

令和 4 年 4 月 27 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08724

研究課題名(和文) 蛋白翻訳後修飾O-GlcNAc修飾の腎生理ならびに糖尿病性腎臓病における役割

研究課題名(英文) Role of protein O-GlcNAcylation in pathogenesis of diabetic kidney disease

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肥満患者数の増加に伴う肥満関連腎臓病や糖尿病性腎症の有病率の増加は解決すべき我が国の喫緊の課題の一つである。本研究では、タンパク質の翻訳後修飾の一つであるO-GlcNAc修飾の腎臓での生理的役割を解明し、その制御が新たな腎臓病治療標的となりえるかを検討した。結果、腎近位尿細管細胞におけるO-GlcNAc修飾は同細胞における絶食時の脂肪酸燃焼を介したATP産生に不可欠であること、そしてその異常が肥満や糖尿病状態での腎障害の病態に寄与す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

肥満患者数の増加に伴う腎臓病患者数の増加に対する新たな治療法が求められている。本研究では、腎臓におけるO-GlcNAc修飾が腎臓におけるエネルギー代謝の中核を担うメカニズムであり、その異常が肥満や糖尿病を背景とする腎臓病の発症進展に寄与することが明らかとなった。今後の研究の発展により、O-GlcNAc修飾を標的とした新規腎臓病治療の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：The increasing prevalence of obesity-related kidney disease and diabetic nephropathy due to the increasing number of obese patients is one of the most pressing issues in Japan that must be resolved. In this study, we investigated the physiological role of O-GlcNAcylation, one of the post-translational modifications of proteins, in the kidney and whether its regulation could be a new therapeutic target for kidney disease. The results revealed that the O-GlcNAcylation is essential for ATP production via fatty acid burning during fasting in renal proximal tubular cells, and that its abnormalities contribute to the pathogenesis of renal injury in obesity and diabetic conditions.

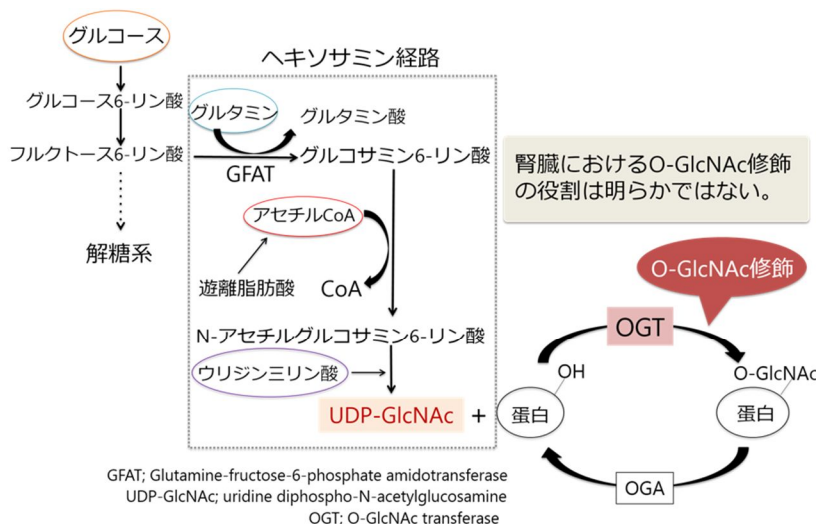
研究分野：腎臓病

キーワード：腎臓病 糖鎖修飾 糖尿病性腎症 肥満関連腎臓病

1. 研究開始当初の背景

蛋白の翻訳後修飾はその蛋白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。近年、細胞質や核に存在する蛋白に対して、酵素学的な糖鎖修飾 (O-GlcNAc 修飾) が生じること、この修飾が細胞内栄養センサーとして、細胞機能調節に重要な役割を果たしていることが明らかとされた。この O-GlcNAc 修飾は、解糖系側副路でできた修飾基質 UDP-GlcNAc を、蛋白の Ser、Thr 残基に付加する修飾であり、O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) により付加され、O-GlcNAc 分解酵素 (OGA) により除去される (下図)。

糖尿病性腎症や肥満関連腎臓病の腎組織ではこの O-GlcNAc 修飾が亢進しているとの知見があり、また、O-GlcNAc 修飾の異常が、様々な代謝・老化疾患の発症に関連していることが明らかにされ、腎臓のみならず、種々の組織で O-GlcNAc 修飾が担う細胞機能の詳細な説明が待たれている。しかしこれまで、



O-GlcNAc 修飾の腎臓における生理的な機能解析、糖尿病性腎症や肥満関連腎臓病の病態との関連解析は十分に進んでいない状況である。

2. 研究の目的

本研究では、腎における O-GlcNAc 修飾の生理的機能の解明、並びに、O-GlcNAc 修飾の異常と糖尿病性腎症や肥満関連腎臓病の病態との関わりを解明し、O-GlcNAc 修飾がこれら疾患の新規治療標的になり得るかを探索する。

