

Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	滋賀医科大学 内科学講座 糖尿病腎臓神経内科
氏 名	久米真司
研究テーマ	糖尿病性腎症の尿細管障害進展機構における尿細管細胞オートファジーの役割

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

<研究目的> オートファジーとは細胞内蛋白質やオルガネラに対する分解機構の一つである。細胞がアミノ酸飢餓や異常蛋白質・異常オルガネラの蓄積といったストレス状態に晒されると、分解標的分子が細胞内に形成されたオートファゴソーム内に集積し、その後リソソームに運搬され分解される。このようにオートファジーは下等生物において、飢餓時の細胞内栄養素リサイクル、ならびに異常蛋白・オルガネラの除去といった細胞内恒常性維持機構としての役割を担っている。近年、マウスを用いた検討で、哺乳類の各臓器におけるオートファジーの生理的役割が明らかにされつつあるが、オートファジーの糖尿病性腎症の発症進展における役割、さらには腎臓における飢餓誘導性オートファジーの生理的な役割は明らかとされていない。本研究では遺伝子改変マウスを用いた検討により腎症発症進展過程におけるオートファジーの役割、更には飢餓誘導性オートファジーの役割を検討した。

<糖尿病性腎症におけるオートファジーの役割>

- ①ヒト腎生検組織ならびに動物モデルを用いた検討において、糖尿病状態でネフローゼレベルの蛋白尿を呈する糸球体上皮細胞(ポドサイト)においてオートファジー不全が観察された。
- ②ポドサイト特異的オートファジー不全マウスに対し高脂肪食負荷にて肥満2型糖尿病を誘導したところ、顕著な蛋白尿の増加、ポドサイト機能不全、ポドサイト数の減少を認めた。
- ③ネフローゼレベルの蛋白尿を呈する糖尿病モデル動物のポドサイト、高脂肪食負荷肥満2型糖尿病ポドサイト特異的オートファジー欠損マウスのポドサイトには異常なリソソームの蓄積が生じており、糖尿病状態では、リソソーム障害が生じること、この異常リソソームの排除をオートファジーが担っていたことが示唆された。
- ④ネフローゼレベルの蛋白尿を呈するモデル動物ならびに糖尿病患者血清を培養ポドサイトに添加すると、オートファジー不全、異常リソソームの蓄積、細胞死が誘導され、糖尿病状態の血清内にオートファジー不全によるポドサイト障害を引き起こす液性因子が存在することが明らかとなった。

<哺乳類における飢餓誘導性オートファジーの役割の検討>

- ①絶食時の糖新生、ケトン産生に関わる臓器である肝臓、筋肉、腎臓近位尿細管細胞特異的なオートファジー欠損マウス、これらのうち2臓器でオートファジーを欠損するマウスを作製し、絶食試験を行った。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、肝臓オートファジー欠損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欠損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細胞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。肝臓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臓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た。
- ②オートファジー抑制臓器において飢餓誘導性の脂肪滴形成が障害されたことから、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。

<考察> 腎症増悪に関わるポドサイト障害において、オートファジーは腎保護的な役割を果たすことが明らかとなり、オートファジーの活性化を標的とした新規腎症治療の可能性が示された。また、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すことが明らかとなった。オートファジーが飢餓時のエネルギー代謝維持に必須である結果は、オートファジーならびに腎生理研究の発展に大きく寄与するものと考えられる。

Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	滋賀医科大学 内科学講座 糖尿病腎臓神経内科
氏 名	久米真司
研究テーマ	糖尿病性腎症の尿細管障害進展機構における尿細管細胞オートファジーの役割

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

<研究目的> オートファジーとは細胞内蛋白質やオルガネラに対する分解機構の一つである。細胞がアミノ酸飢餓や異常蛋白質・異常オルガネラの蓄積といったストレス状態に晒されると、分解標的分子が細胞内に形成されたオートファゴソーム内に集積し、その後リソソームに運搬され分解される。このようにオートファジーは下等生物において、飢餓時の細胞内栄養リサイクル、ならびに異常蛋白・オルガネラの除去といった細胞内恒常性維持機構としての役割を担っている。近年、マウスを用いた検討で、各臓器におけるオートファジーの生理的役割や、その異常と各種疾患発症との関わりが明らかにされつつあるが、オートファジーの糖尿病性腎症の発症進展における役割、さらには腎臓における飢餓誘導性オートファジー生理的な役割は明らかとされていない。本研究では遺伝子改変マウスを用いた検討により腎症発症進展過程におけるオートファジーの役割、更には飢餓誘導性オートファジーの役割を検討した。

