

令和 4 年 5 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08677

研究課題名(和文)急性腎障害におけるリポファジーの役割解明と治療への応用

研究課題名(英文)Lipophagy in AKI: the role and clinical application

研究代表者

高橋 篤史(Takahashi, Atsushi)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10704786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：(1)48時間飢餓後のマウス腎臓から脂肪滴分画を抽出、精製した。同分画をLC-3抗体で免疫沈降し、質量分析を行った。その解析によりリポファジーの過程に関わると推測される分子を数個同定した。

(2)AKI時に近位尿細管で亢進するリポファジーは腎保護に寄与するが、脂肪滴内に蓄積する過酸化脂質代謝産物がリソソーム機能障害を惹起し、リポファジー活性低下を引き起こす。PPAR α アゴニストやferrostatin-1投与は過酸化脂質阻害やリポファジー活性化作用を介して、AKIを改善する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓病を含め多くの疾患では、オートファジーを亢進させて細胞ストレスに対抗しているが、実際にはオートファジーを十分亢進させられず、停滞していることが病態を悪化させている。本研究ではAKI時のリポファジーを取り上げ、リポファジーの腎障害における役割とそれを亢進させる方法を探求した。当初企画したリポファジーの標的分子(受容体)は候補を見出したものの、その役割解明については研究途上である。しかしリポファジーを調節する分子としてPPAR α を同定した。PPAR α はそのアゴニストが実臨床で使用されていることから、臨床応用が容易で、社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The lipid droplet fraction isolated from the kidneys of starved mice was immunoprecipitated by LC-3 antibody and subjected to mass spectrometry. Then, we identified several molecules which are involved in the lipophagy process.

We focused on the relationship between lipid droplets and lysosomes which are in close proximity during AKI, and found that dysregulation of lipid metabolism induces lysosomal dysfunction, leading to inadequate activation of lipophagy. Treatment of PPAR α agonist or ferrostatin-1 attenuated lysosomal dysfunction and induced lipophagy, leading to the attenuation of kidney injury.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：オートファジー リポファジー 近位尿細管 急性腎障害 脂肪滴 PPAR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎臓とオートファジー

オートファジーはユビキチン-プロテアソーム系と並ぶ主要な細胞内分解システムであり、リソソームにおける細胞質成分分解の総称である。オートファジーは以下のように進行する。細胞質に小胞体様の隔離膜が出現し、細胞質成分やミトコンドリア等のオルガネラを包み込み、二重膜構造を持つオートファゴソームとなり、リソソームと融合し分解が始まる。オートファジーは低酸素や酸化ストレスによっても誘導され、生体にとって有害な物質の除去・分解を通じて細胞内品質管理の役割を果たしている。研究代表者らはオートファジーの腎疾患における機能に注目し、腎虚血再還流およびシスプラチン腎症などの急性ストレス下において、またシクロスポリン腎症や代謝性アシドーシス、糖尿病性腎症、老化腎など慢性ストレス下において、近位尿細管のオートファジーの果たす役割について探求してきた。

急性腎障害 (AKI) における脂質代謝異常とオートファジー

AKI は数時間から 1 週間程度の経過で腎臓の機能が低下する病態であり、以前は“一過性”腎機能低下、つまり“完全に回復可能な”腎機能低下とされてきたが、近年 AKI 後の生命予後が著しく悪化することや、末期腎不全や慢性腎臓病 (CKD) に至る予後の悪い病態であることが明らかとなってきた。一方で高齢化、CKD や糖尿病などの AKI 高リスク疾患患者の増加などによりその頻度は増加し続けている。そのため AKI の制御は急務であるが、治療法の開発は十分でない。

AKI の主座である腎近位尿細管では、脂肪滴の蓄積、脂質代謝全般の低下、一部の有害な脂肪蓄積による細胞傷害 (脂肪毒性) など脂質代謝の異常が病態の進展に関わることが古くから知られている。最近研究代表者らは 脂肪毒性とオートファジー: 高脂肪食負荷により生じる腎障害にオートファジーが対抗する、脂肪滴とオートファジー: 飢餓時には尿管に取り込まれた脂肪酸 (脂肪組織由来) から形成された脂肪滴をオートファジーが分解する (リポファジー) ことで、飢餓時のエネルギー恒常性が維持される、など脂質代謝におけるオートファジーの果たす役割について探求している。これらの研究の過程で、AKI 時の発症進展、特に脂質代謝異常、脂肪毒性におけるリポファジーの役割に着眼するに至った。

