

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06371

研究課題名(和文)オートファジー活性調節を介した腎疾患治療の試み

研究課題名(英文)Strategies aimed at modulating autophagy for treating kidney diseases

研究代表者

山本 毅士(Yamamoto, Takeshi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20756994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題ではオートファジー活性(フラックス)に焦点を絞り、フラックス異常を認める腎疾患の病態解明、またフラックス異常を是正する遺伝子改変マウス作成と治療薬の探索を行い、その疾患抵抗性を検証した。結果、(1)in vivoオートファジーフラックス評価方法を確立し、腎老化や肥満におけるフラックス調節異常を明らかにした。(2)オートファジー阻害因子Rubiconをノックアウトしオートファジー亢進モデルを作成した。このマウスは確かにオートファジーが亢進し腎疾患ストレスに抵抗性であった。(3)あるオートファジー活性化薬(EPA)に着目し肥満マウスに投薬したところフラックス異常是正と腎保護効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：Autophagy plays an essential role for cellular homeostasis. Here, we established the methods for monitoring autophagic flux in vivo by using GFP-LC3 transgenic mice and tamoxifen-inducible proximal tubule-specific autophagy-deficient mice. Using the methods, we investigated the impact of altered autophagic flux in kidney aging. Furthermore, we newly established mice models in which autophagic flux is genetically (Rubicon, a Beclin1-interacting negative regulator for autophagosome-lysosome fusion, knockout mice) and pharmacologically(omega-3 fatty acid, EPA) enhanced. Proximal tubule-specific Rubicon knockout mice showed high autophagic flux in basal and stressed conditions and exhibited significant improvement of kidney injury in some chronic kidney disease models. Also, EPA attenuated renal lipotoxicity by improving autophagic flux in obese mice kidneys. Modulating autophagic flux would be a potentially important therapeutic target for regulating progression of kidney diseases.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：オートファジー フラックス 近位尿細管 老化 Rubicon クロロキン

1. 研究開始当初の背景

高齢化や生活習慣病の増加に伴い、慢性腎臓病および透析患者数は年々増加し医療経済を圧迫しており、慢性腎臓病の病態解明と治療法の開発が急務である。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。オートファジーの最も重要な役割は、飢餓時の栄養源確保であるが、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。研究代表者らのグループで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など慢性の代謝ストレス下において、近位尿細管オートファジーが果たす役割について探求してきた。一方、オートファジーは非常に動的な過程でありそのターンオーバー速度をフラックスと呼ぶ。オートファゴソームが多数観察された場合、オートファジー「停滞」を意味するのか、「亢進」を意味するかは不明である。in vitro ではオートファジー阻害剤を添加してLC3 (オートファゴソームに一致する)蓄積を評価することによりフラックスを推定することは可能だが in vivo では一般的でない。オートファジー活性調節に焦点をあてた、慢性腎臓病の病態解明と治療法の開発に向けて、まず in vivo オートファジーフラックス評価系の確立が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究課題では、まず(1)オートファジー活性が徐々に低下すると一般的に考えられている、in vivo マウス腎老化でのオートファジーフラックスを評価する方法を確立し、さらに(2)オートファジー阻害因子 Rubicon をノックアウトすることで「オートファジー亢進マウス」を作成し種々の腎疾患ストレスに抵抗性であるかどうかを検証すること、(3) オートファジーを亢進させる薬剤の検証・発見・開発を行うこと、を目的とする。

3. 研究の方法

(1) GFP-LC3 マウスにリソソーム機能阻害剤クロロキンを投与し、腎尿細管の GFP 陽性ドット数を、クロロキン投与をしない場合とで比較すること、およびタモキシフェン誘導性近位尿細管特異的オートファジー不全マウスでタモキシフェン投与2週間後に、オートファジー選択的基質である p62 陽性タンパク凝集塊の量を (タモキシフェン投与なしの場合と)比較することにより、in vivo オートファジーフラックスを正しく評価できるかどうかを検証しその評価方法を確立する。

