

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20710

研究課題名（和文）腎組織リピドミクスを用いた慢性腎臓病の病態解明および新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of chronic kidney disease and development of new therapeutic agents using renal tissue lipidomics

研究代表者

高橋 直宏（Takahashi, Naohiro）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：20907737

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：ULK1ノックアウトマウスのCKDモデルでは、腎機能と腎線維化の悪化を認めた。病理学的にもULK1ノックアウトCKDモデルマウスでは高度な尿細管障害と腎線維化を認めた。また、ULK1ノックアウトCKDモデルマウスの腎臓では、AMPKの活性化の低下とその下流の代謝シグナルである酸化が低下し、AMP/ATP比が上昇している（エネルギー不良状態）ことを確認した。また、腎機能が正常なコントロールULK1ノックアウトマウスでは、腎臓におけるAMPKの活性化と酸化に関するシグナルが野生型マウスと比較して低下しており、ULK1の欠乏が腎臓におけるAMPK活性を抑制していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ULK1蛋白の欠乏がCKDモデルマウスの腎機能の増悪、腎線維化の悪化に繋がることを明らかにした。さらに、ULK1の欠乏はAMPKの活性を抑制し、酸化の低下から腎組織内のエネルギー不全につながることを示した。今回の発見は、CKDの進行と腎組織内のエネルギー恒常性維持におけるULK1の新しい役割を明らかにするものである。このことはULK1がCKD治療の新規ターゲットとなる可能性を示唆しており、意義深いものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that AMPK and ULK1 activities were decreased in the kidneys of CKD mice. However, whether and how ULK1 is involved in the underlying mechanism of CKD exacerbation remains unknown. In this study, we investigated the ULK1 involvement in CKD, using ULK1 knockout mice. The CKD model of Ulk1/ mice exhibited significantly exacerbated renal function and worsening renal fibrosis. In the kidneys of the CKD model of Ulk1/ mice, reduced AMPK and its downstream -oxidation could be observed, leading to an energy deficit of increased AMP/ATP ratio. In addition, AMPK signaling in the kidney was reduced in control Ulk1/ mice with normal renal function compared to control wild-type mice, suggesting that ULK1 deficiency suppressed AMPK activity in the kidney. This study is the first to present ULK1 as a novel therapeutic target for CKD treatment, which regulates AMPK activity in the kidney.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓 慢性腎臓病 脂質代謝物 AMPK エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

本邦の CKD 患者数は 1330 万人と推計され、CKD の新規治療開発は患者の QOL や医療費削減の点で非常に重要な課題である。しかし CKD の現行治療は保存的加療が中心であり、病態に直接アプローチする治療法の開発が求められている。

PUFA は炎症の開始と収束の両者に重要であり、主に 6 系脂肪酸の代謝物が炎症性、3 系脂肪酸の代謝物が抗炎症性メディエーターとして機能することが知られている。通常、両者の適切なバランスによって炎症が制御されているが、これが破綻すると炎症が遷延し、線維化などの不適切な組織修復を惹起し心血管疾患などの慢性炎症を主体とした病態に関わってくる。生体内には脂肪酸代謝酵素(COX、LOX、CYP など)の下流に数多くの脂質メディエーターが存在するが、近年リポミクスと呼ばれる網羅解析により脂質メディエーターのプロファイルと個別分子の同定が可能になった。CKD も慢性炎症を主な徴候とする病態であるが、腎の炎症・線維化への PUFA の関与については今まで不明であった。申請者はこれまでに CKD 腎臓では脂肪酸代謝酵素 ALOX15 が増加しており、ALOX15 欠失マウスは CKD の腎障害と線維化に抵抗性であり、リポミクスによってそのフェノタイプには PGD2 の増加が関与していることを明らかにした(Clin Exp Nephrol. 2021)。このように特定の脂肪酸・脂肪酸代謝酵素が CKD の治療標的となり得ることから、PGD2 以外にも CKD の病態を修飾し得る脂肪酸を探索することが、CKD の新規治療標的につながると考える。

