

平成 30 年 4 月 20 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293217

研究課題名(和文)オートファジーを標的とした糖尿病ならびに合併症の包括的病態解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of autophagy in the pathogenesis of diabetes and its complications

研究代表者

前川 聡 (Maegawa, Hiroshi)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：00209363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内浄化機構オートファジーは細胞の恒常性維持に不可欠な機構であり、近年、その異常が種々の疾患の病態形成に関与することが明らかとされつつある。今回の研究において、哺乳類におけるオートファジーは、絶食時のケトン産生を制御することで、全身のエネルギー代謝の恒常性維持に寄与することが明らかとなった。また、このオートファジーの活性は糖尿病状態で減弱すること、そして、この異常が糖尿病血管合併症の発症進展に寄与することが明らかとなった。今回の結果より、オートファジーの活性化が糖尿病患者の健康寿命の促進に寄与する可能性が示され、今後、オートファジー活性化薬による新規糖尿病治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is an intracellular catabolic process that can maintain cellular homeostasis during several stress conditions such as starvation and mitochondrial oxidative stress. Growing evidences have shown that altered autophagy activity is associated with the pathogenesis of a variety of diseases. The present study revealed that mammalian autophagy is essential for maintaining energy homeostasis via enhancing ketogenesis during starvation, and that diabetes-related dysregulation of autophagy is involved in the pathogenesis of diabetic vascular complications, such as diabetic nephropathy. These observation suggest that autophagy activation should shed a light on therapy for diabetic complications and contribute to health promotion in diabetic patients.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 肥満 糖尿病性腎症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者数の増大、それに伴う糖尿病血管合併症有病者数の増加は、健康寿命の低下、医療費の高騰など、多くの医療問題を引き起こしている。本研究課題は、細胞内浄化機構の一つ「オートファジー」に着目し、オートファジーの糖尿病ならびに血管合併症への関与を検証し、その治療標的としての可能性を探索するものである。

オートファジーには大別して2つの生理的役割が存在する。1つ目は、飢餓時に自己成分を分解することで蛋白再合成のためのアミノ酸再供給を行うことであり、2つ目は、不良蛋白質や異常オルガネラなどの細胞内老廃物の排除である。このようなオートファジーの細胞内恒常性維持機構としての働きは、線虫などの下等生物で主に確認されてきたが、近年の研究では、哺乳類でもこれらの機能が確認され、更に、その異常が各種疾患発症に関与することが示されつつあることから、オートファジーの活性制御が種々の疾患に対する治療標的となる可能性に期待が高まっている。

糖尿病(特に肥満2型糖尿病)の発症には、生物が進化の過程で飢餓を克服すべく獲得した俟約機構が関与し、また合併症の発症には、細胞内ストレス過剰により生じる細胞障害が深く関与している。上述するオートファジーの生理作用を考えると、糖尿病や合併症の発症に全身臓器のオートファジーが密接に関与しうる事が推察され、その関与の解明はオートファジーを標的とした新規糖尿病、合併症治療の開発をもたらし可能性がある。

実際に、糖尿病、合併症領域の研究でも少しずつではあるが、オートファジー機構の関与が示されつつある。しかし、オートファジー研究は未だ始まったばかりであること、糖尿病発症から合併症進展までには、多臓器での種々の病態が関与することから、臨床応用への発展の為には、各臓器におけるオートファジーの生理的作用、臨床的問題を解決しうる基礎研究を積み重ねる必要がある。

2. 研究の目的

オートファジーとは細胞質成分の大規模分解機構であり、その活性化は飢餓時の生存や細胞内異常構造物の排除を介した細胞内恒常性維持に不可欠な機構である。近年、種々の疾患とオートファジー機構との関わりが報告されつつあり、糖尿病領域においても、オートファジーと肥満あるいは合併症との関わりが少しずつ解明されつつある。しかし今後、オートファジーを標的とした糖尿病、合併症治療を確立する為には、糖尿病の発症から、糖尿病に関わる急性期、慢性期合併症に至る全ての病態とオートファジーとの関わり、そして、全ての臓器におけるオートファジーの生理的役割を包括的に解明してお

く必要がある。本研究では、哺乳類で確認されているマクロオートファジーならびにシャペロン介在性オートファジーの飢餓応答における生理的役割から糖尿病の各臓器における役割を解明すると共に、成体におけるオートファジー活性を反映する新規バイオマーカーの同定を目指す。

