

令和 2 年 4 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09861

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームにおけるオルガネラ機能不全と腎尿細管間質障害機構の解明

研究課題名(英文)Organelle dysfunction of proximal tubular cells in metabolic syndrome

研究代表者

中司 敦子(Nakatsuka, Atsuko)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：00625949

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)：肥満や糖尿病を背景とした近位尿細管細胞障害の機序のひとつとして、飽和脂肪酸による脂肪毒性や小胞体ストレスの亢進がリソソーム膜を不安定化し、リソソーム膜透過性亢進によるカテプシンBの細胞質への放出により、NLRP3インフラマソームが活性化され細胞死に至ることを示した。また、我々が発見したアディポカインであるバスピンは、これらの経路を抑制して、近位尿細管細胞保護作用を示すことを明らかにした。また、バスピンは近位尿細管細胞においてGRP78、HSPA1Lと結合して細胞内に取り込まれることや、アルブミンによりHSPA1Lの細胞外分泌が増加することなど新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満や糖尿病を背景とした腎障害が増加しているが、予防や治療法の確立はまだ十分とは言えない。そこで、腎予後に強く影響する尿細管間質障害に着目した肥満や糖尿病では、近位尿細管細胞において、細胞内小器官のストレス応答が代償的に亢進しているが、細胞ストレスが過剰であったり、遷延すると非代償的となり細胞死に至る。本研究では、内臓脂肪から分泌される生理活性物質であるバスピンが、近位尿細管細胞の細胞内小器官のストレス応答不全を軽減し、細胞保護的に作用することが明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Obesity and diabetes cause proximal tubular cells (PTCs) injury via excessive organelle stresses. In present study, we revealed unique mechanism of PTCs injury induced by palmitate and chemical ER stressor. In HK2 cells, palmitate, tunicamycin and thapsigargin promoted lysosomal membrane permeabilization, leakage of cathepsin B into cytosol, and subsequent NLRP3 inflammasome activation, and ultimately cell death was induced. Vaspin, an adipokine previously we discovered, inhibited this pathway and protected HK2 cells. We newly found that vaspin-interactive molecules, GRP78 and HSPA1L, independently form complex with clathrin heavy chain and both complexes are involved in endocytosis of vaspin. We further identified that intracellular HSPA1L promoted autophagy, and HSPA1L protein level of HK2 cell was decreased by albumin administration accompanied with increased HSPA1L extracellular secretion. Vaspin and HSPA1L may be new therapeutic target to diabetic kidney diseases.

研究分野：糖尿病・肥満、脂質異常症、腎臓病

キーワード：メタボリックシンドローム 近位尿細管細胞 慢性腎臓病 バスピン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満や糖尿病、高血圧を背景とした慢性腎臓病および透析患者が増加し、慢性腎臓病の征圧が医学的社会的な課題となっている。古くから、肥満・糖尿病・高血圧などにおける糸球体障害について研究されてきたが、最近では多くの臨床および基礎研究から「尿細管間質障害・線維化が腎予後決定の主要な因子である」ことが明らかになった。しかし現在まで、尿細管細胞障害や、間質線維化の分子メカニズムは十分に解明されておらず、尿細管障害や間質線維化を抑制する治療薬は開発されていない。

これまでの我々の先行研究をもとに内臓脂肪細胞から分泌される生理活性物質である **vaspin** が近位尿細管細胞障害を抑制する可能性を示唆する知見を得たため、本研究を立案した。

2. 研究の目的

我々はアディポカインである **vaspin** を発見し(*PNAS*, 2005)、肥満やインスリン抵抗性、脂肪肝、血管内皮細胞のアポトーシスを抑制することを報告した(*Diabetes* 2012, *Circ Res* 2013)。さらに肥満や糖尿病の腎尿細管間質障害を **vaspin** が抑制することを見出した。本研究では、肥満や糖尿病の近位尿細管細胞において、小胞体ストレスがライソゾームやミトコンドリア機能不全を引き起こし、アポトーシスに至る分子機構を想定し、「オルガネラストレス応答不全・オルガネラ相互作用」の観点から解明する。さらに **vaspin** が、肥満や糖尿病の尿細管細胞アポトーシスを抑制し、腎症進展を抑制する機序を解明する。近位尿細管細胞において、**vaspin** と複合体を形成する分子の同定を行い、この分子に関しても病態における意義を明らかにする。

