

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04188

研究課題名(和文)オートファジーリサイクリングを標的とした生活習慣病に伴う慢性腎臓病治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy for lifestyle-related CKD targeting autophagy recycling system

研究代表者

猪阪 善隆 (ISAKA, YOSHITAKA)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00379166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは飢餓等により誘導され、非特異的に蛋白などを消化すると考えられてきたが、肥満や脂質異常、高尿酸血症等、過栄養の状態においても、消化すべき変性蛋白や異常ミトコンドリアなどが尿細管細胞で増加するために、定常状態のオートファジー活性は上昇している。しかし、このような状態が持続すると、オートファジー・リソソーム系の停滞が起こり、ストレス時におけるオートファジー活性亢進が障害され、オートファジーによる腎保護作用が働かず、腎障害が進展することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

定常レベルのオートファジーは尿細管細胞の恒常性の維持を担うとともに、ストレス時には、傷害を受けた細胞内小器官や変性蛋白をオートファジー・リソソーム系により消化することにより、腎障害を抑制する。加齢や肥満・脂質異常など生活習慣病に伴う腎障害の共通メカニズムとして、定常レベルのオートファジー活性が常に上昇しているために、オートファジー予備能が低下し、ストレス下でのオートファジー活性化が不十分となり、尿細管細胞に対する保護作用が働かず、炎症が惹起されるということを見出した。オートファジー予備能にも注目した治療法の開発につながると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been thought that autophagy is induced by starvation, etc. and nonspecifically digests proteins and the like. However, even in the case of overnutrition such as obesity, lipid abnormalities and hyperuricemia, denatured proteins and abnormal mitochondria to be digested. , Etc. are increased in renal tubular cells, so that the steady-state autophagy activity is increased. However, it was found that if such a state persists, the autophagy-lysosomal system becomes stagnant, the autophagy activation is impaired during stress, the renal protective effect of autophagy does not work, and renal damage progresses.

研究分野：腎臓内科

キーワード：オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(chronic kidney disease; CKD)は2002年に造られた新しい概念である。末期腎不全に至る患者を減らすとともに、CKD患者に合併しやすい心血管病を防ぐことを目的としている。医療関係者のみならず、国民にもCKDの重要性とリスクが理解できやすいように、蛋白尿などの腎障害の存在、もしくは推算糸球体濾過量(estimated glomerular filtration rate; eGFR) 60 mL/min/1.73 m²未満をもとに診断するという、単純なものに決められた。しかしながら、いまだCKDに対する有効な治療法は存在しない。

真核生物は「自己の細胞質構成成分を隔離し、リソソームの酸性コンパートメント内で分解するシステム」として、オートファジー・リソソーム系を有している。オートファジーは飢餓時に強く誘導され、エネルギー産生や生存に必須な蛋白質合成のために、細胞内の蛋白質などを非特異的に分解するシステムである。しかし、変性蛋白や障害を受けた細胞内小器官を消化することにより細胞の恒常性維持にも関与する。また、虚血再灌流障害に伴うミトコンドリア障害など、様々な病態に対しても保護的に作用すると考えられており、CKDに対しても有効な治療法となりうる可能性がある。

2. 研究の目的

増加の一途を辿る生活習慣病に起因する慢性腎臓病(CKD)の進展にも慢性炎症が関与していると考えられており、慢性炎症を伴うCKD進展の病態を解明し、治療法を開発することは急務である。本研究では、生活習慣病によるCKD進展の共通したメカニズムとして、老廃物や異常オルガネラの増加により、リソソームによる消化の停滞 オートファジーリサイクリング障害 ストレス下でのオートファジー活性化不足によるインフラマソームの誘導という仮説を検証する。このために、各生活習慣病におけるオートファジー・インフラマソーム系の解析を行うとともに、オートファジーリサイクリング可視化細胞を用いた薬剤スクリーニングや代謝フラックス解析により、生活習慣病に起因するCKD進展抑制のためのシーズを同定する。

3. 研究の方法

我々が有している近位尿細管特異的オートファジー不全マウスやタモキシフェン誘導型のオートファジー不全マウス、オートファジーのモニタリングに適している GFP-LC3 トランスジェニックマウスなどを用いて、糖尿病や高リン血症など生活習慣病におけるオートファジーの関与を検討した。

