

慢性腎臓病の合併症と lipotoxicity

※



増田真志 Masashi MASUDA*

徳島大学大学院医歯薬学研究部
臨床食管理学分野助教

塩崎雄治 Yuji SHIOZAKI

徳島大学大学院医歯薬学研究部応用栄養学分野助教

竹谷 豊 Yutaka TAKETANI

徳島大学大学院医歯薬学研究部臨床食管理学分野教授

宮崎 淳 Makoto MIYAZAKI

University of Colorado Denver, Department of Medicine,
Division of Renal Diseases and Hypertension, Professor

1 はじめに

Lipotoxicity(脂肪毒性)は、非脂肪組織などにおける異所性の遊離脂肪酸等の蓄積が原因となって、細胞機能障害や細胞死が引き起こされる現象であり、糖尿病や動脈硬化症をはじめとする代謝性疾患の病態基盤として注目されている。我が国の慢性腎臓病(CKD)の患者数は推定1,300万人を超え、CKDは新たな国民病として認知されつつある。CKDの患者では、種々の要因で血清non-HDLコレステロール値(血清総コレステロール値から血清高密度リポタンパク質(HDL)値を引いたもの)の増加などの脂質代謝異常が起き、動脈硬化症の促進やCKDの更なる悪化を介して、高血圧、心不全、貧血、骨ミネラル代謝異常などの様々な合併症が出現するという悪循環を形成する。

リンは骨、ATP、核酸などの構成成分であることから生命活動を支える必須栄養素であり、生体内のリン恒常性は主に腎臓で制御されている。ところが、腎機能が低下しているCKDでは、生体内リン恒常性の破綻による高リン血症が動脈硬化症の原因となる血管石灰化を誘発するため、高リン血症はCKDの死亡率上昇に大きく寄与する。

本稿では、CKD時に多発する血管石灰化の発症機序として関わるlipotoxicityについて、著者らの研究結果を中心に概説する。

2 Lipotoxicityによる血管石灰化と小胞体ストレス

これまで、スタチン系薬剤(脂質異常症治療薬)に

よる血管石灰化の抑制や、酸化脂質オキシステロールによる血管石灰化の促進など、脂質と血管石灰化との関係が報告されている。¹⁻³⁾ また、肝臓の脂肪酸合成を抑制する胆汁酸核内受容体 farnesoid X receptor(FXR)の活性化は、リン負荷によって石灰化した血管細胞(calcifying vascular cells: CVCs)における脂質の蓄積やApoE欠損CKDモデルマウスにおいて発症する血管石灰化を抑制する。⁴⁾ 逆に、肝臓での脂質生合成を促進するオキシステロール核内受容体 liver X receptor(LXR)の活性化は、リン負荷によって石灰化した血管細胞において、パルミチン酸(16:0)やステアリン酸(18:0)などの飽和脂肪酸量を増加させるだけでなく、パルミトレイン酸(16:1)やオレイン酸(18:1)などの一価不飽和脂肪酸の量も増加させ、さらなる石灰化の亢進を引き起こす。しかしながら、リン負荷によって石灰化した血管細胞をステアリン酸で刺激すると石灰化が亢進するが、オレイン酸にはそのような効果は認められない(図1)。⁵⁾

異所性の過剰な脂質蓄積を起因とするlipotoxicityは、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、血管石灰化などの原因となるが、飽和脂肪酸と一価不飽和脂肪酸ではlipotoxicityに対する影響は異なる。一価不飽和脂肪酸とは異なり、飽和脂肪酸は、多くのほ乳類細胞株において小胞体ストレスやアポトーシスを誘導する。小胞体は脂質代謝だけでなく、合成されたタンパク質の折りたたみなどのタンパク質のプロセッシングにも関わる細胞内小器官である。細胞内外からの様々な刺激により小胞体内腔に折りたたみ不全タンパク質(unfolding protein)が蓄積すると、小胞体ストレスが引き起こされる。スト

