

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461341

研究課題名(和文) 脂肪酸合成酵素ACC の活性化抑制を標的とした新規糖尿病性腎症治療の可能性

研究課題名(英文) Inhibition of activation of ACCbeta, fatty acids synthase, might be a novel therapeutic strategy against diabetic nephropathy.

研究代表者

一色 啓二 (ISSHIKI, KEIJI)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60378487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪酸合成酵素ACC の糖尿病性腎症発症進展における役割を検討するため、糸球体上皮細胞特異的ACC 過剰発現マウスならびに近位尿細管細胞特異的ACC 過剰発現マウスを作成し、ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルによる検討を行ったところ、ACC の過剰発現は糖尿病モデルにおいて各々糸球体上皮細胞障害ならびに近位尿細管細胞障害をもたらすことを確認した。

さらに培養糸球体上皮細胞および培養近位尿細管細胞にACC を過剰発現させたところ、高糖濃度条件下においてACC 過剰発現は各々糸球体上皮細胞障害、近位尿細管細胞障害をもたらし、AMPK活性化剤であるAICARの投与により抑制された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of ACC, fatty acids synthase, in initiation and progression of diabetic nephropathy, we examined the effect of ACC using streptozotocin-induced diabetic mouse model in podocyte-specific ACC overexpressing mice and proximal tubular cell-specific ACC overexpressing mice. Overexpression of ACC exacerbated podocyte injury and proximal tubular injury, respectively in streptozotocin-induced diabetic model. Furthermore, in ACC overexpressing-cultured podocytes and ACC overexpressing-cultured proximal tubular cells, podocyte injury and proximal tubular injury, respectively, were enhanced under high glucose condition. The AMPK activation by AICAR ameliorated both ACC -induced podocyte injury and ACC -induced proximal tubular injury under high glucose condition. It is suggested that excess of ACC contributes to exacerbation of diabetic nephropathy, and the regulation of AMPK/ACC pathway may be a new therapeutic strategy to prevent diabetic nephropathy.

研究分野：腎臓病学

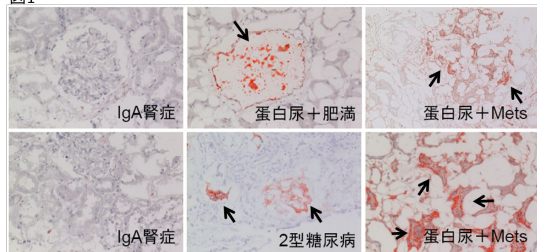
キーワード：腎臓病学 糖尿病性腎症 脂肪毒性

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症（腎症）は我が国における透析導入原疾患の第一位である。腎症の発症進展抑制を目指し、個々の症例に対し厳格な血糖管理ならびにレニン・アンジオテンシン系阻害薬を使用した集学的治療が行われているが、治療抵抗性症例も未だ多く存在しており、腎症に対する新規治療標的の解明が今もなお必要とされている。

糖尿病に関連した種々の臓器障害の進展に、異所性脂肪蓄積を介した脂肪毒性の関与が示唆されている。ヒト腎生検組織を用いた我々の基礎検討でも、腎症やメタボリックシンドロームを有する尿蛋白症例の糸球体や尿細管

図1



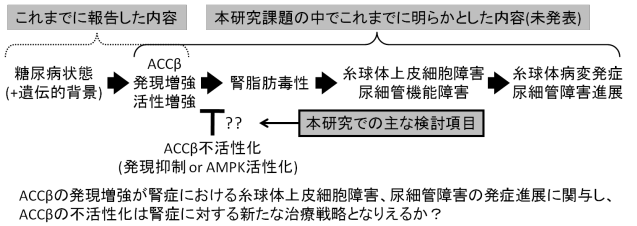
糖脂質代謝異常のないIgA腎症症例の腎組織には腎内脂肪蓄積は認められないが、肥満や2型糖尿病症例の糸球体、尿細管細胞内には異所性脂肪蓄積が観察される。脂肪蓄積(図内→)はOil-red O染色で同定した。

細胞において、顕著な脂肪蓄積が確認されている（図1）。そこで、肥満や糖尿病状態で生じる腎脂肪蓄積が腎障害の一原因となるのであれば、この病態の解明ならびに抑制機構の解明が腎症に対する新規治療標的の解明に繋がるとの仮説のもと、我々はこれまで、糸球体ならびに尿細管障害の進展における腎脂肪毒性の役割を解明することを目的とした基礎研究を進めてきた。

