

令和元年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09614

研究課題名(和文)オートファジー抑制因子Rubiconをターゲットとした生活習慣病関連腎疾患の治療

研究課題名(英文) Autophagic inhibitor Rubicon in proximal tubules can be a therapeutic target for metabolic syndrome-related kidney disease.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞内恒常性を維持するリソソームによる分解機構である。Rubiconはオートファジーの抑制因子であるが、近位尿細管特異的Rubiconノックアウトマウス(KOマウス)の表現型を解析したところ、近位尿細管細胞にリン脂質の蓄積したリソソームの拡張を認め、メタボリック症候群を呈していた。さらにKOマウスから単離したRubicon欠損近位尿細管細胞を用いて、脂質代謝を調べたところ、リソソームへのリン脂質の輸送が亢進しており、また、肝細胞の共培養実験においては、肝細胞への中性脂肪の輸送・蓄積が亢進しており、KOマウスがメタボリック症候群を呈している機序と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究から、腎臓の近位尿細管におけるオートファジー抑制因子Rubiconの欠損が、脂肪肝や内臓脂肪の増加につながり、メタボリック症候群につながるということがわかった。すなわち、近位尿細管のRubiconが肥満を抑制する働きを担っていると考えられる。オートファジーが栄養飢餓に対する防御機構であることを考えると、Rubiconがオートファジーを適度に抑制することも重要なかもしれない。もともと腎臓は様々な物質の排泄・吸収が行われている臓器とはいえ、このように全身の脂質代謝に関わっていることは大きな発見であり、今後の生活習慣病研究における意外な展開や創薬のターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a lysosomal degradation system which plays an essential role in intracellular homeostasis. Rubicon (Run domain and cysteine-rich domain containing, Beclin-1 interacting protein) inhibits the fusion of autophagosomes and lysosomes. We analyzed the phenotype of proximal tubular epithelial cells(PTEC)-specific Rubicon-deficient knockout (KO) mice. KO mice exhibited hallmark features of metabolic syndrome accompanied by expanded lysosomes containing phospholipids in the PTECs. Additionally, we investigated the role of Rubicon in lipid metabolism using isolated Rubicon-deficient PTECs. Rubicon deficiency in cultured PTECs promoted the mobilization of phospholipids from cellular membranes to lysosomes via enhanced autophagy. Furthermore, KO PTECs promoted massive triglyceride accumulation in hepatocytes co-cultured, suggesting accelerated fatty acids efflux from the PTECs contributes to the metabolic syndrome in KO mice.

研究分野：腎臓内科

キーワード：オートファジー Rubicon メボリック症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)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(Mizushima N, et al. *Nature*, PMID: 18305538) (図1)。

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(Mizushima N, et al. *Annu Rev Nutr.* PMID: 17311494)、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恒常性維持の役割を果たしている。申請者らは腎疾患におけるオートファジーの役割・機能に注目し、シスプラチン腎症(Takahashi A. et al. *Am J Pathol.* PMID: 22265049)や急性尿酸腎症(Maejima I and Takahashi A et al. *EMBO journal.* PMID: 23921551)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(Kimura T and Takahashi A, et al. *Autophagy.* PMID: 24128672)や代謝性アシドーシス(Namba T, et al. *J Am Soc Nephrol.* PMID: 24700866)など慢性の代謝ストレス下において、近位尿細管のオートファジーの果たす役割について探求してきた(総説: Takabatake Y. et al. *Nephrol Dial Transplant.* PMID: 24520117、高島義嗣ら、日本腎臓学会誌 54号:78-85)。

これらの結果からオートファジーは様々な障害モデルにおいて腎保護作用を有していると考えられ、オートファジーを亢進させることによって腎疾患の治療につながる可能性があると考えられた。

(2)Rubicon

Rubicon(Run domain Beclin-1 interacting and cysteine-rich containing protein)は大阪大学遺伝学教室の吉森保教授らのグループによって発見された新規蛋白質で、オートファジー関連蛋白である Beclin-1 との結合により、オートファジーの後期段階を抑制する(図1)。

