

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860746

研究課題名(和文) 飢餓状態下の生体防御反応におけるオートファジーの生理的役割の解明

研究課題名(英文) Mammalian autophagy is essential for hepatic and renal ketogenesis during starvation.

研究代表者

近藤 基之 (MOTOYUKI, KONDO)

滋賀医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：60569052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：全身のオートファジー不全をきたすLamp2欠損マウス、Atg5遺伝子ヘテロ欠損マウスでは飢餓時のケトン産生が減少した。Atg5遺伝子に対する肝臓・筋肉・腎近位尿細管細胞特異的、さらにダブル欠損マウスを作製し検討した。筋肉及び腎近位尿細管細胞特異的Atg5欠損マウスでは飢餓時ケトン産生は障害されなかったが、肝臓特異的Atg5欠損マウスでは部分的なケトン産生が障害され、肝臓+近位尿細管細胞特異的ダブル欠損マウスでは更なるケトン産生の低下が確認された。オートファジー機構は飢餓時のケトン産生に必須であり、肝臓が大部分を担っているが腎近位尿細管細胞にも潜在的なケトン産生能が存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We analysed starvation induced gluconeogenesis and ketogenesis in mouse strains lacking autophagy in liver, skeletal muscle or kidney. Though skeletal muscle and kidney specific autophagy deficiency did not alter starvation induced increases in blood ketone levels, liver specific autophagy deficiency significantly attenuated this effect. During starvation, mice lacking autophagy both in liver and kidney showed even lower blood ketone levels and physical activity than mice lacking autophagy only in liver. Starvation induced massive lipid droplet formation in extra adipose tissues, which was essential for ketogenesis. Moreover, this process was impaired in the autophagy deficient liver and kidney. These findings demonstrate that hepatic and renal autophagy are essential for starvation induced lipid droplet formation and subsequent ketogenesis and, ultimately, for maintaining systemic energy homeostasis.

研究分野：内分泌代謝・糖尿病

キーワード：オートファジー ケトン体 飢餓応答 ケトン体新生 糖新生

1. 研究開始当初の背景

オートファジーとはリソソームを分解の場とする、蛋白質やオルガネラを含む細胞質成分に対する細胞内大規模分解機構である。オートファジーには「マクロオートファジー」、「シャペロン介在性オートファジー(以下CMA)」、「ミクロオートファジー」の3種が存在する。この中でも、マクロオートファジー研究は最も進み、哺乳類における生理的役割や病態への関与が解明されつつある。一方で、CMAに関する知見は非常に少なく、ミクロオートファジーに関しては哺乳類での確認方法も確立していないのが現状である。

オートファジーには大別して2つの生理的役割が存在する。1つ目は、飢餓時に自己成分を分解することで蛋白再合成のためのアミノ酸再供給を行うことであり、2つ目は、不良蛋白質や異常オルガネラなどの細胞内老廃物の排除である。このようなオートファジーの細胞内恒常性維持機構としての働きは、線虫などの下等生物で確認されてきたが、近年の研究では、哺乳類でもこれらの機能が確認され、更に、その異常が各種疾患発症に関与することが示されつつあることから、オートファジーの活性制御が種々の疾患に対する治療標的となる可能性に期待が高まっている。

糖尿病(特に肥満2型糖尿病)の発症には、生物が進化の過程で飢餓を克服すべく獲得した儉約機構が関与し、また合併症の発症には、細胞内ストレス過剰により生じる細胞障害が深く関与している。上述するオートファジーの生理作用を考えると、糖尿病や合併症の発症に全身臓器のオートファジーが密接に関与しうる事が推察され、その関与の解明はオートファジーを標的とした新規糖尿病、合併症治療の開発をもたらす可能性がある。実際に、糖尿病、合併症領域の研究でも少しずつではあるが、オートファジー機構の関与が示されつつある。しかし、オートファジー研究は未だ始まったばかりであること、糖尿病発症から合併症進展までには、多臓器での種々の病態が関与することから、臨床応用への発展の為には、各臓器におけるオートファジーの生理的作用、臨床的問題を解決しうる基礎研究を積み重ねる必要がある。

2. 研究の目的

生物は進化の過程で飢餓応答機構を発達させてきた。生物は摂食時の余剰エネルギーを脂肪に蓄積する一方、飢餓時には脂肪酸を遊離し、各臓器のATP産生源として供給する。脳は脂肪酸をATP産生に使用できないため、肝臓や腎臓による脂肪酸由来のケトン産生や糖新生が、脳へのATP産生源供給、生命維持に不可欠となる。我々は基礎検討として、飢餓時に脂肪から遊離された脂肪酸が