結果、これら一連の研究成果の一つとして、腎での脂肪酸合成酵素acetyl-CoA carboxylase β (ACC β) の発現増加を伴う脂肪酸合成系の亢進が腎局所における異所性脂肪蓄積の原因の一つであることを報告した（Kume S. et al. J Am Soc Nephrol. 2007）。また時を同じくして、共同研究者である理化学研究所の前田士郎博士らによる腎症感受性遺伝子スクリーニングの結果、ACC β が腎症感受性遺伝子として同定され、この遺伝子のイ

ントロン内の一塩基多型（疾患Allele）がACC β 遺伝子発現の増強に働いていることが明らかとされた（Maeda S. et al. PLoS Genet. 2010）。これらの知見をもとに、我々は脂肪酸合成酵素ACC β の発現亢進が腎症の発症進展要因の一つであり、その抑制が腎症に対する新規治療標的と成り得るとの仮説に至った（図2）。

図2



ACC β の発現増強が腎症における糸球体上皮細胞障害、尿細管障害の発症進展に関与し、ACC β の不活性化は腎症に対する新たな治療戦略となりえるか？

2. 研究の目的

上記の仮説を証明するため、1) ACC β の発現亢進が腎症の発症進展に関与しうるか、2) ACC β の発現や活性抑制が腎症の新規治療標的と成り得るかの2段階に分け検討を進めてきた（図2）。これまで、本研究課題の中でも検討1)に関する研究を主に進め、下記の知見を得た。

ヒトACC β を強発現する組換えアデノウイルスを用い、培養マウス糸球体上皮細胞ならびに培養マウス近位尿細管細胞におけるACC β 発現増強の影響を各種病態刺激下で検討した。結果、培養糸球体上皮細胞では高糖濃度条件下において糸球体上皮細胞の機能維持に不可欠とされるsynaptopodinやpodocinの発現抑制や、stress fiberの形成といった形態学的異

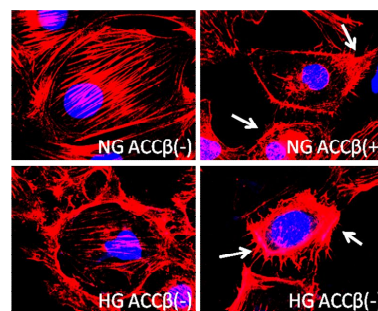


図3 培養糸球体上皮細胞におけるACC β 過剰発現はストレスファイバーの形成(→)を引き起こす。この現象は高糖濃度(HG)培養下で増強する。

常を伴う糸球体上皮細胞障害を認めしたが、ACC β 過剰発現によりこれら上皮細胞障害は増

強した(図3)。

培養近位尿細管細胞における検討でも、ACCβ 過剰発現は炎症性サイトカイン MCP-1 発現ならびに細胞内酸化ストレスの増加、アポトーシスの誘導を引き起こすこと

が明らかとなった(図4)。

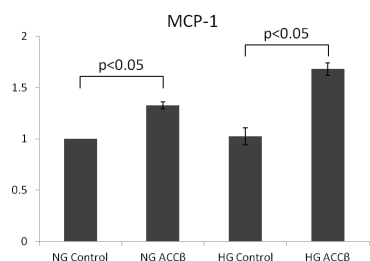


図4 マウス培養近位尿細管細胞におけるACCβ 過剰発現によるMCP-1のmRNA発現量の検討

更に、糸球体上皮細胞特異的 ACCβ 過剰発現(TG)マウスを作製し、腎症の発症におけるACCβ 発現増強の役割を検討したところ、ストレプトゾトシン誘発糖尿病を惹起した糸球体上皮細胞特異的 ACCβ-TG マウスにおいて、顕著な尿中アルブミン排泄量の増加、糸球体障害の増悪、上皮細胞における synaptopodin、podocin 発現量の低下を認め

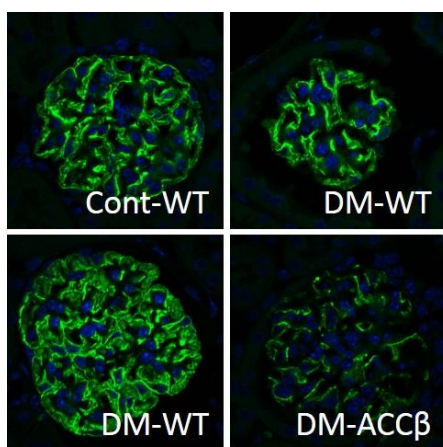


図5 糖尿病(DM)モデルではACCβの過剰発現により糸球体上皮細胞におけるシナプトポジンの発現低下を認めた。

近位尿細管特異的 ACCβ-TG マウスを用いた検討でも、ストレプトゾトシン誘発糖尿病状態では、尿細管における MCP-1、TNF-α といった炎症性サイトカインの発現増加、間質におけるマクロファージ浸潤の増加、尿細管

