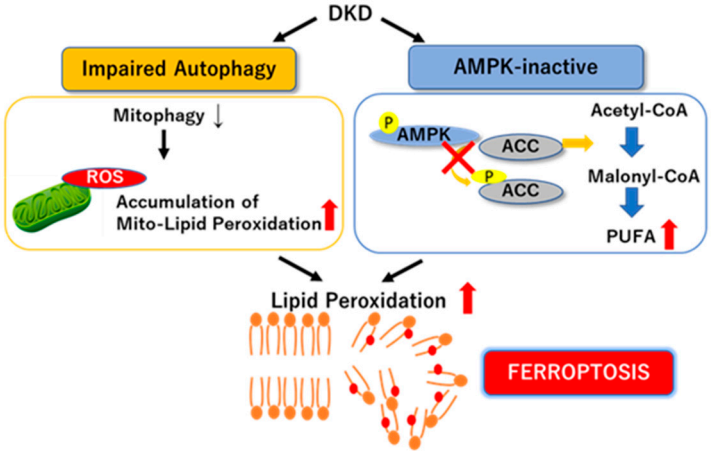
191　フェロトーシスに着目した糖尿病性腎臓病の病態解明	山本　毅士

【目的】1998 年以降、糖尿病性腎臓病（Diabetic Kidney Disease：DKD）は透析導入の原疾患第一位であり、RAS 阻害薬を中心とした多角的治療でも制圧できていない。近年、DKD においてオートファジー調節不全が病態に関与すること、多くの腎疾患の発症・進行に、新しい制御性細胞死であるフェロトーシスが関与することが判明しているが、それら病態をつなぐ機序の解明は行われていない。そこで本研究では、「高血糖やオートファジー不全状態は腎尿細管フェロトーシスを促進する」との仮説をたて、DKD におけるフェロトーシスの病的意義を検討し、フェロトーシスとオートファジーの相互関係の細胞生物学的基盤を明らかにし、さらに病態解明に基づきフェロトーシスを制御することによって腎保護実現に道筋をつけることを目的とした。

【方法】1 型 DKD の高血糖状態およびオートファジー不全がフェロトーシスに及ぼす影響を検討するために、STZ 誘発性 1 型糖尿病モデルオートファジー不全マウスと対照群に対して腎虚血再灌流傷害（IRI）を行った。フェロトーシス特異的抑制薬 Ferrostatin-1（Fer-1）を投与することで障害が軽減される程度をフェロトーシスによる障害と判断した。次に 2 型 DKD を用いた検討では、オートファジー活性化がフェロトーシスに及ぼす影響を検討するために、2 型糖尿病（DM）db/db マウスと対照群に対して IRI を行い、オートファジー活性化薬ラパマイシンの効果を評価した。さらに高血糖状態における AMPK や脂質代謝の異常がフェロトーシス亢進に関与しているかを検討するために、AMPK 活性化薬 AICAR を投与し IRI 時の腎障害を評価した。機序追究のため培養近位尿細管細胞（Atg5（−）・Atg5（+））を用いて低酸素再酸素化（H/R）によって引き起こされるフェロトーシスに対して高血糖およびオートファジー不全が与える影響を評価した。

【結果】非 DM 群と比較して STZ 群では、また野生型と比較してオートファジー不全群では腎障害が悪化しており、さらに STZ 群のオートファジー不全マウスは相乗的に腎障害の増悪を示しており、それらは Fer-1 投与で改善した。オートファジー不全を示唆する p62 凝集塊陽性近位尿細管で、フェロトーシスを示唆する 4HNE やフェロトーシス促進因子である ACSL4 が陽性であり、特にオートファジー不全尿細管でフェロトーシスが強く起こっていることがわかった。db/＋と比較して db/db マウスではフェロトーシスによる腎障害は悪化したが、ラパマイシン投与により Fer-1 と同程度に腎障害は改善した。非 DM 群では AICAR による腎障害抑制効果がみられなかった一方で、DKD 群では AICAR 投与による腎障害軽減を認めた。高血糖状態の Atg5（−）細胞は相乗的に細胞死増悪を示し Fer-1 投与で改善した。以上より、DKD におけるオートファジー不全と脂質代謝異常はフェロトーシス亢進を介して腎障害を悪化させることがわかった。今後、食事や運動、薬剤によるオートファジー調整、あるいは直接的なフェロトーシス抑制を介して、DKD 進行やストレス脆弱性への対策を確立できる可能性がある。

