

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591130

研究課題名（和文）糸球体上皮細胞の AMPK-ACC 経路制御による糖尿病性腎症に対する新たな治療戦略

研究課題名（英文）A new strategy for the treatment of diabetic nephropathy: regulation of AMPK/ACC pathway in podocyte.

研究代表者

一色 啓二（ISSHIKI KEIJI）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：60378487

研究成果の概要（和文）：脂肪酸合成酵素である ACC β の糸球体上皮細胞特異的過剰発現は、糸球体上皮細胞のアポトーシスやスリット構成蛋白の減少、炎症反応の増加などをもたらすことにより、糸球体上皮細胞の形態ならびに機能異常を惹起し、アルブミン尿の増加をもたらす。AMPK の活性化は、ACC β をリン酸化することにより ACC β の活性を抑制することから、糖尿病性腎症における糸球体上皮細胞障害に対する新たな治療標的となりうる。

研究成果の概要（英文）：Podocyte-specific overexpression of ACCbeta, a lipogenic enzyme, causes apoptosis, inflammation and reduction of slit-diaphragm proteins in podocytes. These structural and functional abnormalities in podocytes are related to the increase of albuminuria. The activation of AMPK, which suppresses the activity of ACCbeta, may be a new therapeutic target of podocyte injury in diabetic nephropathy by inhibiting the activity of ACCbeta in podocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：

キーワード：Acetyl-CoA carboxylase beta (ACC β)、5' AMP-activated protein kinase (AMPK)、糸球体上皮細胞、糖尿病性腎症、腎内脂肪毒性

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満患者の増加を背景に糖尿病患者数が増加している。糖尿病性腎症は我が国における透析導入原疾患の第一位を占めており、糖尿病性腎症の発症、進展抑制を目的として、現在レニン・アンジオテンシン系阻害薬を中心とした集約的治療の有効性が報告される中、その治療に抵抗性を示す患者も多数存在するのが現状である。透析導入患者数

の増加を抑制する為には、糖尿病性腎症の発症、進展を抑制しうる新たな治療戦略の確立が望まれている。尿蛋白の発症機構に、糸球体上皮細胞の異常が深く関わることが報告されている。しかし、未だ糸球体上皮細胞を標的とした治療の確立には至っておらず、糖尿病性腎症における糸球体上皮細胞障害に対する新たな治療戦略の確立が望まれている。

2. 研究の目的

糖尿病性腎症の進展に腎での脂肪毒性が関与していることが報告されている。そこで新たな治療標的を探るべく、高脂肪食負荷肥満モデルマウスを用い、肥満2型糖尿病を誘発し、腎症発症機構を脂肪毒性に着目し検討を行った。結果、高脂肪食負荷に伴う腎症の発症には、腎局所における脂肪酸合成系の亢進、脂肪酸分解系の低下という脂肪酸代謝バランスの異常が関与し、さらにその腎局所における脂肪酸合成系の亢進には ACC β の発現増加と 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性低下を介した ACC β 活性化が関与していることを明らかとした (Kume S et al. J Am Soc Nephrol 18(10): 2715-2723, 2007)。理化学研究所の前田士郎博士らはヒト2型糖尿病性腎症のリスクに ACC β 遺伝子のイントロン内の single nucleotide polymorphism (SNP) がエンハンサーとして関与していることを示唆している。このことは、動物実験のみならず遺伝的因子の面からも、糖尿病性腎症発症・進展機構に脂肪酸合成系酵素 ACC β が関与していることを示す結果である。これらの結果より、腎脂肪酸代謝異常の中で ACC β が大きな役割を担っており、ACC β の発現、活性制御が新たな糖尿病性腎症に対する治療戦略となりえるとの仮説に至った。更に ACC β は AMPK によりその活性が負に制御されている酵素であることから、本研究では糖尿病性腎症の発症、進展における ACC β の役割を解明すると共に、ACC β の不活性化を標的とした AMPK 活性化剤の投与が、腎脂肪酸代謝異常の改善をもたらす、糖尿病性腎症に対する新たな治療戦略になりえるかを検討する

3. 研究の方法

Acetyl-CoA carboxylase beta (ACC β) 過剰発現が及ぼす糸球体上皮細胞の細胞数、機能への影響を検討する。
遺伝子工学技術 (アデノウイルス、トランスジェニックマウス) を用い培養細胞、マウス糸球体上皮細胞に ACC β 発現増強を行い、これまでの検討で得られた病的状態 (高脂肪食負荷等) で見られるような ACC β 発現状態を誘導する。

