

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08632

研究課題名(和文) 糖尿病性腎・肝疾患に対する新規治療標的としてのBsgの有用性

研究課題名(英文) Usefulness of Basigin as a novel therapeutic target for diabetic kidney and liver diseases

研究代表者

小杉 智規 (KOSUGI, TOMOKI)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90584681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Basigin(Bsg)はモノカルボン酸の細胞内輸送を促進する。高脂肪食負荷時に、Bsg欠損は糖尿病やインスリン抵抗性の改善、腎障害や脂肪性肝疾患の軽減を示した。本研究は、糖尿病性腎疾患や脂肪性肝疾患に対する新たな治療戦略の構築を目指し、細胞内代謝機構へのBsgの詳細な役割を解明し、高脂肪食負荷マウスを使用して人工核酸による治療実験を行った。肝臓・腎近位尿細管の初代培養細胞において、TCA回路内の中間代謝産物はBsg阻害により30%から70%程度の低下を示した。高脂肪食負荷マウスの全身投与実験では、肝臓の血清学的指標に改善傾向を認めしたが、糖尿病に著明な効果を示したとは判断し難かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、¹³C標識の安定同位体基質を使用したIn vivo / In vitro tracer metabolomicsを用い、Bsg抑制による各臓器の生体恒常性の変化を俯瞰し、糖尿病の合併症を含む全身性代謝性疾患の発症、進展機序について検証を深めた。これらの知見を基に、本検証では基質輸送の関門となる細胞膜輸送体に対しBsgを用いた制御による治療応用を目指した。MCT-Bsg axis が如何に“Healthy”な状況から糖尿病やNAFLDの代謝性疾患に至る過程へ関与するか、を明らかにし、ストレス応答や腫瘍領域の細胞増殖・浸潤に関する理解と治療応用が可能である。

研究成果の概要(英文)：Basigin (Bsg) promotes intracellular transport of monocarboxylic acids. Upon high-fat diet loading, Bsg deficiency ameliorated diabetes and insulin resistance, and reduce renal damage and fatty liver disease. To develop new therapeutic strategies for diabetic kidney disease and fatty liver disease, this study aimed to elucidate the detailed involvements of Bsg in intracellular metabolic mechanisms and to conduct therapeutic experiments with artificial nucleic acids using high-fat diet-loaded mice. In primary cultured cells of liver and renal proximal tubules, intermediate metabolites in the TCA circuit were reduced by 30% to 70% by Bsg inhibition. Systemic administration experiments in high-fat diet-loaded mice showed a trend toward improvement in serological indices in the liver, but it was difficult to conclude that the treatment had a significant effect on diabetes mellitus.

研究分野：Nephrology

キーワード：ベイシジン 乳酸 ピルビン酸 高脂肪食 糖尿病 TCA回路

1. 研究開始当初の背景

乳酸やピルビン酸を基質とする糖新生や脂肪酸β酸化によるケトン生成は、生体のエネルギー恒常性の維持に不可欠であり、肝臓や腎臓は協調的に他臓器にエネルギーを供給する。糖尿病や非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) では、過剰な基質の取り込みが解糖系や TCA 回路で内因性代謝物の滞留を引き起こし、慢性的な ATP の欠乏や臓器障害をもたらす。腎虚血や薬剤による急性腎障害においても尿細管の ATP 産生低下を認める。内因性代謝経路の制御やエネルギー恒常性の維持はこれら代謝性疾患の臓器保護に有益である。腎尿細管細胞のエネルギー代謝は摂食状態に関係なく脂肪酸β酸化に大きく依存すると推定されるが、詳細な検証はなされていない。エネルギー恒常性の変化を俯瞰する事は新たな治療戦略の構築に繋がる (Figure 1)。