糖尿病性腎臓病におけるオートファジー不全と代謝異常はフェロトーシス亢進を介して腎障害を悪化させる



191. フェロトーシスに着目した糖尿病性腎臓病の病態解明

山本　毅士

大阪大学 医学部附属病院 血液浄化部

Key words：糖尿病性腎臓病，フェロトーシス，オートファジー，AMPK，脂質代謝

緒　言

1998 年以降、糖尿病性腎症（Diabetic Nephropathy：DN）は透析導入の原疾患第一位であり、RAS 阻害薬を中心とした多角的治療でもいまだ制圧できていない。近年、糸球体高血圧に伴い蛋白尿が出現したのちに腎機能が低下する古典的糖尿病性腎症に加え、蛋白尿は少量で腎機能が低下する非典型例が増加し、「糖尿病性腎臓病（Diabetic Kidney Disease：DKD）」という概念が登場している。DKD の病態形成には糸球体病変だけでなく尿細管・間質病変が大きく関与しており、その進行抑制のためには尿細管、特に近位尿細管細胞に焦点をあてた病態解明が重要である。

オートファジーはリソソームにおける細胞質成分分解の総称であり、我々は腎疾患におけるオートファジーの役割を研究し、DKD の病態形成にオートファジー不全が寄与することを報告してきた［1，2］。一方、近年、制御された細胞死（Regulated Cell Death：RCD）は apoptosis 以外に necroptosis、pyroptosis、autophagic cell death など様々な様式が存在することが明らかになっている。2012 年米国 Stockwell らは、がん細胞に細胞死を誘導する化合物のスクリーニングを端緒として新しい細胞死を報告した。鉄イオンのキレーターが阻害的に働くことから「Ferroptosis フェロトーシス」と命名され、過剰な過酸化脂質蓄積が重要であることが報告された［3］。2014 年腎虚血再灌流傷害（IRI）による急性腎障害（AKI）においてフェロトーシスが関与すること［4］、フェロトーシス抑制因子であるグルタチオンペルオキシダーゼ（GPx4）をノックアウトすると急性腎不全を発症することが報告され［5］、以降種々の AKI モデルにおけるフェロトーシスの重要性が相次いで報告され大きな注目を浴びている。がん細胞での研究報告を多く含んだフェロトーシスに関する総説では、一般的に「オートファジーはフェロトーシスを亢進させる」とされているが［6］、腎近位尿細管におけるオートファジーとフェロトーシスの関連はこれまで検証されていない。

そこで本研究では、「高血糖は腎尿細管フェロトーシスを促進する」との仮説をたて、DKD におけるフェロトーシスの病的意義を検討し、フェロトーシスとオートファジーの相互関係の細胞生物学的基盤を明らかにし、さらに病態解明に基づく治療応用によりフェロトーシスを制御することによって腎保護実現に道筋をつけることを目的とした。

方　法

1. 糖尿病モデルマウス、遺伝子改変（オートファジー不全）マウスを用いた *in vivo* フェロトーシス研究

我々は以前、高血糖下でのオートファジー活性の相違と病態への関与を検討するために、ストレプトゾトシン誘発性 1 型糖尿病モデル（STZ マウス）および自然発症肥満 2 型糖尿病モデル（db/db マウス）を用いた［2］。今回の *in vivo* 実験においても、C57BL/6 系統の近位尿細管特異的 *Atg5* ノックアウトマウス（KAP-Cre Atg5 flox マウス）とその対照となる野生型マウス、2 型糖尿病モデルとして C57BL/6 系統 db/db マウスとその対照として db/+マウスを使用した。STZ 誘発性 1 型糖尿病モデルを作製するために 8 週令で STZ を投与した。いずれも雄マウスのみを使用した。IRI は 12 週齢に対して片腎虚血 35 分を行い再灌流後 48 時間に解剖を行った。フェロトーシス抑制薬 Ferrostatin-1（Fer-1）（5 mg/kg）は IRI 30 分前と IRI 1 時間後に投与、オートファジー活性化薬ラパマイシン（0.4 mg/kg）は IRI 前 3 日間投与、AMPK 活性化薬 AICAR（500 mg/kg）は、IRI 前 7 日間投与した。腎組織評価（PAS 染色、TUNEL 染色、4HNE および F4/80 の免疫染色）で腎尿細管障害、細胞死、過酸化脂質蓄積、炎症の評価を行った。

