役割の解明。
ポドサイト特異的 OGT 欠損マウスでは生後8週齢から尿中アルブミン排泄量の増加が認められ、32週齢で著明な尿中アルブミン排泄量の増加を呈した。ポドサイト特異的 OGT 欠損マウスの腎組織では硬化系球体・炎症細胞浸潤、ポドシンの発現量低下及び顆粒状染色パターン、WT1 陽性細胞数の減少、ポドサイト二次突起の消失、ポドサイト足突起の平坦化が確認され、著しい足突起構造の破綻が確認された。

タモキシフェン誘導性ポドサイト特異的 OGT 欠損マウスのタモキシフェン投与後2週時点での腎組織における RL2 及び WT1 共陽性細胞数測定から、ポドサイト特異的 OGT 欠損マウスの遺伝子欠損効率は $92.8 \pm 0.6\%$ であった。タモキシフェン誘導性ポドサイト特異的 OGT 欠損マウスはタモキシフェン投与後32週まで尿中アルブミン排泄量の増加を認めなかった。タモキシフェン誘導性ポドサイト特異的 OGT 欠損マウスの腎組織では野生型マウスと比べ、軽微な足突起構造の変化を認めたが、先天的モデルのような顕著なポドサイト障害は認めなかった。

Bis-T-23 は足突起形成を促進する薬剤として発見された薬剤であり、Bis-T-23 によるポドサイト特異的 OGT 欠損マウスにおけるポドサイト障害抑制効果を確認した。Bis-T-23 非治療群のポドサイト特異的 OGT 欠損マウスは著明な尿中アルブミン排泄量の増加及びポドシン発現量の低下、足突起構造の破綻を認めたが、Bis-T-23 治療によりポドサイト特異的 OGT 欠損マウスの尿中アルブミン排泄量は有意に減少し、ポドシン発現量の低下及び足突起構造異常も認めなかった。

先天的ポドサイト特異的 Ogt 遺伝子欠損マウスでは、著明な尿中アルブミン排泄量の増加、足突起構造の破綻、ポドサイト数減少が認められたが、後天的 Ogt 遺伝子欠損マウスでは、尿中アルブミン排泄量の増加が認められず、足突起構造異常が軽微であった。これらの結果より、翻訳後修飾の一つ O-GlcNAc 修飾が、ポドサイトの機能制御に不可欠なものであり、特に出生後のポドサイト足突起の発達過程に重要である可能性が示された。また、出生から成体に至るまでのポドサイト足突起の発達過程において、Bis-T-23 治療を行ったポドサイト特異的 OGT 欠損マウスが高度アルブミン尿及び足突起構造異常に至らなかったことから、O-GlcNAc 修飾のポドサイト細胞骨格タンパクへの関与が示唆された。本研究では、ポドサイト特異的 Ogt 遺伝子欠損から足突起構造異常に至る具体的機序や、ポドサイトにおける OGT 標的タンパクの同定には至らなかった。腎臓においては、1000以上のタンパクが OGT による O-GlcNAc 修飾を受けると報告されており、今後、細胞骨格タンパクを含むポドサイト機能制御に関わる OGT 標的タンパクの探索が必要である。

近位尿細管細胞特異的 OGT 欠損マウスを用いた近位尿細管細胞 O-GlcNAc 修飾の役割の解明。
摂食条件では、近位尿細管特異的 OGT 欠損マウスの腎組織、尿所見に異常は認めなかった。48時間絶食後、野生型マウスの近位尿細管には絶食応答として、肝臓、心臓などと同様の脂肪滴が形成され、腎内 ATP 含量も正常に維持されたが、近位尿細管特異的 OGT 欠損マウスでは、脂肪滴の顕著な増大を伴う腎内 ATP 含量の減少、アミノ酸、グルコース、各種イオンの尿中排泄の増加といった尿細管機能障害、アポトーシスの亢進を認めた。

各種遺伝子改変マウスからの腎サンプルを用いたプロテオミクスによる O-GlcNAc 修飾の腎臓における機能解析。

この異常の原因検索のため、腎プロテオーム解析を行った結果、近位尿細管特異的 OGT 欠損マウス腎では、脂肪酸代謝関連酵素群の発現異常を認め、中でも、脂肪酸エステル分解酵素 Carboxylesterase1 (CES1) の顕著な発現低下が確認された。近位尿細管特異的 OGT 欠損マウス由来の単離近位尿細管細胞でも、CES1 発現低下を伴う脂肪滴分解の障害と ATP 産生の障害が再現され、この異常が遺伝子導入による CES1 過剰発現により改善されたことから、CES1 発現低下が O-GlcNAc 修飾欠損による脂肪滴分解の障害、ATP 産生の低下を招いたと考えられた。またプロテオーム解析からは、転写因子 FXR の活性低下が CES1 発現低下に寄与した可能性も示された。

