

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 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590889

研究課題名（和文）腎尿細管細胞オートファジーを標的とした慢性腎臓病に対する新たな治療戦略の探索

研究課題名（英文）An examination of whether the autophagy in the renal tubule cell could be a new therapeutic target of chronic kidney disease.

研究代表者

宇津 貴 (UZU TAKASHI)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20422884

研究成果の概要（和文）：我々は肥満に伴う腎障害に関し、細胞内の浄化機構であるオートファジーに注目し検討した。蛋白尿にて惹起されるによる尿細管障害は肥満マウスにて悪化し、その機構として肥満によって腎保護的に働くオートファジーが障害されていることが明らかとなった。また、オートファジー抑制機構に、栄養センサーである mTORC1 の亢進が関与していた。今後、オートファジー回復が慢性腎臓病の新たな治療法となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Autophagy is an intracellular degradation system to protect cells by removing damaged proteins and organelles. We examined the role of autophagy in obesity-mediated exacerbation of proteinuria-induced tubular damages. In non-obese mice, proteinuria induced by intraperitoneal albumin-overload led to mild proximal tubular epithelial cell damage and apoptosis. In contrast, high fat diet-induced obesity suppressed proteinuria-induced autophagy in proximal tubular cells and exacerbated proteinuria-induced proximal cell damage and apoptosis. Proximal tubular cell-specific autophagy-deficient mice developed severe proteinuria-induced proximal tubular cell damage, suggesting that proteinuria-induced autophagy was renoprotectively elicited. Autophagy insufficiency was ameliorated by treatment with the mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor. These results suggest that a restoration of the renoprotective action of autophagy in proximal tubular epithelial cells become a new therapeutic approach to improve the renal outcome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病・オートファジー

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症をはじめとした各種腎疾患

の進展抑制に対し、レニン-アンギオテンシン系阻害薬を中心とした集学的治療の有効性が確立されている。しかし、これら治療に抵

抗性を示す患者も存在しており、新たな治療戦略の確立が望まれている。加齢や肥満は慢性腎臓病進展の危険因子であり、高齢化や肥満患者の増加を背景に慢性腎臓病から末期腎不全に至る患者が増加している。慢性腎臓病の発症には糸球体硬化、蛋白尿を主体とする糸球体病変が注目されているが、糸球体疾患における腎予後は尿細管間質病変の程度に相関することも示されている。よって、加齢や肥満が尿細管間質病変に及ぼす影響、その分子機構の解明が慢性腎臓病に対する新たな治療標的の解明に繋がると考えられる。これら腎障害における様々な分子機構、治療標的の検討がなされる中、申請者はこれまで腎局所での細胞内代謝異常、オルガネラ異常の関与を検討し、その治療標的への可能性を報告してきた (Kume S, et al. JASN 2008)。今回、これまでに得られた知見を元に、新たな治療標的としてオートファジーという細胞内機構に着目した。

オートファジーは細胞内に蓄積する異常オルガネラ・蛋白の細胞内浄化機構であり、カロリー制限により活性化されることが知られている。近年、オートファジーの異常が細胞内恒常性の低下をもたらし、加齢や代謝 (インスリン抵抗性、糖尿病) に関わる病態に関与する事が報告され、オートファジー活性化がこれら疾患に対する治療標的と成り得る事が期待されている。腎疾患の進展予防には蛋白尿減少が重要とされており、糸球体から漏出した蛋白が尿細管障害を悪化させることが知られている。

そこで本研究では、糸球体疾患に伴う糸球体漏出蛋白の尿細管細胞への取り込み、分解処理、ならびに尿細管間質病変進展に対する尿細管細胞でのオートファジー活性低下の影響、ならびにその分子機構を明らかとし、尿細管細胞のオートファジー制御を標的とした慢性腎臓病進展に対する新たな治療標的の可能性を探索することとした。