4. 研究成果

糖尿病がオートファジー機能に及ぼす影響について、1型糖尿病モデルマウスと2型糖尿病モデルマウスに違いがあるかを検討した。ストレプトゾシン(STZ)投与による1型糖尿病モデルマウスでは高齢マウスと同様に定常状態のオートファジーflux はむしろ上昇している。しかし、飢餓によるストレス下ではオートファジーflux は抑制されている。1型糖尿病では、加齢と同様に高血糖状態によるオートファジーflux 上昇が持続するため、オートファジー・リソソーム系のリサイクリングが停滞し、その結果としてストレスに対するオートファジーflux が抑制された状態に陥ることが明らかとなった。一方、2型糖尿病モデル(db/db)マウスでは、食餌摂取下の定常状態のオートファジーflux も飢餓によるストレス下のオートファジーflux もどちらも抑制されている。2型糖尿病モデルマウスでは定常状態でもストレス下でも尿細管細胞にp62が蓄積し、オートファジー活性が抑制されていることが確認された。2型糖尿病でオートファジーが抑制されるメカニズムとして、高インスリン血症によるmTOR活性上昇を介していることが明らかとなった。

また、糖尿病患者は急性腎障害(acute kidney injury; AKI)をきたしやすいことが知られている。前述したように、1型糖尿病と2型糖尿病では定常状態のオートファジーflux の動態が異なっており、2

型糖尿病では定常状態においてもオートファジー flux が抑制されている。この両者に虚血再灌流障害を加えたところ、2 型糖尿病モデルの方がより重度の AKI を呈し、TUNEL 陽性のアポトーシスに陥った細胞も増加していた。しかし、mTOR 阻害薬を投与することによりオートファジー活性を上昇させると、2 型糖尿病モデルでは AKI の病変が改善したのに対し、1 型糖尿病モデルではむしろ AKI の病変が悪化することが確認された。すなわち、定常レベルのオートファジーが抑制されている 2 型糖尿病モデルでは、オートファジー活性を亢進させることにより、虚血再灌流障害によるストレスに対抗することができるが、逆に定常レベルのオートファジーが亢進している 1 型糖尿病モデルではオートファジーを亢進させると、オートファジー・リソソーム系のリサイクリングがかえって停滞してしまい、虚血再灌流障害によるストレスに対抗できず、むしろ病変が悪化すると考えられた。このことは、オートファジー活性を亢進されることが常に病態を改善とは限らず、オートファジー活性をモニタリングしたうえでオートファジー活性の調整が必要であることを示唆する。我々は、モデルマウスの尿のエクソソーム解析が腎臓の尿細管細胞のオートファジー活性をモニタリングすることに有用であることを確認しており、現在臨床研究により検証しているところである。

高リン血症は、CKD のリスク因子であるとともに、心血管死亡の危険因子でもある。そこで、リン負荷時の近位尿細管細胞におけるオートファジーの役割を検討した。加齢などの病態と同様に、高リン食負荷により定常レベルのオートファジー flux はむしろ亢進しているが、飢餓ストレスに対するオートファジー flux は抑制されている。高リン負荷によりミトコンドリアの膜透過性が亢進するため、ミトコンドリアの膜電位が低下し、活性酸素が産生されることが判明した。オートファジー不全尿細管細胞では、膜電位の低下したミトコンドリアや活性酸素を産生するミトコンドリアが増加するが、これは障害をうけたミトコンドリアがオートファジーにより消去できないためである。PT-Atg5 KO マウスはリン負荷によりさらなるミトコンドリア機能不全を呈するとともに、ROS 産生も増加し、ATP 産生も低下する。リン負荷に伴い誘導されるオートファジー活性は損傷したミトコンドリアなどを消去することにより、細胞の恒常性維持に関与することが明らかとなった。

さらに、我々は糸球体内皮細胞におけるオートファジーの機能を解析した。まず絶食下での autophagy flux の違いを腎臓の各細胞において検討したところ、ポドサイトと比べて、近位尿細管細胞や糸球体内皮細胞の方が autophagy flux が亢進していることが判明した。そこで、我々は Tie2 が血管内皮細胞特異的に発現することを利用し、血管内皮特異的オートファジー不全マウス(ES-Atg5 KO)を作製した。後述するが、このマウスは血管内皮細胞でのオートファジー機能が失われるだけでなく、Tie2 が造血幹細胞にも発現することから徐々に汎血球減少をきたし、12 週令で死亡してしまう。

