

令和元年5月29日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15472

研究課題名(和文) 内皮細胞オートファジー不全が糖尿病腎線維化において演じる分子機構の解明

研究課題名(英文) Endothelial autophagy deficiency induces interleukin 6-dependent endothelial mesenchymal transition and organ fibrosis

研究代表者

古家 大祐 (KOYA, Daisuke)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70242980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：Atg5 siRNAで処理したヒト細小血管内皮細胞において、内皮間葉化がIL-6発現を介して生じること、IL-6中和抗体負荷により内皮間葉化が消失することが明らかとなった。内皮細胞Atg5欠失マウス (Atg5endo; Cdh5-Cre Atg5flox/flox mice) においても、in vitroの結果と同様に内皮間葉化を介して腎臓および心臓の線維化が生じ、高脂肪食負荷にて線維化はさらに増悪した。その分子機構は、血中IL-6の上昇がみられたため、IL-6依存性であると考えられた。そこで、高脂肪食負荷Atg5欠失マウスにおいてIL-6中和抗体にて介入すると、心・腎線維化が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト血管内皮細胞におけるオートファジーが生理学的意義として恒常性維持に重要であることを明らかにできた。さらに、高脂肪食負荷オートファジー不全マウスにおいて、腎・心線維化を生じ、それがIL-6中和抗体にて改善されたことは、2型糖尿病性腎臓病および肥満関連腎症に、すでに関節リウマチの治療薬として臨床応用されているIL-6阻害薬が有効な治療戦略になりえる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Inhibition of autophagy, either by a specific inhibitor or siRNA for Atg5, in human microvascular endothelial cells (HMVECs) induced EndMT. The IL-6 level was significantly higher in Atg5 siRNA-transfected HMVEC culture medium compared with the control HMVEC culture medium, and neutralization of IL-6 by a specific antibody completely inhibited EndMT in Atg5 siRNA-transfected HMVECs. Similar to the in vitro data, endothelial-specific Atg5 knockout mice (Atg5endo; Cdh5-Cre Atg5flox/flox mice) displayed both EndMT-associated kidney and heart fibrosis when compared to littermate controls. The plasma level of IL-6 was higher in Atg5endo mice compared to that of control mice, and fibrosis was accelerated in Atg5endo mice treated with HFD; neutralization of IL-6 by a specific antibody inhibited EndMT and fibrosis in HFD-fed Atg5endo mice associated with the amelioration of metabolic defects.

研究分野：腎臓内科

キーワード：内皮細胞 オートファジー 線維化 高脂肪食負荷

1. 研究開始当初の背景

先進国では総死亡の約 45%が何らかの線維性増殖疾患と関係すると報告されている。腎臓においても、線維化はすべての腎疾患の最終末像であり、腎機能障害とも直接相関する。腎臓の線維化は長期にわたる炎症-障害が持続する事、及びその後生じる創傷治癒不全の結果生じると考えられている。臓器線維化に至る詳細な分子機構は不明であるが、サイトカインなどの刺激により誘導される内皮細胞間葉細胞分化(EndMT)は様々な慢性腎臓病モデルマウスにおける線維化において重要な役割を演じることが報告されている。

近年、生体内の恒常性維持機構においてオートファージ機構に注目が集まっている。我々は予備的検討において培養内皮細胞におけるオートファージ不全が EndMT を誘導することを見出し、現在その詳細な分子機構と病態生理における意義の解明を行っている。

2. 研究の目的

臓器線維化の克服は、先進諸国が抱える多彩な健康被害の克服につながる。血管内皮細胞は、サイトカインなどの刺激を受けて間葉系細胞に分化し(EndMT)、臓器線維化に寄与する事が報告されている。オートファージ機構は細胞の恒常性維持に必須であるが、我々は予備的検討でオートファージ不全(Atg5 siRNA 過剰投与)が、EndMT を惹起する事を見出した。オートファージ不全誘導 EndMT は予想に反して線維性増殖疾患で中心的役割を演じる transforming growth factor (TGF)-ベータ非依存的であり、現在分子機構を解明中である。この結果は TGF-ベータ阻害を中心に立脚した抗線維化治療戦略の限界も示唆し、EndMT 制御を治療標的とするにはオートファージ機構の正常化もしくは、下流の EndMT 制御分子を見出す必要がある。本研究の目的はそこにある。