2. 研究の目的

リポファジーの受容体 (すなわちオートファジーで分解される脂肪滴上の標的分子) を同定すること。

AKI 後の近位尿細管におけるリポファジーの動態とその役割の解明

リポファジーの調節が AKI に与える影響を調べる

3. 研究の方法

リポファジー受容体の同定

48 時間飢餓後のマウスより採取した腎組織より、超遠心法を用いて脂肪滴分画を抽出・精製する。得られた脂肪滴分画を LC-3 抗体で免疫沈降し、質量分析にかける。得られたいくつかのリポファジー受容体の候補について (1) ~ (3) の方法で絞り込みを行う。(1) 48 時間飢餓後の腎臓での発現上昇、(2) 培養細胞系で候補 X をノックダウンした際の表現型 (脂肪滴の蓄積) (3) 培養細胞において脂肪酸を負荷した際の分子 X が脂肪滴に局在するか否か。また AKI (マウス片側腎 35 分の虚血再灌流 (IRI)) 時の腎臓での X の発現上昇を mRNA レベル、蛋白レベルで確認する。

AKI 時のリポファジーの動態

マウス AKI モデルを用い、脂肪滴やリポファジーの動態を形態的・機能的に解析する。脂肪滴と関連の深いリソソームについても並行して探索し、脂肪滴や脂質代謝との関連を調べる。必要に応じて不死化培養近位尿細管細胞を用い、低酸素下培養後再酸素化の動態を AKI の in vivo モデルとして使用し、リポファジーの分子機構解明のために用いる。

リポファジーの分子機構の解明とその調節が AKI に与える影響

-1 リポファジーの分子機構の解明: 受容体 X が同定されれば、次に受容体 X の flox マウスを作成する。すでに入手あるいは樹立済みの近位尿細管特異的 Cre マウス (KAP-Cre および NDRG-Cre マウス) と交配することで、近位尿細管細胞特異的リポファジー不全マウスを作成し、AKI モデルでの表現型を解析する。

-2 同時に肝臓においてリポファジー抑制因子として報告されている Rubicon やリポファジー活性化因子として報告されている TFEB や PPAR のノックアウトマウスを作成し解析することで、リポファジー亢進により AKI において尿管障害が軽減するか否かを検討する。PPAR のノックアウトマウスの結果が予想通りであれば、AKI モデルを用い PPAR アゴニスト投与による腎保護効果を検証する。

4. 研究成果

飢餓後のマウス腎の脂肪滴分画を LC-3 抗体で免疫沈降し、質量分析にかけた。コントロールとしては自然給餌状態のマウス腎を用いた。(1)48 時間飢餓下での発現上昇、(2)培養細胞系でノックダウンした際の表現型(脂肪滴の蓄積)をもとに数個のリポファジー受容体候補分子を同定した。この一部については、培養細胞において脂肪酸を負荷した際に脂肪滴に局在し、かつ AKI 時の腎臓で発現が亢進していた。

電子顕微鏡による観察から、IRI48 時間後には近位尿細管内に多数の脂肪滴の蓄積を認め、それを消化するリポファジーが惹起されていることが明らかになった。脂肪滴の近傍には拡大したリソソームを多数認め、リソソーム酵素活性低下およびリソソーム膜透過性亢進(LMP)を伴っていた。IRI 時の脂肪滴の蓄積をはじめとする脂質代謝異常とリソソーム障害の関連を解明するため、培養細胞を用いた解析やリポミクス解析を行ったところ、脂肪滴内に蓄積する過酸化脂質代謝産物がリソソーム障害、引き続きリポファジー活性低下・LMP を引き起こすことが明らかとなった。

-1 現在 で候補となった分子の flox マウスを作成中で、尿細管細胞特異的ノックアウトマウスを樹立する予定である。

-2 近位尿細管細胞特異的 Rubicon あるいは TFEB ノックアウトマウスについては、AKI 時のリポファジーの亢進(Rubicon)や抑制(TFEB)を確認しているが、詳細な解析は途上である。また AKI モデルで PPAR アゴニストを投与したところ、リポファジーが亢進することにより脂肪滴が減少し、リソソーム障害や腎傷害が改善した。一方、PPAR ノックアウトマウスでは増悪した。また過酸化脂質阻害効果を有する ferrostatin-1 の投与でもリソソーム障害や腎傷害が改善した。

【結論】

AKI 時に近位尿細管で亢進するリポファジーは腎保護的に機能するが、脂肪滴内に蓄積する過酸化脂質代謝産物がリソソーム障害、引き続きリポファジー活性低下を引き起こす。PPAR アゴニストや ferrostatin-1 投与は過酸化脂質阻害やリポファジー活性化作用を介して、AKI を改善する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村隼、南聡、山本毅士、高島義嗣、難波倫子、高橋篤史、余西洋明、猪阪善隆
2. 発表標題 脂質代謝異常によるリソソーム障害が急性腎障害（AKI）を進展させる
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南聡、高島義嗣、山本毅士、難波倫子、高橋篤史、酒井晋介、余西洋明、中村隼、猪阪善隆
2. 発表標題 急性腎障害（AKI）では尿細管での脂質代謝障害がリソソーム機能を低下させ腎機能増悪を進展させる
3. 学会等名 第10回分子腎臓フォーラム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	猪阪 善隆 (Isaka Yoshitaka) (00379166)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	高島 義嗣 (Takabatake Yoshitsugu) (30403075)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------