

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890089

研究課題名(和文)糖尿病性腎症におけるミトコンドリア異常とオートファジー

研究課題名(英文)Role of autophagy in the pathogenesis of diabetic nephropathy

研究代表者

森田 善方(Morita, Yoshikata)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：40636130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：難治性腎症に対する新たな病態解明として、糖尿病に特異的なmTORC1の上流ならびに下流分子機構の解明に着目して研究を進めた結果、飽和脂肪酸がmTORC1を活性化しうる新規栄養素であること、mTORC1には増殖や分化以外に、ある種の環境下では細胞死を引き起こす役割があることを報告した。また、糸球体上皮細胞におけるオートファジー活性の低下が、腎症における高度蛋白尿、糸球体上皮細胞障害の病態に寄与することが明らかとなった。この結果は、糸球体上皮細胞におけるオートファジーの活性化が、mTORC1抑制による副作用を示さない、新たな治療法の開発になりえる可能性を示すこととなった。

研究成果の概要(英文)：Diabetic nephropathy is a leading cause of end stage of renal disease. Thus new therapeutic strategy is urgently required. Hyperactivation of mTORC1 signal in podocytes has been reported to be strongly associated with the progression of diabetic nephropathy. However, the detailed mechanism underlying diabetes-related mTORC1 activation has remained unclear. In this study, we have revealed that saturated fatty acid is a potent activator of mTORC1 and subsequent inducer of apoptosis in podocytes. Furthermore, autophagy insufficiency related to mTORC1 hyperactivation was strongly associated with the progression of podocyte dysfunction and subsequent proteinuria in mice. The results suggest that inhibition of free fatty acid-mediated mTORC1 activation and activation of autophagy in podocytes are new therapeutic strategies for diabetic nephropathy.

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：糖尿病性腎症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病腎症(腎症)は糸球体硬化や蛋白(アルブミン)尿の出現で特徴付けられる進行性腎疾患であり、わが国の透析導入原疾患の第1位である。近年の疫学研究の結果、早期微量アルブミン尿の段階であれば、厳格な血糖・血圧管理などの集学的治療により、腎症が寛解しうるということが明らかとされた。一方、ひとたび顕性蛋白尿期に移行すると、有用な治療法がなく不可逆的となり、末期腎不全への進行を防ぐことが困難となる。現在、アルブミン尿から顕性蛋白尿に移行する病態の全貌は解明されておらず、このような難治性腎症に対する新規治療法の開発を目指した研究の試みが強く望まれている。

糸球体には蛋白の漏出を防ぐための糸球体バリア機構が備わっている。このバリア機能は、糸球体上皮細胞、基底膜、血管内皮細胞により構成されているが、中でも足突起を有する糸球体上皮細胞は糸球体バリア機能の維持に最も重要な役割を担っている。腎症の進行過程においても、高度蛋白尿の症例では糸球体上皮細胞の障害が生じているが、その病態はこれまで明らかとされていない。そこで、糖尿病における糸球体上皮細胞障害の病態解明を行うことで、腎症における高度蛋白尿進行機構の解明を目指し、現在治療法のない難治性腎症に対する新規治療法の提言を行うことを目標に研究を開始した。

腎症における糸球体上皮細胞障害の病態に関する研究の一つとして、細胞内栄養感知シグナル mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) を標的とした治療の可能性が報告されている。mTORC1 は糖、インスリンなどの成長因子、アミノ酸など栄養状態で増加する栄養因子によって活性化されるキナーゼであり、蛋白の翻訳、増殖、成長を正に制御する働きをもつ。糖尿病状態では、糸球体上皮細胞内での mTORC1 活性が異常亢進し、その結果生じる小胞体ストレスの亢進により細胞機能障害が生じると報告された。さらに、mTORC1 に対する選択的阻害薬である免疫抑制剤ラパマイシンによる腎症改善効果も同時に示された。しかし一方で、臨床的には、ラパマイシン投与により糸球体上皮細胞障害が生じ、副作用として蛋白尿の出現が報告されている。また先ほどの報告の中でも、マウス糸球体上皮細胞内での過剰な mTORC1 抑制により顕著な細胞障害、機能障害の結果、蛋白尿が出現することが示された。この結果は、糸球体上皮細胞における mTORC1 シグナルは正常の糸球体上皮細胞機能維持に不可欠であるが、その過剰な亢進もまた腎症における蛋白尿の原因となるという結果を示している。このように、腎症において mTORC1 を抑制することは有効であるが、過剰な mTORC1 抑制に伴う副作用をいかにして減少させるかが次の重要な研究課題となった。