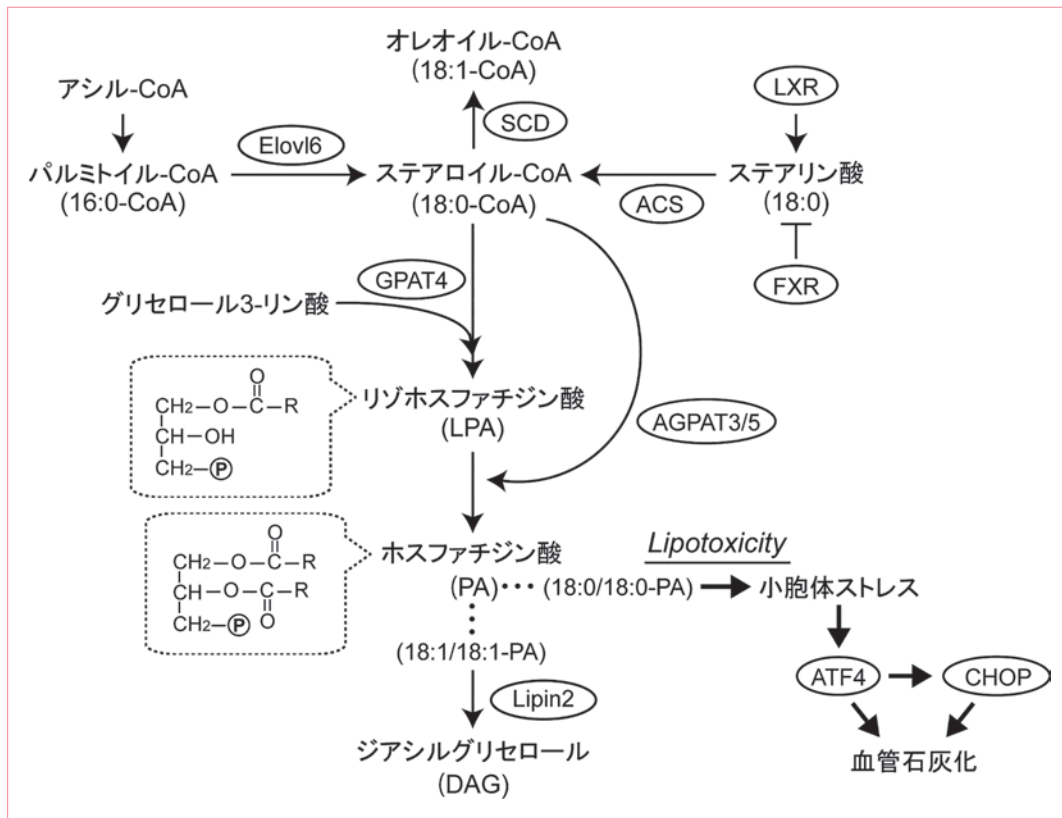


図1 ステアリン酸代謝を介した小胞体ストレスと血管石灰化

レスセンサーである PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) や, activating transcription factor 6 (ATF6), inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) が小胞体ストレスを感知すると, 細胞はただちにストレスを回避するために小胞体ストレス応答 (unfolding protein response: UPR) と呼ばれる防御システムを活性化させ, 小胞体に蓄積した異常タンパク質を排除する. ところが, 小胞体ストレスが過剰となって UPR では対応できなくなると, 細胞はアポトーシスを起こし, これが様々な疾患発症の原因となる.