(2) Rubicon は大阪大学の吉森保教授によって発見された新規タンパク質で、オートファ

ジーに不可欠なタンパク質である Beclin に結合する。Rubicon と Beclin の複合体はオートファジーの後期段階 (オートファゴソームとリソソームの融合) を抑制する。Rubicon ノックアウト細胞ではオートファジーが亢進している。そこでまず腎尿細管細胞特異的 Rubicon ノックアウトマウスを新たに作成する。これは「腎特異的オートファジー亢進マウス」として期待される。このマウスを用い、前項に記した各種疾患モデルでの疾患抵抗性を証明する。

(3) オートファジー活性化薬を臨床応用する試みの前段階として、既存の薬剤のオートファジー活性化能の検証を行う。

当院泌尿器科、大阪府立急性期総合医療センター泌尿器科では腎移植症例でのエベロリムス(一般的にはオートファジー活性化薬として認知されている)の使用経験が豊富である。プロトコール腎生検組織(光顕標本、電顕標本)においてオートファジーの活性化マーカーや他剤と比較して組織の改善度を評価する。

オートファジー活性化薬を探索し腎疾患モデルマウスへ投与することの有用性を検証する。

4. 研究成果

(1) in vivo オートファジーフラックス評価方法を確立し、腎老化におけるフラックス調節異常を明らかにした。GFP-LC3 老年マウス(2 年 齢)では自由摂取下でも若年マウスとは対照的にオートファジー亢進が見られる一方、若年マウスで認められる絶食に対するオートファジーフラックスの亢進は鈍化していた。また、8 週齢および 2 年 齢のタモキシフェン誘導性近位尿細管特異的オートファジー不全マウスで 2 週間オートファジー不全状態にしたところ老年マウスの腎では p62 陽性凝集塊が著増し、老年マウス腎でオートファジーがより多くの基質を処理していることが判明した。以上より、オートファジーは加齢ストレスに抗すべく活性化され経年的にその依存性が増すが、新たなストレスに対し適切な応答ができず相対的オートファジー低下状態となり老化につながる事が明らかになった。この in vivo オートファジーフラックス評価系を応用し、高脂肪食摂取肥満マウス腎でも、老化と似通った、オートファジーフラックス異常を認めた。

(2) オートファジー亢進モデルを創出することを目的に、オートファジー阻害因子 Rubicon を近位尿細管特異的にノックアウトしたマウス (Rubicon F/F;KAP) を新たに作成した。さらに GFP-LC3 マウスと交配することで Rubicon F/F;KAP-GFP-LC3 マウスを作成し、(1)で確立したオートファジーフラックス評価を行ったところ、確かに近位尿細管でのオートファジーフラックスが亢進す

ることが確かめられた。このマウスは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は有意な改善が得られなかったものの、ある種の慢性腎臓病モデルにおいてストレスに抵抗性であった。現在、その詳細な機序の解明に取り組んでいる。

(3) ヒト移植腎生検サンプルを用いて p62 と LAMP1 の免疫染色を行ったが、現時点での評価項目に関しては、エベロリムス使用の有無による明らかな差異は認めず、さらにオートファジー関連蛋白、mTOR シグナルなどを検討中である。

オートファジー活性化薬を探索した結果、いくつかの脂肪酸にオートファジー活性化能を認めた。特に、3系脂肪酸として知られるイコサペント酸エチル(EPA)に着目し、高脂肪食負荷肥満マウスに投与したところ、オートファジーフラックス異常を是正することができ、炎症軽減と虚血再還流に対する抵抗性を認めた。

以上より、マウスにおいてオートファジーフラックスをできる限り正確に評価し、さらにオートファジーフラックスを適切に調節することが、腎疾患の治療に有用であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Yoshitsugu Takabatake, Takeshi Yamamoto, Yoshitaka Isaka.

Stagnation of autophagy: A novel mechanism of renal lipotoxicity. *Autophagy*. (査読有), Taylor & Francis Online, 3;13(4):775-776, 2017.

Takeshi Yamamoto, Yoshitsugu Takabatake, Atsushi Takahashi, Tomonori Kimura, Tomoko Namba, Jun Matsuda, Satoshi Minami, Jun-ya Kaimori, Isao Matsui, Taiji Matsusaka, Fumio Niimura, Motoko Yanagita, Yoshitaka Isaka.