mTORC1 はブドウ糖、アミノ酸の存在下で細胞質からリソソーム膜上に移行し、リソソ-

ム膜上に存在する Rheb (Ras homolog enriched in brain) により活性化される。インスリンなどの成長因子は Rheb の活性化を介して mTORC1 を活性化させる。インスリンや糖、アミノ酸は細胞の成長、分化などの生命維持に不可欠な因子であり、このような基本的な mTORC1 シグナルを止めてしまうことが、mTORC1 過剰抑制による副作用につながったものと考えられる。

2. 研究の目的

前述の背景をもとに、1) 糖尿病状態に特異的な mTORC1 過剰亢進の上流分子機構の解明、2) 糖尿病状態での mTORC1 過剰亢進が糸球体上皮細胞障害を引き起こす下流分子機構の解明を行うことで、より安全な mTORC1 抑制を標的とした難治性腎症に対する新規治療法の開発を目指すこととした。

特に本研究では、糖尿病状態での糸球体上皮細胞でのオルガネラ異常の発症機構を mTORC1 の下流分子機構であるオートファジーに着目し検討を行うことで、腎症進展予防を目指した新たな治療戦略の可能性を探索する。糸球体上皮細胞特異的にオートファジー活性を抑制する遺伝子改変マウスを作成し、糖尿病を惹起することで腎症発症における糸球体上皮細胞のオートファジーの役割ならびにオルガネラ異常との関連を検討する。また、糖尿病状態に特異的な mTORC1 活性化の上流機構の解明を脂肪酸に着目して検討することとした。

3. 研究の方法

糖尿病性腎症含むヒト腎生検組織標本を用い、糸球体上皮細胞内オートファジー活性を検討する。P62 蛋白はオートファジーによる選択的分解標的分子であり、その蓄積はオートファジー活性の低下を示す。

Atg5 コンディショナルノックアウトマウスと糸球体上皮細胞特異的(Neph2 プロモーターを使用)Cre 発現マウスを用いた Cre-Lox 系により糸球体上皮細胞特異的オートファジー欠損マウスを作成する。作成した遺伝子改変マウスならびにワイルドタイプマウスに対し、高脂肪食負荷 2 型糖尿病モデルを誘発し、糸球体上皮細胞特異的オートファジーの抑制が糸球体病変に及ぼす影響を検討する。

オートファジー活性を負に制御する mTORC1 経路の糖尿病性腎症における活性化機序に関して、培養糸球体上皮細胞を用い検討する。

4. 研究成果

糖尿病性腎症患者の腎生検サンプルを用い、オートファジー活性をオートファジー分解標的蛋白である P62 蛋白の染色により評価

した。結果、同じ糖尿病腎症の患者でも、高度の蛋白尿を有する患者でのみ、糸球体上皮細胞への P62 蛋白の蓄積、つまりはオートファジー活性の低下が認められた。

ヒト腎生検で確認されたオートファジー不全と高度尿蛋白の因果関係を検討する為、糸球体上皮細胞特異的オートファジー欠損マウスを作製し、肥満糖尿病モデルを作製し腎病変を検討した。結果、肥満糖尿病単独、オートファジー欠損単独では顕著な障害を来たさないが、肥満糖尿病状態のオートファジー欠損マウスでのみ、顕著な糸球体上皮細胞の障害が生じ、糖尿病に伴う蛋白尿が著しく増悪した。

