

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17741

研究課題名(和文)腎尿細管における糖新生とオートファジー不全の関わり

研究課題名(英文)Regulation of renal gluconeogenesis by proximal tubule autophagy

研究代表者

酒井 晋介(Sakai, Shinsuke)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60817360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎における糖新生の機序は今までわかっておらず、特に糖尿病性腎症において腎糖新生が亢進する機序について明らかにされていなかった。本研究において、オートファジー不全によって惹起する乳酸産生亢進が、腎近位尿細管細胞での糖新生が亢進することを明らかにした。乳酸は、糖新生の基質のみならず糖新生律速酵素であるG6Pase活性を上昇させることで腎糖新生を制御することが明らかになった。糖尿病によって惹起されるオートファジー不全により、乳酸産生が亢進することにより腎糖新生が亢進されて全身血糖の増悪に寄与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今まで糖尿病における腎臓での糖新生上昇の機序はわかっていなかったが、本研究によりその機序の一端が明らかになったと同時に、糖尿病における腎糖新生が、全身血糖値上昇に影響することが明らかになった。また、古くから指摘されていた腎糖新生と肝糖新生の制御機構の相違の原因の一端も明らかになり、乳酸代謝物の基質およびメディエーターとしての働きが全身代謝に重要であることも判明した。今後、糖尿病における腎糖新生の抑制は、いまだ患者数の減らない糖尿病への新たな治療介入として、新しい視点での治療となる可能性が高く社会的意義の高い研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Kidney is a gluconeogenic organ that sustains circulating blood glucose level. Nevertheless, the physiological and pathological roles and regulation of renal gluconeogenesis are largely unknown. Our findings suggest that autophagy dysfunction accelerates lactate production in renal proximal tubules and lactate up-regulates the expression of gluconeogenetic genes (PEPCK, FBP1, G6PC) in proximal tubules. Lactate contributes renal gluconeogenesis to substrate for glucose and increasing of G6Pase activity. Our findings suggests that autophagy stagnation worsens glucose metabolism by renal gluconeogenesis from lactate.

研究分野：オートファジー

キーワード：オートファジー 腎糖新生

1. 研究開始当初の背景

①腎における糖新生の生理学的意義と糖尿病の関わり：糖新生の分子学的機序は、肝臓での研究が先行しており、肝と腎では糖新生機序に相違が存在することが指摘されていたものの、腎についても肝臓と同様の機序が想定されていた。糖尿病において腎糖新生が上昇することは古くから知られていたが、どのように病態に関わるのかは未解明なままであった。糖尿病患者では、健康人に比べて糖産生が亢進しているが、この糖産生亢進の 50%近くが腎において行われていることが知られており (PMID:9691098)、腎における糖新生の制御機構を解明することは、糖尿病の治療の観点からも重要と考えられている。

オートファジーと糖尿病性腎症：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、細胞質成分 (タンパク質や細胞内器官) をリソソームで消化し細胞成分の代謝回転に貢献している (Mizushima N, et al. Nature. 2008 PMID:18305538)。さらに、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も果たしている。研究代表者らのグループは近位尿細管オートファジーに着目し、腎虚血再還流 (Kimura T, et al. J Am Soc Nephrol. 2011 PMID:21493778) やシスプラチン腎症 (Takahashi A, et al. Am J Pathol. 2012 PMID:22265049) などの急性障害にオートファジーが対抗すること、シクロスポリン腎症 (Kimura T, et al. Autophagy. 2013 PMID:24128672) や代謝性アシドーシス (Namba T, et al. J Am Soc Nephrol. 2014 PMID:24700866) などの慢性代謝ストレスへの防御的役割を發揮することを報告し、近位尿細管のオートファジーの果たす役割について詳細に探求してきた。その後、腎におけるオートファジー活性評価法を確立し、加齢に伴いオートファジー活性低下が生じること (Yamamoto T, et al. Autophagy. 2016 PMID:26986194) を報告した。さらに、生活習慣病に焦点をあて、ストレプトゾトシン誘発 1 型糖尿病モデルで腎オートファジーがリソソーム機能を支持することで、AGEs の処理に寄与すること (Takahashi A, et al. Diabetes. 2017 PMID:28246295) や、高脂肪食 (HFD) 負荷が、リソソーム過剰負担に伴うオートファジー停滞をもたらし、結果として傷害ミトコンドリアの処理などが滞ることで脂肪毒性に寄与すること (Yamamoto T, et al. J Am Soc Nephrol. 2017 PMID:27932476)、1 型、2 型糖尿病モデルマウスでは、異なるパターンのオートファジー機能不全がおこり尿細管障害を進展させることを報告した。