2. 近位尿細管細胞を用いた *in vitro* フェロトーシス研究

当研究室にて樹立した *Atg5* 欠損近位尿細管細胞（Atg5（−）PTEC）と、Atg5（−）PTEC に Atg5 を reconstitution した Atg5（+）PTEC を使用し培養細胞による機序解明を行った。培養液として 5% FBS を含んだ low glucose（LG）DMEM と high glucose（HG）DMEM を使用した。低酸素再酸素化（H/R）負荷として、低酸素（5% CO_2、1% O_2、94% N_2）18 時間、再酸素（5% CO_2、21% O_2、74% N_2）6 時間の処置を行い、MTS assay により cell viability を評価した。

結果および考察

1. 糖尿病性腎臓病では高血糖とオートファジー不全が相乗的にフェロトーシスを亢進させる

1 型 DKD では高血糖・低インスリンによりオートファジー活性が平常時でも亢進しており、糖毒性に対し保護的に作用するが、オートファジー後期段階のリソソーム負担となりオートファジーが停滞する。一方、2 型 DKD は高インスリン血症-mTOR 異常亢進によりオートファジー誘導が強く抑制されている［2］。そこでまず、1 型 DKD の高血糖状態およびオートファジー不全がフェロトーシスに及ぼす影響を検討するために、STZ 誘発性 1 型糖尿病モデルオートファジー不全マウスと対照群に対して IRI を行った。フェロトーシス特異的抑制薬 Fer-1 を投与することで障害が軽減される程度をフェロトーシスによる障害と判断した。非 DM 群と比較して STZ 群では、また野生型と比較してオートファジー不全群では腎障害が悪化しており、さらに STZ 群のオートファジー不全マウスは相乗的に腎障害の増悪を示しており、それらは Fer-1 投与で改善した（図 1）。オートファジー不全マウスの障害尿細管を共焦点顕微鏡で観察すると、オートファジー不全を示唆する p62 凝集塊陽性近位尿細管で、フェロトーシスを示唆する 4HNE やフェロトーシス促進因子である ACSL4 が陽性であり、特にオートファジー不全尿細管でフェロトーシスが強く起こっていることがわかった（図 2）。

次に 2 型 DKD を用いた検討では、オートファジー活性化がフェロトーシスに及ぼす影響を検討するために、2 型糖尿病モデル db/db マウスと対照群に対して IRI を行い、オートファジー活性化薬ラパマイシン投与の効果を評価した。db/+と比較して db/db マウスではフェロトーシスによる腎障害は悪化したが、ラパマイシン投与により Fer-1 と同程度に腎障害は改善した（図 3）。以上より、病型に関わらず糖尿病性腎臓病では高血糖とオートファジー不全が相乗的にフェロトーシスを亢進させることがわかった。