3. 研究の方法

血管内皮細胞でのオートファージ機構不全が糖尿病腎線維化に及ぼす影響を明らかにするとともに、新規治療戦略開発の基盤となる研究を行うため、次の検討を行った。

Atg5siRNA によって human microvascular endothelial cells (HMVECs)オートファージ不全が、内皮間葉化を惹起するか、その標的分子は何かを検討した。血管内皮細胞オートファージ機構不全マウス (Atg5endo; Cdh5-Cre Atg5flox/flox mice) を用いて、代謝異常環境下における腎臓線維化における意義を同定するとともに、オートファージ不全誘導 EndMT を抑制できる治療手段をスクリーニングし同定する。

4. 研究成果

Atg5 siRNA で処理したヒト細小血管内皮細胞において、内皮間葉化が IL-6 発現を介して生じること、また、IL-6 中和抗体負荷により内皮間葉化が消失することが明らかとなった。内皮細胞 Atg5 欠失マウス (Atg5endo; Cdh5-Cre Atg5flox/flox mice) においても、in vitro の結果と同様に内皮間葉化を介して腎臓および心臓の線維化が生じ、高脂肪食負荷にて線維化はさらに増悪した。その分子機構は、血中 IL-6 の上昇がみられたため、IL-6 依存的であると考えられた。そこで、高脂肪食負荷 Atg5 欠失マウスにおいて IL-6 中和抗体にて介入すると、心・腎線維化が抑制された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 31 件)

1. Zhou FL, Watada H, Tajima Y, Berthelot M, Kang D, Esnault C, Shuto Y, Maegawa H, Koya D. Identification of subgroups of patients with type 2 diabetes with differences in renal function preservation between sglt2 inhibitors and dpp4 inhibitors using a supervised machine learning algorithm (profile study): A Retrospective analysis of a japanese commercial medical database. *Diabetes Obes Metab*. 2019 May 3. doi: 10.1111/dom.13753 査読あり
2. Kitada M, Ogura Y, Monno I, Koya D. The impact of dietary protein intake on longevity and metabolic health. *EBioMedicine*. 2019 Apr 8. pii: S2352-3964(19)30239-7. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.04.005. 査読あり
3. Gao R, Kanasaki K, Li J, Kitada M, Okazaki T, Koya D. klotho is essential for the anti-endothelial mesenchymal transition effects of N-acetyl-seryl-aspartyl-

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9、C K - 1 9 (共通)