3. 研究の方法

近位尿細管特異的 O-GlcNAc 修飾欠損マウス表現型の検討

Ogt^{f/f} マウスと近位尿細管特異的 Cre 発現マウス (NDRG1-CreER^{T2} マウス) を交配し得られたマウスに生後 8 週齢でタモキシフェンを腹腔内投与することにより、近位尿細管特異的 Ogt 欠損マウスを作製した。Ogt^{f/y} マウスをコントロールマウスとした。タモキシフェン投与後の体重、血糖、食餌量を評価し、摂食時および 48 時間絶食下における腎組織観察、蓄尿検査、組織内 ATP 濃度測定を行なった。

近位尿細管における O-GlcNAc 修飾標的蛋白の検討

48 時間絶食下における近位尿細管特異的 Ogt 欠損マウスおよびコントロールマウスの腎皮質組織をプロテオーム解析に供し、発現蛋白の比較検討およびパスイ解析を行なった。発現変動を認めた蛋白とその関連蛋白を免疫沈降法により、実際に O-GlcNAc 修飾標的蛋白であるか確認

した。また、単離培養近位尿細管に対して、標的蛋白の過剰発現を pcDNA3 ベクターの導入により行い、細胞内脂肪滴観察、ATP 測定、細胞死評価を行なった。

肥満糖尿病状態における近位尿細管と O-GlcNAc 修飾欠損との関連の検討

肥満糖尿病モデルとして db/db マウスと高脂肪食負荷マウス、肥満糖尿病・動脈硬化モデルとして高脂肪食負荷 ApoE^{-/-}マウスを用い、それぞれの腎組織における O-GlcNAc 修飾蛋白、腎障害、腎線維化を評価した。近位尿細管特異的 Ogt 欠損マウス、Ogt^{f/y} マウスに高脂肪食負荷を行い、腎障害、細胞内脂肪毒性の評価を行なった。

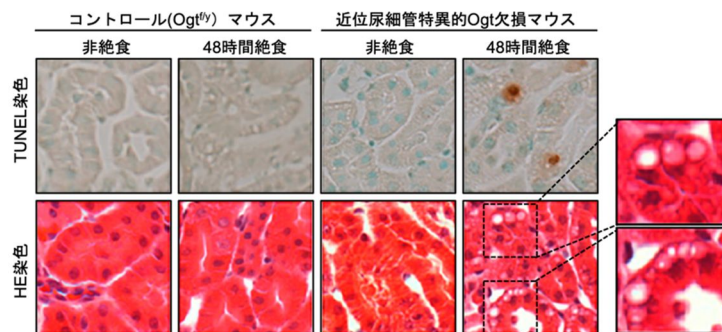
ポドサイトと近位尿細管における O-GlcNAc 修飾過剰が両細胞機能に及ぼす影響の検討

Oga^{f/y} マウスとポドサイト特異的 Cre 発現マウス (Podocin-Cre^{ERT2}) 並びに、近位尿細管特異的 Cre 発現マウス (NDRG1-Cre^{ERT2} マウス) を交配し、ポドサイト特異的 Oga 欠損マウス、近位尿細管特異的 Oga 欠損マウスを作製し、ストレプトゾトシン非投与、投与下での表現系を解析した。

4. 研究成果

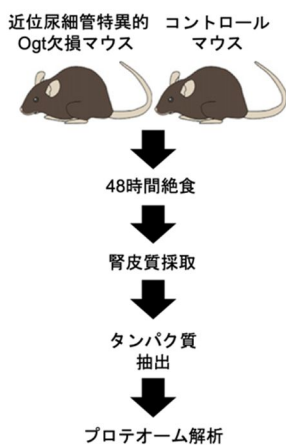
近位尿細管特異的 O-GlcNAc 修飾欠損マウス表現型の検討

近位尿細管特異的 Ogt 欠損マウスでは、摂食時には有意な表現型を呈さなかったが、48 時間絶食時に、アミノ酸、グルコース、各種イオンの尿中排泄の増加、近位尿細管細胞のアポトーシス亢進を認めた(右図)。さらに、近位尿細管細胞内への顕著な脂肪蓄積、ミ



トコンドリアの断片化を伴う ATP 含量の有意な減少が確認された。

近位尿細管における O-GlcNAc 修飾標的蛋白の検討



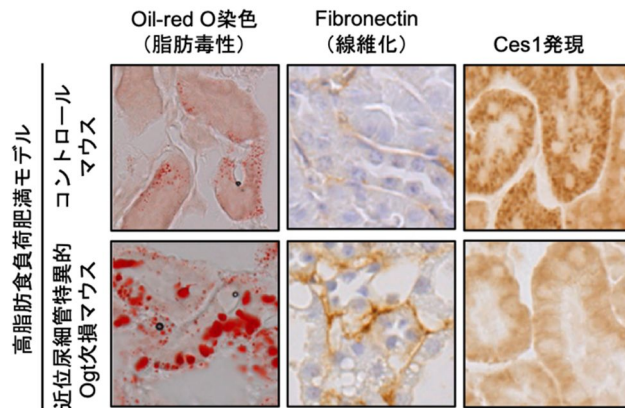
Rank	Pathway	Score	Score(p)	Score(v)	Score(c)
1	Lipoprotein metabolism	122.575	1.262E-037	0.018	0.301
2	MMP signaling pathway	67.509	4.761E-021	0.018	0.092
3	Granzyme signaling pathway	46.941	7.403E-015	0.007	0.228
4	Transcriptional regulation by Nrf	46.587	9.459E-015	0.007	0.224
5	Alternative complement pathway	36.447	1.067E-011	0.004	0.538
6	Intermediate filament signaling pathway	36.356	1.137E-011	0.010	0.085