3 飽和脂肪酸による小胞体ストレスを介する血管石灰化

マウス血管平滑筋細胞株 (MOVAS-1 cells) をステアリン酸で処理すると UPR 関連遺伝子の発現量が増加して石灰化が亢進すること, そして PERK 経路の下流に位置する activating transcription factor 4 (ATF4) 遺伝子をノックダウンするとこれらの反応が抑制されることから, ステアリン酸は小胞体スト

レスを介して MOVAS-1 cells を石灰化させることが分かった.⁶⁾ また MOVAS-1 cells において, ステアリン酸をステアロイル-CoA (18:0-CoA) に変換する反応を触媒するアシル-CoA 合成酵素 (ACS) を阻害すると, ステアリン酸による UPR 関連遺伝子発現量の増加は抑制される. 一方, ステアロイル-CoA からオレオイル-CoA (18:1-CoA) に変換するステアロイル-CoA 不飽和化酵素 (SCD) を阻害すると, UPR 関連遺伝子の発現量は増加する. つまり, MOVAS-1 cells において, ステアリン酸の代謝産物であるステアロイル-CoA が, 小胞体ストレスを介する石灰化を誘導することが分かった (図1).⁶⁾ また, 血管石灰化が認められる CKD 患者の血管において, SCD の mRNA 発現量やその活性は低下している.⁷⁾

MOVAS-1 cells において, SCD の阻害により生じるステアロイル-CoA の7割以上が, 脂肪酸転移反応を触媒するアシルトランスフェラーゼの基質としてアシル脂質部分に組み込まれる. そこで, MOVAS-1 cells のアシルトランスフェラーゼにつ

いて検討したところ、グリセロール 3-リン酸(G3P)とステアロイル-CoA からリゾホスファチジン酸(LPA)を合成する反応を触媒するグリセロール 3-リン酸アシルトランスフェラーゼ(glycerol-3-phosphate acyltransferase 4: GPAT4), そしてステアロイル-CoA と LPA からホスファチジン酸(PA)を合成する反応を触媒する 1-アシルグリセロール 3-リン酸アシルトランスフェラーゼ(1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase: AGPAT)3や AGPAT5が, ステアリン酸により誘発される小胞体ストレスや石灰化に関与していることが分かった.⁷⁾ 一方 MOVAS-1 cells において, PA をジアシルグリセロール(DAG)に変換する酵素(PA phosphatase: PAP)活性を有する *Lipin2* 遺伝子をノックダウンすると, ステアリン酸により誘導される小胞体ストレスや石灰化が亢進する. また, MOVAS-1 cells の SCD を阻害すると, 細胞内のアシル脂質の割合が変化し, グリセロール 3-リン酸にステアリン酸が2つエステル結合したホスファチジン酸(18:0/18:0-PA)の量が劇的に増加する. 興味深いことに, MOVAS-1 cells の SCD 阻害で誘導される小胞体ストレス, 石灰化, および 18:0/18:0-PA の蓄積は, オレイン酸との共処理により抑制される. さらに, PAP の基質としてはグリセロール 3-リン酸にオレイン酸が2つエステル結合したホスファチジン酸(18:1/18:1-PA)よりも 18:0/18:0-PA の方が不利であることから, ジアシルグリセロールに変換されずに過剰に蓄積した 18:0/18:0-PA による小胞体ストレスの誘導が, 血管石灰化に寄与することが考えられる(図1).⁷⁾

4 飽和脂肪酸による小胞体ストレスへの CDK9/Cyclin T1 の寄与

PERK 経路の下流に位置する ATF4 は, 転写因子 C/EBP β とヘテロ二量体を形成し, III 型 Na 依存性リン酸輸送担体 PiT1/2 の発現量を上昇させる. その結果, 血管平滑筋細胞内へのリン酸の取り込みが増加し, 血管石灰化が誘導される.⁸⁾ 実際に, *ApoE* 欠損 CKD モデルマウスで認められる血管石灰化は, 血管平滑筋特異的に *ATF4* 遺伝子をノックアウトすると消失する. 一方, 血管平滑筋特