このように、糸球体上皮細胞におけるオートファジー活性の低下が、腎症における高度蛋白尿、糸球体上皮細胞障害の病態に寄与することが明らかとなった。

インスリン、ブドウ糖、アミノ酸とは独立した、糖尿病に特有の mTORC1 過剰亢進に関わる因子の新規同定が重要であると考えた。糖尿病状態での血清では高血糖と共に脂肪細胞のインスリン抵抗性の結果生じる高脂肪酸血症が生じる。もし脂肪酸が mTORC1 活性化機序に参与するのであれば、その分子機構の解明が、mTORC1 の生理作用に影響を及ぼさず、副作用のない mTORC1 活性抑制を標的とした腎症治療の可能性をもたらすと考えた。

脂肪酸には飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸が存在し、その両者には異なった生理機能が存在することが知られている。そこで、培養マウス糸球体上皮細胞を用い、各種脂肪酸が mTORC1 活性、アポトーシスに及ぼす影響を検討した。結果、以下を新たに明らかとした。

飽和脂肪酸は mTORC1 を活性化し、不飽和脂肪酸は飽和脂肪酸による mTORC1 活性化を抑制した。飽和脂肪酸はアポトーシスを誘導し、不飽和脂肪酸は飽和脂肪酸によるアポトーシスを抑制した。mTORC1 選択的阻害薬ラパマイシン投与、ならびに mTORC1 活性に不可欠な Raptor 蛋白に対する siRNA により飽和脂肪酸によるアポトーシスは抑制された。ブドウ糖、インスリン、アミノ酸による mTORC1 活性化はアポトーシスを誘導しなかった。飽和脂肪酸は mTORC1 の細胞質からリソソーム膜への移行を促進させ、mTORC1 活性を亢進させた。不飽和脂肪酸は飽和脂肪酸による mTORC1 のリソソーム膜上への移行を抑制した。

このように、飽和脂肪酸が mTORC1 を活性化しうる新規栄養素であること、mTORC1 には増殖や分化以外に、ある種の環境下では細胞死を引き起こす役割があることを報告した。この結果は、飽和脂肪酸過剰摂取に伴い生じる種々の病態に参与する分子機構の可能性を秘めている。mTORC1 を介したアポトーシスはブドウ糖やインスリン、アミノ酸刺激では

確認されないことから、飽和脂肪酸による mTORC1 活性化機構を抑制することが、腎症における副作用のない新規 mTORC1 抑制を標的とした治療の可能性となることが示唆された。

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1件)

1. Yasuda M, Tanaka Y, Kume S, Morita Y, Chin-Kanasaki M, Araki H, Isshiki K, Araki SI, Koya D, Haneda M, Kashiwagi A, Maegawa H, Uzu T. Fatty acids are novel nutrient factors to regulate mTORC1 lysosomal localization and apoptosis in podocytes. *Biochim Biophys Acta.*1842(7):1097-1108, 2014. 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

1. 安田 真子, 田川安都子, 久米真司, 田中敬, 森田善方, 荒木久澄, 一色啓二, 荒木信一, 宇津貴, 前川聡. 糖尿病性腎症発症における糸球体上皮細胞オートファジーの役割. 第 25 回日本糖尿病性腎症研究会 (東京: 2013 年 11 月) 口頭発表・査読あり

2. 安田 真子, 田中 敬, 久米 真司, 森田善方, 荒木 久澄, 一色 啓二, 荒木 信一, 古家 大祐, 羽田 勝計, 柏木 厚典, 宇津貴, 前川 聡. 飽和脂肪酸は mTORC1 過剰亢進を介し糸球体上皮細胞のアポトーシスを惹起する. 第 28 回日本糖尿病合併症学会 (旭川: 2013 年 10 月) 口頭発表・査読あり

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 森田 善方
(MORITA Yoshikata)
滋賀医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：40636130

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：