

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17248

研究課題名（和文）オートファジー抑制因子Rubiconの阻害による老化制御の試み

研究課題名（英文）Strategies for delaying aging and age-related diseases focusing on autophagy suppressor Rubicon in the kidney

研究代表者

中村 隼（Nakamura, Jun）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10846679

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、高リン血症による老化促進の病態として、筋肉に着目してマウス実験を行った。様々な実験モデル（高リン食の期間、片腎摘の有無など）を行うことで、高リン血症自体ではなく高リン負荷により生じる腎機能障害が、筋肉に影響している可能性が示唆された。さらに、高リン負荷による腎機能障害に影響するマグネシウムに着目し、片腎摘の上高リン低マグネシウム食を負荷すると、腎傷害が悪化すると共に筋力低下・筋重量減少を認めた。興味深いことに、高リン低マグネシウム食群の腎臓ではRubiconの発現が著増しており、腎臓のRubiconが高リン負荷による腎傷害・サルコペニアに関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会の超高齢化や生活習慣病の長期化に伴い、慢性腎臓病（CKD）患者数は依然増加し、医療的にも社会的にも問題となっている。CKDはサルコペニアと密接に関係しており、超高齢化社会である現在、CKD関連サルコペニアの対策は急務である。今回の研究で明らかとなった、高リン負荷によりサルコペニアが生じること、その原因として高リン負荷により生じる腎臓のRubiconが関与している可能性があることから、Rubiconを阻害することで高リン負荷による腎傷害・サルコペニアを改善させることができればその意義は極めて大きい。

研究成果の概要（英文）：This study focused on sarcopenia as a potential mechanism underlying accelerated aging induced by hyperphosphatemia. Various experimental models were used, including different durations of high phosphate intake and the presence of unilateral nephrectomy. The findings suggest that high phosphate-induced renal dysfunction, rather than hyperphosphatemia itself, may impact muscle function. Furthermore, a high-phosphate/low-magnesium diet following unilateral nephrectomy exacerbated renal damage and led to muscle weakness and weight loss. Notably, the expression of Rubicon in the kidneys of the high-phosphate/low-magnesium diet group was significantly increased, suggesting a potential involvement of renal Rubicon in both renal damage and sarcopenia as a phenotype of age-related diseases.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：Rubicon オートファジー 高リン 腎毒性 老化 サルコペニア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) これまで研究代表者らのグループは、腎疾患における尿細管オートファジーに着目し研究を行ってきた。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(PMID: 18305538)。その成果の要点は、尿細管オートファジーは尿細管細胞のホメオスタシスに必須である、腎疾患時には、各状況に応じて傷害された小器官を選択的に除去することで疾患に対抗する、の2点である。さらに、オートファジーフラックスを厳密に検証することで、各種腎疾患ストレス時には尿細管オートファジーが惹起されるが、種々の要因によりオートファジーが停滞することが判明した。特に老化によりこの現象が生じることを見出している(PMID: 26986194)。

(2) わが国は超高齢化社会であり、高齢による慢性腎臓病(CKD)患者数が増加し、医療経済を圧迫している。CKD患者は一般人と比較して老化が進むとされているが、その一因として高リン血症の存在が指摘されている。そこで高リン負荷と尿細管オートファジーの関係を検証したところ、高リン負荷に対してオートファジーが保護的に作用することを見出した(PMID: 32029271)。一方で、高リン負荷を続けるとオートファジーが停滞し、オートファジー阻害因子であるRubiconの増加が原因である可能性を予備検討により見出した。

### 2. 研究の目的

CKD患者ではサルコペニアを呈する患者が多いことから、高リン負荷により生じる老化の表現型として腎臓に加え筋肉にも着目し、(1)高リン負荷がサルコペニア・腎傷害に与える影響、(2)高リン負荷がオートファジーへ与える影響を調べた。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウスモデル

Klotho ノックアウトマウスを用いて高リン血症によるオートファジーへの影響を評価することを当初は計画していたが、CKDの高リン血症はKlotho ノックアウトマウスに比して緩徐に増悪するため、食餌によるリン負荷を行うことで高リン負荷モデルを作成し老化の評価を行うこととした。なお、負荷は高リン食(2%リン(コントロールは0.83%))を3か月負荷するモデルに加えて、高リン負荷を高めるために片腎摘を行った上で高リン食(1.29%リン(コントロールは0.29%))を1か月負荷するモデル、リン毒性を高めるために、高リン負荷に対し保護的に作用するマグネシウムに着目し(PMID: 30535376)、片腎摘を行った上で高リン低マグネシウム食(1.29%リン(コントロールは0.29%)、0.01%マグネシウム(正マグネシウムは0.05%、高マグネシウムは0.2%))を1か月負荷するモデルを用いた。さらに、オートファジー阻害因子Rubiconにも着目し、全身Rubicon ノックアウトマウス、筋肉特異的Rubicon ノックアウトマウス(骨格筋でCre リコンビナーゼを特異的に発現するタモキシフェン誘導性 ACTA1-cre/Esr1 マウスとRubicon flox マウスを交配して作成)も用いて検証を行った。

