

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08608

研究課題名（和文）ミトコンドリアダイナミクスにおけるバスピンの意義と腎尿細管間質障害の制御

研究課題名（英文）Vaspin inhibits tubulointerstitial injury via maintaining mitochondrial homeostasis

研究代表者

中司 敦子（Nakatsuka, Atsuko）

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：00625949

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：尿細管間質障害は腎機能低下の大きなリスクである。尿細管細胞は多機能細胞のためエネルギー需要が高く、ミトコンドリアが体内でも豊富な細胞であり、ミトコンドリア機能を維持することが重要である。本研究では脂肪細胞から分泌されるバスピが、血流を介して腎臓に到達し、HSPA1Lを介してミトコンドリアの機能を保ち、糖尿病腎症における尿細管間質障害を軽減することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バスピンのミトコンドリア恒常性維持における意義を解明することは、今後、腎臓以外にも、心臓や褐色脂肪など、ミトコンドリアが豊富な臓器や細胞に関する病態の解明や、疾患治療への応用が可能と考えられる。また、これまで十分機能が解明されていないHSPA1Lの機能を明らかにすることは、学術的な今後の研究の広がりにつながる。

研究成果の概要（英文）：Tubular interstitial injury is a major risk for renal dysfunction. Tubular cells have high energy demands due to their multifunctional cellularity, and mitochondria are among the most abundant cells, so it is important to maintain mitochondrial function. In this study, we show that Vaspin, secreted by adipocytes, reaches the kidney via the blood and maintains mitochondrial function via HSPA1L, reducing tubulointerstitial damage in diabetic nephropathy.

研究分野：糖尿病・代謝学、腎臓病学

キーワード：アディポカイン Vaspin ミトコンドリア 糖尿病腎症 尿細管間質障害

## 1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病や加齢・動脈硬化を背景とした慢性腎臓病が増加しているが、SGLT2 阻害薬や GLP-1 受容体作動薬により腎予後の改善が以前よりも期待できるようになったものの、解決していないリスクや課題も残存している。尿細管間質障害は非常に強い腎予後決定因子であることから、尿細管間質障害の病態解明が重要と考え、近位尿細管細胞に注目して研究を開始した。近位尿細管細胞は、物質の再吸収・分解や輸送・再分泌、また電解質・水分調節、さらに糖新生も担う多機能性のため、基底状態でエネルギー必要量が高い。さらに糖尿病や肥満では、細胞内小器官(オルガネラ)の負荷・ストレスが増加し、適応応答としてオルガネラ機能が亢進する(代償期)。しかし、ストレスが遷延しかつ過度の場合は応答不全・オルガネラ機能不全を来し、細胞死に繋がる(非代償期)、線維化の進行を来し腎機能低下に至る。

我々はアディポカインであるバスピンを同定し(PNAS, 2005)、これまでにバスピンは肥満やインスリン抵抗性、脂肪肝や動脈硬化を抑制することを示し、その分子機構を解明して報告した(Diabetes, 2012) (Circ Res, 2013)。次に、バスピンは肥満・糖尿病における近位尿細管細胞の小胞体ストレスを軽減し、オートファジー不全を改善することを見出し機序を解明した(Commun Biol, 2021)。しかしミトコンドリアに対するバスピンの作用は未解明であり、本研究課題を立案した。

## 2. 研究の目的

バスピ欠損マウス(vaspin<sup>-/-</sup>)をストレプトゾトシン(STZ)で誘発し糖尿病モデルにすると、尿細管に多重リング状のミトコンドリアが観察された。野生型における出現頻度に比べて、vaspin<sup>-/-</sup>では5匹中2匹で観察され、バスピンのミトコンドリア恒常性維持における重要性が示唆された。多重リング状のミトコンドリアが出現する病態・機序、意義とは?、さらにバスピがどのようにミトコンドリアの形態や機能を制御しているのか?という課題が生じた。さらに、バスピが近位尿細管細胞において HSPA1L と結合して作用することを見出したが、HSPA1L はこれまで機能や病態意義が十分解明されていない分子である。これらのことから、『ミトコンドリアダイナミクスにおける HSPA1L の役割とバスピのかかわり』、また『近位尿細管細胞に特徴的な HSPA1L の機能』の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) 多重リング状のミトコンドリアについて、「Advanced Bioimaging Support 先端バイオイメージング支援プラットフォーム」の支援を頂き、ミトコンドリアの3次元構造について電子顕微鏡を用いた検討を行った。
- (2) STZ で糖尿病を誘発した vaspin<sup>-/-</sup>マウス、野生型、バスピトランスジェニック(Tg)マウスの腎皮質から蛋白を抽出し、mitofusin(Mfn)1,2、Optic atrophy 1 (Opa1)、dynamamin-related protein 1 (Drp1) などミトコンドリア fission, fusion に関わる分子の発現を検討した。また p62, parkin などマイトファジーに関係する分子についても検討し