オートファジー不全と糖新生：腎臓におけるオートファジー不全と糖新生の関わりを報告したものはない。肝特異的オートファジー不全が肝臓のインスリン抵抗性を惹起し、対照的に肝特異的オートファジー因子過剰発現により、インスリン感受性の上昇と全身糖代謝の改善がおこることが報告されている (Yang L, et al. Cell Metab. 2010 PMID: 20519119)。オートファジーがインスリンシグナルなどに関わり、糖代謝に影響を与えることが少しずつ解明されてきているが、その明確な機序は不明であった。

2. 研究の目的

尿細管におけるオートファジーと糖新生の関連を明らかにし、将来的には糖尿病でのオートファジー不全を解消し、過剰な腎糖新生を抑制することによって糖尿病性腎症や高血糖を改善する薬剤の開発への道筋をつけることが本課題の目的である。

3. 研究の方法

オートファジー不全 (KO) マウス血糖値異常の評価とその病態解明 (in vivo)

・全身のインスリン感受性の評価：KO マウス HFD 負荷モデルにおける代謝評価として、ITT 腎以外の糖代謝関連臓器 (膵・肝・筋肉・脂肪) に差がないかを確かめる。腎以外の臓器で差を認めたら、その原因 (腎と他臓器の連関) を検討した。

・腎糖新生亢進の評価：PEPCK・G6PC などの糖新生因子の発現 (一部確認済)、酵素活性を評価し、腎における糖新生を多面的に評価した。

オートファジー不全がいずれの機序で腎糖新生を亢進させるかの検討 (in vitro)

・オートファジー不全が直接糖新生に関わっているか否か

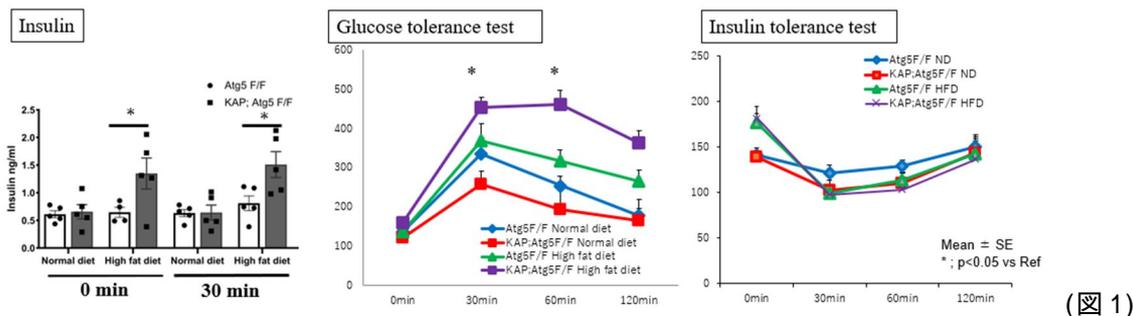
糖新生の評価は、初代培養細胞の単離による無グルコース培地への糖分泌能力を評価する方法が一般的である。既にマウス腎からの単離方法を確立しており、通常および KO マウス由来の単離尿細管細胞を用いて糖新生能を検討した。

・オートファジー不全が細胞間シグナルを介して、二次的に糖新生を亢進させるか
液性因子を介した細胞間シグナルに着目した。通常初代培養細胞に、野生型もしくは KO 不死細胞を接地させ、糖新生の上昇を確認した上で (一部確認済である)、KO マウス HFD 負荷モデルで野生型に比べて KO マウスの腎で増加している代謝産物を同定した。同定された代謝産物に対して、トランスポーターが同定されていたら、RNA 阻害や阻害薬投与により糖新生の亢進が代謝産物依存性に生じることを確認した。