また、近年、私たちの研究室はエネルギー恒常性を維持するキナーゼ蛋白である AMP-activated protein kinase (AMPK) が、CKD においてはエネルギー不全状態を正常に感知できず、結果として AMPK の活性が得られない事を発見した。この AMPK の活性低下は腎組織内において更なるエネルギー不全状態を引き起こし、CKD の悪循環に繋がることも報告した。AMPK の活性低下は、その下流シグナルである Acetyl-CoA carboxylase (ACC)の活性低下に関わり、酸化の低下から CKD の進行に関与することが近年報告されている。しかしながら、AMPK はこの ACC の他に様々な下流シグナルの活性化にも関与しており、これらの下流シグナル活性の低下と CKD 進展の関係はいまだ不明な点が多い。私たちは、この AMPK と下流シグナルの関係性の解明が、CKD の新たな治療戦略の開発に繋がることを期待した。

2. 研究の目的

本研究は、3 系脂肪酸を生体内で多量に合成可能な遺伝子改変マウスの CKD モデルを作成し、その腎組織における脂質メディエーターのプロファイル変化を網羅的に解析することで、CKD に関与する specific な 3 系脂肪酸代謝物を同定し、バイオマーカーや新規治療標的など CKD の診断と治療へ応用可能な知見を得ていくことを目的とする。

さらに、本研究では、この AMPK の下流シグナルとして知られる Unc-51-like kinase 1 (ULK1) に注目した。ULK1 はオートファジーに関わる蛋白として知られ、AMPK によってリン酸化を受けることで活性化されることが知られている。一方で、近年は逆に ULK1 が AMPK をリン酸化することで、AMPK の活性を制御することも分かっている。私たちの研究室では、CKD モデルマウスの腎臓において、この ULK1 の活性が低下していることを発見していたが、この ULK1 の活性低下と CKD の進行の関係性に関しては不明であった。そこで本研究では、ULK1 ノックアウトマウスを用いて、ULK1 蛋白が CKD の進行に関与するかを明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

脂肪酸代謝物研究については、CKD・fat-1 遺伝子の有無で 4 群のマウスを用意し、リポミクスで腎の脂質メディエーターを網羅解析する。

また、AMPK 研究においては、CKD モデルマウスの作成のため、6-8 週齢時の雄の C57BL/6 マウスを用いて、麻酔下に左腎臓の 2/3 を外科的に切除し摘出した。その 3 週間後に麻酔下に右腎臓を外科的に摘出し、右腎臓摘出から 4 週間後のマウスを CKD モデルマウスとした (5/6 腎摘モデルマウス)。

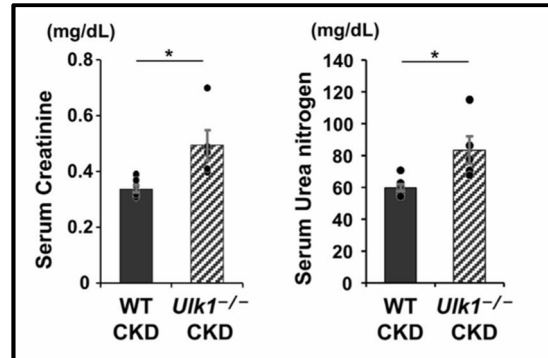
野生型および ULK1 ノックアウトの健常群と CKD 群から腎臓を摘出し、蛋白抽出を行った後、ウェスタンブロッティングで腎臓内の蛋白発現量を評価した。また、同様に野生型および ULK1 ノックアウトの健常群と CKD 群から摘出した腎臓から RNA を抽出し、逆転写を行い、得られた相補的 DNA を用いて、腎臓内の遺伝子転写量を評価した。また、腎臓内の AMP, ATP を測定するため、AMP assay kit (Abcam)および AMERIC-ATP kit (Americ)を用いて、組織中の AMP および ATP を抽出した。