準備中、図1)。この結果は、腎疾患の改善におけるオートファジーの活性化の関与を示す新たな知見である。また、この検討においてCRにより尿細管病変のみならず、加齢に伴うアルブミン尿の出現も有意に抑制されている事から (図2)、CRにより上皮細胞でのオートファジーも尿細管細胞同様に活性化しており、その改善に関与した可能性が考えられる。オートファジーの活性調節にも関与しうる可能性が示唆される。そこで、本研究では、腎尿細管におけるオートファジー活性化調節を標的とした新たな慢性腎臓病に対する治療標的の開発を目指すこととした。

2. 研究の目的

1) 「肥満状態で腎尿細管細胞におけるオートファジー活性が低下しており、その低下が、糸球体性蛋白尿による尿細管間質病変の進展に關与する」との仮説を実証するため、

①腹腔内アルブミン負荷により蛋白尿を誘発し、非肥満マウスと高脂肪食負荷肥満 (メタボリックシンドロームモデル) マウスにおけるオートファジー活性の差異を調べる。

②近位尿細管細胞特異的にオートファジー活性を低下させることによって蛋白尿惹起性尿細管障害が増悪するか否かを調べる。

2) 尿細管細胞においてオートファジー活性を制御する分子機構を調べるとともに、肥満状態においてオートファジー活性を正常化することが糸球体性蛋白尿による尿細管間質病変の進展を抑制するか否かについて調べる。

3. 研究の方法

1)

①オートファジーの活性化を評価するためにオートファジーが活性化されるとオートファゴソーム膜に結合する LC3 蛋白を可視化できる GFP-LC3-TG マウスを用い、通常食群、高脂肪食群の2群に腹腔内アルブミン負荷を行った。またオートファジーが活性化されると LC3-I から LC3-II に変換されることより、LC3-II/LC3-I 比をその指標とした。また、糸球体から漏出し近位尿細管で再吸収されたアルブミンがオートファジーをうけるか否かを検討するため、腹腔内にアルブミンを負荷すると同時に尾静脈からテキサスレッドでラベルしたアルブミンを注入し、アルブミンの集積部位を観察した。

②オートファジー惹起に必須である遺伝子である Atg5 が近位尿細管特異的に欠損したマウスを作成し、腹腔内アルブミン負荷モデルでの尿細管障害に関する検討を行う。また、培養尿細管細胞を用い Atg5 抑制の有無によるアルブミン刺激時に対する変化を分子機構の面から観察した。

2) 肥満状態における栄養センサーと考えられている mTORC1 経路、AMPK 経路、サーチュイン経路に関し、それらの変化とオートファジーの関連を検討した。また、培養尿細管細胞を用い TSC1 (mTORC1 経路)、AMPK 経路 (AMPK α)、サーチュイン経路 (SIRT1) をそれぞれ RNA 干渉法で抑制しアルブミン刺激時に対するオートファジー活性化変化を観察した。さらに、関連のあった分子の関与をより明確にするため、肥満 GFP-LC3-TG マウスに特異的阻害薬を用いオートファジーの変化が回復するか否かを検討した。

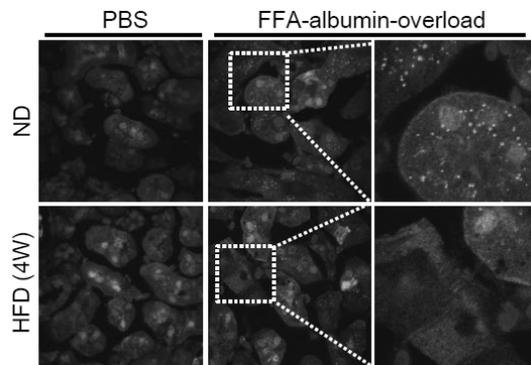
4. 研究成果

1)

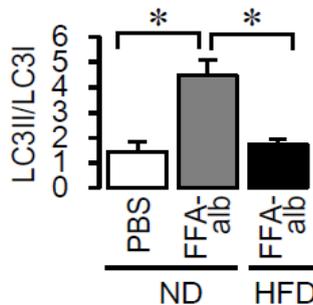
①高脂肪食で4週間飼育したマウス (HFD)