Fold change	High	Low	Protein	Function
10.3	Control	Knockout	Carboxylesterase 1C (Ces1c)	TG and CE hydase
1.9	Control	Knockout	Carboxylesterase 1D (Ces1d)	TG and CE hydase
1.8	Control	Knockout	Carboxylesterase 1F (Ces1f)	TG and CE hydase
1.7	Control	Knockout	Carboxylesterase 1E (Ces1e)	TG and CE hydase

プロテオーム解析の結果、近位尿細管特異的 Ogt 欠損マウスの腎では、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(上図)。近位尿細管特異的 Ogt 欠損マウス腎からの単離近位尿細管細胞において、CES1 過剰発現により細胞内の脂肪滴の蓄積、アポトーシス亢進、ATP 含量の低下が改善されたことから、CES1 発現低下が表現型の原因と考えられた。また、免疫沈降法からは、CES1 の転写因子 Farnesoid X Receptor (FXR) が O-GlcNAc 修飾を受けることにより、その転写活性を維持していることが明らかとなった。

肥満糖尿病状態における近位尿管と O-GlcNAc 修飾との関連の検討

各種代謝関連疾患モデルマウス腎の検討で、動脈硬化および尿管障害に付随して O-GlcNAc 修飾と CES1 発現の低下が認められた。また、高脂肪食負荷した近位尿管特異的 Ogt 欠損マウスでは、腎内 CES1 発現の減少を伴う顕著な脂肪滴形成、高度な尿管障害を呈した（右図）。



以上より、肥満糖尿病状態において、O-GlcNAc 修飾の減弱は CES1 現象を伴う腎脂肪毒性の悪化、尿管障害の進展に寄与することが示された。

ポドサイトと近位尿管における O-GlcNAc 修飾過剰が両細胞機能に及ぼす影響の検討

ポドサイト特異的 Oga 欠損マウス、近位尿管特異的 Oga 欠損マウスともに、ストレプトゾトシン非投与下、投与下において、コントロールマウスと比べ有意な腎表現系を示さなかった。

本研究から、ポドサイト並びに近位尿管細胞における O-GlcNAc 修飾の過剰は、腎臓において、特に影響を与えないことが明らかとなった。一方で、近位尿管細胞における O-GlcNAc 修飾の消失により顕著な表現系が得られ、同細胞での O-GlcNAc 修飾は絶食状態・肥満糖尿病状態で、脂質代謝調節を介して腎・尿管機能の維持に関与していることが明らかになった。近位尿管は、生体の恒常性の維持のために重要な役割を担っており、糸球体で濾過された物質の再吸収や分泌調整のため、常にエネルギーを必要としている。そのため、様々な生理的環境下に対応すべく、エネルギー源を主として脂肪酸に依存する特徴的な代謝機構を発達させてきたと考えられ、O-GlcNAc 修飾による FXR 転写活性の維持はその一つと考えられる。本研究により、近位尿管細胞 O-GlcNAc 修飾調節機構の破綻が、腎障害と関連することが明らかとなり、同機構の維持が糖尿病性腎症を含む腎障害の新たな治療標的となり得る可能性が示唆された。今後、FXR を含めた O-GlcNAc 修飾を受ける分子の解明が、糖尿病性腎症の病態生理の解明および新規治療標的の同定につながるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugahara Sho, Kume Shinji, Chin-Kanasaki Masami, Tomita Issei, Yasuda-Yamahara Mako, Yamahara Kosuke, Takeda Naoko, Osawa Norihisa, Yanagita Motoko, Araki Shin-ichi, Maegawa Hiroshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Protein O-GlcNAcylation Is Essential for the Maintenance of Renal Energy Homeostasis and Function <i>via</i> Lipolysis during Fasting and Diabetes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 962 ~ 978
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2018090950	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅原 翔, 久米 真司, 山原 真子, 山原 康佑, 武田 尚子, 大澤 紀之, 金崎 雅美, 柳田 素子, 荒木 信一, 前川 聡
2. 発表標題 腎臓近位尿管のO-GlcNAc修飾依存的脂肪酸代謝に着目した新規糖尿病性腎臓病治療標的の探索
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
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
研究協力者	久米 真司 (Kume Shinji)		
研究協力者	菅原 翔 (Sugahara Sho)		

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
---------	---------