4. 研究成果

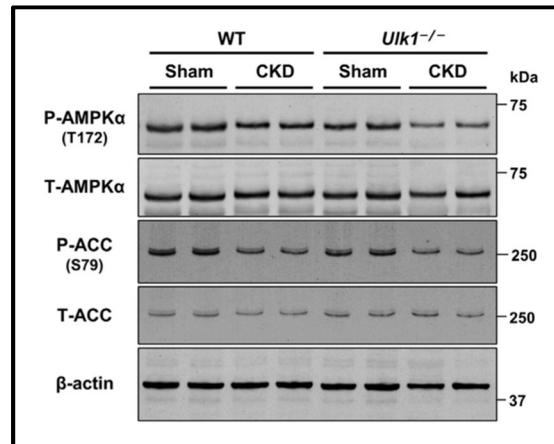
脂肪酸代謝物研究については、いずれが CKD の病態に深く関与しているかを解明するため腎組織のリピドミクスを行った。CKD や *fat-1* の存在に連動して興味深い挙動を示す脂質メディエーター分子を 5 種類ほど同定しており、今後、さらなる研究を進めていく。

AMPK 研究に進捗があり、共著者としても論文報告があったので記載する (Genes Cells. 2023. 28, 5-14.)

まず野生型マウスの健常腎と CKD 腎の AMPK および ULK1 蛋白の発現量を評価したところ、CKD 腎では AMPK の発現・活性および、ULK1 の発現・活性が共に低下を認めた。ULK1 蛋白が CKD 増悪に関与するか評価を行うため、ULK1 ノックアウトマウスを用いて CKD モデルマウスを作成したところ、ULK1 ノックアウト CKD マウスでは、血清クレアチニン値、尿素窒素値の上昇を認めた (右図)。また、ULK1 ノックアウト CKD マウスでは、病理学的な高度な腎線維化所見を認め、腎組織内の NGAL 蛋白 (尿管障害因子) 発現の増加と、腎線維化遺伝子 (*Col1a*, *Col3a*, *Fn1*) の転写量の増加を認めた。次に、ULK1 ノックアウト CKD モデルマウスの高度な腎障害とオートファジーの影響を評価するため、腎組織内のオートファジー関連蛋白である LC3- / 蛋白、SQSTM/p62 蛋白の評価を行った。ULK1 ノックアウト CKD 腎は、野生型 CKD 腎と比較して、上記オートファジー関連蛋白の有意な発現量の変化は認めず、腎障害へのオートファジーの影響は確認できなかった。



続いて、ULK1 ノックアウト CKD 腎における AMPK の活性を評価すると、ULK1 ノックアウト CKD 腎では野生型 CKD 腎と比較して、高度な AMPK 活性の低下を認め、同時に β 酸化に関与する ACC の活性も低下を認めた。また、ULK1 ノックアウト健常腎と野生型健常腎の AMPK および ACC の活性を評価したところ、ULK1 ノックアウト健常腎で有意に AMPK および ACC 活性が低下していたことから、ULK1 の欠乏が AMPK の活性低下の原因であることが示唆された (右図)。一方で、ULK1 ノックアウトと野生型マウスの腎組織内のエネルギー状態 (AMP/ATP 比) を評価すると、ULK1 ノックアウト群で有意なエネルギー状態の悪化 (AMP/ATP 比の増高) を認めた。AMPK の活性に関わる AMPK の上流キナーゼである liver kinase B1 (LKB1) のリン酸化は、ULK1 ノックアウトと野生型マウスでは有意な差は認めなかった。また AMPK の脱リン酸化に関与する protein phosphatase 2A (PP2A) および 2C (PP2C) の発現は、ULK1 ノックアウトマウスでの上昇は認めなかった。AMPK の下流に位置し、 β 酸化に関わる代謝遺伝子 (*Ppara*, *Acox1*, *Cpt2*) の転写量に関しても、ULK1 ノックアウト CKD 腎で有意に低下を認めた。これらの結果、ULK1 の欠乏は AMPK の活性低下と β 酸化の低下を引き起こし、エネルギー不全から CKD の増悪に繋がることがわかった。



本研究の考察であるが、ULK1 蛋白の欠乏が CKD モデルマウスの腎機能の増悪、腎線維化の悪化に繋がることが明らかになった。さらに、ULK1 の欠乏は AMPK の活性を抑制し、 β 酸化の低下から腎組織内のエネルギー不全につながることを示した。今回の発見は、CKD の進行と腎組織内のエネルギー恒常性維持における ULK1 の新しい役割を明らかにするものである。

