

平成 30 年 4 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09260

研究課題名(和文)腎における脂質毒性抑制機構としてのオートファジーの役割とその病態生理的意義の解明

研究課題名(英文)Unraveling the Role of Autophagy in Counteracting Lipotoxicity in the Kidney

研究代表者

高畠 義嗣 (Takabatake, Yoshitsugu)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30403075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：過剰な脂肪摂取は細胞傷害や炎症を惹起する(脂質毒性)。オートファジーはリソソームにおける細胞質成分分解の総称であり、細胞恒常性維持や飢餓応答に寄与する。本研究では腎脂質毒性や飢餓状態における腎オートファジーの役割について検証した。高脂肪食によりオートファジーへの依存性が高まるが、リソソーム機能障害からオートファジーがスムーズに機能せず、ミトコンドリア機能低下や細胞傷害が生じることが判明した。高脂肪食とともにイコサペント酸エチルを投与すると、オートファジーがスムーズに進行し、脂質毒性が軽減された。また腎臓のオートファジーが脂肪滴を分解することで長期飢餓状態に適応するリポファジーの存在も解明した。

研究成果の概要(英文)：Excessive fat intake leads to cellular injury and inflammation (lipotoxicity). Autophagy is a self-degradation process that combats starvation and cellular stress. Here, we studied the effect of lipid overload on lysosomal function and autophagic activity in the kidney. Lipid overload basically stimulates autophagy for renovation of the plasma and organelle membranes, which plays an essential role in maintaining the integrity of proximal tubules. However, this autophagic activation is inevitably accompanied with lysosomal stress and consequent downstream suppression of autophagy, which manifest as phospholipid accumulation in the lysosome. Pharmacological correction by eicosapentaenoic acid restored autophagic flux. We also investigated the autophagy-mediated regulation of renal lipid metabolism during prolonged starvation and elucidated that autophagic degradation of lipid droplets (lipophagy) combats prolonged starvation in the kidney to avoid cellular energy depletion.

研究分野：腎臓内科

キーワード：オートファジー 脂質毒性 リソソーム オートファジーフラックス リポファジー イコサペント酸エチル

1. 研究開始当初の背景

腎臓とオートファジー：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(タンパク質や細胞内器官)分解の総称である。オートファジーの最も重要な役割は、飢餓に陥ったときの栄養源(アミノ酸・ATP)確保であるが、飢餓以外の低酸素や酸化ストレスによってもオートファジーが誘導され、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。

腎近位尿細管における脂質代謝とオートファジー：近位尿細管細胞はエネルギー要求性が高く、エネルギー産生効率の高い遊離脂肪酸を細胞外から取り込み、ミトコンドリアで酸化して ATP を産生している。過剰な脂質は尿細管細胞内でジアシルグリセロールやセラミドの蓄積をもたらし、活性酸素の増加や ER ストレスを惹起することで細胞毒性を発揮する(脂肪毒性)と推測されるが、肝臓や脂肪細胞ほど明確な証拠はない。一方オートファジーと脂質との関係に関しては、肝細胞で脂肪滴がオートファジーによって分解される(リポファジー)との報告がある一方で、これに相反する報告もあり議論が続いている。研究代表者らは予備実験の過程で尿細管細胞特異的オートファジー不全マウスに高脂肪食を与えた際の腎組織における脂肪の蓄積が野生型と比較して全く異なることを見出し、本格的に研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腎臓における脂質毒性に対する適応反応としてのオートファジーの役割を解析し、腎疾患における病態生理学的意義を探索し、最終的に薬剤によりオートファジーを調節することにより脂肪毒性を軽減し、腎保護を実現すること、および長期飢餓時に腎臓においてリポファジーが起こっているか否かを明確にし、その役割を検証することである。

3. 研究の方法

(1) 高脂肪食負荷時のオートファジーの挙動及び役割

GFP-LC3 マウス(オートファジー可視化マウス)に高脂肪食(HFD)を2か月負荷した後の腎臓の解析(GFP-LC3の局在など)