のアポトーシスなどといった尿細管間質細胞障害を認めたが、近位尿細管特異的ACCβ の過剰発現によりこれら尿細管間質障害は増強された。上記のACCβ-TG マウスを用いた検討の結果は、「ACCβ 発現の増強が腎症の発症進展に関わる」という我々の仮説の一つを裏付けるものであった(図2)。

3. 研究の方法

本研究ではACCβの発現抑制ならびに活性抑制が腎症の新規治療標的と成り得るかを検討する(図2)。

1) **ACCβ の発現抑制が糖尿病状態における糸球体上皮細胞ならびに近位尿細管細胞へ及ぼす影響を検討する。**腎症の発症進展に及ぼすACCβ 発現抑制の影響を検討するため、組織特異的 Cre 発現マウスを用いた Cre-loxP システムにより糸球体上皮細胞特異的ACCβ ノックアウト(KO)マウス、近位尿細管細胞特異的ACCβ-KO マウスを作製したのちに高脂肪食あるいはストレプトゾトシンを用いて糖尿病を誘発し、その表現形を検討する。また、siRNA を用いて培養糸球体上皮細胞ならびに近位尿細管細胞におけるACCβ 発現を抑制させ、それぞれの培養細胞における形態ならびに機能異常の評価を行う。具体的には糸球体上皮細胞における synaptopodin や podocin の発現量の検討、stress fiber 形成といった形態学的異常の検討、アポトーシスの評価などを行う。近位尿細管細胞においてはMCP-1、TNF-α など炎症性サイトカインの発現量や細胞内酸化ストレス、アポトーシスの検討などを行う。

2) **糖尿病状態や遺伝的背景によりACCβ が強発現するような病態においても、ACCβ の不活化が腎糸球体病変ならびに尿細管病変の発症進展を抑制しうるかを検討する。**

ACCβ の酵素活性は細胞内栄養シグナル AMP-activated protein kinase (AMPK)により負に制御されている。上述の遺伝子改変技

術を使用した ACC8 発現抑制実験は、腎症における ACC8 の関与を示す上で不可欠な検討であるが、現時点でこの手法を臨床応用させる事は困難である。よって、糖尿病状態や遺伝的背景により ACC8 の発現が増強するような環境においても、AMPK 活性化により ACC8 の活性を抑制することで、腎症の病変を改善しうることを示すことは臨床応用の面でもより重要な知見となる。アディポネクチンや 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR) は AMPK の活性化物質と知られており、その投与により ACC8 発現が過剰な状態でも ACC8 活性が負に調節されうる可能性がある。そこで培養系球体上皮細胞や近位尿細管細胞において、ACC8 の過剰発現により惹起される形態学的異常、MCP-1 の発現量や酸化ストレスの増加、アポトーシスの誘導に対しても、AMPK 活性化剤が抑制しうるかを検討する。

4. 研究成果

1) ACC8 の発現抑制が糖尿病状態における系球体上皮細胞ならびに近位尿細管細胞へ及ぼす影響の検討

組織特異的 Cre 発現マウスを用いた Cre-loxP システムにより系球体上皮細胞特異的 ACC8-KO マウス、近位尿細管細胞特異的 ACC8-KO マウスを作製し、通常飼育群と高脂肪食負荷糖尿病群ならびにストレプトゾトシン誘発糖尿病群において各種代謝マーカーや尿中アルブミン排泄量、系球体障害、尿細管間質細胞障害などの検討を行った。通常飼育群、糖尿病群（高脂肪食負荷あるいはストレプトゾトシン誘発）いずれにおいても系球体上皮細胞特異的 ACC8-KO マウスあるいは、近位尿細管細胞特異的 ACC8-KO マウスはワイルドタイプ(WT)マウスと比較して、体重や血糖値などの代謝マーカーに有意な差は認められなかった。さらに尿中アルブミン排泄量や系球体障害、上皮細胞における

synaptopodin、podocin 発現量、尿細管間質細胞障害などについても WT マウスと系球体上皮細胞あるいは近位尿細管細胞特異的 ACC8-KO マウスとの間に有意な差は認められなかった。

さらに、siRNA を用いて培養系球体上皮細胞ならびに近位尿細管細胞における ACC8 発現を抑制させ、通常糖濃度および高糖濃度条件下で系球体上皮細胞障害、近位尿細管細胞障害の検討を行ったが、ACC8 発現抑制による有意な差は確認されなかった。