同定された代謝産物が糖新生因子の転写を制御する可能性があるかを確認した。

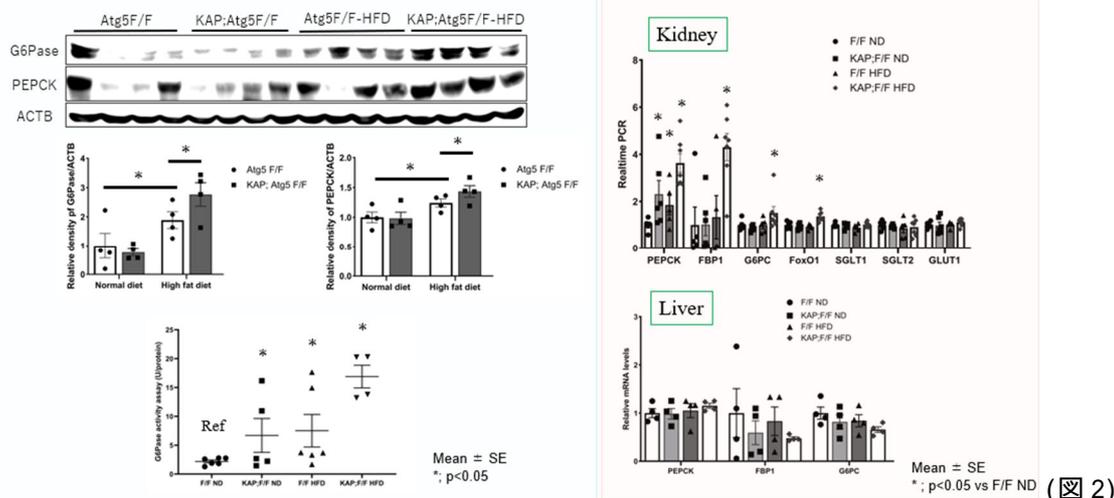
4. 研究成果

Atg5 flox マウスに、近位尿細管特異的に存在する KAP プロモーター下に Cre を発現するマウスを交配し、近位尿細管特異的オートファジー不全マウスを作製し、糖尿病モデルとして高脂肪食負荷(HFD60)を2ヵ月給餌し糖尿病を発症させた。耐糖能(GTT)を測定したところ、オートファジー不全糖尿病モデルでは耐糖能異常がみられたものの、一方でインスリン負荷試験(ITT)では両群に差がみられなかった(図1)。耐糖能増悪の原因としてインスリン分泌不全などを想定し、試験時のインスリン測定を施行したが、増悪しているオートファジー不全糖尿病マウスにおいてもインスリン分泌は保たれており、インスリン作用不全による増悪ではなかった(図1)



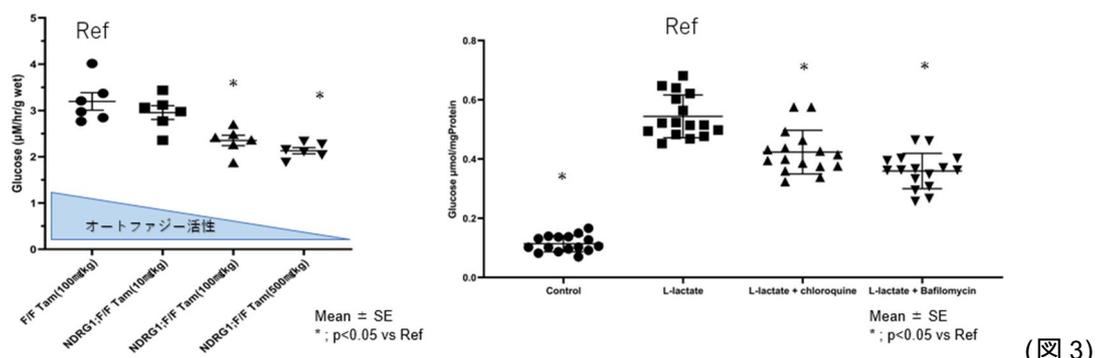
(図1)