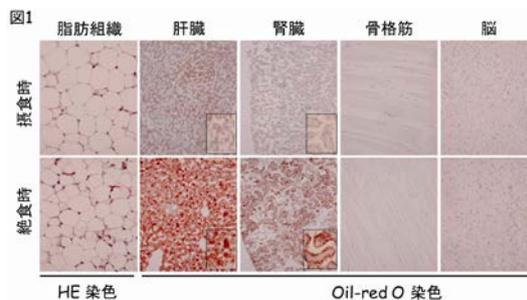


図1 絶食時に脂肪組織から放出された脂肪酸は肝臓、腎臓(近位尿細管細胞)において中性脂肪として蓄積する(Oil-red O陽性細胞の増加)。骨格筋、脳では絶食時の脂肪蓄積は認められない。

肝臓や腎近位尿細管細胞において、細胞内脂肪滴として蓄積され(図1)、これら組織内では同時にオートファジーが活性化されることを確認している(図2)。しかし、哺乳類での糖新生やケトン産生における、脂肪からの脂肪酸遊離、肝腎での脂肪蓄積とオートファジーの生理的役割は未だ不明である。

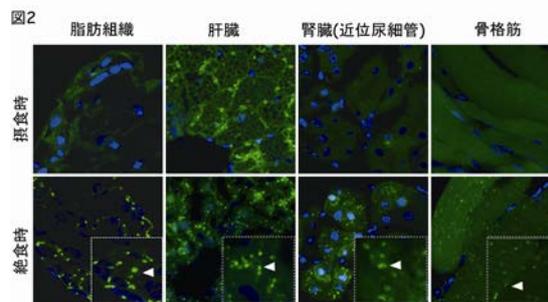


図2 GFP-LC3トランスジェニックマウスの摂食時、絶食時における代謝臓器でのオートファジー活性の検出。オートファジーの活性化はGFP-LC3蛋白の点状シグナルとして示されている。各臓器において絶食によりオートファジーの活性化が生じている(=)。

本研究は、飢餓における脂肪からの脂肪酸放出ならびに肝臓や腎臓に蓄積した脂肪酸が糖やケトンに変換される飢餓応答過程におけるオートファジーの役割の解明を目的としている。飢餓時代に進化させた脂肪蓄積という儉約的機能が、現在、過剰な脂肪蓄積の原因となり、肥満2型糖尿病を引き起こしていることが明らかであるように、生理的な飢餓応答の破綻は2型糖尿病の原因となる。本研究により、脂肪分解という飢餓応答におけるオートファジーの各臓器間ネットワークの役割を解明することは、2型糖尿病の新規分子基盤、治療標的の解明につながるものと考えている。

3. 研究の方法

オートファゴソーム形成に必要な Autophagy-related gene 5 (Atg5) 蛋白をコードする Atg5 遺伝子を肝臓、腎近位尿細管、骨格筋でそれぞれ特異的に欠損したマウス

を Cre-loxP システムを用いて作製し、これらを使用して以下の実験を行った。

① 肝オートファジーの糖新生・ケトン合成における役割の検討

肝臓特異的に Atg5 遺伝子を欠損したマウス (L-Atg5^{-/-}) と対照マウス (Atg5^{f/f}) を 36 時間絶食とし、12 時間毎に血糖値と血中ケトン濃度を測定した。また 36 時間絶食後のマウスの血液と組織サンプルを採取し、Western blot 法等により糖代謝や脂肪酸代謝の評価を行った。

② 骨格筋オートファジーの糖新生・ケトン合成における役割の検討

Atg5^{f/f}、L-Atg5^{-/-} と骨格筋特異的 Atg5 遺伝子欠損マウス (M-Atg5^{-/-})、さらに肝臓と骨格筋の双方で Atg5 遺伝子を欠損したダブルノックアウトマウス (LM-Atg5^{-/-}) を 36 時間絶食とし、12 時間毎に血糖値と血中ケトン濃度を測定した。

③ 腎オートファジーの糖新生・ケトン合成における役割の検討

Atg5^{f/f}、L-Atg5^{-/-} と腎近位尿細管特異的 Atg5 遺伝子欠損マウス (K-Atg5^{-/-})、さらに肝臓と腎近位尿細管の双方で Atg5 遺伝子を欠損したダブルノックアウトマウス (LK-Atg5^{-/-}) を 36 時間絶食とし、12 時間毎に血糖値と血中ケトン濃度を測定した。

④ 飢餓時の組織内脂肪滴形成におけるオートファジーの役割の検討

ミトコンドリア内の脂肪酸 β 酸化を阻害する L-Aminocarnitine (L-ACA) を投与したマウスと、Adipose differentiation-related protein (ADRP) ノックアウトマウスを 36 時間絶食として 12 時間毎に血糖値と血中ケトン濃度を測定するとともに、絶食後の組織サンプルを採取して Oil Red O 染色による脂肪滴の評価を行い、飢餓時のケトン合成と脂肪滴の関連を検討した。また、36 時間絶食後の Atg5^{f/f}、L-Atg5^{-/-}、K-Atg5^{-/-}、LK-Atg5^{-/-} マウスの組織サンプルを用いて飢餓時の脂肪滴形成におけるオートファジーの役割を組織学的に検討した。