3. 研究の方法

Vaspin 欠損マウスを高脂肪高蔗糖食で飼育すると、近位尿細管細胞に著しい空胞形成が認められ、電顕および免疫染色では大型化リソソームであった。そのため、肥満や糖尿病におけるリソソームに着目した。

(1) 飽和脂肪酸、小胞体ストレス誘導物質による近位尿細管細胞のリソソームへの作用

培養近位尿細管(HK2)細胞に 500 μ M パルミチン酸、1 μ g/ml tunicamycin, 1 μ M thapsigargin を添加し、Lysotracker Red や lysosome-associated membrane protein 1 (lamp1)の蛍光染色によりリソソームの形態やサイズを観察した。ヒトリコンビナント **vaspin** をこれらの薬剤に共添加し、**vaspin** の作用を検討した。

(2) 大型化リソソームの尿細管障害における意義について

大型化リソソーム膜は脆弱化し、透過性が亢進し(lysosomal membrane permeabilization; LMP)、リソソーム内からプロテアーゼなど消化物質が細胞質に放出され細胞障害を惹起することが報告されている (Shen J., *Dev Cell* 3:99-111, 2002) (Ono K., *Mol Cell Biol* 23:665-76, 2003)。パルミチン酸、tunicamycin, thapsigargin を HK2 細胞に添加し、カテプシン B の細胞内の局在を蛍光染色で確認し、また超遠心法により細胞質分画とリソソームを含む膜分画を分けてウェスタンブロットを行いカテプシン B の細胞質への放出を評価する。

(3) LMP とインフラマソーム活性化について

LMPにより細胞質に放出されたカテプシン B は NLR (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor) family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3)インフラマソームを活性化することが報告されている(Tschopp J., *Nat Rev Immunol* 10:210-5, 2010)。そこで HK2 細胞にパルミチン酸や小胞体ストレス誘導物質を添加して NLRP3 インフラマソーム関連分子の発現を検討した。また、**vaspin** 欠損マウス、野生型、トランスジェニックマウスにおいて interleukin (IL)-1 β 免疫染色や TUNEL アッセイを行った。

(4) **vaspin** と相互作用する分子についての検討

先行研究において **vaspin** は 78kDa glucose regulated protein (GRP78)と結合することを肝細胞および血管内皮細胞で明らかにした。本研究では近位尿細管細胞においても同様に結合するかどうかを検討した。さらに他の結合分子について、3xFLAG-Vaspin を pcDNA3 にサブクローニングした発現ベクターを構築し HK2 細胞に発現させて、免疫沈降および LC-MS/MS 解析を行い探索した。新たに同定分子について、HK2 細胞を用いて発現変化や機能について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 飽和脂肪酸・小胞体ストレス誘導物質による HK2 細胞への作用

(i) パルミチン酸による培養近位尿細管細胞(HK2 細胞)への影響と **vaspin** 添加による作用
HK2 細胞に 500 μ M パルミチン酸を添加すると、phospho-eIF2 α , C/EBP homologous protein (CHOP), activating transcription factor 4 (ATF4)発現が亢進し、また p62 の蓄積が観察され、これらは 100 ng/ml **vaspin** の添加により抑制された。Lysotracker Red や lamp1 でリソソームを染色するとパルミチン酸により大型化リソソームが認められ、**vaspin** により抑制された。また TUNEL 染色において、パルミチン酸による TUNEL 陽性アポトーシス細胞の増加が **vaspin** により抑制された。