- lysyl-proline. FEBS Open Bio. 2019 May;9(5):1029-1038. doi: 10.1002/2211-5463.12638 査読あり
4. Kitada M, Ogura Y, Monno I, Koya D. Sirtuins and Type 2 Diabetes: Role in Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. Front Endocrinol (Lausanne). 2019 Mar 27;10:187. doi: 10.3389/fendo.2019.00187. 査読あり
 5. Nitta K, Nagai T, Mizunuma Y, Kitada M, Nakagawa A, Sakurai M, Toyoda M, Haneda M, Kanasaki K, Koya D. N-Acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline is a potential biomarker of renal function in normoalbuminuric diabetic patients with eGFR \geq 30 ml/min/1.73 m₂. Clin Exp Nephrol. 2019 Apr 4. doi: 10.1007/s10157-019-01733-6. 査読あり
 6. Kitada M, Ogura Y, Monno I, Koya D. Sirtuins and Type 2 Diabetes: Role in Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. Front Endocrinol (Lausanne). 2019 Mar 27;10:187. doi: 10.3389/fendo.2019.00187. 査読あり
 7. Yang F, Takagaki Y, Yoshitomi Y, Ikeda T, Li J, Kitada M, Kumagai A, Kawakita E, Shi S, Kanasaki K, Koya D. Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 Accelerates Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer Metastasis via the CXCL12/CXCR4/mTOR Axis. Cancer Res. 2019 Feb 15;79(4):735-746. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0620. 査読あり
 8. Kume S, Araki SI, Ugi S, Morino K, Koya D, Nishio Y, Haneda M, Kashiwagi A, Maegawa H. Secular changes in clinical manifestations of kidney disease among Japanese adults with type 2 diabetes from 1996 to 2014. J Diabetes Investig. 2018 Nov 19. doi: 10.1111/jdi.12977. 査読あり
 9. Srivastava SP, Li J, Kitada M, Fujita H, Yamada Y, Goodwin JE, Kanasaki K, Koya D. SIRT3 deficiency leads to induction of abnormal glycolysis in diabetic kidney with fibrosis. Cell Death Dis. 2018 Sep 24;9(10):997. doi: 10.1038/s41419-018-1057-0. 査読あり
 10. Kitada M, Ogura Y, Nitta K, Fujii M, Kanasaki K, Konishi K, Iida Y, Nakagawa A, Koya D. Effect of switching to teneligliptin from other dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on glucose control and renoprotection in type 2 diabetes patients with diabetic kidney disease. J Diabetes Investig. 2019 May;10(3):706-713. doi: 10.1111/jdi.12917. 査読あり
 11. Yoshida S, Yamahara K, Kume S, Koya D, Yasuda-Yamahara M, Takeda N, Osawa N, Chin-Kanasaki M, Adachi Y, Nagao K, Maegawa H, Araki SI. Role of dietary amino acid balance in diet restriction-mediated lifespan extension, renoprotection, and muscle weakness in aged mice. Aging Cell. 2018 Jun 25:e12796. doi: 10.1111/ace1.12796. 査読あり
 12. Ogura Y, Kitada M, Monno I, Kanasaki K, Watanabe A, Koya D. Renal mitochondrial oxidative stress is enhanced by the reduction of Sirt3 activity, in Zucker diabetic fatty rats. Redox Rep. 2018 Dec;23(1):153-159. doi: 10.1080/13510002.2018.1487174. 査読あり

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

13. Kitada M, Ogura Y, Monno I, Koya D. A Low-Protein Diet for Diabetic Kidney Disease: Its Effect and Molecular Mechanism, an Approach from Animal Studies. *Nutrients*. 2018 Apr 27;10(5). pii: E544. doi: 10.3390/nu10050544. 査読あり
14. Li J, Kanasaki M, Xu L, Kitada M, Nagao K, Adachi Y, Jinzu H, Noguchi Y, Kohno M, Kanasaki K, Koya D. A ketogenic amino acid rich diet benefits mitochondrial homeostasis by altering the AKT/4EBP1 and autophagy signaling pathways in the gastrocnemius and soleus. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2018 Jul;1862(7):1547-1555. doi: 10.1016/j.bbagen.2018.03.013. 査読あり
15. Kitada M, Ogura Y, Suzuki T, Monno I, Kanasaki K, Watanabe A, Koya D. A low-protein diet exerts a beneficial effect on diabetic status and prevents diabetic nephropathy in Wistar fatty rats, an animal model of type 2 diabetes and obesity. *Nutr Metab (Lond)*. 2018 Mar 2;15:20. doi: 10.1186/s12986-018-0255-1. 査読あり
16. Takagi S, Li J, Takagaki Y, Kitada M, Nitta K, Takasu T, Kanasaki K, Koya D. Ipragliflozin improves mitochondrial abnormalities in renal tubules induced by a high-fat diet. *J Diabetes Investig*. 2018 Sep;9(5):1025-1032. doi: 10.1111/jdi.12802. 査読あり
17. Hu Q, Li J, Nitta K, Kitada M, Nagai T, Kanasaki K, Koya D. FGFR1 is essential for N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline regulation of mitochondrial dynamics by upregulating microRNA let-7b-5p. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 15;495(3):2214-2220. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.089. 査読あり
18. Kitada M, Ogura Y, Maruki-Uchida H, Sai M, Suzuki T, Kanasaki K, Hara Y, Seto H, Kuroshima Y, Monno I, Koya D. The Effect of Piceatannol from Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seeds on Metabolic Health in Humans. *Nutrients*. 2017 Oct 18;9(10). pii: E1142. doi: 10.3390/nu9101142. 査読あり
19. Shimizu M, Furuichi K, Toyama T, Funamoto T, Kitajima S, Hara A, Ogawa D, Koya D, Ikeda K, Koshino Y, Kurokawa Y, Abe H, Mori K, Nakayama M, Konishi Y, Samejima KI, Matsui M, Yamauchi H, Gohda T, Fukami K, Nagata D, Yamazaki H, Yuzawa Y, Suzuki Y, Fujimoto S, Maruyama S, Kato S, Naito T, Yoshimura K, Yokoyama H, Wada T; Research Group of Diabetic Nephropathy, the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan and Japan Agency for Medical Research and Development. Decline in estimated glomerular filtration rate is associated with risk of end-stage renal disease in type 2 diabetes with macroalbuminuria: an observational study from JDNCS. *Clin Exp Nephrol*. 2018 Apr;22(2):377-387. doi: 10.1007/s10157-017-1467-9. 査読あり
20. Wada T, Ishikawa A, Watanabe E, Nakamura Y, Aruga Y, Hasegawa H, Onogi Y, Honda H, Nagai Y, Takatsu K, Ishii Y, Sasahara M, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T. Eplerenone prevented obesity-induced inflammasome activation and glucose intolerance. *J Endocrinol*. 2017 Dec;235(3):179-191. doi: 10.1530/JOE-17-0351. 査読あり