た。

- (3) 多重リング状ミトコンドリアは高脂肪食マウスでは認められず、STZ 誘発糖尿病マウスで観察されることから、高度の高血糖や酸化ストレス、高度蛋白尿が誘因であると考えた。培養近位尿細管細胞 (HK2 細胞) を用いて、高糖濃度培養、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加、アルブミン(BSA)添加、HSPA1L 過剰発現などを行い、ミトコンドリア蛍光プローブ mitotracker Red によりミトコンドリア形態を評価した。また、ウエスタンブロットにより p62 などオートファジー関連分子や、前述のミトコンドリア分裂・融合に関わる分子の発現を検討し、さらにバスピン添加による変化を検討した。
- (4) 脱共役剤 CCCP を HK2 細胞に添加してマイトファジーを誘導し、ミトコンドリア分裂・融合やマイトファジーに関連する分子の発現、またバスピン添加による変化を検討した。また、CCCP によるミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup>取り込み低下をバスピンが回復させるか、JC-1 mitochondrial membrane potential assay kit を用いて検討した。
- (5) 尿細管細胞における HSPA1L の役割について、複合体形成分子を同定し検討した。
  - a. HSPA1L とクラスリン重鎖 (CHC) の複合体については、バスピンの取り込みに寄与すると想定し、HSPA1L や CHC を過剰発現させた細胞にバスピンを添加し、細胞内へのバスピン取り込みを検討した。
  - b. HSPA1L と lamnp2 の複合体形成に関しては、シャペロン介在オートファジーに寄与すると想定し、バスピンの作用も併せて検討した。
  - c. ミトコンドリア機能に関して既報では Parkin と HSPA1L の結合が報告されている。Vaspin が HSPA1L-Parkin を介してマイトファジーを促進するか、免疫沈降・ウエスタンブロットで検討した。
- (6) 間質線維化における HSPA1L の意義について、バスピンの役割とともに検討した。
  - a. STZ で糖尿病を誘発した vaspin<sup>-/-</sup>マウス、野生型、バスピントランスジェニック (Tg) マウスの腎組織染色を行い線維化やアポトーシスの評価を行った。
  - b. 「HSPA1L は HIF1 $\alpha$  と結合して安定化させる」という既報 (Oncogene 36:6555-6567, 2017) を基に、両者とバスピンの関係、また線維化における意義を HK2 細胞で検討した。

#### 4. 研究成果

- (1) STZ 誘発糖尿病 Vaspin<sup>-/-</sup>マウスの尿細管で散見された多重リング状のミトコンドリアについて電顕 3D 立体構築を行うと、小球状ミトコンドリアを中心に円盤状ミトコンドリアが何層にも包み混むような構造を取り、その切断面が多重リング状に見えていることが判明した。一方でこの特徴的なミトコンドリアの周辺や背景のミトコンドリアの多くは分断化されていた。このことから、STZ 誘発糖尿病マウスの腎臓では高血糖や酸化ストレスや小胞体ストレスの増強、蛋白尿増加によるリソソーム障害などとともに、ミトコンドリアの多くは分断化されるが、本来マイトファジーにより除去されるべき障害ミトコンドリアが、マイトファジー不全により除去されず残存し、特徴的な構造をとると推察された。