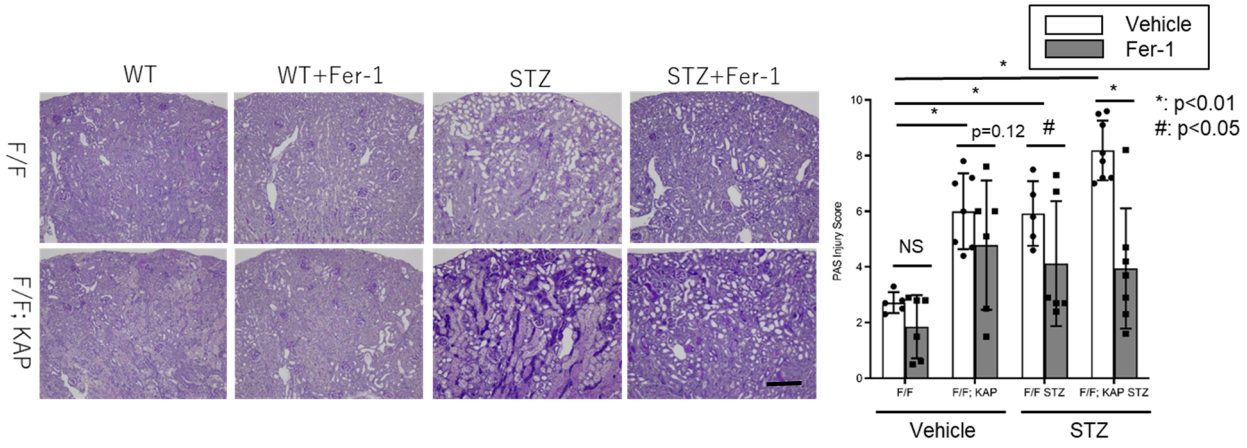


図 1. 高血糖とオートファジー不全は相乗的にフェロトーシスを亢進させる
IRI 2 日後の腎皮質の PAS 染色代表写真（Bar：100 μm）。と尿細管障害スコア *：p＜0.01、#：p＜0.05（Tukey 検定）。

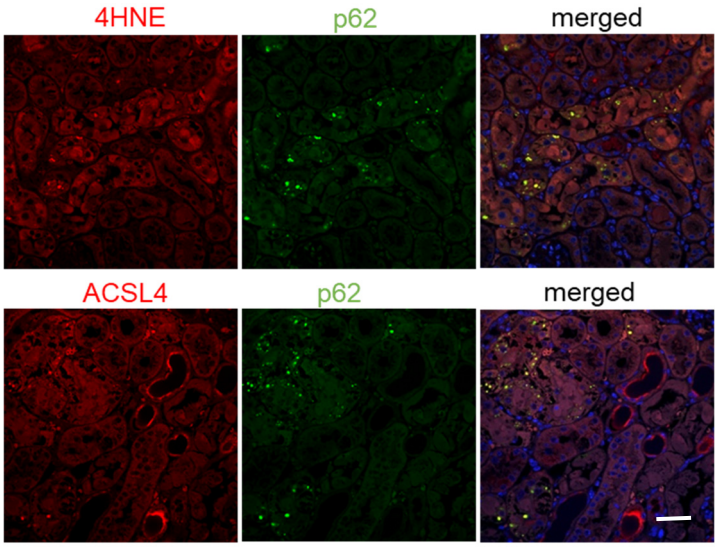


図 2. オートファジー不全近位尿細管ではフェロトーシスが生じやすい
オートファジー不全を示唆する p62 とフェロトーシスマーカーである 4HNE と ACSL4 をそれぞれ免疫染色した（Bar：50μm）。