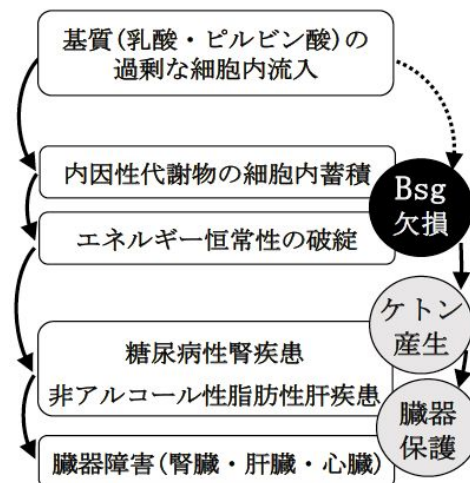


Figure 1. Basigin阻害の有用性

研究代表者らは、エネルギー恒常性に関与する重要な因子として Basigin(Bsg)に着目してきた。膜貫通型糖蛋白質である Bsg は腎尿細管細胞に豊富に存在し、Monocarboxylate transporter (MCT) のシャペロンとして乳酸やピルビン酸の細胞内取り込みに強く関与する。研究代表者らは、Bsg がレプチンにより制御を受けるという実験結果と高脂肪食を负荷した Bsg 欠損マウス ($Bsg^{-/-}$) は、1)糖尿病やインスリン抵抗性の改善、2)腎機能障害の改善、3)脂肪性肝疾患の軽減を示す知見を有している。また、細胞内、特にミトコンドリアにおける Bsg の役割を検討するため、絶食下の $Bsg^{-/-}$ を用いて Static metabolomics を行った。 $Bsg^{-/-}$ 由来の肝臓・腎臓共にクエン酸、フマル酸など TCA 回路の Flux やアラニンやグルタミン酸など糖新生に関与する Flux は野生型と比して抑制された。一方で、脂肪酸β酸化に関与するアセチル CoA や内因性ケトン体の 3-ヒドロキシ酪酸は有意な増加を示した。以上の結果は、Bsg の欠損は、1)ピルビン酸や乳酸の TCA 回路への取り込みを抑制し、2)エネルギー産生のため脂肪酸β酸化を促進する事を示す。

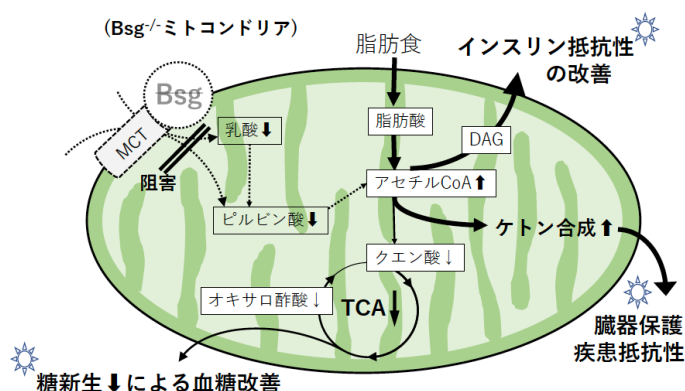


Figure 2. 高脂肪食負荷時にBsg欠損がもたらす有用性

2. 研究の目的

本研究は、「Bsg が何に制御され、尿管のどの部位に作用し、更にどの程度、乳酸やピルビン酸の細胞内輸送に関与するのか」、「糖尿病性腎・肝疾患に対して、Bsg は有効な新規治療標的となりうるか」を研究の目的とする。

3. 研究の方法

本研究では研究期間内に、下記について検証を行う。

(1) Bsg が何に制御され、どの程度、乳酸やピルビン酸の細胞内輸送に関与するか。

Bsg は MCT のシャペロンとして乳酸やピルビン酸を細胞内に輸送するが、研究代表者らは MCT の Shuttle 機能は Bsg に強く依存するという知見を得ている。また、Bsg 発現は高脂肪食負荷動物より ob/ob マウス(レプチン変異)において極めて著明であった。Bsg の制御機構を明らかにする。更に、安定同位体標識基質 (^{13}C -Lactate, ^{13}C -pyruvate) を使用し、tracer metabolomics を施行。安定同位体が其々の内因性代謝物に含まれる分量を追跡し、Bsg がどの程度、乳酸やピルビン酸の細胞内輸送、その後のミトコンドリア内への移行に関与するかを検証。

(2) 高脂肪食負荷モデルに対する人工核酸医薬の治療応用。

本研究室で既に使用されている人工核酸を用い、治療実験に用いる。培養細胞における Bsg 発現抑制効率を検討し、効果が認められれば、高脂肪食負荷 Bsg^{+/+}マウスに対して、Bsg に対するアンチセンスオリゴを高脂肪食負荷 2 ヶ月後に経静脈的投与を行い、腎機能および肝機能に関して検討する。併せて、血糖値、肝中性脂肪含有量、OGTT、インスリン抵抗性の各指標について検証する。