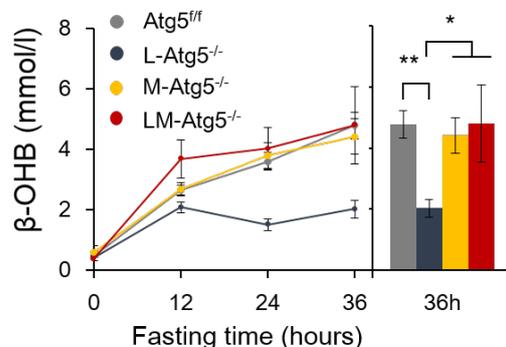
4. 研究成果

① 絶食期間中の体重と血糖値の変化には差がなかったが、血中ケトン濃度の上昇が対照マウスと比較して L-Atg5^{-/-} マウスで有意に抑制された。ただしこのケトン合成障害は部分的であった。自由摂食下での脂肪蓄積量や、絶食時の血清遊離脂肪酸には差がなく、ケトン合成の鍵酵素である Mitochondria-localized 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase 2 (HMGCS2) 蛋白は L-Atg5^{-/-} マウスの肝臓でも絶食下で十

分に発現上昇していることを Western blot 法により確認した。

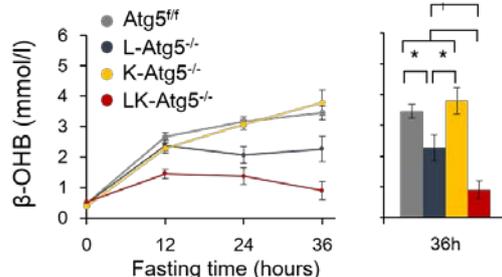
② Atg5^{f/f}、L-Atg5^{-/-}、M-Atg5^{-/-}、LM-Atg5^{-/-} マウスにおいて絶食期間中の血糖値には差がなかった。また L-Atg5^{-/-} マウスのケトン合成障害は LM-Atg5^{-/-} マウスでは回復した (図 3)。

図 3 MANOVA Pillai's trace, p=0.003

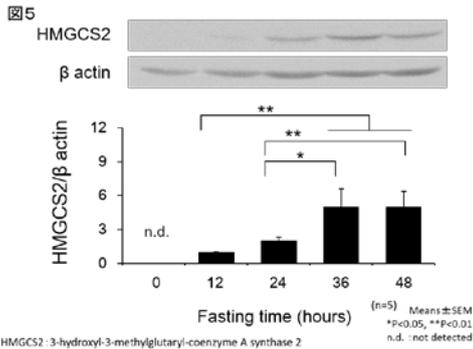


③ Atg5^{f/f}、L-Atg5^{-/-}、K-Atg5^{-/-}、LK-Atg5^{-/-} マウスで絶食期間中の血糖値には差がなかったが、LK-Atg5^{-/-} マウスでは L-Atg5^{-/-} マウスよりさらに著明に血中ケトン濃度の上昇が抑制された (図 4)。

図 4 MANOVA Pillai's trace, p<0.001



さらに、36 時間絶食後の LK-Atg5^{-/-} マウスではほかの 3 群と比較して身体活動性が低下していた。また絶食時間の延長に伴い、腎での HMGCS2 蛋白の発現は上昇した (図 5)。



HMGCS2: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase 2

④ 36時間絶食下のL-ACA投与マウスでは著明なケトン合成障害と大きな脂肪滴を認め(図6)、ADRPノックアウトマウスでは部分的なケトン合成障害と脂肪滴形成の抑制を認めた(図7)。Atg5f/f, L-Atg5^{-/-}, K-Atg5^{-/-}, LK-Atg5^{-/-}マウスで同様の実験を行った結果、オートファジー抑制臓器において脂肪滴形成の抑制を認めた(図8)。