パルミチン酸(PA)負荷をかけた GFP-LC3 発現(および非発現)培養近位尿細管細胞のリソソームの機能・形態解析、オートファジーフラックスの評価

培養尿細管細胞(オートファジー可能および不能株)を用いたリン脂質の pulse chase assay

薬剤誘導性尿細管細胞特異的オートファジー不全マウスを用いた HFD 負荷時のオートファジー基質処理量の解析

培養尿細管細胞(オートファジー可能およ

び不能株)を用いた PA 負荷によるミトコンドリア機能・形態解析(膜電位、活性酸素産生量など)

尿細管細胞特異的オートファジー不全マウスを用いた HFD 負荷時のオートファジーの役割に関する解析

HFD 負荷時の腎虚血再灌流負荷に対する感受性の変化における尿細管オートファジーの役割

ヒト腎生検サンプルを用いた肥満者の腎尿細管の形態的観察

腎尿細管の脂肪毒性に対するイコサペント酸エチル(EPA)の治療効果

(2) 尿細管におけるリポファジーの役割

飢餓下の腎尿細管の形態的・生化学的解析(とくに脂肪滴の動態)

長期飢餓下の培養尿細管細胞を用いた脂肪酸の pulse chase assay

長期飢餓下のオートファジー不全(および可能)培養尿細管細胞における脂肪滴の動態、細胞内エネルギー状態、生存率

長期飢餓下のオートファジー不全(および可能)マウス尿細管細胞の解析(脂肪滴、ATP 含量など)

4. 研究成果

(1) 高脂肪食負荷時のオートファジーの挙動及び役割

近位尿細管培養細胞に PA を負荷すると、LC3-I から LC3-II へのシフト(オートファゴソームの形成促進)を認めたが、同時にオートファジーの基質である p62 蛋白凝集塊の蓄積を認めたことから PA はオートファジーを活性化すると同時にオートファジー経路の後期段階を停滞させると考えられた。電顕による観察では、リソソーム内に消化不良オルガネラの蓄積を認め、リソセンサーを用いた観察にて PA によるリソソーム酸性化不良を認めた。

次に GFP-LC3 マウスに2ヶ月間 HFD 負荷を行ったところ、HFD 群の腎尿細管にはリソソーム膜蛋白 Lamp1 陽性の空胞形成が観察され、内部には GFP 陽性リン脂質が蓄積していた。以上より過剰脂質蓄積による機能不全リソソームがオートファジーフラックス障害につながることを示された。

培養尿細管細胞のリン脂質を FL-HPC にてラベリングしたのち PA(あるいはコントロールの BSA)を負荷し、リン脂質を追跡したところ、PA 負荷により、オートファジー依存性に細胞膜のリン脂質が早期にリソソームへ移行していた。

薬剤誘導性近位尿細管特異的オートファジー不全マウスに2ヶ月間 HFD 負荷を行ったのち3週間オートファジー不全にしたところ、HFD 群腎尿細管では p62 陽性凝集塊蓄積が増加し、HFD 負荷により腎尿細管オートファジーの基質量が増加することが判明した。

培養尿細管細胞(オートファジー可能およ

び不能株)に PA を負荷したところ、オートファジー不能株においてミトコンドリア膜電位がより低下し、活性酸素産生が増加していた。

次に近位尿細管特異的オートファジー不全マウス(K0 マウス)及び野生型マウスに対し HFD 負荷を行ったところ、K0 マウスでは尿細管のミトコンドリア機能低下が増悪し、マクロファージ浸潤とインフラマソーム活性化を伴うことが判明した。

さらに虚血再灌流傷害を施したところ、野生型マウスにおいて HFD 群は ND 群に比し重度の組織傷害・アポトーシスを認め、K0 マウスではその傷害が増悪した。

ヒト腎生検標本においても肥満者においてリソソーム内のリン脂質の蓄積などの所見が確認された。

HFD 負荷マウスに EPA を摂取させると尿細管における脂肪毒性の所見が緩和された。

以上から HFD によりオートファジーへの依存性が高まるが、リソソーム機能障害からオートファジーがスムーズに機能せず、ミトコンドリア機能低下も相まって虚血による腎障害増悪につながる事が明らかとなった。