糖尿病モデルでの O-GlcNAc 修飾の役割の解明

腎 O-GlcNAc 修飾と糖尿病性腎症進展との関連について検討した。尿細管障害が軽微な HFD 肥満マウス腎では、O-GlcNAc 修飾および CES1 発現が増強する一方で、動脈硬化を伴い尿細管障害が高度な高脂肪食肥満 ApoE-KO マウス腎では O-GlcNAc 修飾と CES1 発現が共に低下した。そこで、O-GlcNAc 修飾の減弱と尿細管障害悪化の関係性を、高脂肪食肥満近位尿細管特異的 OGT 欠損マウスを用い検証した。結果、高脂肪食肥満近位尿細管特異的 OGT 欠損マウスは、高脂肪食肥満野生型マウスに比し、腎内 CES1 発現の減少を伴う顕著な脂肪滴形成、高脂肪食負荷肥満 ApoE-KO マウスと類似の高度な尿細管障害を呈した。以上より、肥満糖尿病に伴う O-GlcNAc 修飾の増強は腎保護的であり、その減弱は腎脂肪毒性の悪化、尿細管障害の進展に寄与することが示唆された。

近位尿細管において、O-GlcNAc 修飾は、絶食時の CES1 を介した細胞内脂肪滴の分解、ATP 産生、機能維持に不可欠であること、そして、この経路の異常が糖尿病性腎症における尿細管障害進展に関与することを明らかとした。近位尿細管のエネルギー代謝制御機構に新たな生理学的知見がもたらされると共に、O-GlcNAc 修飾-FXR-CES1 経路という新規糖尿病性治療標的が同定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ono S, Kume S, Yasuda-Yamahara M, Yamahara K, Takeda N, Chin-Kanasaki M, Araki H, Sekine O, Yokoi H, Mukoyama M, Uzu T, Araki SI, Maegawa H. O-linked N-acetylglucosamine modification of proteins is essential for foot process maturation and survival in podocytes. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 Sep 1;32(9):1477-1487. doi: 10.1093/ndt/gfw463.

Sugahara S, Kume S, Chin-Kanasaki M, Tomita I, Yasuda-Yamahara M, Yamahara K, Takeda N, Osawa N, Yanagita M, Araki SI, Maegawa H. Protein O-GlcNAcylation Is Essential for the Maintenance of Renal Energy Homeostasis and Function via Lipolysis during Fasting and Diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2019 Jun;30(6):962-978. doi: 10.1681/ASN.2018090950.

〔学会発表〕(計 7 件)

国内学会

小野 真也, 山原 真子, 久米 真司, 中澤 純, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 荒木 信一, 宇津 貴, 前川 聡. 蛋白 O-GlcNAc 修飾は糸球体上皮細胞(ポドサイト)の機能維持に不可欠である. 第 59 回日本腎臓学会学術集会 (2016 年 6 月 17 日~19 日 横浜)

菅原 翔, 久米 真司, 武田 尚子, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 柳田 素子, 宇津 貴, 荒木 信一, 前川 聡. 近位尿細管における蛋白質 O-GlcNAc 修飾の生理的役割の解明. 第 60 回日本腎臓学会学術集会 (2017 年 5 月 26 日~28 日 仙台)

菅原 翔, 久米 真司, 金崎 雅美, 武田 尚子, 大澤 紀之, 柳田 素子, 荒木 信一, 前川 聡. 近位尿細管のエネルギー代謝恒常性維持における蛋白質 O-GlcNAc 修飾の役割. 第 61 回日本腎臓学会学術集会 (2018 年 6 月 8 日~10 日 新潟)

菅原 翔, 久米 真司, 金崎 雅美, 山原 康佑, 山原 真子, 武田 尚子, 大澤 紀之, 柳田 素子, 荒木 信一, 前川 聡. 近位尿細管における蛋白質 O-GlcNAc 修飾は脂質代謝の安定化を介して絶食時および肥満糖尿病状態での細胞障害を軽減する. 第 33 回日本糖尿病合併症学会 (2018 年 10 月 19 日~20 日 東京)

国際学会

Sugahara S, Kume S, Takeda N, Chin-Kanasaki M, Araki H, Yanagita M, Araki S-I, Maegawa H. Protein o-glcnaacylation regulates mitochondrial function and albumin reabsorption in proximal tubular cells. 54th ERA-EDTA Congress (2017. Madrid, Spain)

Sugahara S, Kume S, Takeda N, Osawa N, Chin-Kanasaki M, Yanagita M, Araki S-i, Maegawa H. Protein O-GlcNAcylation regulates lipid metabolism and ATP production in proximal tubular cells during fasting. 1st ISN FRONTIERS (2018. Tokyo, Japan. International Society of Nephrology)

Sugahara S, Maegawa H, Kume S, Yamahara K, Yamahara M, Takeda N, Osawa N, Kanasaki M, Yanagita M, Araki S. Protein O-GlcNAcylation Regulates Renal Lipolysis During Fasting and Diabetes. Kidney Week 2018 (2018. San Diego, USA. American Society of Nephrology)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：久米真司

ローマ字氏名：Shinji Kume

研究協力者氏名：小野真也

ローマ字氏名：Shinya Ono

研究協力者氏名：菅原翔

ローマ字氏名：Sho Sugahara

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。