我々は Rubicon の機能抑制により、オートファジーが活性化され、炎症・線維化の抑制を介して腎保護作用を発揮する可能性があると考え、腎臓における Rubicon の役割に着目した。

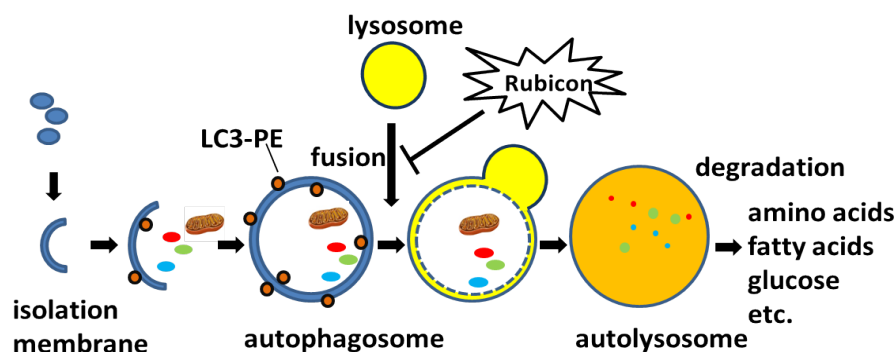


図1: オートファジーの一連の流れと Rubicon の作用点

2. 研究の目的

当初は Rubicon のノックアウトによりオートファジーを亢進させ、腎保護作用が得られることを想定していたが、虚血再灌流モデルや尿酸腎症などのモデルにおいて腎保護作用は得られなかった。

一方で、近位尿細管における Rubicon 欠損が全身のメタボリック症候群につながる事が観察されたので、その機序について解明することとした。

3. 研究の方法

(1)近位尿細管の Rubicon 欠損がオートファジーフラックスに与える影響を評価する。

オートファジーを可視化できる GFP-LC3 マウスに、リソソーム阻害薬であるクロロキンを投与することで、オートファジーフラックスを視覚的に評価することが可能である(クロロキンを負荷することによって、オートファジーが起こった分だけ GFP-LC3 dot が増加する)。このことを用いて、近位尿細管特異的 Rubicon ノックアウトマウスにおいて、オートファジーフラックスが実際に亢進しているか否かを検討した。

(2)近位尿細管特異的 Rubicon KO マウスの肝臓や脂肪組織において、脂肪が増加するメカニズムを検証・確認する。

近位尿細管特異的 Rubicon KO マウス、ならびに、対照マウスを通常食下で飼育し、経時的に餌摂取量・体重変化などを確認し、12 か月齢の時点で各臓器重量や組織所見を評価した。また、HE 染色・Oil red 染色にて、脂肪肝の程度を評価し、腹腔内糖負荷試験において耐糖能を評価した。さらに、内臓脂肪と肝臓における脂肪合成・分解に関わる分子発現を real time PCR で評価した。

(3)近位尿細管における Rubicon 欠損が、どのような機序(作用)で脂肪の増加(肥満)につながるかを検証する。

Rubicon flox マウスから近位尿細管細胞を単離し、不死化後に Cre を transfection することで Rubicon KO 近位尿細管細胞(以下、Rubicon KO 細胞)を樹立した。通常の培養条件下において、Rubicon KO 細胞と対照細胞において、ウェスタンブロッティングにより mTOR の基質である p-S6RP, p-S6K1, p-4EBP1 を評価した。

次に、同細胞を用いて脂質代謝を評価した。「Rubicon KO 細胞および対照細胞にオレイン酸を負荷した後にオレイン酸の投与を中止する」プロトコールで、脂肪滴の合成・分解を評価した。さらに、一定時間オレイン酸負荷した Rubicon KO 細胞を肝細胞と共培養し、近位尿細管細胞と肝細胞の脂肪の輸送について検討した。