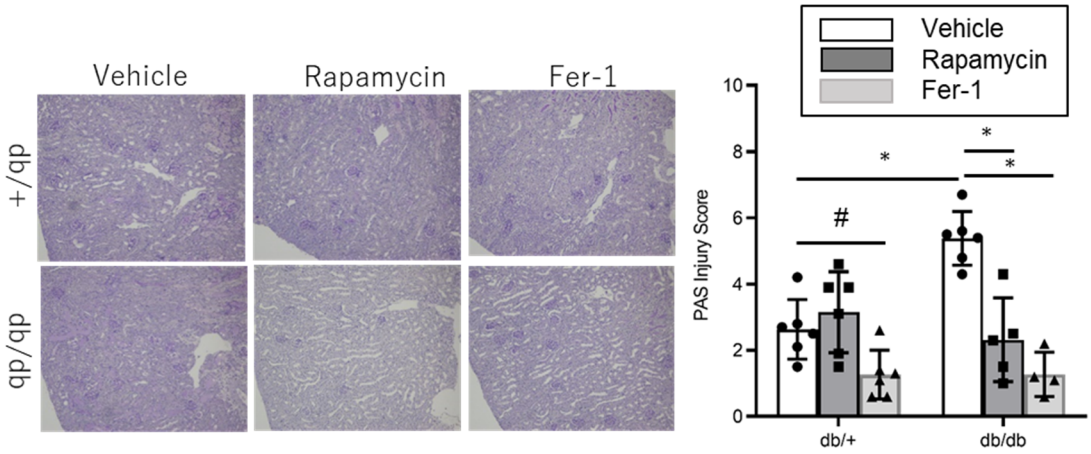


図 3. オートファジー活性化は、2 型 DKD におけるフェロトーシスを抑制する
db/db マウスに IRI を施すと db/+と比べフェロトーシスが増悪したがラパマイシンにより改善した。db/+、db/db マウスに vehicle、rapamycin もしくは Fer-1 投与群の IRI 2 日後の腎皮質 PAS 染色代表写真（Bar：100μm）と尿細管障害スコア *：p<0.01、#：p<0.05（Tukey 検定）。

2. 糖尿病性腎臓病では AMPK 活性低下と脂質代謝異常がフェロトーシスを亢進させる

最近 Stockwell らは、グルコース飢餓といったエネルギーストレスが AMPK を活性化させ脂質代謝を亢進させることで悪玉脂質を減少させフェロトーシスを抑制することを報告した［7］。一方、高血糖や高脂肪食により腎尿細管の AMPK 系が攪乱され DKD の病態形成に寄与することが判明している［1，2］。そこで今回、AMPK 系に着目してさらなる検討を行った。まず STZ 群では非 DM 群と比較して pAMPK/AMPK が低下していること、その下流にある脂質代謝が低下していることを確認した。DKD においてこれらの異常がフェロトーシス亢進に関与しているかを検討するために、AMPK 活性化薬 AICAR を投与し IRI 時の腎障害を評価した。非 DM 群では AICAR による腎障害抑制効果がみられなかった一方で、DKD 群ではいずれの病型も AICAR 投与による腎障害軽減を認めた（図 4）。以上より

DKD では pAMPK/AMPK 低下・脂質代謝異常が生じることでフェロトーシスが亢進しやすいことが示唆された。

腎保護効果が確立している SGLT2 阻害薬は、SIRT1 や AMPK 活性化を介し脂質代謝やオートファジー停滞を改善し腎保護に働く可能性があり、今後、上記のフェロトーシス評価法を応用し検証する予定である。