異的に *ATF4* 遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは, 血管石灰化が生じる.⁸⁾ また, リン酸化された ATF4 の標的遺伝子である C/EBP-homologous protein(CHOP)の活性化も CKD モデルマウスにおける血管石灰化の原因となる. *ApoE* 欠損 CKD モデルマウスで認められる血管石灰化は *CHOP* 遺伝子をノックアウトすると消失するが, 血管平滑筋特異的に *CHOP* 遺伝子を過剰発現させた CKD モデルマウスにおいては, 血管石灰化は亢進する.^{3,10)} 既に述べたように, ステアリン酸は UPR 関連遺伝子ならびに CHOP の発現量を増加させる.^{6,7)} MOVAS-1 cells において, このステアリン酸により誘発される CHOP の発現量増加には, cyclin-dependent kinase 9(CDK9) が寄与しており, CDK9 阻害薬である flavopiridol は, MOVAS-1 cells や CKD モデルマウスの血管平滑筋細胞において, CHOP の発現量増加や石灰化を抑制する.¹⁰⁾ CDK9 は, RNA polymerase-II のリン酸化を介して広く転写活性を制御しており, 多様な生理的役割を持つが, それには CDK9 が Cyclin T1, Cyclin T2

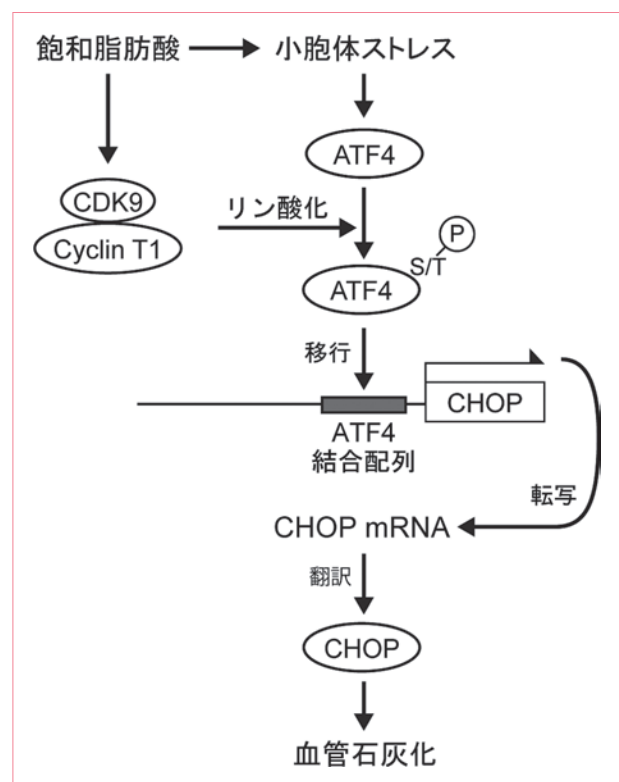


図2 Lipotoxicity における CDK9 依存的 ATF4 リン酸化と血管石灰化

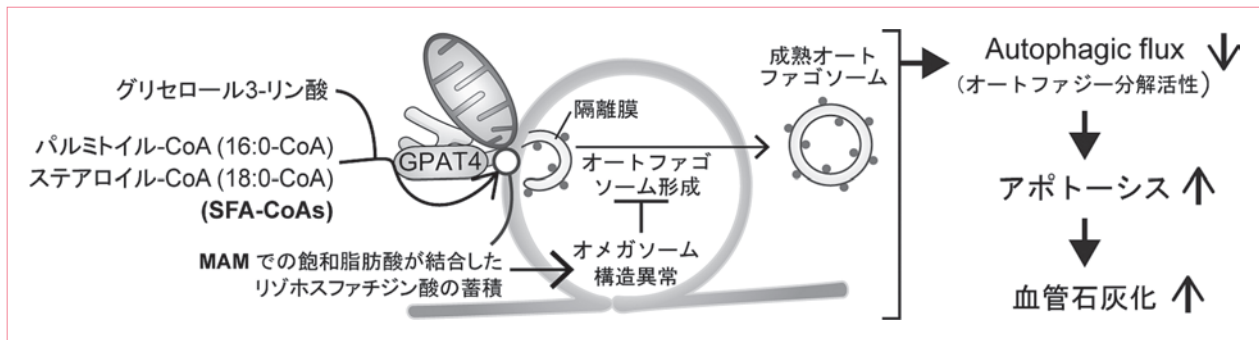


図3 飽和脂肪酸によるオートファジー阻害機序と血管石灰化

または Cyclin K と形成する複合体が大きな意味を持つ。¹¹⁾ Cyclin 遺伝子をノックアウトした MOVAS-1 cells を解析したところ、ステアリン酸により誘導される CHOP の発現や石灰化には Cyclin T1 が関与することが、また *in vitro* kinase assay により CDK9/Cyclin T1 が ATF4 を直接リン酸化することが明らかになった。さらに、CDK9/Cyclin T1 によりリン酸化されるアミノ酸をアラニンに置換した ATF4 のリン酸化欠失変異体を発現させると、CHOP 遺伝子の転写活性が低下したことから、飽和脂肪酸による血管石灰化には CDK9/Cyclin T1 による ATF4 のリン酸化が重要だと考えられる (図2)。¹⁰⁾

5 飽和脂肪酸によるオートファジー阻害と血管石灰化