High-Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to Lipotoxicity in the Kidney. *J Am Soc Nephrol*. (査読有), the American Society of Nephrology (in press, 2017)

山本毅士, YIA 受賞記念講演 加齢によるオートファジー活性の変化がミトコンドリア機能低下を介して腎老化を引き起こす(第 38 回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング) 日本腎臓学会誌 (査読無し). 58(8), 1238-1242, 2016

Takeshi Yamamoto, Yoshitsugu Takabatake, Tomonori Kimura, Atsushi Takahashi, Tomoko Namba, Jun Matsuda, Satoshi Minami, Jun-ya Kaimori, Isao Matsui, Harumi Kitamura, Taiji Matsusaka, Fumio Niimura, Motoko Yanagita, Yoshitaka Isaka, Hiromi Rakugi.

Time-dependent dysregulation of autophagy: Implications in aging and mitochondrial homeostasis in the kidney proximal tubule. *Autophagy*. (査読有), Taylor & Francis Online, 12: 801-813, 2016.

[学会発表](計 7 件)

山本毅士, 「オートファジー機能不全としての老化と肥満」(CKD New Horizon Conference, 大阪, 2016 年 12 月 15 日)

Takeshi Yamamoto, Yoshitsugu Takabatake, Atsushi Takahashi, Tomonori Kimura, Tomoko Namba, Jun Matsuda, Satoshi Minami, Jun-ya Kaimori, Isao Matsui, Taiji Matsusaka, Fumio Niimura, Motoko Yanagita, Yoshitaka Isaka. "

High Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to the Lipotoxicity in the Kidney" American Society of Nephrology (ASN) Kidney Week 2016 Annual Meeting, Poster presentation: Poster Board #:SA-P0357, Chicago, 11/19/2016

山本毅士, 「YIA 受賞記念講演 加齢によるオートファジー活性の変化がミトコンドリア機能低下を介して腎老化を引き起こす」(第 38 回腎臓セミナー・Nexus Japan, 東京, 2016 年 8 月 27 日)

Takeshi Yamamoto, et al. " High Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to the Lipotoxicity in the Kidney" (3rd Next Generation Kidney Research Meeting, 東京, 2016 年 8 月 20 日)

山本毅士, 高畠 義嗣, 高橋 篤史, 難波 倫子, 松田 潤, 南 聡, 木村 友則, 新村 文男, 松阪 泰二, 柳田 素子, 猪阪 善隆 「オートファジーフラックス障害とミトコンドリア機能低下は近位尿細管における脂肪毒性に寄与する」(第 59 回日本腎臓学会学術集会、口頭発表、横浜、2016 年 6 月 19 日)

山本毅士, 高畠 義嗣, 木村 友則, 高橋 篤史, 難波 倫子, 松田 潤, 新村 文男, 松阪 泰二, 柳田 素子, 楽木 宏実, 猪阪 善隆

「加齢によるオートファジー活性の変化がミトコンドリア機能低下を介して腎老化を引き起こす」(第58回日本腎臓学会学術集会、口頭発表、名古屋、2015年6月5日、優秀演題賞)

Takeshi Yamamoto, Yoshitsugu Takabatake, Tomonori Kimura, Atsushi Takahashi, Tomoko Namba, Jun Matsuda, Satoshi Minami, Jun-ya Kaimori, Isao Matsui, Harumi Kitamura, Taiji Matsusaka, Fumio Niimura, Motoko Yanagita, Yoshitaka Isaka, Hiromi Rakugi.

"Altered Autophagy flux contributes to kidney Aging via mitochondrial dysfunction" ASN, Kidney Week 2014 Annual Meeting, Oral presentation: Abstract Program #:FR-OR017, Philadelphia, 11/14/2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
大阪大学腎臓内科ホームページ
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/kid/kid/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 毅士 (YAMAMOTO, Takeshi)
大阪大学・大学院医学系研究科医員
研究者番号：20756994