(3) ヒト糖尿病における腎 Bsg 発現と腎尿管局所の内因性代謝物の相互関係について。

腎尿管細胞のエネルギー代謝は摂食状態に関係なく脂肪酸 β 酸化に依存し、近位尿管や遠位尿管はそれぞれのエネルギー産性能が異なるため虚血に対する臓器保護作用も異なると考える。これらの知見の確認と共に、腎 Bsg 発現と様々な代謝経路によるエネルギー恒常性のリバランスの関係性を見出す。

4. 研究成果

(1) Bsg が何に制御され、どの程度、乳酸やピルビン酸の細胞内輸送に関与するか

安定同位体 ^{13}C 標識のピルビン酸と乳酸を用いて肝細胞初代培養細胞を培養、基質の細胞内取り込みとその利用効率に関し検証した。結果として、糖新生系については、Bsg 遺伝子欠損マウスにおける glucose-6-phosphate や Fructose-6-phosphate などの物質はほとんど認めなかった。オキサロ酢酸など測定困難な中間代謝産物を除き、TCA 回路内の中間代謝産物は Bsg 欠損により 30%から 70%程度の低下を示した。腎近位尿管初代培養細胞を用いた同様の検証では、Bsg 欠損は肝臓と同様の傾向を得た。一方、骨格筋において Bsg 抑制はグルコース負荷時に細胞外への乳酸排泄を有意に促進する事を予想に反し示した事から治療実験に際し、他臓器からの乳酸供給や他の MCTs family の発現に対する対応を検討する必要性が新たに示唆された。

(2) 高脂肪食負荷モデルに対する人工核酸医薬の治療応用

細胞を使用した予備実験において、Bsg 発現を著明に減少させる効果的な siRNA を設計し、高脂肪食負荷モデルマウスに対し、Bsg siRNA を頸静脈的に投与した。引き続き、本研究室で既に使用されている Serinol を基本骨格とし、Nuclease 活性が高く RNA に対する親和性においても強固な新規人工核酸 Serinol Nucleic Acid (SNA) を用いる。投与 2 ヶ月後、脂肪性肝疾患が抑制されるか否か、検証を繰り返した。Bsg siRNA 投与により、一部の肝臓に関する血清学的指標に若干の改善を示す効果を認めるが、著明な効果を示すとは判断し難かった。従来的人工核酸より強固な人工核酸医薬の治療応用を検討したが、投与経路を再検討し、継続することとした。

(3) ヒト糖尿病における腎 Bsg 発現と腎尿細管局所の内因性代謝物の相互関係について

2 型糖尿病モデルマウス由来の腎臓における Bsg 発現は、障害初期の尿細管細胞を中心に発現の亢進が認められた。しかし、尿細管障害が強く萎縮傾向を示す尿細管において Bsg の発現は著しく減少していた。リンパ球など間質に浸潤した炎症細胞に Bsg 発現は著明に認められた。これらの Profile はヒト糖尿病の腎生検検体の profile と類似していた。現在、血清学的に各種サイトカインを含む液性因子の発現形態を検討しており、尿細管細胞における内因性代謝産物の測定は Metabolome を利用し、検討過程にある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryuge A, Kosugi T, Maeda K, Banno R, Gou Y, Zaitsu K, Ito T, Sato Y, Hirayama A, Tsubota S, Honda T, Nakajima K, Ozaki T, Kondoh K, Takahashi K, Kato N, Ishimoto T, Soga T, Nakagawa T, Koike T, Arima H, Yuzawa Y, Minokoshi Y, Maruyama S, Kadomatsu K	4. 巻 6(20)
2. 論文標題 Basigin deficiency prevents anaplerosis and ameliorates insulin resistance and hepatosteatosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e142464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.142464.	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	前田 佳哉輔 (Maeda Kayaho) (00836306)	名古屋大学・医学部附属病院・助教 (13901)	
研究分担者	佐藤 由香 (Sato Yuka) (60846864)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	加藤 規利 (Kato Noritoshi) (90716052)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	
研究分担者	門松 健治 (Kadomatsu Kenji) (80204519)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

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
---------	---------