(A) 培養糸球体上皮細胞における ACC β 過剰発現による形態・機能異常の評価

① ACC β 組換えアデノウイルスベクターの作製

ヒト acetyl-Coenzyme A carboxylase beta (Acacb) 遺伝子をアデノウイルス作製用プラスミドに挿入、大腸菌で増殖させた後精製、Ela 遺伝子持続発現 HEK293 細胞にトランスフ

ェクションし、組換えアデノウイルスを作製した。ACC β の発現は、mRNA を用いた定量的 RT-PCR 法および Western Blot 法を用いて確認する。

② 培養糸球体上皮細胞の形態および機能に及ぼす ACC β の影響

作製したヒト Acacb 遺伝子を組換えたアデノウイルスを培養糸球体上皮細胞に感染させ、ACC β を過剰発現させることにより、糸球体上皮細胞に及ぼす Slit 構成蛋白 (nephrin, podocin など) 発現の変化といった形態学的異常、アポトーシス、および脂肪酸合成・分解酵素など機能蛋白発現・活性変化への影響を野生型培養糸球体上皮細胞と比較検討する。

③ 高糖濃度条件下ならびに高脂肪酸条件下で培養糸球体上皮細胞における ACC β 過剰発現による形態・機能異常の評価

培養糸球体上皮細胞における ACC β 過剰発現による Slit 構成蛋白、synaptopodin 発現減少効果ならびにアポトーシス惹起効果の糖濃度による影響を検討するため、通常糖濃度条件下 (5.5mM) および高糖濃度条件下 (25mM) での ACC β 過剰発現効果の検討を行う。さらに、高脂肪酸条件下での影響を検討するため、飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (200 μ M) の共孵置下で ACC β 過剰発現による Slit 構成蛋白、synaptopodin 発現減少効果ならびにアポトーシス惹起効果の糖濃度による影響を検討する。

(B) 糸球体上皮細胞特異的 ACC β 過剰発現トランスジェニックマウスの作製と腎局所の脂質代謝と腎機能に及ぼす影響の解析

① 糸球体上皮細胞の特異的蛋白であるネフリン蛋白のプロモーターを用い、ACC β を糸球体上皮細胞特異的に過剰発現するトランスジェニックコンストラクトを作製し、既知の方法により糸球体上皮細胞特異的な ACC β 過剰発現トランスジェニックマウスを作製。なお、ACC β の発現は、糸球体から採取した mRNA を用いた定量的 RT-PCR 法および in situ hybridization、蛍光染色などの組織学的手法を用いて確認する。

② 組織特異的 ACC β 過剰発現が腎局所の脂質代謝や腎機能に及ぼす影響を解析するために、体重推移や、血中脂質・血糖値など全身における代謝マーカーを測定するとともに、腎評価項目として尿中アルブミン定量やクレアチンクリアランス (Ccr)、糸球体上皮細胞数や線維化、脂肪蓄積などの腎組織学的検討、腎抽出蛋白や mRNA を用いた腎局所の脂質代謝関連分子の発現量や活性を経時的に測定し、野生型マウスと比較評価する。

③ 糸球体上皮細胞特異的 ACC β 過剰発現トランス

ンスジェニックマウスを用いて、1型糖尿病ならびに2型糖尿病モデルマウスを作製し、ACC β 過剰発現が腎局所の脂質代謝や腎機能に及ぼす影響を解析し、野生型マウスと比較評価する。

4. 研究成果

(A) 培養糸球体上皮細胞におけるACC β 過剰発現による形態・機能異常の評価

①ヒトAcacb遺伝子をアデノウイルス作製用プラスミドに挿入、大腸菌で増殖させた後精製し、Ela遺伝子持続発現HEK293細胞にトランスフェクションし、組換えアデノウイルスを作製した。作製したアデノウイルスを培養糸球体上皮細胞に感染させ、定量的RT-PCR法およびWestern Blot法により、AcacbのmRNA発現量および蛋白発現量の増加を確認した。