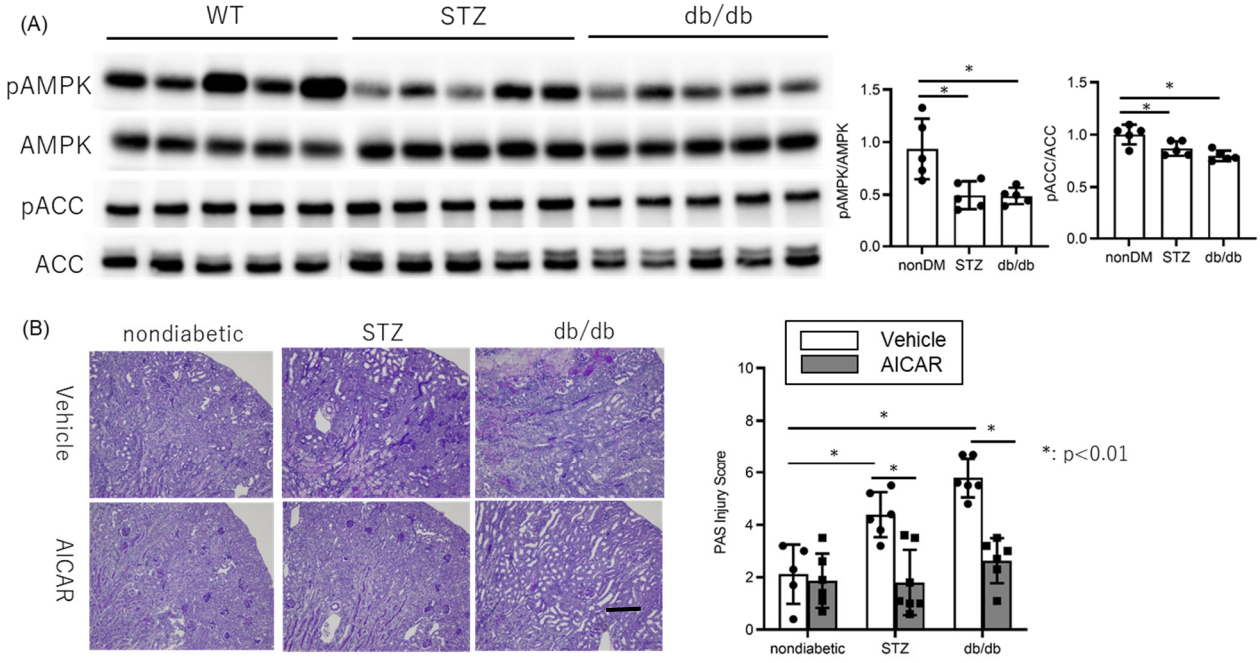


図 4. AMPK 活性化薬 AICAR は、DKD におけるフェロトーシスを軽減させる

DKD では AMPK と脂質代謝の異常を呈したが、AICAR 投与により腎障害は軽減した。

A) nonDM、STZ、db/db マウスの pAMPK、AMPK、pACC、ACC の WB 解析結果（n＝5）。

B) Vehicle、AICAR を投与した nonDM、STZ、db/db マウスの IRI 2 日後の腎皮質の PAS 染色。代表写真（Bar：100μm）と尿細管障害スコア*：p＜0.01（Tukey 検定）。

3. 傷害時の腎近位尿細管においてオートファジー不全がフェロトーシスを亢進させる機序の解明

「がん細胞ではオートファジーはフェロトーシスを促進する」との通説とは対照的に、DKD マウスモデルを用いた検討では「腎近位尿細管ではオートファジー不全がフェロトーシスを亢進させる」ことが明らかとなったため、その分子機構を追究することとした。培養近位尿細管細胞（Atg5（−）および Atg5（＋）PTEC）を用いて、低酸素再酸素化（H/R）によって引き起こされるフェロトーシスに対して高血糖およびオートファジー不全が与える影響（Cell viability、Lipid peroxidation assay）を評価した。LG と比較して HG では、また Atg5（＋）と比較して Atg5（−）では細胞死が増加しており、さらに HG 状態の Atg5（−）は相乗的に細胞死の増悪を示しており、それらは Fer-1 投与で改善した（図 5）。以上より、培養 PTEC でも高血糖とオートファジー不全が相乗的にフェロトーシスを亢進することがわかった。

今後、さらなる病態解明のため、高血糖状態がフェロトーシスを亢進する機序として、①エネルギーセンサー（AMPK および mTOR 経路）、②脂質合成（ACC、DGAT）・脂肪酸β酸化（CPT1、AOX、MCAD）の蛋白・mRNA 発現解析、③全脂質プロファイル解析に加え、④フェロトーシス制御因子（シスチントランスポーター、Gpx4 活性、鉄代謝）の評価を行う予定である。一方、オートファジー不全がフェロトーシスを亢進する機序として、「オートファジー（mitophagy）はミトコンドリア ROS を軽減することによってフェロトーシスを抑制する」との仮説を、Mito SOX Red 評価や mitoTEMPO を使用した ROS 軽減がフェロトーシスを軽減させる効果を検証予定である。