は通常食 (ND) に比し腹腔内アルブミン負荷時 (FFA-albumin-overload) に尿細管細胞内にて増加する LC3 蛋白が有意に抑制されていた (図 1-a) LC3-II/LC3-I も HFD で低下していた (図 1-b)。

(図 1a)



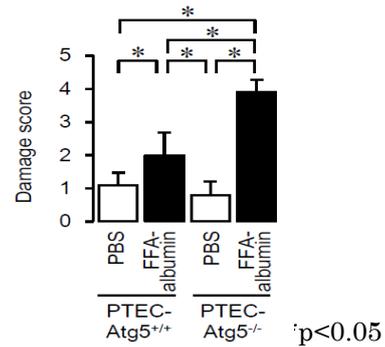
(図 1b)



高脂肪食マウスにおける蛋白尿負荷時尿細管細胞オートファジー活性化の変化
*P<0.05

また、尾静脈より注入したアルブミンは LC3 蛋白と merge していた。つまり、糸球体から濾過されたアルブミンは尿細管にて再吸収をされオートファジーをうけていた。

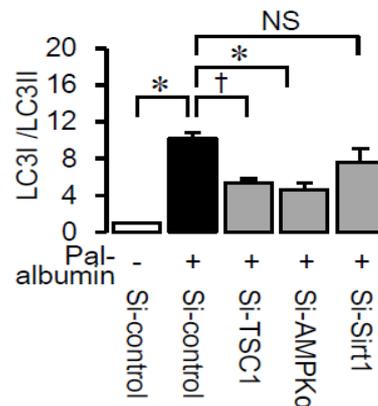
② *Atg5* を近位尿細管細胞特異的に欠損させたマウスに腹腔内アルブミン負荷を行ったところ、*ATG5* を欠損マウスによって腎組織障害は増悪し (図 2)、アポトーシスが亢進していた。さらに、培養近位尿細管細胞を用い RNA 干渉法によって同様の検討を行った。尿細管細胞特異的に *ATG5* の発現を障害したマウスでは、脂肪酸結合アルブミンによるアポトーシスが亢進していた。これらの結果より、蛋白尿に対して活性化する尿細管細胞のオートファジーは、腎保護的に働いていることが示唆された。



(図 2) オートファジー障害と蛋白尿負荷による腎組織障害

2) 尿細管細胞においてオートファジー活性を制御する分子機構

オートファジーを制御する分子機構として肥満によって変化する栄養感知経路に着目した。培養尿細管細胞に対し *TSC1*, *AMPK α* , *SIRT1* それぞれの分子を RNA 干渉法で抑制し脂肪酸結合アルブミン刺激 (Pal-albumin) によるオートファジーを誘導したところ、*TSC1* 抑制群 (*mTORC1* の亢進群) と *AMPK α* の抑制群においてオートファジーは抑制された (図 3)。



(図 3) 脂肪酸結合アルブミン (Pal-albumin) による培養尿細管細胞のオートファジー活性化

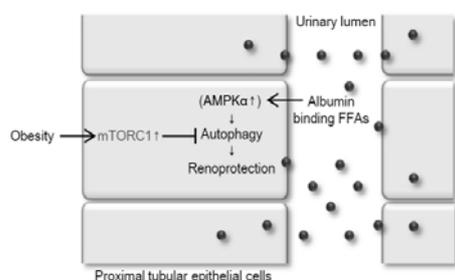
さらに、これらの分子を *in vivo* にて検討した。マウスに腹腔内アルブミン負荷を行ったところ、腎皮質の *AMPK α* は活性化された。しかし、この *AMPK α* 活性化は肥満の有無によって影響を受けなかった。つまり、*AMPK α* は蛋白尿 (脂肪酸結合アルブミン) による腎障害には関与するものの、肥満による腎障害増悪の関与は認めなかった (図 4)