3. 研究の方法

臓器特異的オートファジー不全マウスを作製する。

のマウスに絶食刺激を行い、絶食応答における臓器別オートファジーの役割を解明する。

のマウスを用い、糖尿病発症における臓器別オートファジーの役割を解明する。

腎特異的オートファジー欠損マウスに糖尿病を誘発し、腎症におけるオートファジーの役割を明らかにする。

糖尿病症例サンプルを用い、新規バイオマーカーあるいは病態関連遺伝子の探査を行う。

4. 研究成果

マクロオートファジーの臓器特異的不全マウスを作製する。

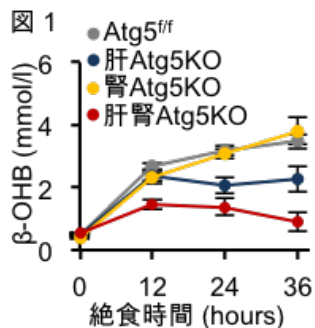
オートファジー活性に不可欠な遺伝子である Atg5 遺伝子 Flox マウスと各組織特異的 Cre 発現マウスとの交配により、肝臓 (Alb-Cre)、骨格筋 (Mlc1-Cre)、膵細胞 (Glucagon-Cre)、小腸上皮 (Villin-Cre)、糸球体上皮細胞 (Podocin-Cre)、腎近位尿細管細胞 (Kap-Cre) における組織特異的オマクロオートファジー欠損マウスを作製した。

シャペロン介在性オートファジーに不可欠な Lamp2 遺伝子の Flox マウス作製を立案したが、技術的問題により、本研究では Lamp2 遺伝子の全身欠損マウスを作製した。

各オートファジー欠損マウスを絶食とし、血糖値、ケトン (-OHB) 値を測定した結果、骨格筋、膵細胞、小腸上皮、糸球体上皮細胞特異的オートファジー欠損マウスでは有意な変化を認めなかった。

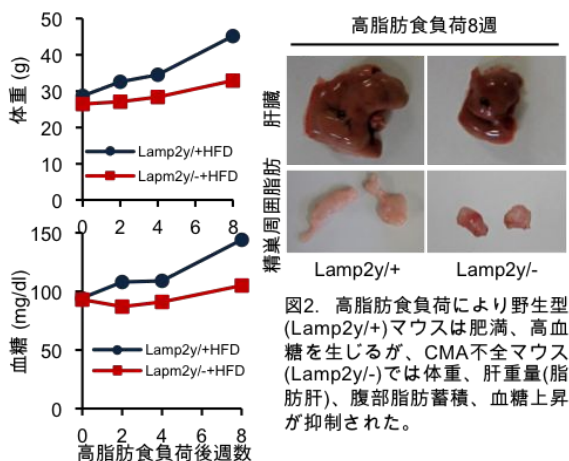
一方、36時間絶食時、Lamp2欠損マウスと肝臓特異的 Atg5欠損マウスでは有意にケトン産生が減少した。腎近位尿細管特異的 Atg5欠損マウスでは変化がなかったが、ケトン産生の材料となる中性脂肪の蓄積を Oil Red 染色で確認すると、肝臓だけでなく腎近位尿細管細胞でも多量の脂肪滴が観察された。そこで、ケトン産生における肝臓と腎臓のオートファジーの役割を検討するため、肝臓と腎近位尿細管の Atg5 ダブル欠損マウスを作製した。その結果、ダブル欠損マウスでは、肝臓特異的オートファジー欠損マウスに比し、さらに有意なケトン産生減少を認めた。一方、いずれのマウスも糖新生には影響がなかつ

た。このことから、オートファジーは飢餓時のケトン産生で重要な役割を果たすこと、また腎近位尿細管細胞にも潜在的なケトン産生能が備わっていることが明らかになった(図1)。



作製した遺伝子改変マウスに高脂肪食負荷を行い、各臓器のオートファジー欠損が肥満糖尿病の発症に及ぼす影響を検討した。

各遺伝子改変マウスを用いた検証のうち、Lamp2 欠損マウスの検証が終了している。LAMP-2 欠損マウスでは、8 週間の高脂肪食負荷による体重増加、空腹時の血糖ならびに血清インスリン値の上昇、糖負荷試験による耐糖能異常、インスリン負荷試験によるインスリン抵抗性、肝内脂肪蓄積の増大、白色脂肪細胞の肥大および炎症細胞浸潤がすべて有意に改善した(図2)。さらにLAMP-2 欠損マウスでは、高脂肪食負荷による高レプチン血症は改善し、血清 FGF21 濃度の上昇を認めた。CMA の低下は高脂肪食による肥満糖尿病の発症を抑制することが示唆された。