4. 研究成果

(1)近位尿細管の Rubicon 欠損がオートファジーフラックスに与える影響を評価する。

通常栄養下において、GFP-LC3 を transgenic した近位尿細管特異的 Rubicon KO マウスでは、対照の GFP-LC3 マウスと比較して、クロロキン投与により GFP のドットが有意に増加していた。このことから、近位尿細管 Rubicon KO マウスでは恒常的にオートファジーフラックスが亢進していることが確認できた(図2)。

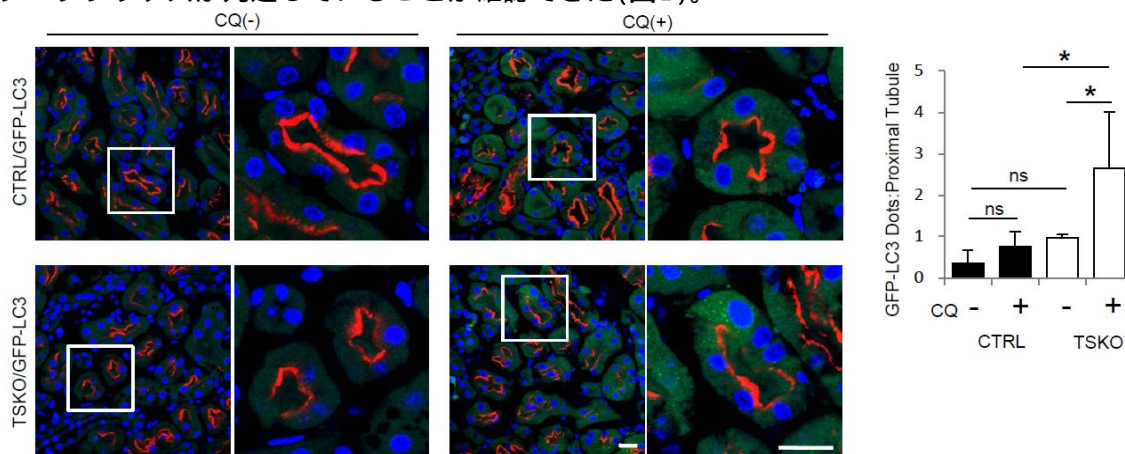


図2 : GFP-LC3 によりオートファジーを可視化した近位尿細管特異的 Rubicon KO マウス (TSKO) では、CQ(クロロキン)投与時のオートファゴソーム増加量が対照マウス(CTRL)と比べて有意に多かった。

(2)近位尿細管特異的 Rubicon KO マウスの肝臓や脂肪組織において、脂肪が増加するメカニズムを検証・確認する。

KO マウスでは、体重、内臓脂肪、皮下脂肪、精巣周囲脂肪および肝臓の重量が対照マウスに比して有意に増加していた（図3）。更に、近位尿細管特異的 Rubicon KO マウスにおいては、尿細管内に野生型マウスの高脂肪食負荷モデルと同様のリン脂質で占拠された拡張したリソソームを多数認めた（すなわち、通常食にも関わらず、あたかも高脂肪食を負荷されたかのような状態になっていた）。また、HE 染色・Oil red 染色による評価において、KO マウスでは軽度の脂肪肝を呈しており（図3）、糖負荷試験において耐糖能の悪化を認めた。さらに、内臓脂肪と肝臓における脂肪合成・分解に関わる分子発現を real time PCR で評価したところ、ともにノックアウトマウスで Srebp1c が増加傾向にあり、脂肪合成が亢進していることが示唆された。