ULK1 はこれまで AMPK によってリン酸化を受けるキナーゼ蛋白として知られてきた。一方で近年、反対に ULK1 が AMPK の活性を制御する報告がされており、本研究で発見した ULK1 ノックアウト腎における AMPK 活性の低下は、この ULK1 による AMPK 活性の制御機構の存在を支持するものである。しかしながら、この ULK1 による AMPK の制御機構に関してはまだ不明な点が多い。

AMPK の活性制御には主に 3 つの経路に関わることが知られており、1) AMPK の上流キナーゼである LKB1 による制御、2) 脱リン酸化酵素である PP2A および PP2C による AMPK の脱リン酸化、3) AMPK の AMP/ATP 比に対する反応、が関与することが分かっている。本研究では、LKB1 と PP2A/2C に注目したが、このどちらも ULK1 欠乏と AMPK 活性低下への影響を認めなかった。近年私たちの研究室では、CKD の腎臓では、AMPK が正常に AMP を感知できない

ことを報告した。本研究では、ULK1 ノックアウト CKD 腎における AMP/ATP 比の増高を認めただけに関わらず、ULK1 ノックアウト CKD 腎では AMPK の活性が低下していたことから、より AMPK の AMP 感知能が低下していることが予想された。これらの事実から ULK1 によって AMPK の AMP 感知が制御されている可能性が考えられる。今後更なる研究による解明が期待される。

ULK1 はオートファジーに関わるシグナル蛋白として知られている。一方で、ULK1 欠乏によるオートファジーへの影響は組織によって異なることが分かっている。本研究では、腎組織においては ULK1 欠乏によるオートファジーへの影響は認めず、ULK1 ノックアウト CKD 腎で認められた高度な腎機能障害の進行へのオートファジーの影響は少ないと考えられた。

以上のことから、ULK1 ノックアウト CKD モデルマウスでは、高度な腎機能障害と腎線維化を認めた。また、ULK1 ノックアウト CKD モデルマウスの腎臓では、AMPK の活性低下とその下流の β 酸化の低下が観察され、ULK1 ノックアウトマウスの CKD 悪化は、AMPK 活性の低下によるエネルギー不足と、AMPK のエネルギー不足への感知不良が原因であることが示唆された。本研究では、ULK1 が腎臓で AMPK 活性を調節していることを明らかにし、このことは ULK1 が CKD 治療の新規ターゲットとなる可能性を示唆する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahashi Naohiro, Kikuchi Hiroaki, Usui Ayaka, Furusho Taisuke, Fujimaru Takuya, Fujiki Tamami, Yanagi Tomoki, Matsuura Yoshiaki, Asano Kenichi, Yamamoto Kouhei, Ando Fumiaki, Susa Koichiro, Mandai Shintaro, Mori Takayasu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Arita Makoto, Sohara Eisei	4. 巻 25
2. 論文標題 Deletion of Alox15 improves kidney dysfunction and inhibits fibrosis by increased PGD2 in the kidney	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 445 ~ 455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02021-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yanagi Tomoki, Kikuchi Hiroaki, Susa Koichiro, Takahashi Naohiro, Bamba Hiroki, Suzuki Takefumi, Nakano Yuta, Fujiki Tamami, Mori Yutaro, Ando Fumiaki, Mandai Shintaro, Mori Takayasu, Takeuchi Koh, Honda Shinya, Torii Satoru, Shimizu Shigeomi, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Sohara Eisei	4. 巻 28
2. 論文標題 Absence of ULK1 decreases AMPK activity in the kidney, leading to chronic kidney disease progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 5 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12989	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔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 柳 智貴, 蘇原 映誠, 菊池 寛昭, 竹内 恒, 須佐 紘一郎, 高橋 直宏, 中野 雄太, 安藤 史顕, 萬代 新太郎, 森 崇寧, 本多 真也, 鳥居 暁, 清水 重臣, 頼 建光, 内田 信一
2. 発表標題 ULK1によるAMPKのAMP感受性制御の発見とCKDにおける破綻の解明
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 菊池 寛昭, 高橋 直宏, 蘇原 映誠	4. 発行年 2021年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 7
3. 書名 腎と透析【新しい手法を駆使した腎臓病研究の最前線】慢性腎臓病 慢性腎臓病とエネルギー代謝障害 メタボロミクス	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	National Institute of Health			