- (2) 非糖尿病コントロールマウスに比べて STZ 誘発糖尿病マウスではミトコンドリア分裂に関わる Drp1 やマイトファジーに関わる parkin 発現が亢進したが、STZ 誘発糖尿病 Vaspin<sup>-/-</sup>マウスではさらに Drp1 発現が亢進する一方で、OPA1 は減少し、p62 蓄積からマイトファジー不全が示唆された。すなわちこの結果は (1) で示した分断化されたミトコンドリアを反映し、多重リング状ミトコンドリアはマイトファジー不全により処理されなかった機能不全ミトコンドリアであると考えられた。
- (3) HK2 細胞に脱共益剤 CCCP を添加し、バスピン添加の有無によるマイトファジー関連分子の発現をウェスタンブロットで検討すると、Drp1、p62 発現が亢進し、ミトコンドリア融合に関わる OPA1 と Mfn2 発現が低下した。バスピンを添加すると、Drp1、p62 発現の上昇が抑制され、OPA1、Mfn2 発現低下が回復した。Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit を用いた検討では、ミトコンドリアの Ca<sup>2+</sup>取り込みに対してバスピンは影響を示さなかった。
- (4) HK2 細胞に HSPA1L を過剰発現させ、バスピン蛋白を添加すると、HSPA1L 発現量の濃度依存性に細胞におけるバスピン蛋白量が増加した。すなわちバスピンは HSPA1L・CHC 複合体に結合し、クラスリン依存性に細胞内に取り込まれることが示唆された。BSA を HK2 細胞に添加すると、細胞内 HSPA1L 蛋白量が減少し、p62 蓄積すなわちマイトファジー不全が増強したが、バスピン添加または HSPA1L 過剰発現細胞では、p62 蓄積が軽減した。また、免疫沈降で HSPA1L と lamp2 が複合体形成を確認した。すなわち、バスピンは HSPA1L と結合し細胞内で HSPA1L・lamp2 複合体形成を介してリソソームに作用し、リソソーム膜透過性亢進を抑制する (別研究で示した) 機序が考えられた。
- (5) 既報のとおり HSPA1L と parkin の複合体形成を確認した。さらに今回新たに、HSPA1L と Mfn2 の複合体形成を見出した。HSPA1L は E3 ユビキチンリガーゼ autocrine motility factor receptor ; AMFR(Gp78)と結合してその作用を阻害することが報告されている (Oncogene. 36; 6555,2017)。同既報では、HSPA1L が HIF1 $\alpha$  蛋白を安定化することが示されている。このことから HSPA1L は Mfn2 を安定化すると想定され、HK2 細胞に HSPA1L を過剰発現させると Mfn2 蛋白量の増加を認めた。Mfn2 はミトコンドリアと小胞体の接着面(MAM)に存在することから、HSPA1L は MAM を介したオルガネラ連関にも寄与することが示唆された。さらに検討を進め、またバスピンによる MAM を介したオルガネラ連関への作用について検討が必要である。
- (6) STZ 誘発糖尿病 Vaspin<sup>-/-</sup>マウスの腎組織を用いた fibronectin 染色を行うと、非糖尿病コントロール Vaspin<sup>+/+</sup>マウスにくらべて STZ-Vaspin<sup>+/+</sup>および STZ-Vaspin<sup>-/-</sup>マウスでは fibronectin 陽性面積(%)が増加し、また PAS 染色において尿細管細胞の菲薄化や尿細管腔の拡大が認められた。一方、STZ 誘発糖尿病 Vaspin トランスジェニック(Tg)マウスではその面積(%)が抑制され、PAS 染色における尿細管細胞の菲薄化や尿細管腔の拡大が抑制された。HK2 細胞を用いて scratch assay を行うと、高糖培養による細胞の migration が Vaspin 添加により抑制され、さらに、尿細管細胞の上皮間葉転換に対する Vaspin の抑制機序について検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Mise K, Imamura M, Yamaguchi S, Watanabe M, Higuchi C, Katayama A, Miyamoto S, Uchida HA, Nakatsuka A, Eguchi J, Hida K, Nakato T, Tone A, Teshigawara S, Matsuoka T, Kamei S, Murakami K, Shimizu I, Miyashita K, Ando S, Nunoue T, Yoshida M, Yamada M, Shikata K, Wada J. | 4. 巻<br>8            |
| 2. 論文標題<br>Novel Urinary Glycan Biomarkers Predict Cardiovascular Events in Patients With Type 2 Diabetes: A Multicenter Prospective Study With 5-Year Follow Up (U-CARE Study 2).   | 5. 発行年<br>2021年      |
| 3. 雑誌名<br>Front Cardiovasc Med.  | 6. 最初と最後の頁<br>668059 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fcvm.2021.668059   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-            |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Kuroda M, Bujo H, Yokote K, Murano T, Yamaguchi T, Ogura M, Ikewaki K, Koseki M, Takeuchi Y, Nakatsuka A, Horii M, Matsuki K, Miida T, Yokoyama S, Wada J, Harada-Shiba M. | 4. 巻<br>28(7)         |
| 2. 論文標題<br>Current Status of Familial LCAT Deficiency in Japan.  | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>J Atheroscler Thromb.  | 6. 最初と最後の頁<br>679-691 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.5551/jat.RV17051.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Zhang D, Yamaguchi S, Zhang X, Yang B, Kurooka N, Sugawara R, Albuayjan HHH, Nakatsuka A, Eguchi J, Hiyama TY, Kamiya A, Wada J. | 4. 巻<br>12           |
| 2. 論文標題<br>Upregulation of Mir342 in Diet-Induced Obesity Mouse and the Hypothalamic Appetite Control.                                     | 5. 発行年<br>2021年      |
| 3. 雑誌名<br>Front Endocrinol (Lausanne).   | 6. 最初と最後の頁<br>727915 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fendo.2021.727915  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-            |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Yamaguchi S, Zhang D, Katayama A, Kurooka N, Sugawara R, Albuayjan HHH, Nakatsuka A, Eguchi J, Wada J. | 4. 巻<br>12           |