次に、オートファジー可視化マウスを肥満にし、同様に腹腔内アルブミン負荷を行った。

その結果、肥満マウスの近位尿細管では mTORC1 が亢進するとともにオートファゴソーム形成が抑制されていた。また、ラパマイシンによる mTORC1 阻害薬によって、オートファゴソームの形成は回復した。

さらに、顕性蛋白尿患者の腎組織に免疫染色を行ったところ、肥満患者の近位尿細管細胞で mTORC1 が亢進しオートファジーが低下し、この現象はマウスを用いた検討と同様であった。

以上の結果から、AMPK は蛋白尿で活性化されオートファジーを亢進させることによって尿細管保護作用を發揮していること、肥満状態では mTORC1 の活性化が生じており、mTORC1 によるオートファジー抑制によって腎障害が増悪することが示唆された (図 4)。



(図 4) 肥満、蛋白尿のオートファジーに対する影響

以上の結果より、(1)糸球体由来の蛋白が尿細管で再吸収を受ける際に近位尿細管細胞ではオートファジーが誘導されること、

(2)尿細管で誘導されるオートファジーは蛋白尿負荷に対し腎保護的に働くこと、(3)肥満によりこのオートファジー誘導能が低下するが、その機構として肥満で誘導される mTORC1 亢進がオートファジーを抑制していること、を明らかにした。

本研究ではオートファジー可視化マウスに蛋白尿モデルを導入し、尿蛋白を再吸収した近位尿細管細胞特異的な栄養感知シグナルおよびオートファゴソームの変化を同一組織で捉えることに成功した。その結果、近位尿細管細胞内での mTORC1 の亢進個所とオートファジーの抑制個所は合致することを明らかにした。オートファジーの欠損により尿細管障害が悪化することは知られているが、ヒトにおいて尿細管オートファジーが低下するという病態は見つかっていなかった。しかし、本研究により身近に存在する肥満という過栄養状態がこの腎尿細管保護的オートファジーを抑制することを明らかにした。栄養感知経路によるオートファジーの制御は高インスリン血症や高血糖による細胞障

害機構を解明する一つの着眼点になり、今後の糖尿病合併症研究に大きく寄与しうると考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

1) Yamahara K, Kume S, Uzu T 他 (14 人中 14 番目)

Obesity-mediated autophagy insufficiency exacerbates proteinuria induced tubulointerstitial lesions. J Am Soc Nephrol in press (査読有)

2) Kume S, Uzu T, Maegawa H, Koya D. Autophagy: a novel therapeutic target for kidney diseases. Kume S, Uzu T, Maegawa H, Koya D. Clin Exp Nephrol. 2012;16:827-32 (査読有)

3) Tanaka Y, Kume S, Kitada M, Kanasaki K, Uzu T, Maegawa H, Koya D. Autophagy as a therapeutic target in diabetic nephropathy. Exp Diabetes Res.;2012;628978. doi: 10.1155 (査読有)

4) Koyama T, Kume S, Uzu T 他(12 人中 12 番目) SIRT3 attenuates palmitate-induced ROS production and inflammation in proximal tubular cells. Free Radic Biol Med. 2011;51:1258-67. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1) 山原康佑, 宇津 貴 高脂肪食負荷肥満マウスの腎尿細管病変進展におけるオートファジーの役割 日本糖尿病性腎症研究会 2012 年 12 月 1 日 東京

2) 武田尚子, 宇津 貴 肥満や加齢に伴う尿蛋白誘導性尿細管障害の悪化における小胞体ストレスの関与 日本腎臓学会学術総会 2012 年 6 月 1 日 横浜市

3) 久米真司, 宇津 貴 慢性腎臓病とオートファジー 日本腎臓学会西武学術大会 2011 年 9 月 30 日 徳島市

4) Kume S, Uzu T Autophagy deficiency in obese and aging mice exacerbates proteinuria-related renal tubulointerstitial lesion 71st meeting of American Diabetes Association 2011 年 6 月 28 日 サンディエゴ市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇津 貴 (UZU TAKASHI)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20422884

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：