#### (2) オートファジーの評価

研究代表者らのグループは世界で初めて腎臓のオートファジーフラックスを評価する方法を見出した(PMID: 26986194)。GFP-LC3 マウスに各負荷を行った上で、解剖6時間前にリソソーム阻害剤であるクロロキンを投与した。解剖した検体からfixed frozen サンプルを作成し、共焦点顕微鏡にて観察した。尿細管のGFP 陽性ドット数をクロロキンの有無で比較することによりオートファジーフラックスを評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 高リン食3か月負荷モデル

8週齢より2%リン負荷を3か月行い、grip test で筋力を評価したところ、高リン負荷により筋力が低下していることを見出した。また全身Rubicon ノックアウトマウスにも高リン負荷を行い、Rubicon 阻害が高リン負荷による筋力低下を緩和するか評価したところ、Rubicon ノックアウトで筋力低下が緩和されることが判明した。Rubicon ノックアウトマウスで筋重量が増加していることも確認できた。

Rubicon 阻害が高リン負荷によるサルコペニアの改善に寄与することが判明したため、筋肉特異的Rubicon ノックアウトマウスを作成し、筋肉のRubicon が高リン負荷による筋力低下に影響するか評価した。8週齢でタモキシフェンを投与しCre 誘導後(コントロールマウスにも同様にタモキシフェンを投与した)、12週齢より3ヶ月間2%リン負荷を行い評価したが、筋肉特異的Rubicon ノックアウト群で筋力がむしろ低下するという結果であった。なお本実験では、コントロールマウスにおいて高リン負荷による筋力低下が乏しく、タモキシフェン投与や月齢が筋力に影響する可能性が示唆された。

#### (2) 片腎摘を併用した高リン食1か月負荷モデル

上記の通り2%リン3か月負荷による筋力低下効果の再現性が乏しかったため、片腎摘施行後

高リン負荷を行うことで尿へのリン排泄を低下させた、より高リン血症に近い状態とした実験を計画することとした。7-8 週齢で片腎摘を施行し、1 週間後より 1.29%リンを 1 ヶ月給餌し筋力評価を行ったが、本モデルでも高リン負荷による筋力低下が認められなかった。

### (3) 片腎摘を併用した高リン低マグネシウム食 1 か月負荷モデル

以上のように、高リン負荷に対する抵抗性が認められたため、高リン負荷による腎機能障害・血管石灰化に影響するマグネシウムに着目した。7-8 週齢で片腎摘を施行し、1 週間後より高リン低マグネシウム食・高リン正マグネシウム食・高リン高マグネシウム食を 4 週間給餌し評価を行った。高リン低マグネシウム食群では他群に比較し、筋力の低下・筋重量の減少が認められた。筋肉と共に腎臓の評価も PAS 染色で行ったところ、高リン低マグネシウム食群の腎臓の傷害は他群より強かった。また、高リン低マグネシウム食群の腎臓はオートファジーフラックスが停滞しており、Rubicon の発現も増加していることが判明した。

以上より、高リン負荷下において全身 Rubicon ノックアウトマウスで認めた筋力改善効果を筋肉特異的 Rubicon ノックアウトマウスで認めなかったこと、高リン低マグネシウム食負荷群で筋力悪化を認めると共に、腎臓の Rubicon 増加・オートファジー停滞、傷害増悪を認めたことより、腎臓の Rubicon 上昇によるオートファジー停滞・傷害増悪がサルコペニアに関与している腎筋連関が生じている可能性が考えられた。今後は腎臓特異的に Rubicon をノックアウトし、高リン負荷による腎傷害・筋力低下が緩和されるか検証していく予定である。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Jun, Yamamoto Takeshi, Takabatake Yoshitsugu, Isaka Yoshitaka, et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 TFEB-mediated lysosomal exocytosis alleviates high-fat diet-induced lipotoxicity in the kidney	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.162498	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村隼、山本毅士、高島義嗣、難波倫子、南聡、高橋篤史、松田潤、酒井晋介、余西洋明、前田志穂美、新村文男、松阪泰二、猪阪善隆
2. 発表標題 TFEBはリソソームエクソサイトーシスを介したリン脂質蓄積抑制により腎保護的に働く
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村隼、山本毅士、高島義嗣、難波倫子、南聡、高橋篤史、松田潤、酒井晋介、前田志穂美、松井翔、新村文男、松阪泰二、猪阪善隆
2. 発表標題 TFEBは尿中へのリン脂質排出促進により肥満関連尿管細管症に対して保護的に働く
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022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
---------	---------