(ii) 小胞体ストレス誘導による HK2 細胞への作用と **vaspin** 添加による変化

1 μ g/ml tunicamycin, 1 μ M thapsigargin を HK2 細胞に添加すると、phospho-eIF2 α , CHOP, ATF4 発現が亢進し、また p62 の蓄積が認められ、vaspin はこれらの変化を抑制した。また Lysotracker Red でリソソームを染色すると、パルミチン酸同様に小胞体ストレス誘導により大型化リソソームが観察され、vaspin 添加により抑制された。さらに小胞体ストレス誘導でアポトーシス細胞が増加したが、vaspin により抑制された。

(2) HK2 細胞のリソソーム膜透過性亢進による NLRP3 インフラマソーム活性化

HK2 細胞にパルミチン酸、tunicamycin, thapsigargin を添加して cathepsin B の蛍光染色を行うと、リソソーム内 cathepsin B の dots 状の染色パターンから、細胞質の局在を示す diffuse な染色パターンへの変化が観察された。また細胞質蛋白を分離してウエスタンブロットを行うと、パルミチン酸添加により有意に細胞質の cathepsin B が増加し、vaspin はこれを抑制した。また NLRP3, caspase-1, IL-1 β の蛋白発現はパルミチン酸や tunicamycin、thapsigargin により増加し、vaspin 添加により抑制された。

(3) vaspin と相互作用する分子の同定と近位尿細管細胞における意義について

HK2 細胞に 3xFLAG-vaspin を発現させ、免疫沈降、LC-MS/MS 解析により vaspin と相互作用する分子として heat shock 70 kDa protein 1-like (HSPA1L)を同定した。vaspin と HSPA1L の発現は免疫沈降およびウエスタンブロットによっても確認した。C57BL6J マウスの腎臓を含む種々の臓器において HSPA1L の蛋白発現が認められ、HK2 細胞に対して 30 mM グルコース、100 nM インスリン、10 mg/ml bovine serum albumin (BSA)、500 μ M パルミチン酸、1 μ g/ml tunicamycin, 1 μ M thapsigargin を添加して 24 時間培養し HSPA1L の発現を検討したところ、興味深いことに、BSA により HK2 細胞の HSPA1L 蛋白が有意に減少し、HSPA1L の細胞外分泌が増加していることが判明した。そして HK2 細胞に BSA を添加すると p62 蓄積が認められたが、HSPA1L を過剰発現させるとこれが軽減し、また vaspin 添加した場合も同様に p62 蓄積が軽減した。

また、本研究において、HSPA1L および GRP78 はクラスリン重鎖(CHC)と複合体を形成することを見出し、vaspin は HSPA1L/CHC や GRP78/CHC を介して細胞内に取り込まれる機序が考えられた。