2) 糖尿病状態や遺伝的背景により ACC8 が強発現するような病態においても、ACC8 の不活化が腎系球体病変ならびに尿細管病変の発症進展を抑制しうるかの検討

前述のとおり、ヒト ACC8 を強発現する組換えアデノウイルスを用い、培養マウス系球体上皮細胞ならびに培養マウス近位尿細管細胞に ACC8 を過剰発現させたところ、培養系球体上皮細胞では高糖濃度条件下において系球体上皮細胞の機能維持に不可欠とされる

synaptopodin や podocin の発現抑制や、stress fiber の形成といった形態学的異常を伴う系球体上皮細胞障害を認めたと、ACC8 過剰発現によりこれら上皮細胞障害は増強した（図3）。また培養近位尿細管細胞についても ACC8 過剰発現は炎症性サイトカイン MCP-1 発現ならびに細胞内酸化ストレスの増加、アポトーシスの誘導を引き起こすことが明らかとなった（図4）。そこで、AICAR を用いた AMPK 活性化により ACC8 の活性を抑制することで、これら ACC8 過剰発現によりもたらされた系球体上皮細胞障害ならびに近位尿細管細胞障害が抑制されうるかを検討した。

AICAR は培養系球体上皮細胞において高糖濃度条件下で ACC8 過剰発現により増悪した synaptopodin や podocin の発現抑制や、stress fiber の形成といった形態学的異常を伴う系球体上皮細胞障害、MCP-1、TNF- α など炎症性

サイトカインの発現上昇を有意に抑制した（図6）。培養近位尿細管細胞においても高糖濃度条件下でACCβの過剰発現により増強した炎症性サイトカインMCP-1発現ならびに細胞内酸化ストレスの増加、アポトーシスの誘導はAICARの投与により有意に抑制された。

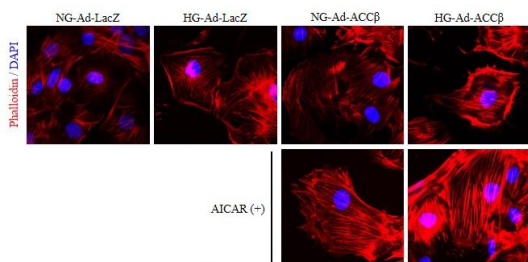


図6 AICARは培養糸球体上皮細胞において高糖濃度条件下でACCβの過剰発現により増強したストレスファイバーの形成を抑制した。

以上の結果より、脂肪酸合成酵素 ACCβ の発現過剰は糖尿病状態において糸球体上皮細胞障害ならびに近位尿細管細胞障害をもたらすことにより糖尿病性腎症の発症進展に関与しうること、AICAR などによる ACCβ の発現抑制は糖尿病性腎症の新たな治療戦略となりうることが示唆される。

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）

〔学会発表〕(計 5 件)

Yuki Tanaka, Shinji Kume, Shiro Maeda, Itsuki Oshima, Hisazumi Araki, Keiji Isshiki, Shin-ichi Araki, Takashi Uzu and Hiroshi Maegawa

Increased Expression of Acetyl-CoA Carboxylase β is Involved in Podocyte Injury in Diabetic Nephropathy

The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology, 2014, Shinagawa

田中敬、久米真司、前田士郎、荒木信一、一色啓二、大島五紀、宇津貴、前川聡

脂肪酸合成酵素 Acetyl-CoA carboxylase β (ACCβ) の発現亢進は糖尿病性腎症におけるポドサイト障害を増悪させる

第 25 回日本糖尿病性腎症研究会、2013、東京

田中敬、久米真司、前田士郎、荒木久澄、一色啓二、荒木信一、大島五紀、古家大祐、羽田勝計、柏木厚典、宇津貴、前川聡

脂肪酸合成酵素 Acetyl-CoA carboxylase β (ACCβ) の発現亢進は糖尿病状態におけるポドサイト障害を増悪させる

第 28 回日本糖尿病合併症学会、2013、旭川

田中敬、久米真司、前田士郎、荒木久澄、一色啓二、荒木信一、古家大祐、羽田勝計、宇津貴、前川 聡

ポドサイトにおける脂肪酸合成酵素 ACCβ の発現亢進は糖尿病におけるポドサイト障害を増悪させる

第 56 回日本腎臓学会学術総会、2013、東京

Yuki Tanaka, Shinji Kume, Shiro Maeda, Hisazumi Araki, Keiji Isshiki, Shin-ichi Araki, Itsuki Oshima, Daisuke Koya, Masakazu Haneda, Atsunori Kashiwagi, Takashi Uzu and Hiroshi Maegawa,
Increased Expression of Acetyl-CoA Carboxylase β is Involved in Podocyte Injury in Diabetic Nephropathy
73rd American Diabetes Association Scientific Sessions, 2013, Chicago

6 . 研究組織

(1)研究代表者

一色 啓二 (Keiji Isshiki)

滋賀医科大学 医学部 非常勤講師

研究者番号 : 60378487