<方法>**<糖尿病性腎症におけるオートファジーの役割>**

1) 腎組織を用いた蛋白尿の程度とポドサイト障害ならびにオートファジー活性との関連の検討:ヒト腎生検組織を用い、ポドシン染色によりポドサイト障害を、オートファジー不全マーカーである p62 免疫染色によりオートファジー活性を評価した。また、腎症モデル動物での蛋白尿の程度とポドサイト障害ならびにオートファジー活性との関連を検討した。軽度の蛋白尿モデルとして高脂肪食(HFD)負荷 2 型糖尿病モデルマウスと 32 週齢の自然発症糖尿病 OLETF ラットを用い、高度の蛋白尿モデルとして 50 週齢の OLETF を用い、腎組織にてポドサイト障害とオートファジー活性を評価した。

2) 糖尿病に伴うポドサイト障害におけるオートファジーの役割の検討を検討した。①動物モデル:オートファジーの活性化に必須の遺伝子の1つである Atg5 を Cre-LoxP システムを用いポドサイト特異的ノックアウト(KO)マウス(Podo-Atg5^{-/-}マウス)を作製した。このマウスに対し 32 週間の HFD 負荷により糖尿病を誘発し、尿蛋白定量と電子顕微鏡(電顕)・ポドシン染色・WT1 染色によるポドサイト障害を評価した。②細胞実験:オートファジーの活性化に必須の遺伝子の1つである Atg7 を同様に Cre-LoxP システムを用い Podo-Atg7^{-/-}マウスを作製した。このマウスと野生型マウスからそれぞれ単離したポドサイトに温度感受性不死化遺伝子を導入し培養ポドサイト(Atg7KO ポドサイト、Atg7WT ポドサイト)を作製し、HFD 負荷糖尿病マウスと非糖尿病マウスの血清を孵置し、Western blot にてオートファジー不全を p62 と LC3-II/LC3-I 比の低下で、細胞死を cleaved caspase-3 で評価した。

3) 高度蛋白尿を呈する糖尿病状態の血清にオートファジー活性を落とす因子が存在するか否かを検討した。糖尿病でオートファジー不全を呈する 50 週齢の OLETF ラットの血清を正常培養ポドサイトに孵置し Western blot にて p62 と LC3II/LC3I および cleaved caspase-3 を評価した。

4) 糖尿病状態にオートファジー不全が伴うとポドサイト障害を起こす機序について検討した。3)-①実験の HFD 負荷 Podo-Atg5^{-/-}マウスの透過型電顕所見よりリソソームの障害を疑い、Lamp2 染色によるリソソームの局在とユビキチン化蛋白の染色によるリソソームの機能障害を確認した。また 50 週齢の OLETF でも同様に確認した。腎症患者の蛋白尿病期によるオートファジー活性・リソソーム障害の検討:腎症患者の血清を病期別に正常培養ポドサイトに孵置し、Western blot にて p62 とユビキチン化蛋白を評価した。

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

<方法つづき>**哺乳類における飢餓誘導性オートファジーの役割の検討**

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) 肝臓オートファジーの糖新生・ケトン合成における役割を検討した。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を検討した。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) 腎臓オートファジーの糖新生・ケトン合成における役割を検討した。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を検討した。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。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。

【結果】**<糖尿病性腎症におけるオートファジーの役割>**

- 1) 軽度蛋白尿の腎症や他の腎炎症例の腎組織では、明らかなポドサイト障害やオートファジー活性の低下は認められなかったが、高度蛋白尿を呈する腎症症例では、ポドシンの発現量が低下し顆粒状パターンを呈するなどのポドサイト障害を認め、p62 が蓄積しておりオートファジー活性の低下が認められた。また動物実験においても、軽度の尿蛋白モデルでは、明らかなポドサイト障害やオートファジー活性の低下は認められなかったが、高度尿蛋白モデルでは、ヒトの結果と同様にオートファジー活性の低下を伴う顕著なポドサイト障害が認められた。
- 2) ① 対照マウスでは HFD 負荷による糖尿病状態で軽度の蛋白尿を呈するのみであったが、Podo-Atg5^{-/-} マウスでは、糖尿病状態においてのみ、ポドサイト数の減少、足突起の消失、ポドシン発現数の減少を伴う顕著な蛋白尿の増加が確認された。② Atg7KO ポドサイトでは p62 の蓄積と LC3-II/LC3-I 比の減少を認め、オートファジー不全が示された。また HFD 負荷糖尿病マウスの血清刺激は Atg7KO ポドサイトに対してのみ顕著な細胞死を誘導した。
- 3) OLETF50 週 of 血清で刺激した細胞では、p62 の蓄積と LC3-II/LC3-I の減少を認め、オートファジー不全が示された。そして、50 週齢の OLETF の血清刺激でのみ細胞死が増加した。
- 4) HFD 負荷 Podo-Atg5^{-/-} マウスのポドサイトでは Lamp2・ユビキチン化蛋白ともに増加しておりリソソームの障害が示唆された。50 週齢の OLETF でも同様の結果であった。更にヒト尿サンプルを用いた検討でも、高度蛋白尿を呈する腎症の血清孵置でのみ p62 とユビキチン化蛋白の増加をみとめオートファジー活性の低下とリソソーム障害が示唆された。