以上より vaspin は HSPA1L/CHC や GRP78/CHC を介して近位尿細管細胞内に取り込まれ、肥満・糖尿病による小胞体ストレスやオートファジー不全、リソソーム膜不安定化、NLRP3 インフラマソーム活性化を抑制し、細胞保護作用を示すことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mise K, Imamura M, Yamaguchi S, Teshigawara S, Tone A, Uchida HA, Eguchi J, Nakatsuka A, Ogawa D, Yoshida M, Yamada M, Shikata K, Wada J.	4. 巻 41
2. 論文標題 Identification of Novel Urinary Biomarkers for Predicting Renal Prognosis in Patients With Type 2 Diabetes by Glycan Profiling in a Multicenter Prospective Cohort Study: U-CARE Study 1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes Care.	6. 最初と最後の頁 1765-1775
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/dc18-0030.	査読の有無 有
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 Shibata Y, Nakatsuka A, Eguchi J, Miyamoto S, Masuda Y, Awazawa M, Takaki A, Yoshida R, Yagi T, Wada J.	4. 巻 12
2. 論文標題 Acquired partial lipoatrophy as graft-versus-host disease and treatment with metreleptin: two case reports.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Med Case Rep.	6. 最初と最後の頁 368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13256-018-1901-y.	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 Eguchi J, Miyashita K, Fukamachi I, Nakajima K, Murakami M, Kawahara Y, Yamashita T, Ohta Y, Abe K, Nakatsuka A, Mino M, Takase S, Okazaki H, Hegele RA, Ploug M, Hu X, Wada J, Young SG, Beigneux AP.	4. 巻 13
2. 論文標題 GPIHBP1 autoantibody syndrome during interferon 1a treatment.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Lipidol	6. 最初と最後の頁 62-69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacl.2018.10.004.	査読の有無 無
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 Wada N, Takaki A, Ikeda F, Yasunaka T, Onji M, Nouse K, Nakatsuka A, Wada J, Koike K, Miyahara K, Shiraha H, Yamamoto K, Okada H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Serum-inducible protein (IP)-10 is a disease progression-related marker for non-alcoholic fatty liver disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hepato Int.	6. 最初と最後の頁 115-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12072-016-9773-y.	査読の有無 有
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 中司敦子、和田淳	4. 巻 62
2. 論文標題 糖尿病と心腎連関	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床検査	6. 最初と最後の頁 72 - 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Atsuko Nakatsuka, Satoshi Yamaguchi, Dongxiao Zhang, Jun Wada.
2. 発表標題 Vaspin regulates lysosome function and protects from tubulopathy in metabolic syndrome.
3. 学会等名 Keystone Symposia Conference, Immunometabolism, Metaflammation and Metabolic Disorders (D6). (Workshop) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中司敦子, 山口哲志, 江口潤, 和田淳
2. 発表標題 脂肪肝における脂肪酸20:3 (n6), 20:3 (n9) の意義
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中司敦子, 江口潤, 和田淳
2. 発表標題 第62回日本腎臓学会総会
3. 学会等名 糖尿病における近位尿管細胞のGRP78局在変化とバスピンの受容体としての意義
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中司敦子, 山口哲志, 江口潤, 和田淳
2. 発表標題 肥満糖尿病の近位尿細管障害におけるHSPsの新規機能の解明
3. 学会等名 第40回日本肥満学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中司敦子, 山口哲志, 高橋寛子, 柴田祐助, 勅使川原早苗, 江口潤, 和田淳
2. 発表標題 肥満・糖尿病の近位尿細管障害に対する分子シャペロンの新規機能の解明
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中司敦子, 和田淳
2. 発表標題 糖尿病腎症における近位尿細管細胞の新規シャペロン蛋白を介したvaspinの細胞保護作用
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中司敦子, 山口哲志, 江口潤, 和田淳
2. 発表標題 肥満糖尿病における尿細管障害とHSPsを介したvaspinの作用機序の解明
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakatsuka A, Wada J
2. 発表標題 Vaspin and proximal tubular cell injury in metabolic syndrome
3. 学会等名 ISN Frontiers Meetings (symposium) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakatsuka A, Wada J
2. 発表標題 The role of vaspin on lysosomal function through a regulation of lamp2 in diabetic nephropathy
3. 学会等名 Keystone Symposia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中司敦子、山口哲志、高橋寛子、柴田祐助、勅使川原早苗、江口潤、和田淳
2. 発表標題 メタボリックシンドロームにおける尿細管障害機構の解明とvaspinの細胞保護作用
3. 学会等名 第37回日本肥満学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中司敦子、山口 哲志、柴田 祐助、高橋 寛子、三瀬 広記、勅使川原 早苗、江口 潤、和田 淳
2. 発表標題 肥満・糖尿病による近位尿細管細胞障害とvaspinの細胞保護作用機序の解明
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中司敦子、江口潤、和田 淳
2. 発表標題 肥満・糖尿病における近位尿細管細胞障害とアディポカインvaspinの作用
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中司敦子、和田淳	4. 発行年 2020年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 p204-213
3. 書名 そうだったんだ！脂質異常症	

〔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
研究協力者	和田 淳 (Wada Jun)	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・腎・免疫・内分泌代謝内科学・教授	