耐糖能の増悪の原因として、腎糖産生に着目し、糖新生因子(PEPCK、G6PC、FBP1)を腎組織の Lysate を用いて Western blot、RealtimePCR、糖新生の活性酵素である G6Pase 活性の測定を行ったところ、オートファジー不全糖尿病モデルでより亢進していることを確認した(図2)。一方、肝臓におけるこれらの糖新生因子は低下がみられた(図)。以上から、近位尿細管特異的オートファジー不全糖尿病マウスでは腎糖新生が亢進し耐糖能を増悪させることが判明した。



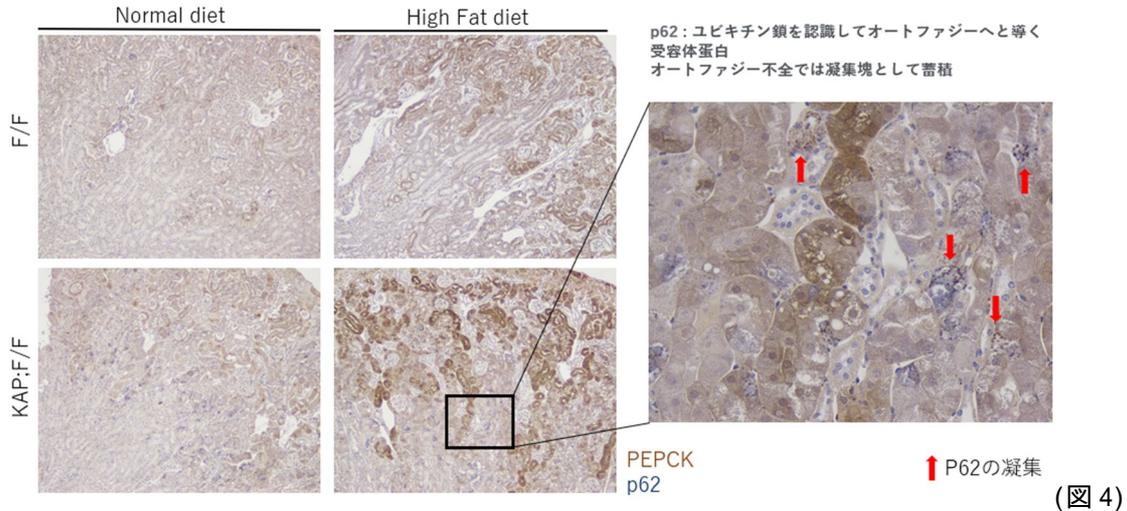
(図2)

Autophagy 不全細胞において糖産生が亢進すると仮説をたて、初代培養細胞を用いた糖産生能測定を施行した。具体的には、薬剤(タモキシフェン)誘導性に近位尿細管特異的オートファジー不全をおこすマウスを使用し、タモキシフェンを濃度別に投与しオートファジー不全の程度を調整して誘導した尿細管細胞を単離し、基質として Lactate を添加した No glucose medium を負荷し、一定時間後に糖濃度を測定することで糖産生能を確認した。予想外のことに、マウスの結果とは逆に、オートファジー不全細胞からの糖産生が低下する結果が得られた(図3)。オートファジー活性を抑制する薬剤(3MA やクロロキシン)を添加した Medium において、同様の手法により糖産生能を検討したが、いずれもオートファジー活性の低下により尿細管からの糖産生の低下がみられた(図3)。