オートファジーとは、飢餓刺激やストレス負荷に応答してタンパク質や細胞内小器官などの基質を二重の脂質二重膜で囲まれたオートファゴソーム内に隔離し、リソソームへ輸送して分解する機構である。リン負荷による血管石灰化に対してオートファジーは抑制的に働くが、¹²⁾ 飽和脂肪酸がオートファジーに与える影響やその機序に関しては研究報告ごとに異なっており、議論が分かれている領域である。著者らの解析では、培養血管平滑筋細胞へのステアリン酸処理は、オートファジー活性を抑制すると結論している (図3)。¹³⁾ MOVAS-1 cells にステアリン酸を処理したところ、リソソーム内でのオートファゴソームマーカーである light chain 3(LC3) の分解やオートファゴソーム-リソソーム間の膜融合には影響せず、オートファゴソーム形成に働く

「オメガソーム」の構造異常を誘導する。さらに、ステアリン酸処理によってオートファゴソーム形成の早期マーカーである ATG16L1 が細胞内に蓄積することから、ステアリン酸がオートファゴソームの成熟を障害する可能性が示唆される。オメガソームはホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) によるホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P) 産生量に依存して形成されるが、MOVAS-1 cells にステアリン酸を処理しても細胞内の PI3P 量は変化しない。

MOVAS-1 cells において、ステアリン酸をステアロイル-CoA に変換する反応を触媒する ACS を阻害すると、ステアリン酸処理によるオートファジー活性の抑制が減弱する。さらに、MOVAS-1 cells を用いてアシルトランスフェラーゼノックダウンスクリーニングを行った結果、LPA を産生する GPAT4 がステアリン酸によるオートファジー阻害に関与することが分かった。MOVAS-1 cells をステアリン酸で処理すると、オメガソームが形成されるミトコンドリアと小胞体が接着する膜構造 (mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes: MAM) 画分において、グリセロール3-リン酸にステアリン酸が1つエステル結合したリゾホスファチジン酸 (18:0-LPA) の量が劇的に増加し、細胞内に伸長したオメガソームが出現してくる。また GPAT4 は、ミクロソーム画分以外に MAM 画分にも局在しており、ステアリン酸添加により蓄積する異常なオメガソーム構造やオートファゴソームは、GPAT4 やミトコンドリアに近接している。血管平滑筋特異的に *Scd1*, *Scd2* および *Gpat4* をノックアウトしたマウスでは、血管平滑筋