<結果つづき>**哺乳類における飢餓誘導性オートファジーの役割の検討**

- 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。
- 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。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。
- 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、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。Atg5^{f/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。

<考察>

- 1) ポドサイトにおけるオートファジー不全は、糖尿病性腎症における蛋白尿を増悪させることが明らかとなった。今回の研究より高度蛋白尿へ進行する原因の一つにオートファジー不全によるポドサイト障害が明らかとなり、その下流の機序としてリソソーム障害が考えられた。また糖尿病血清によりオートファジー不全が確認されたことより、糖尿病が持続することでオートファジー不全をきたすということも明らかとなった。この糖尿病血清中の何がオートファジー不全をもたらすのかを解明することが治療標的になると考えられる。
- 2) 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ことが明らかとなった。絶食期間を通じ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。

<本研究の意義>

これまでの腎領域の研究から、腎臓の体液恒常性維持機構における交感神経やレニンアンジオテンシン系の生理学的重要性が明らかとされた結果、体液恒常性維持の破綻に伴い生じる高血圧や腎疾患に対する治療法の開発が飛躍的に進み、腎疾患症例の腎予後は大幅に改善されることとなった。この事実は、体液の恒常性のみならず、種々の恒常性維持に関わる生理機能を正確に捉えていくことが、その破綻に伴い発症する疾患に対する治療法の開発に不可欠であること示している。本研究は、腎臓を全身のエネルギー代謝恒常性維持臓器の一つと捉え、「腎栄養代謝学」の全貌を明らかにすることで、腎内栄養応答機構に着目した新規腎臓病治療標的の解明を目指すという独創的な研究である。本研究成果が「腎栄養代謝学」の重要性を示す萌芽的研究となると共に、糖尿病を背景に、増加し続ける腎臓病患者の腎予後改善に貢献することを期待している。

Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

所 属	滋賀医科大学 内科学講座 糖尿病腎臓神経内科
氏 名	久米真司

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ・ 国内外雑誌を問わない。 ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	Yasuda-Yamahara M, <u>Kume S</u> , Tagawa A, Maegawa H, Uzu T. Emerging role of podocyte autophagy in the progression of diabetic nephropathy. Autophagy. (2015) in press. 査読あり (Corresponding author)
2	Tagawa A, Yasuda M, <u>Kume S</u> , Yamahara K, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki SI, Koya D, Asanuma K, Kim EH, Haneda M, Kajiwara N, Hayashi K, Ohashi H, Ugi S, Maegawa H, Uzu T. Impaired podocyte autophagy exacerbates proteinuria in diabetic nephropathy. Diabetes. (2015)
3	Role of nutrient-sensing signals in the pathogenesis of diabetic nephropathy. Kume S, Koya D, Uzu T, Maegawa H. Biomed Res Int. 2014;315494. (2014) 査読あり (Corresponding author)
② <論文 PDF 添付なし>	
1	Takagi A, Kume S, Kondo M, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki SI, Koya D, Haneda M, Chano T, Matsusaka T, Nagao K, Adachi Y, Chan L, Maegawa H, Uzu T. Mammalian autophagy is essential for hepatic and renal ketogenesis during starvation. Scientific Reports. (2015) in press. 査読あり (Corresponding author)
2	久米 真司:近位尿細管細胞障害の発症進展過程におけるオートファジーの役割; 腎と透析 76 巻 3号 Page417-421 (2014) 査読なし
3	久米真司:オートファジーと腎疾患; BIO Clinica 28 巻 7号 Page646-650 (2013)
	久米真司:腎疾患とオートファジー 糖尿病性腎症治療標的としての可能性; 医学のあゆみ 245 巻 4号 Page313-314 (2013)

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 国内外を問わない。 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2015 年 6 月	第 58 回日本腎臓学会学術総会・シンポジウム：久米 真司 糖尿病性腎症の新規治療標的の解明を目指して。
2	2014 年 10 月	第 35 回日本肥満学会・シンポジウム：久米 真司 肥満関連腎障害とオートファジー
3	2014 年 10 月	The 2014 International Conference on Diabetes and Metabolism (ICDM 2014). Kume S. Role of autophagy in the pathogenesis of diabetic nephropathy. (Korea Diabetes Association). Invited lecture.
4	2013 年 10 月	第 55 回西部腎臓学会学術総会・シンポジウム：久米真司 オートファジー機構の破綻と糖尿病性腎症との関わり
5		
3. 投稿、発表予定(投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2016 年 6 月	第 59 回日本腎臓学会学術総会・シンポジウム：久米 真司 「糖尿病と腎」新規治療法の可能性
2	2016 年 5 月	第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会・シンポジウム：久米真司 肥満・老化関連腎障害の発症機構ならびに新規治療標的の解明
3		
4		