

氏 名	高木 彩乃
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博士 甲第747号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成28年 3月 10日
学位論文題目	Mammalian autophagy is essential for hepatic and renal ketogenesis during starvation (哺乳類においてオートファジーは飢餓状態での肝腎ケトン合成に重要な役割を果たす)
審査委員	主査 教授 安藤 朗 副査 教授 等 誠司 副査 教授 伊藤 俊之

論文内容要旨

*整理番号	754	氏名	高木 彩乃
学位論文題目	Mammalian autophagy is essential for hepatic and renal ketogenesis during starvation 哺乳類においてオートファジーは飢餓状態での肝腎ケトン合成に重要な役割を果たす。		
<p>【目的】生物は飢餓という生命の危機に対して、全身のエネルギー代謝を維持するための様々なシステムを発達させた。細胞内恒常性維持を担うオートファジーもそのひとつと考えられ、飢餓によりオートファジーが強く誘導されることや、酵母等の原始生物でオートファジーを抑制すると飢餓状態での生命維持が不可能になることが報告されている。哺乳類でも同様に飢餓誘導性オートファジーが確認されているが、その生理学的役割については詳細の解明が期待されている分野である。本研究では飢餓時の糖新生やケトン合成において重要な役割を果たす肝臓、腎近位尿細管、骨格筋において特異的にオートファジー活性が抑制されるマウスを使用して、肝臓、腎近位尿細管、骨格筋のオートファジーが飢餓時の糖新生とケトン合成において果たす生理学的役割について検討した。</p> <p>【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 <i>Atg5</i> 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。</p> <p>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の検討 肝臓特異的に <i>Atg5</i> 遺伝子を欠損したマウス (L-<i>Atg5</i>^{-/-}) と対照マウス (<i>Atg5</i>^{fl/fl}) 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。</p> <p>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 <i>Atg5</i>^{fl/fl}, L-<i>Atg5</i>^{-/-} と骨格筋特異的 <i>Atg5</i> 遺伝子欠損マウス (M-<i>Atg5</i>^{-/-})、さらに肝臓と骨格筋の双方で <i>Atg5</i> 遺伝子を欠損したダブルノックアウトマウス (LM-<i>Atg5</i>^{-/-}) 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。</p> <p>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の検討 <i>Atg5</i>^{fl/fl}, L-<i>Atg5</i>^{-/-} と腎近位尿細管特異的 <i>Atg5</i> 遺伝子欠損マウス (K-<i>Atg5</i>^{-/-})、さらに肝臓と腎近位尿細管の双方で <i>Atg5</i> 遺伝子を欠損したダブルノックアウトマウス (LK-<i>Atg5</i>^{-/-}) 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。</p> <p>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、</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

36 時間絶食後の Atg5^{fl/fl}, 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】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。

②Atg5^{fl/fl}, 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。

③Atg5^{fl/fl}, 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。

④36 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^{fl/fl}, 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】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。

【結論】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。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	754	氏名	高木 彩乃
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>生体は飢餓状態におけるエネルギー代謝維持機構としてオートファジーを利用している。哺乳類でも飢餓状態でオートファジーが誘導されるが、その生理的意義は明らかになっていない。本研究は、飢餓状態での糖新生、ケトン合成におけるオートファジーの生理的意義について、肝臓、腎近位尿細管、骨格筋の各臓器特異的に autophagy-related gene 5(ATG5) 蛋白を欠損する遺伝子改変マウスを用いて、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 飢餓状態の糖新生に対して、肝臓、近位尿細管、骨格筋に誘導されるオートファジーは関与しないこと。 2) 飢餓状態で肝臓に誘導されるオートファジーは、ケトン合成に関与していること。 3) 飢餓状態で腎近位尿細管に誘導されるオートファジーは、ケトン合成に関与していること。 4) 飢餓状態で骨格筋に誘導されるオートファジーは、ケトン合成に関与しないこと。 5) オートファジーは臓器における脂肪滴形成に関与していること。 <p>本論文は、飢餓状態で誘導されるオートファジーの生理的意義について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 477 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成28年1月25日)</p>			