(2) 尿細管におけるリポファジーの役割

野生型マウスに 24-48 時間飢餓をかけると、近位尿細管の基底側に脂肪滴が観察された。脂肪滴の一部はオートファゴソームマーカーである LC3 と共同在し、また脂肪滴分画には LC3 が豊富に存在した。電子顕微鏡による観察で脂肪滴の一部がオートファゴソームに取り囲まれていた。

さらに近位尿細管培養細胞において、蛍光標識脂肪酸を用いた pulse chase assay から、脂肪滴がオートファゴソームによりリソソームに運ばれ分解される、“リポファジー”が存在することが明らかとなった。

オートファジー不全近位尿細管培養細胞では、脂肪滴を適切に分解できず、脂肪蓄積、ATP 低下、飢餓ストレスに対する脆弱性を認めた。

近位尿細管特異的オートファジー不全マウス(K0 マウス)に 48 時間飢餓をかけると、野生型マウスに比し、著明な脂肪蓄積、酸化の低下を認めた。K0 マウスの腎組織中 ATP は、野生型マウスと同等に保たれていた。飢餓時の K0 マウスの血中ケトン体濃度は、野生型マウスに比し有意に上昇しており、肝臓での酸化が亢進していた。

リポファジーは近位尿細管において飢餓時のエネルギー恒常性維持に働くこと、オートファジー不全尿細管細胞が肝ケトン体産生亢進によってエネルギー枯渇を代償す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 5 件)

Yamamoto T, Takabatake Y, Takahashi A, et al. High-Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to Lipotoxicity in the Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2017 May;28(5):1534-1551.

Takabatake Y, Yamamoto T, Isaka Y. Stagnation of autophagy: A novel mechanism of renal lipotoxicity. *Autophagy*. 2017 Apr 3;13(4):775-776

Minami S, Yamamoto T, Takabatake Y, et al. Lipophagy maintains energy homeostasis in the kidney proximal tubule during prolonged starvation. *Autophagy*. 2017 Oct 3;13(10):1629-1647.

猪阪善隆、山本毅士、難波倫子ら：医学と医療の最前線 腎疾患進行防御機構としてのオートファジー、日本内科学会雑誌：2017：106：1206～1211.

高島義嗣：尿細管とオートファジー：ベンチから実臨床へ、腎と透析：2017：83：263～267

[学会発表](計 9 件)

高島義嗣：腎疾患進行防御機構としてのオートファジー：第 25 回発達腎研究会(招待講演)：2016 年 08 月 27 日、東京

山本毅士ら：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総会：2016 年 6 月 19 日、横浜

南 聡ら：オートファジーによる脂肪滴分解(リポファジー)は、近位尿細管において飢餓時のエネルギー恒常性を維持する：第 7 回分子腎臓フォーラム：2016 年 9 月 03 日、東京

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：2016 年 12 月 15 日、大阪

Yamamoto T, Takabatake Y, Takahashi A, et al. High Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to the Lipotoxicity in the Kidney: *American Society of Nephrology Kidney Week 2016*: 2016 年 11 月 19 日, Chicago

Minami S, Yamamoto T, Takabatake Y, et al. Lipophagy Maintains Energy Homeostasis during Prolonged Starvation in the Kidney Proximal Tubule: *American Society of Nephrology Kidney Week 2016*: 2016 年 11 月

19日,Chicago

Yamamoto T, Takabatake Y, Takahashi A et al. High-fat diet-induced lysosomal dysfunction and impaired autophagic flux the 8th International Symposium on Autophagy 2017, Nara

山本毅士、高嶋義嗣、南 聡ら：イコサペン
ト酸エチルによる脂肪滴形成は高脂肪食に
よるオートファジーフラックス障害を解除
し腎脂肪毒性を軽減する：第60回日本腎臓
学会学術総会：2017年、仙台

高嶋義嗣：尿細管とオートファジー：ベンチ
から実臨床へ：第11回東京腎生理集談会(招
待講演)：2017年、東京

〔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〕

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高嶋義嗣 (TAKABATAKE, Yoshitsugu)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30403075

(2) 研究分担者

猪阪善隆 (Isaka, Yoshitaka)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00379166

高橋篤史 (Takahashi, Atsushi)
大阪大学医学部附属病院・助教

研究者番号 10704786
(3) 連携研究者 ()

研究者番号：
(4) 研究協力者 ()