図6

① 脂肪滴分解障害モデル

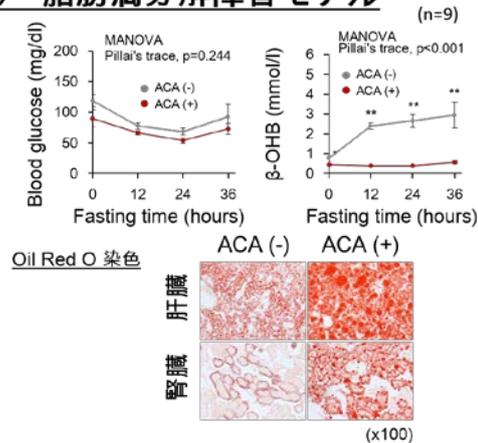


図7

② 脂肪滴形成障害モデル

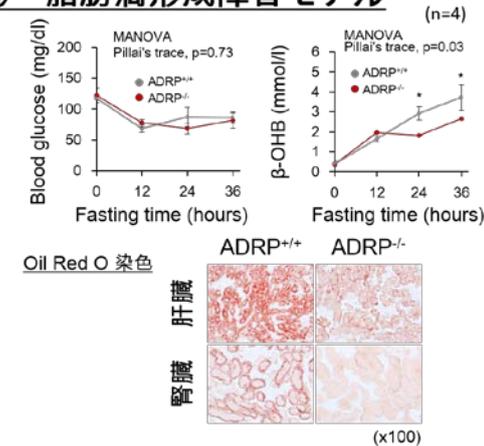
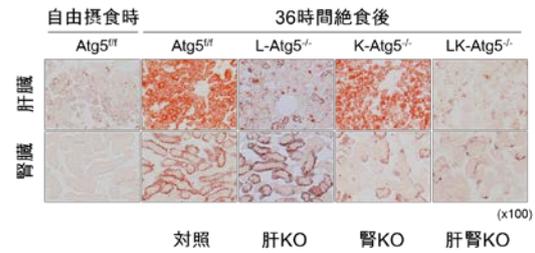


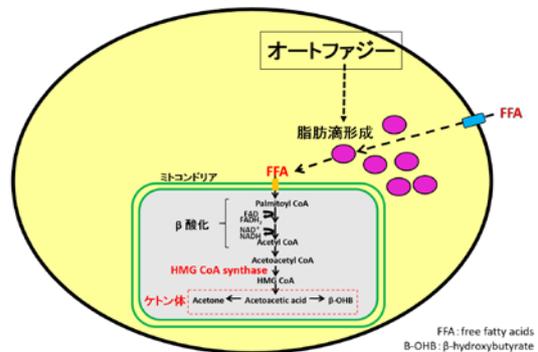
図8

オートファジー活性抑制臓器における脂肪滴形成障害



絶食期間を通していずれのマウス群でも血糖値の変化に有意差は認めなかったが、肝オートファジー抑制マウスでは部分的なケトン合成障害を、肝腎オートファジー抑制マウスでは更なるケトン合成障害を認めたことから、飢餓誘導性オートファジーは糖新生よりもケトン合成に不可欠であり、また肝臓だけでなく腎近位尿細管にも潜在的なケトン合成能が備わっていることが示唆された。肝筋オートファジー抑制マウスの絶食実験の結果から、骨格筋オートファジーは肝オートファジー抑制マウスで残存する血中ケトンの供給には関与しないと考えられるが、肝腎オートファジーとは異なる機構にてケトン合成に関わっている可能性は否定できず、今後さらなる検討を必要とする。最後に、オートファジー抑制臓器において脂肪滴形成が抑制されたことから、オートファジーは脂肪滴形成に関与して飢餓状態でのケトン合成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

飢餓誘導性オートファジーと脂肪滴の関係(仮説)



哺乳類の肝腎における飢餓誘導性オートファジーは、脂肪滴形成に関与してケトン合成に重要な役割を果たし、全身のエネルギー代謝維持に貢献している。

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 1 件)

- ① Ayano Takagi, Shinji Kume, Motoyuki Kondo, Jun Nakazawa, Masami Chin-Kanasaki, Hisazumi Araki, Shin-ichi Araki, Daisuke Koya, Masakazu Haneda, Tokuhiko Chano, Taiji Matsusaka, Kenji Nagao, Yusuke Adachi, Lawrence Chan, Hiroshi Maegawa, Takashi Uzu
Mammalian autophagy is essential for hepatic and renal ketogenesis during starvation.
Scientific Reports, 6 : 18944,
DOI: 10.1038 /srep18944 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Motoyuki Kondo, Ayano Takagi, Shinji Kume, Satoshi Ugi, Takashi Uzu, Hiroshi Maegawa
The role of starvation-induced autophagy in gluconeogenesis and ketogenesis
ADA 75th Scientific Session, Boston U. S. A,
2014 Jun. 5-9
- ② Motoyuki Kondo, Ayano Takagi, Shinji Kume, Takashi Uzu, Hiroshi Maegawa
The role of starvation-induced autophagy in gluconeogenesis and ketogenesis
EASD 50th Annual Meeting, Vienna Austria,
2015 Sep. 15-19

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 基之 (KONDO, motoyuki)
滋賀医科大学・医学部・客員助教
研究者番号 : 60569052