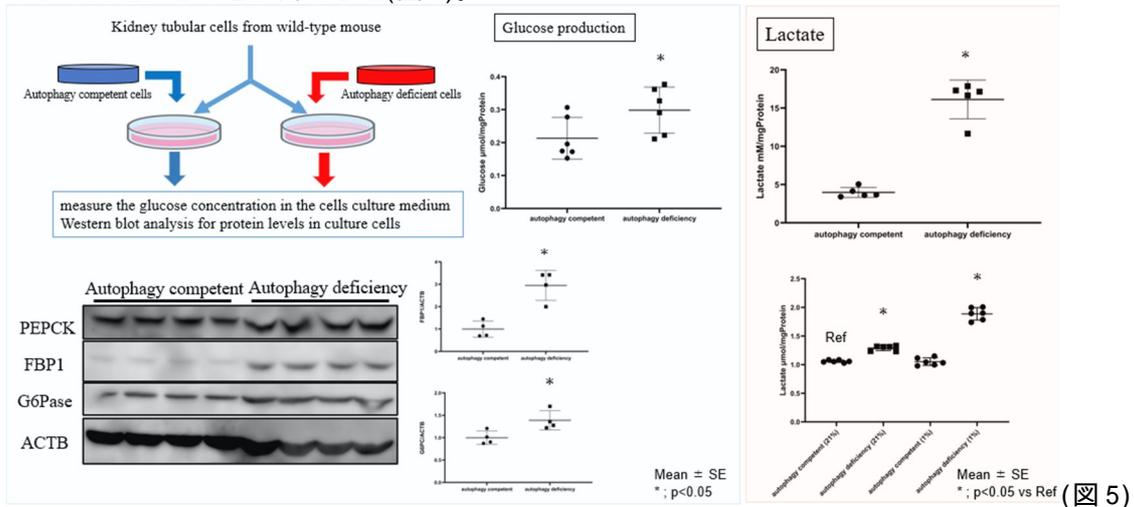


(図3)

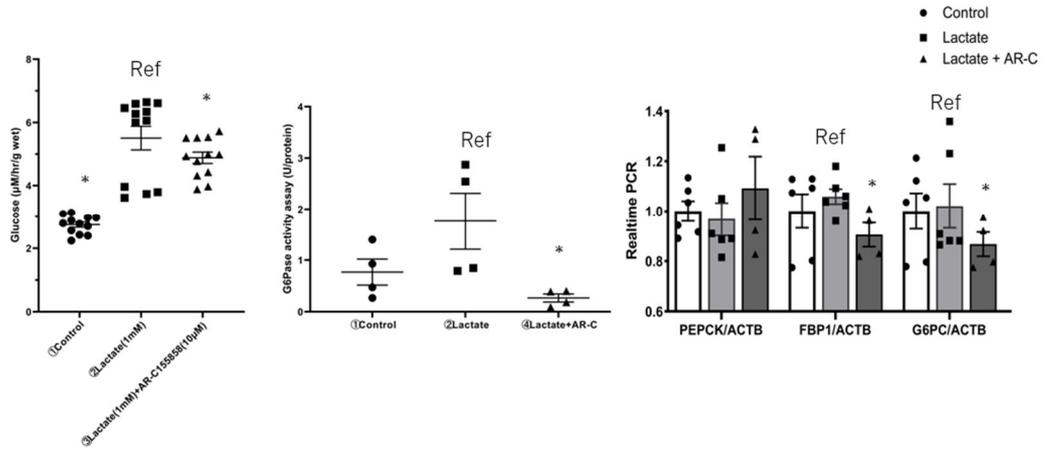
マウス腎組織でのパレフィン切片を用いて腎糖新生因子である PEPCK、オートファジー選択基質である p62 を共染色したところ、p62 の凝集塊のみられない部分(遺伝的にオートファジー不全が惹起されていない尿細管)での糖新生酵素の亢進がみられた(図 4)。



以上の結果が、オートファジー不全細胞とオートファジー不全ではない尿細管細胞との相互作用により誘導されていると考え、野生型マウスより単離した初代培養細胞に、オートファジー活性の高い尿細管細胞(WT)、またはオートファジー活性のない細胞(KO 細胞)をそれぞれ共培養し、糖産生能を評価したところ、活性不全細胞と共培養した細胞において糖産生の亢進および糖新生因子の亢進がみられた(図 5)。これらの培養細胞の Medium 中の乳酸濃度を測定したところ、オートファジー不全細胞では上昇がみられ、また糖尿病病態でみられるような低酸素環境下ではより亢進することが判明した(図 5)。



相互作用する代謝物として乳酸に着目し、乳酸トランスポーターの阻害薬(AR-C)を添加した Medium 中で糖産生能を評価したところ、糖産生の低下だけでなく、G6Pase 活性の低下、糖新生因子(PEPCK、FBP1、G6PC)の発現低下がみられたため、乳酸は基質としてだけでなく糖新生酵素に働きかけて糖新生を亢進させることが判明した(図 6)



(图 6)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 酒井 晋介
2. 発表標題 近位尿細管オートファジー不全は腎糖新生亢進を介して耐糖能異常を悪化させる
3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------