特異的に *Scd1* と *Scd2* をノックアウトしたマウスの血管平滑筋細胞において認められるグリセロール3-リン酸にパルミチン酸が1つエステル結合したりゾホスファチジン酸(16:0-LPA)や18:0-LPAの蓄積, オートファジー基質である p62/Sequestosome-1 の増加, アポトーシス細胞の増加, および血管石灰化などが全て抑制される。つまり, 過剰な飽和脂肪酸の存在下において, GPAT4 は16:0-LPA および18:0-LPA の産生によるオートファジーの阻害を介して血管石灰化を誘導するのではないかと考えられる(図3)。¹³⁾

6 飽和脂肪酸による小胞体ストレスを介する筋萎縮

CKD 患者では, 骨格筋の萎縮もしばしば認められ, この筋萎縮はCKDの進展や死亡率上昇に関わる。CKD 患者において認められる筋萎縮は, 主にユビキチン・プロテアソーム系や caspase-3 によるタンパク質分解が原因で引き起こされる。しかし最近の研究報告では, 筋萎縮が認められる様々な疾患モデル動物の骨格筋においてUPRが活性化しており, 人工透析患者の骨格筋においてもUPR関連遺伝子発現が上昇している。また, 筋萎縮が起きているCKDモデルラットの腓腹筋では, *SCD* mRNA の発現量が減少していた。¹⁴⁾ さらに, マウス骨格筋由来筋芽細胞株(C2C12 cells)を用いた実験において, *SCD* の阻害によって薄くなった筋線維の厚さやユビキチン・プロテアソーム系に関係する遺伝子の発現変化は, オレイン酸や小胞体ストレスを抑制する薬物を共処理することによって改善する。

以上より, CKD 患者において認められる筋萎縮にも, 骨格筋内における *SCD* 活性の低下を起因とする過剰な小胞体ストレスが寄与している可能性が示唆される。¹⁴⁾

7 おわりに

生体内には10万分子種を超える様々な脂質が存在するが, それらは脂質代謝酵素によってその多様性と量が厳密に制御されることによって, エネルギー源としての役割だけでなく, 生理活性物質やその前駆体として働くなど, 多彩な役割を担っている。ところが, 何らかの理由でそのバランスが破綻すると, 一例として本稿で概説したように, lipotoxicity による血管平滑筋細胞の石灰化や, 骨格筋における筋萎縮が発症する。今後, さらに脂質代謝に関する研究が発展し, 組織あるいは細胞特異的に各脂質代謝酵素の制御を可能にする生体内システムの探索やその制御機構の構築が進めば, lipotoxicity が原因となる様々な疾患の治療法の開発につながることを期待される。

参考文献

- 1) Callister T. Q. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 339, 1972-1978(1998).
- 2) Achenbach S. *et al.*, *Circulation*, 106, 1077-1082(2002).
- 3) Miyazaki-Anzai S. *et al.*, *J. Am. Heart Assoc.*, 3, e000949(2014).
- 4) Miyazaki-Anzai S. *et al.*, *Circ. Res.*, 106, 1807-1817(2010).
- 5) Ting T. C. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 286, 23938-23949(2011).
- 6) Masuda M. *et al.*, *J. Lipid Res.*, 53, 1543-1552(2012).
- 7) Masuda M. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 125, 4544-4558(2015).
- 8) Masuda M. *et al.*, *JCI Insight*, 18, e88646(2016).
- 9) Masuda M. *et al.*, *J. Am. Heart Assoc.*, 2, e000238(2013).
- 10) Shiozaki Y. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 293, 17008-17020(2018).
- 11) Boffo S. *et al.*, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 37, 36(2018).
- 12) Dai X. Y. *et al.*, *Kidney Int.*, 83, 1042-1051(2013).
- 13) Shiozaki Y. *et al.*, *iScience*, 23, 101105(2020).
- 14) Niida Y. *et al.*, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 67, 179-187(2020).

キーワード

飽和脂肪酸, 小胞体ストレス, オートファジー, lipotoxicity, 慢性腎臓病

Copyright © 2022 The Pharmaceutical Society of Japan