| 2. 論文標題<br>Adipocyte-Specific Inhibition of Mir221/222 Ameliorates Diet-Induced Obesity Through Targeting Ddit4. | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Front Endocrinol (Lausanne).   | 6. 最初と最後の頁<br>750261 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fendo.2021.750261  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-            |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Kurooka N, Eguchi J, Murakami K, Kamei S, Kikutsuji T, Sasaki S, Seki A, Yamaguchi S, Nojima I, Watanabe M, Higuchi C, Katayama A, Uchida HA, Nakatsuka A, Shikata K, Wada J. | 4. 巻<br>16(2)         |
| 2. 論文標題<br>Circulating GPIHBP1 levels and microvascular complications in patients with type 2 diabetes: A cross-sectional study.  | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>J Clin Lipidol.   | 6. 最初と最後の頁<br>237-245 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.jacl.2022.01.006  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>Nakatsuka A, Yamaguchi S, Eguchi J, Kakuta S, Iwakura Y, Sugiyama H, Wada J.                              | 4. 巻<br>4         |
| 2. 論文標題<br>A Vaspin-HSPA1L complex protects proximal tubular cells from organelle stress in diabetic kidney disease | 5. 発行年<br>2021年   |
| 3. 雑誌名<br>Commun Biol .   | 6. 最初と最後の頁<br>373 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s42003-021-01902-y  | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-         |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Nunoue T, Yamaguchi S, Teshigawara S, Katayama A, Nakatsuka A, Eguchi J, Niki T, Wada J. | 4. 巻<br>16         |
| 2. 論文標題<br>Lgals9 deficiency ameliorates obesity by modulating redox state of PRDX2.               | 5. 発行年<br>2021年    |
| 3. 雑誌名<br>Sci Rep.   | 6. 最初と最後の頁<br>5991 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-021-85080-1   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-          |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Nojima I, Eikawa S, Tomonobu N, Hada Y, Kajitani N, Teshigawara S, Miyamoto S, Tone A, Uchida HA, Nakatsuka A, Eguchi J, Shikata K, Udono H, Wada J. | 4. 巻<br>10          |
| 2. 論文標題<br>Dysfunction of CD8 + PD-1 + T cells in type 2 diabetes caused by the impairment of metabolism-immune axis   | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>Sci Rep.   | 6. 最初と最後の頁<br>14928 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-020-71946-3   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中司敦子  |
| 2. 発表標題<br>臨床医・研究者として継続してきたVaspinの機能解析（会長企画－研究者のサークルを作ろう－3 女性、連携、新しい糖尿病学を切り拓く） |
| 3. 学会等名<br>第64回日本糖尿病学会年次学術集会   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>中司敦子                      |
| 2. 発表標題<br>糖尿病合併症におけるバスピンの作用と新たな病態解明 |
| 3. 学会等名<br>第64回日本糖尿病学会年次学術集会         |
| 4. 発表年<br>2022年                      |

|                                 |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名<br>中司敦子                 |
| 2. 発表標題<br>基礎研究と臨床の間で考える糖尿病合併症  |
| 3. 学会等名<br>日本糖尿病学会中国四国地方会第59回総会 |
| 4. 発表年<br>2022年                 |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中司敦子、和田淳                        |
| 2. 発表標題<br>糖尿病における近位尿細管障害とVaspin/HSP70sの意義 |
| 3. 学会等名<br>第32回日本糖尿病性腎症研究会                 |
| 4. 発表年<br>2022年                            |

〔図書〕 計1件

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>中司敦子, 和田淳                                | 4. 発行年<br>2020年 |
| 2. 出版社<br>文光堂                                      | 5. 総ページ数<br>262 |
| 3. 書名<br>Renal dyslipidemia (分担), 「そうだったんだ! 脂質異常症」 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|