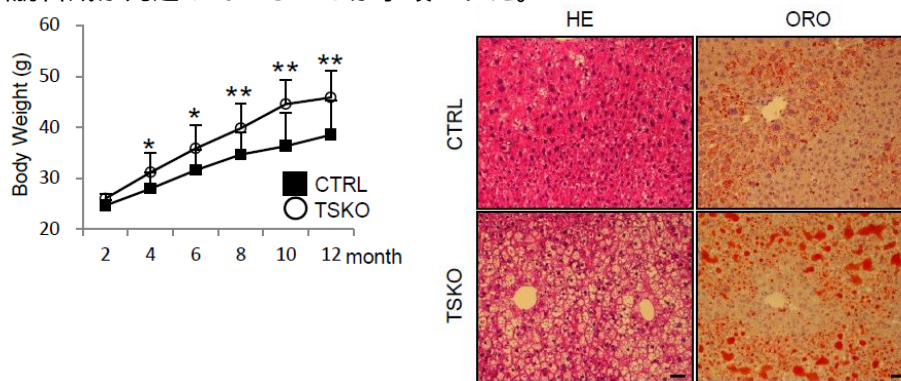


図3：近位尿細管特異的 Rubicon ノックアウトマウス (TSKO) は対照マウス (CTRL) と比べて体重が増加しており、脂肪肝を呈している (ORO: Oil red 染色)。

(3)近位尿細管における Rubicon 欠損が、どのような機序(作用)で脂肪の増加(肥満)につながるかを検証する。

同一の培養条件にも関わらず、Rubicon KO 細胞では対照群に比してウェスタンブロッティングにて mTOR の基質である p-S6RP, p-S6K1, p-4EBP1 が有意に増加していた（図4）。このことから、Rubicon KO 細胞では栄養状態にかかわらず mTOR が亢進していることが明らかとなった。

またオレイン酸の負荷実験において、Rubicon KO 細胞では野生株に比してオレイン酸負荷終了後の脂肪滴消失が有意に速いことが分かった。さらに、近位尿細管細胞を肝細胞の共培養においては、Rubicon KO 細胞と共培養した肝細胞で脂肪滴の形成が有意に増加していた（次ページ 図5）。つまり、Rubicon KO 細胞から全身循環へ過剰な脂質排出 (lipid efflux) が起こっていることが示唆された。