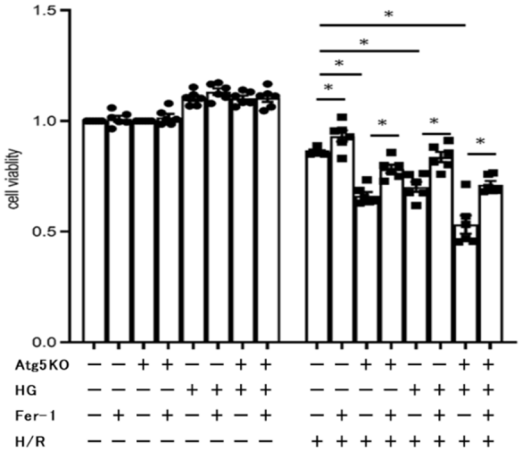


図 5. オートファジー不全がフェロトーシスを亢進させる機序の解明
Atg5（＋）、（－）細胞に対し HG 負荷±Fer-1 投与、低酸素再酸素化時の cell viablity。高血糖とオートファジー不全が相乗的にフェロトーシスを亢進させた。* : p＜0.01（Tukey 検定）。

本研究内容は、『糖尿病性腎臓病におけるオートファジー不全と脂質代謝異常はフェロトーシス亢進を介して腎障害を悪化させる』“Dysregulated autophagy and defective lipid metabolism exacerbate acute kidney injury by accelerating tubular ferroptosis in diabetic kidney disease.”として第 65 回日本腎臓学会学術総会で発表予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院腎臓内科学の松井翔先生（大学院生）、高畠義嗣講師、猪阪善隆教授である。この場を借りて深く感謝申し上げます。

文　献

1） Yamamoto T, Takabatake Y, Takahashi A, Kimura T, Namba T, Matsuda J, Minami S, Kaimori JY, Matsui I, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Isaka Y. High-Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to Lipotoxicity in the Kidney. J Am Soc Nephrol. 2017 May;28(5):1534-1551. doi: 10.1681/ASN.2016070731. Epub 2016 Dec 8. PMID: 27932476

2） Sakai S, Yamamoto T, Takabatake Y, Takahashi A, Namba-Hamano T, Minami S, Fujimura R, Yonishi H, Matsuda J, Hesaka A, Matsui I, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Isaka Y. Proximal Tubule Autophagy Differs in Type 1 and 2 Diabetes. J Am Soc Nephrol. 2019 Jun;30(6):929-945. doi: 10.1681/ASN.2018100983. Epub 2019 Apr 30. PMID: 31040190

3） Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B 3rd, Stockwell BR. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell 2012 May 25;149(5):1060-72. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042. PMID: 22632970

4) Linkermann A, Skouta R, Himmerkus N, Mulay SR, Dewitz C, De Zen F, Prokai A, Zuchtriegel G, Krombach F, Welz PS, Weinlich R, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Pasparakis M, Bleich M, Weinberg JM, Reichel CA, Bräsen JH, Kunzendorf U, Anders HJ, Stockwell BR, Green DR, Krautwald S. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Nov 25;111(47):16836-41. doi: 10.1073/pnas.1415518111. Epub 2014 Nov 10 PMID: 25385600

5) Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, Herbach N, Aichler M, Walch A, Eggenhofer E, Basavarajappa D, Rådmark O, Kobayashi S, Seibt T, Beck H, Neff F, Esposito I, Wanke R, Förster H, Yefremova O, Heinrichmeyer M, Bornkamm GW, Geissler EK, Thomas SB, Stockwell BR, O'Donnell VB, Kagan VE, Schick JA, Conrad M. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. Nat Cell Biol. 2014 Dec;16(12):1180-91. doi: 10.1038/ncb3064. Epub 2014 Nov 17. PMID: 25402683

6) Liu J, Kuang F, Kroemer G, Klionsky DJ, Kang R, Tang D. Autophagy-Dependent Ferroptosis: Machinery and Regulation. Cell Chem Biol. 2020;27(4):420-435. Cell Chem Biol. 2020 Apr 16;27(4):420-435. doi: 10.1016/j.chembiol.2020.02.005. Epub 2020 Mar 10. PMID: 32160513

7) Lee H, Zandkarimi F, Zhang Y, Meena JK, Kim J, Zhuang L, Tyagi S, Ma L, Westbrook TF, Steinberg GR, Nakada D, Stockwell BR, Gan B. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis. Nat Cell Biol. 2020 Feb;22(2):225-234. doi: 10.1038/s41556-020-0461-8. Epub 2020 Feb 6. PMID: 32029897