②作製したヒトAcacb遺伝子を組換えたアデノウイルスを培養糸球体上皮細胞に感染させ、Slit構成蛋白(nephrin, podocin)の発現量の検討を行ったところ、野生型培養糸球体上皮細胞に比べACC β の過剰発現によりSlit構成蛋白の発現量はACC β の濃度依存性に減少を認めた。さらに、actin関連蛋白であるsynaptopodinの発現量も野生型培養糸球体上皮細胞に比べACC β の過剰発現によりACC β の濃度依存性に減少を認めた。また、ACC β 過剰発現によるアポトーシスへの影響を検討したところ、野生型培養糸球体上皮細胞に比べACC β の過剰発現により、濃度依存性にcleaved-poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)ならびにcleaved-caspase 3の増加を認め、ACC β によりアポトーシスが惹起されることを確認した。

③次に、培養糸球体上皮細胞におけるACC β 過剰発現によるSlit構成蛋白、synaptopodin発現減少効果ならびにアポトーシス惹起効果の糖濃度による影響を検討するため、通常糖濃度条件下(5.5mM)および高糖濃度条件下(25mM)でのACC β 過剰発現効果の検討を行ったが、糖濃度の違いによるSlit構成蛋白、synaptopodin発現減少効果ならびにアポトーシス惹起効果の相違は認められなかった。

さらに、培養糸球体上皮細胞におけるACC β 過剰発現によるSlit構成蛋白、synaptopodin発現減少効果ならびにアポトーシス惹起効果に対する脂肪酸負荷の影響を検討するため、飽和脂肪酸であるパルミチン酸の共孵置によるACC β 過剰発現効果の検討を行った。パルミチン酸の共孵置によりSlit構成蛋白、synaptopodin発現減少効果ならびにアポトーシス惹起効果を認めたが、これらは野生型培養糸球体上皮細胞に比べて、ACC β 過剰発

現による増強効果を認めなかった。

(B) 糸球体上皮細胞特異的ACC β 過剰発現トランスジェニックマウスの作製と腎局所の脂質代謝と腎機能に及ぼす影響の解析

①糸球体上皮細胞の特異的蛋白であるnephrin蛋白のプロモーターを用い、ACC β を糸球体上皮細胞特異的に過剰発現するトランスジェニックコンストラクトを作製し、糸球体上皮細胞特異的なACC β 過剰発現トランスジェニックマウスを作製した。マウス腎臓より単離した糸球体から採取したmRNAおよびin situ hybridization法を用いてACC β が糸球体上皮細胞特異的に発現していることを確認した。

②糸球体上皮細胞特異的ACC β 過剰発現が腎局所の脂質代謝や腎機能に及ぼす影響を解析するため、尿中アルブミン排泄量の定量、糸球体上皮細胞数や線維化、脂肪蓄積などの腎組織学的検討を行ったが、野生型マウスに比べて明らかな尿中アルブミン排泄量の増加、糸球体障害などの組織学的変化の増悪は認められなかった。

③次に、糖尿病性腎症病態形成における上皮細胞でのACC β 過剰発現の影響を検討するため、高脂肪食誘発2型糖尿病モデルマウスを作製し、尿中アルブミン排泄量の検討を行ったところ、糸球体上皮細胞特異的ACC β 過剰発現トランスジェニックマウスでは野生型マウスと比べて、高脂肪食負荷による尿中アルブミン排泄量の明らかな増加は認められなかった。また糸球体障害などの組織学的検討も行ったが、トランスジェニックマウスと野生型マウスで糸球体障害の程度に明らかな差や認められなかった。

さらに、1型糖尿病モデルマウスにおいても、糸球体障害の病因の一つとして腎内脂肪毒性が関与しうることが報告されている。そこで、ストレプトゾトシン(STZ)誘発1型糖尿病モデルマウスを作製し、STZ誘発1型糖尿病モデルマウスにおける糸球体上皮細胞特異的ACC β 過剰発現のもたらす効果について検討を行った。糸球体上皮細胞特異的ACC β 過剰発現トランスジェニックマウスでは野生型マウスと比べて、STZ投与により尿中アルブミン排泄量の有意な増加を認めた。なお、血糖値や血中遊離脂肪酸値など糖脂質代謝に関しては、トランスジェニックマウスと野生型マウスで有意な差を認めなかった。さらに、腎組織学的に糸球体の線維化、尿細管間質の炎症の増加も認められた。現在糸球体上皮細胞の形態・機能評価を施行中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一色 啓二 (ISSHIKI KEIJI)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：60378487

(2) 研究分担者

前田 士郎 (MAEDA SHIRO)

独立行政法人理化学研究所・

内分泌代謝疾患研究チーム・

チームリーダー

研究者番号：50314159

(3) 連携研究者

()

研究者番号：