腎特異的オートファジー欠損マウスに糖尿病を誘発し、腎症におけるオートファジーの役割を検討した。

高脂肪食負荷により 32 週間飼育された糸球体上皮細胞特異的オートファジー欠損マウスは、対照マウスに比し、体重増加や血糖上昇に差を認めないものの、糸球体上皮細胞数の減少ならびに足突起の消失を伴う尿中アルブミン排泄量の増加、引き続き尿細管間質病変の悪化を認めた。以上の結果より、オートファジーは糖尿病状態における糸球体

上皮細胞の恒常性維持に不可欠な機構であり、その破綻がアルブミン尿の増大に与与していることが明らかとなった(図3)。

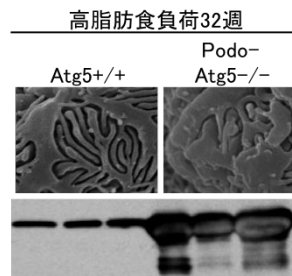


図3. 糸球体上皮細胞特異的マクロオートファジー欠損マウス Podo-Atg5^{-/-}は高脂肪食負荷時に顕著な糸球体上皮細胞障害をもたらす(上段)、蛋白尿を増加させる(下段)。

さらに、血管内皮障害とポドサイトオートファジーとの関連を検討した。タモキシフェン誘導性ポドサイト特異的オートファジー不全マウス(TM-PodoAtg5KO)を新たに作成し、高脂肪食負荷あるいは内皮グリコカリックス消失をもたらすノイラミニダーゼの静脈投与を行い、血管内皮障害に伴うポドサイト障害の程度を検討した。高脂肪食負荷を行った対照群では内皮障害の有無に関わらずポドサイトの形態は保たれ、アルブミン尿も軽度であった。一方、TM-PodoAtg5KO マウスでは、正常な内皮に隣接したポドサイトでは形態異常は観察されないものの、障害内皮に隣接したポドサイトでは顕著な足突起構造の破綻を認め、アルブミン尿が有意に増加した。ノイラミニダーゼ投与モデルでも同様の結果が得られた。糖尿病に伴う糸球体血管内皮障害時にポドサイトオートファジーは細胞保護的な役割を果たしており、その破綻が蛋白尿増悪を引き起こすことが示された。

近位尿細管細胞特異的オートファジー欠損マウスに高脂肪食負荷を行い、尿細管障害の検証を行ったが有意な差は見られなかった。

糖尿病症例コホートサンプルを用い、新規バイオマーカーあるいは病態関連遺伝子の探査を行う。

当科の糖尿病経過外来患者のDNA サンプルを用い、糖尿病性腎症の発症進展とオートファジー関連遺伝子の SNP との相関解析を実施したが、解析した遺伝子群の中に腎症感受性遺伝子は見出すことはできなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Kume S, Koya D, Uzu T, Maegawa H. Role of nutrient-sensing signals in the pathogenesis of diabetic nephropathy.

Biomed Res Int. 2014;2014:315494. 査読有

DOI: 10.1155/2014/315494.

Yasuda-Yamahara M, Kume S, Yamahara K, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S, Koya D, Haneda M, Ugi S, Maegawa H, Uzu T. Lamp-2 deficiency prevents high-fat diet-induced obese diabetes via enhancing energy expenditure. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Sep 18;465(2):249-55. 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.08.010.

Tagawa A, Yasuda M, Kume S, Yamahara K, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S, Koya D, Asanuma K, Kim EH, Haneda M, Kajiwara N, Hayashi K, Ohashi H, Ugi S, Maegawa H, Uzu T. Impaired Podocyte Autophagy Exacerbates Proteinuria in Diabetic Nephropathy. Diabetes. 2016 Mar;65(3):755-67. 査読有

DOI: 10.2337/db15-0473.

Yasuda-Yamahara M, Kume S, Tagawa A, Maegawa H, Uzu T. Emerging role of podocyte autophagy in the progression of diabetic nephropathy. Autophagy. 2015;11(12):2385-6. 査読有

DOI: 10.1080/15548627.2015.1115173.

Takagi A, Kume S, Kondo M, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S, Koya D, Haneda M, Chano T, Matsusaka T, Nagao K, Adachi Y, Chan L, Maegawa H, Uzu T. Mammalian autophagy is essential for hepatic and renal ketogenesis during starvation. Sci Rep. 2016 Jan 6;6:18944. DOI: 10.1038/srep18944. 査読有

Takagi A, Kume S, Maegawa H, Uzu T. Emerging role of mammalian autophagy in ketogenesis to overcome starvation. Autophagy. 2016;12(4):709-10. 査読有 DOI: 10.1080/15548627.2016.1151597.