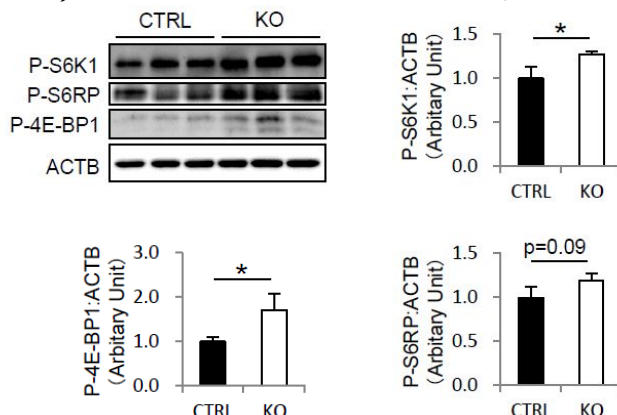


図4：Rubicon 欠損近位尿細管細胞 (KO) では対照細胞 (CTRL) と比べて mTOR が亢進している。

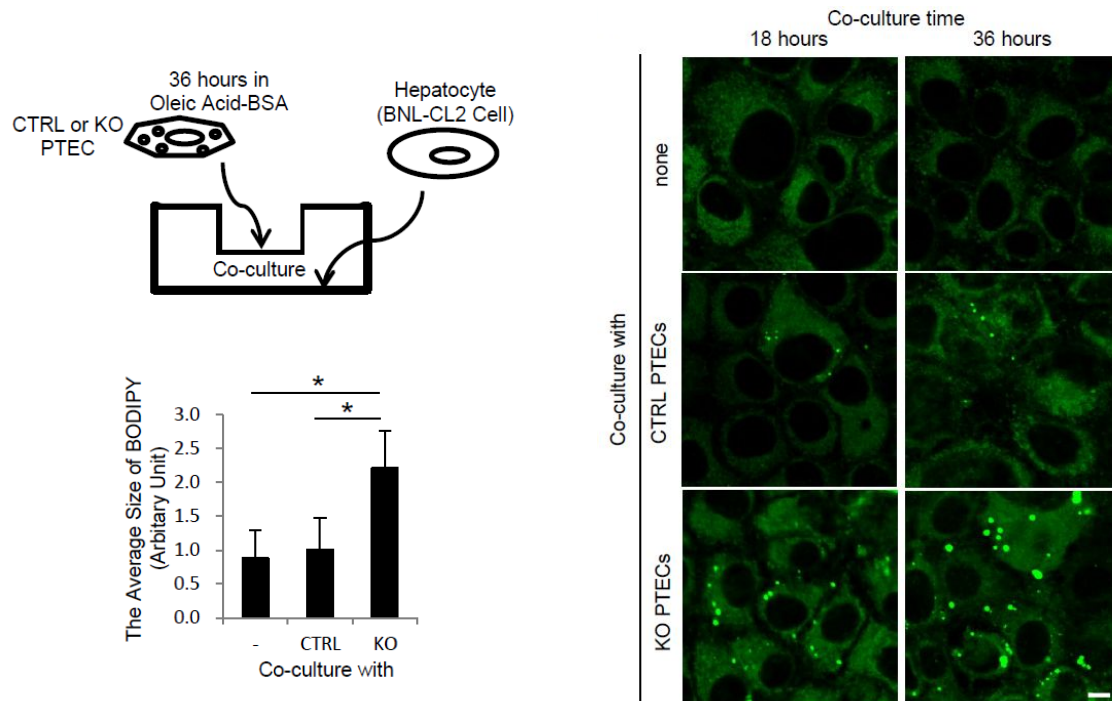


図5：あらかじめ脂肪酸（オレイン酸）を負荷した尿細管細胞を肝細胞と共培養した後に脂肪滴を評価したところ、Rubicon 欠損近位尿細管細胞(KO PTECs)と共培養した肝細胞は、対照細胞(CTRL PTECs)と共培養した肝細胞と比べて、より多くの脂肪滴を含んでいた。

今回の研究から、腎臓の近位尿細管におけるオートファジー抑制因子 Rubicon の欠損が、脂肪肝や内臓脂肪の増加につながり、メタボリック症候群につながるということがわかった。すなわち、近位尿細管の Rubicon が肥満を抑制する働きを担っていると考えられる。オートファジーは栄養飢餓に対する防御機構であるが、栄養が十分にある状態においては、Rubicon がオートファジーを適度に抑制することも重要なかもしれない。

もともと腎臓は様々な物質の排泄・吸収が行われている臓器とはいえ、このように脂質輸送を介してメタボリック症候群に関わっていることは大きな発見であり、今後の生活習慣病研究における意外な展開や創薬のターゲットとなる可能性がある。

5 . 主な発表論文等

(現在、投稿中である。)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Matsuda J, Takahashi A, Takabatake Y, Yamamoto T, Kimura T, Namba T, Minami S, Sakai S, Fujimura R, Kaimori JY, Matsui I, Niimura F, Matsusaka T, Isaka Y.

Rubicon Deficiency Leads to Obesity by Promoting Excessive Lipid Efflux in Proximal Tubular Epithelial Cells.

American Society of Nephrology Kidney Week 2017

松田潤、高橋篤史、高島義嗣、木村友則、難波倫子、山本毅士、南 聡、酒井晋介、藤村龍太、貝森淳哉、松井功、猪阪善隆

近位尿細管細胞におけるオートファジー抑制因子 Rubicon は肥満を抑制する

第 60 回日本腎臓学会学術総会 2017 年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：猪阪 善隆

ローマ字氏名：Isaka Yoshitaka

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：00379166

研究分担者氏名：高畠 義嗣

ローマ字氏名：Takabatake Yoshitsugu

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：講師

研究者番号(8桁)：30403075

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。