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

21. Kitada M, Ogura Y, Suzuki T, Monno I, Kanasaki K, Watanabe A, Koya D. Cyclic and intermittent very low-protein diet can have beneficial effects against advanced diabetic nephropathy in Wistar fatty (fa/fa) rats, an animal model of type 2 diabetes and obesity. *Nephrology (Carlton)*. 2017 Dec;22(12):1030-1034. doi: 10.1111/nep.13152. 査読あり
22. Kanasaki M, Srivastava SP, Yang F, Xu L, Kudoh S, Kitada M, Ueki N, Kim H, Li J, Takeda S, Kanasaki K, Koya D. Deficiency in catechol-o-methyltransferase is linked to a disruption of glucose homeostasis in mice. *Sci Rep*. 2017 Aug 11;7(1):7927. doi: 10.1038/s41598-017-08513-w. 査読あり
23. Li J, Shi S, Srivastava SP, Kitada M, Nagai T, Nitta K, Kohno M, Kanasaki K, Koya D. FGFR1 is critical for the anti-endothelial mesenchymal transition effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline via induction of the MAP4K4 pathway. *Cell Death Dis*. 2017 Aug 3;8(8):e2965. doi: 10.1038/cddis.2017.353. 査読あり
24. Kitada M, Tsuda SI, Konishi K, Takeda-Watanabe A, Fujii M, Kanasaki K, Nishizawa M, Nakagawa A, Koya D. Anagliptin ameliorates albuminuria and urinary liver-type fatty acid-binding protein excretion in patients with type 2 diabetes with nephropathy in a glucose-lowering-independent manner. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2017 Jul 7;5(1):e000391. doi: 10.1136/bmjdr-2017-000391. 査読あり
25. Kitada M, Ogura Y, Monno I, Koya D. Regulating Autophagy as a Therapeutic Target for Diabetic Nephropathy. *Curr Diab Rep*. 2017 Jul;17(7):53. doi: 10.1007/s11892-017-0879-y. 査読あり
26. Ueki N, Kanasaki K, Kanasaki M, Takeda S, Koya D. Catechol-O-Methyltransferase Deficiency Leads to Hypersensitivity of the Pressor Response Against Angiotensin II. *Hypertension*. 2017 Jun;69(6):1156-1164. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09247. 査読あり
27. Onogi Y, Wada T, Kamiya C, Inata K, Matsuzawa T, Inaba Y, Kimura K, Inoue H, Yamamoto S, Ishii Y, Koya D, Tsuneki H, Sasahara M, Sasaoka T. PDGFR Regulates Adipose Tissue Expansion and Glucose Metabolism via Vascular Remodeling in Diet-Induced Obesity. *Diabetes*. 2017 Apr;66(4):1008-1021. doi: 10.2337/db16-0881. 査読あり
28. Koya D. Impact of empagliflozin on diabetic kidney disease. *J Diabetes Investig*. 2017 Sep;8(5):658-660. doi: 10.1111/jdi.12615. 査読あり
29. Takagaki Y, Koya D, Kanasaki K. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and renoprotection: the role of antifibrotic effects. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2017 Jan;26(1):56-66 査読あり
30. Uzu T, Araki SI, Kashiwagi A, Haneda M, Koya D, Yokoyama H, Kida Y, Ikebuchi M, Nakamura T, Nishimura M, Takahara N, Obata T, Omichi N, Sakamoto K, Shingu R, Taki H, Nagai Y, Tokuda H, Kitada M, Misawa M, Nishiyama A, Kobori H, Maegawa H; Shiga Committee for Preventing Diabetic Nephropathy. Comparative Effects of Direct Renin Inhibitor and Angiotensin Receptor Blocker on Albuminuria in