久米 真司, 前川 聡. 肥満と腎臓病 新規治療標的の開発を目指して. 肥満研究 20巻3号 Page160-167(2014.12) 査読無

[学会発表](計12件)

<国際学会>

Takagi A, Kume S, Tanaka Y, Araki H, Isshiki K, Araki SI, Uzu T, Maegawa H. The role of starvation-induced autophagy in gluconeogenesis and ketogenesis. 74th Scientific Sessions, American Diabetes Association. (2014, San Francisco, USA)

Yasuda M, Tagawa A, Kume S, Tanaka Y, Yamahara K, Araki H, Isshiki K, Araki SI, Koya D, Haneda M, Uzu T, Maegawa H. Podocyte Autophagy is Associated with the Progression of Proteinuria in Diabetic Nephropathy. (2014, San

Francisco, USA)

Kondo M, Takagi A, Kume S, Ugi S, Uzu T, Maegawa H. The role of starvation-induced autophagy in gluconeogenesis and ketogenesis. 52th EASD, European Association for the Study of Diabetes. (2014, Vienna, Austria)

Kondo M, Takagi A, Kume S, Araki S-i, Uzu T, Maegawa H. The Role of Starvation-induced Autophagy in Gluconeogenesis and Ketogenesis. 75th Scientific Sessions, American Diabetes Association. (2015, Boston, USA)

Yoshiyoshi M, Kume S, Takeda N, Osawa N, Chin-Kanasaki M, Nakae Y, Yokoi H, Mukoyama M, Araki S-i, Maegawa H. Effect of interaction between podocyte autophagy and glomerular endothelial dysfunction on progression of diabetic nephropathy. 1st ISN FRONTIERS meeting, International Society of Nephrology. (2018, Tokyo, Japan)

<国内学会>

高木 彩乃, 久米 真司, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 一色 啓二, 荒木 信一, 茶野 徳宏, 柏木 厚典, 宇津 貴, 前川 聡. 飢餓時の糖新生ならびにケトン産生におけるオートファジーの役割. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会 (2014年5月・大阪)

安田 真子, 田川 安都子, 久米 真司, 田中 敬, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 一色 啓二, 荒木 信一, 古家 大祐, 羽田 勝計, 柏木 厚典, 宇津 貴, 前川 聡. 糸球体上皮細胞オートファジー不全是糖尿病性腎症における蛋白尿を増悪させる. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会 (2014年5月・大阪)

安田 真子, 久米 真司, 中澤 純, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 荒木 信一, Paul Saftig, 宇津 貴, 前川 聡. シャペロン介在性オートファジー欠損は高脂肪食負荷肥満糖尿病の発症を抑制する. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 (2014年5月・山口)

田川 安都子, 安田 真子, 久米 真司, 中澤 純, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 荒木 信一, 古家 大祐, 羽田 勝計, 宇津 貴, 前川 聡. 糸球体上皮細胞におけるオートファジー不全是糖尿病性腎症における蛋白尿を増悪させる. 第58回日本腎臓学会学術集会 (2015年6月・名古屋)

高木 彩乃, 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. 飢餓時の糖新生ならびにケトン産生における肝腎オートファジーの役割. 第58回日本腎臓学会学術集会 (2015年6月・名古屋)

田川 安都子, 安田 真子, 久米 真司, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 荒木 信一, 古屋 大祐, 羽田 勝計, 宇津 貴, 前川 聡. ポドサイトにおけるオートファジー不全は糖尿病性腎症における蛋白尿を増悪させる. 第30回日本糖尿病合併症学会. (2015年11月・名古屋)

吉林 護, 久米 真司, 武田 尚子, 大澤 紀之, 金崎 雅美, 中江 由紀, 横井 秀基, 向山 政志, 荒木 信一, 前川 聡. 糖尿病性腎症のポドサイト障害における糸球体血管内皮障害とポドサイトオートファジーの役割. 第32回日本糖尿病合併症学会 (2017年10月・東京)

〔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

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmed3/snai/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

前川 聡 (MAEGAWA, Hiroshi)

滋賀医科大学・内科・教授

研究者番号：00209363

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

久米 真司 (KUME, Shinji)

滋賀医科大学・内科・講師(学内)

研究者番号：00452235

前田 士郎 (MAEDA, Shiro)

琉球大学 医学(系)研究科 教授

研究者番号：50314159

(4)研究協力者

山原 真子 (YAMAHARA Mako)

田川 安都子 (TAGAWA Atsuko)

吉林 護 (YOSHIBAYASHI Mamoru)