この ES-Atg5 KO マウスは全身の血管にオートファジーの特異的基質である p62 蛋白が蓄積することから、全身の血管内皮細胞のオートファジー機能が失われていることが確認されている。しかし、生後 2 ヶ月までには主要臓器には組織学的な異常が観察されない。しかしながら、糸球体の内皮細胞に限り、早期から糸球体係蹄の拡大を認めるとともに、2 ヶ月齢になると、メサンジウム基質の増加や係蹄の肥厚、内皮細胞の fenestra の消失、対峙する足突起の融合などの組織障害を呈する。また、他の主要臓器の血管とは異なり、糸球体の内皮細胞では酸化ストレスが亢進していた。

前述したように、ES-Atg5 KO マウスは汎血球減少により 3 か月齢で死亡してしまうため、野生マウスから骨髄移植を行ったうえで、長期間の観察を行った。骨髄移植を受けた ES-Atg5 KO マウスは 12 か月齢においても主要臓器には組織学的な異常を認めないにも関わらず、糸球体は硬化病変をきたし、腎機能も有意に低下していた。興味深いことに、活性酸素のスキャベンジャーである N-acetyl-cysteine を投与すると、この糸球体病変の進展は抑制されていた。これらの観察結果から、糸球体内皮細胞におけるオートファジーの機能は、酸化ストレスによる内皮細胞障害に対して保護的に作用することが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Matsuda Jun, Namba Tomoko, Takabatake Yoshitsugu, Kimura Tomonori, Takahashi Atsushi, Yamamoto Takeshi, Minami Satoshi, Sakai Shinsuke, Fujimura Ryuta, Kaimori Jun-ya, Matsui Isao, Hamano Takayuki, Fukushima Yoko, Matsui Keiko, Soga Tomoyoshi, Isaka Yoshitaka	4. 巻 14
2. 論文標題 Antioxidant role of autophagy in maintaining the integrity of glomerular capillaries	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 53 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2017.1391428	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 Minami Satoshi, Yamamoto Takeshi, Takabatake Yoshitsugu, Takahashi Atsushi, Namba Tomoko, Matsuda Jun, Kimura Tomonori, Kaimori Jun-ya, Matsui Isao, Hamano Takayuki, Takeda Hiroaki, Takahashi Masatomo, Izumi Yoshihiro, Bamba Takeshi, Matsusaka Taiji, Niimura Fumio, Isaka Yoshitaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Lipophagy maintains energy homeostasis in the kidney proximal tubule during prolonged starvation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1629 ~ 1647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2017.1341464	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 Takahashi A, Takabatake Y, Kimura T, Maejima I, Namba T, Yamamoto T, Matsuda J, Minami S, Kaimori JY, Matsui I, Matsusaka T, Niimura F, Yoshimori T, Isaka Y.	4. 巻 66
2. 論文標題 Autophagy Inhibits the Accumulation of Advanced Glycation End Products by Promoting Lysosomal Biogenesis and Function in the Kidney Proximal Tubules	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 1359 ~ 1372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db16-0397	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 Fujimura R, Yamamoto T, Takabatake Y, Takahashi A, Namba-Hamano T, Minami S, Sakai S, Matsuda J, Hesaka A, Yonishi H, Nakamura J, Matsui I, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Isaka Y.	4. 巻 524
2. 論文標題 Autophagy protects kidney from phosphate-induced mitochondrial injury.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 636-642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.137.	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 Matsuda J, Takahashi A, Takabatake Y, Sakai S, Minami S, Yamamoto T, Fujimura R, Namba-Hamano T, Yonishi H, Nakamura J, Kimura T, Kaimori JY, Matsui I, Takahashi M, Nakao M, Izumi Y, Bamba T, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Yoshimori T, Isaka Y.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Metabolic effects of RUBCN/Rubicon deficiency in kidney proximal tubular epithelial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1712107.	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 Nakamura, S., Oba, M., Suzuki, M., et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08729-6.	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Sakai S, Yamamoto T, Takabatake Y, Takahashi A, Namba-Hamano T, Minami S, Fujimura R, Yonishi H, Matsuda J, Hesaka A, Matsui I, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Isaka Y.	4. 巻 30
2. 論文標題 Proximal Tubule Autophagy Differs in Type 1 and 2 Diabetes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Am Soc Nephrol.	6. 最初と最後の頁 929-945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2018100983.	査読の有無 無
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 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 猪阪善隆
2. 発表標題 オートファジーからみた慢性腎臓病治療の新しい知見
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018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	木村 友則 (Kimura Tomonori) (00631300)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難治性疾患研究開発・支援センター・センター長 (84420)	
研究分担者	高橋 篤史 (Takahashi Atsushi) (10704786)	大阪大学・医学部附属病院・助教 (14401)	
研究分担者	高畠 義嗣 (Takabatake Yoshitsugu) (30403075)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	