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

- Hypertensive Patients with Type 2 Diabetes. A Randomized Controlled Trial. PLoS One. 2016 Dec 29;11(12):e0164936. doi: 10.1371/journal.pone.0164936. 査読あり
31. Kume S, Kondo M, Maeda S, Nishio Y, Yanagimachi T, Fujita Y, Haneda M, Kondo K, Sekine A, Araki SI, Araki H, Chin-Kanasaki M, Ugi S, Koya D, Kitahara S, Maeda K, Kashiwagi A, Uzu T, Maegawa H. Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase Regulates Biphasic Insulin Secretion from Pancreatic Cells during Fasting and in Type 2 Diabetes. EBioMedicine. 2016 Nov;13:168-180. doi:10.1016/j.ebiom.2016.10.038. 査読あり

〔学会発表〕(計5件)

1. Ogura, Y, Kitada, M, Monno, I, Koya D. Overexpression of CD38 (NADase) in diabetic kidney disease results in renal mitochondrial oxidative stress and pathologies via NAD(+)-dependent Sirt3 inactivation. EASD 2018
2. Ogura Y, Kitada M, Monno I, Watanabe AI, Koya D. Renal mitochondrial oxidative stress induced by NAD+dependent Sirt 3 inactivation via overexpression of CD38(NADase) in diabetic kidney disease. ADA 2018
3. Mizunuma Y, Niita K, Takagi S, Kanasaki K, Koya D. Blockade db gen into CD-1 background results in novel type 2 diabetic mouse model with progressive kidney fibrosis. ADA 2018
4. Takagaki Y, Lee SM, Dongqing Z, Kanasaki K, Koya D. Atg5 deficiency in endothelial cells contributes to the development of IL-6 dependent endothelial to mesenchymal transition and kidney fibrosis. EASD 2017
5. Takagaki Y, Kanasaki K, Kato M, Koya D. Dipeptidyl peptidase plays a pathogenetic role on BSA-induced kidney injury in diabetic mice. ADA 2017

〔図書〕(計1件)

監修 古家大祐 編集 北田宗弘、新田恭子 なるほどそうだったのか! 糖尿病教室 Q&A . 2017 金沢医科大学出版局

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kanazawa-med.ac.jp/endocrin/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 金崎 啓造

ローマ字氏名: (KANASAKI, Keizo)

所属研究機関名: 金沢医科大学

部局名: 医学部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 60589919

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 高垣 雄太

ローマ字氏名: (TAKAGAKI, Yuta)

研究協力者氏名: 北田宗弘

ローマ字氏名: (KITADA, Munehiro)

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。