

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590890

研究課題名（和文） 腎虚血再還流傷害におけるオートファジーの役割について

研究課題名（英文） The role of autophagy in renal ischemia-reperfusion injury

研究代表者

北村 温美 (KITAMURA HARUMI)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：60570356

研究成果の概要（和文）：オートファジーは細胞内分解システムのひとつであり、細胞構成成分の代謝回転を担うことにより細胞の生存に必須の役割を果たす。本研究では腎近位尿細管特異的オートファジー不全マウスを作成・解析し、まず基底レベルのオートファジーが尿細管のホメオスタシスの維持を担うことを証明した。さらに急性腎傷害（腎虚血再還流モデルおよびシスプラチン腎症モデル）におけるオートファジーの役割を検討し、オートファジーがミトコンドリアにおける酸化ストレスの除去やタンパク凝集塊の除去などを介して急性腎障害ストレスに対抗し、細胞保護的に働くことを示した。

研究成果の概要（英文）：In kidney, proximal tubules consume a large amount of energy in the process of electrolyte reabsorption. These tubules contain large quantities of mitochondria which provide the energy for this reabsorption. Proximal tubules are susceptible to many kinds of insults such as ischemia-reperfusion injury and nephrotoxic substrates, but little is known of the factors that counteract cellular stress signaling pathways. Autophagy mediates bulk degradation and recycling of cytoplasmic constituents to maintain cellular homeostasis. We demonstrated the critical role of autophagy in normal proximal tubule function and protection against acute tubular injury including ischemia-reperfusion injury and cisplatin nephrotoxicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：オートファジー、シスプラチン、タンパク凝集体、虚血再還流、近位尿細管、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、ユビキチン-プロテアソーム系と並ぶ主要な細胞内分解システムであ

り、リソソームにおける細胞質成分分解の総称である。オートファジーは、日々ある一定の割合で細胞質やオルガネラを消化し細胞

成分の代謝回転に貢献していると考えられている。オートファジーの最も重要な役割は飢餓に陥ったときの栄養源確保であるが、生体にとって有害な物質の除去・分解に関与する、いわば細胞内品質管理の役割も果たしていると推測される。また飢餓以外の低酸素や小胞体ストレスによってもオートファジーが誘導され、多くは細胞保護作用があると推測され、実際マウスの肝臓や脳においてそれが実証されている。しかし研究開始当時、腎臓における役割の解明に関しては研究が進んでいなかった。腎尿細管細胞、特に近位尿細管細胞が、虚血傷害や薬剤に対して極めて脆弱であることは、周知の事実であり、また、尿細管間質障害の進展に低酸素状態が関与することも報告されている。研究分担者ら（猪阪、高島）はヒト移植腎の尿細管においてオートファジーが亢進しており、*in vitro*で低酸素や活性酸素負荷時のオートファジーが培養尿細管細胞に対して傷害を促進する方向に作用していることを報告した（Suzuki C, et al, *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Mar 28;368(1):100-6）。しかし腎虚血・尿細管傷害におけるオートファジーが、生体で実際に細胞保護的に作用するのか、あるいは細胞傷害性に作用するのかは明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、虚血や腎毒性物質による急性腎障害の病態へのオートファジーの関与の有無と役割を検討することである。

3. 研究の方法

(1) LC3-GFP トランスジェニックマウスの腎臓に虚血再還流負荷をかけ、尿細管においてオートファジーが亢進しているか否かを検証する。具体的には GFP-LC3 トランスジェニックマウスの腎臓に 40 分虚血再還流負荷をかけた後、経時的にオートファジーの動態を蛍光顕微鏡下で観察する。また、腎皮質の lysate を用いた Western blot により LC3-I、LC3-II の蛋白の推移を検討する。また野生型マウスの腎臓に同様の負荷を与え、内在性の LC3 を検出するため LC3 抗体による免疫染色を行う。

(2) 尿細管細胞特異的オートファジー不全マウスを作成し、その腎臓に虚血再還流負荷をかけ、主に組織学的手法により傷害の程度を野生型マウスの場合とで比較する。具体的には KAP Cre マウス (KAP (kidney androgen regulated protein) は近位尿細管に比較的特異的に発現しているタンパクである) と Atg-5 flox マウスを交配することにより尿細管特異的 Atg-5 ノックアウトマウスを樹立する。このマウスの腎臓に 40 分虚血再還

流負荷を与えた後、経時的に腎臓を摘出し、光顕標本 (PAS 染色)、電顕標本および凍結標本を作製し、組織学的な変化を野生型マウスと比較検討する。とくにアポトーシス・ネクロシスの程度、ユビキチン化タンパクや p62 陽性タンパク凝集塊の有無、ミトコンドリアの形態、尿細管局所における酸化ストレスの程度の違いなどを重点的に解析する。

(3) 尿細管細胞特異的オートファジー不全および野生型マウスから磁気ビーズを用いて近位尿細管細胞を選別し、低酸素や酸化ストレス負荷をかけることによりオートファジーの役割に関するメカニズムを検証する。具体的には 3 週令程度の野生型およびオートファジー不全マウスの腎臓をコラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼなどで処理し、単一細胞の懸濁液を得る。近位尿細管に特異的に発現する LTA (レクチンの一つ) に biotin を結合させたものとともに incubate する。ストレプトアビジンを結合したビーズを用い、磁気ビーズで近位尿細管細胞を positive selection する。近位尿細管に特異的なマーカーの発現を mRNA やタンパクレベルで確認する。確立した細胞を用い、*in vivo* では解析しにくい、分子レベルのメカニズムを探索する。

(4) (1)~(3) と同様の実験をシスプラチン腎症についても行う。すなわち 8 週令の近位尿細管特異的 autophagy (Atg5) ノックアウトマウスと対照マウスに対してシスプラチン (15mg/kg) を投与し、3 日後の腎機能・組織障害などを評価した。また、ノックアウトマウス由来の近位尿細管細胞 (Atg5(-)PTEC) と対照細胞に対する cisplatin (50 μ M) 投与時の ROS 産生を MitoSOXred によって評価した。

4. 研究成果

(1) まず、LC3-GFP トランスジェニックマウスに虚血再灌流障害を与えたところ、GFP 陽性の dot (オートファゴソーム) が近位尿細管において多数形成された。内因性 LC3-II の評価の結果に関しても同様であった。このことから、虚血再灌流障害により近位尿細管においてオートファジーが亢進することが判明した。次に、KAP-Cre マウスと Atg5 flox マウスを交配することで近位尿細管特異的オートファジー不全マウス (以下ノックアウトマウス) を作成した。ノックアウトマウスはメンデルの法則にしたがって出生し、弱齢では目立った異常は認めなかったが、8 週令以降軽度の腎腫大を、6 か月令で軽度の尿糖とアミノ酸尿を認めた。9 か月令までの観察では腎機能、生存率の差はなかった。組織学的検索では、ノックアウトマウスの近位尿細管細胞の細胞質において PAS 弱陽性の均質な沈着物およびユビキチン陽性・P62 陽性の細胞

内封入体を認め、また電子顕微鏡レベルで異常な形態のミトコンドリアの集積を認めた。以上より、基底レベルのオートファジーは尿細管のホメオスタシスの維持を担うことが判明した。ノックアウトマウスおよびコントロールマウス（8週齢：この時点では表現型は存在しない）に虚血再灌流障害を与え、尿細管細胞の障害の程度を組織学的に比較したところ、オートファジー不全マウスでは腎障害が増悪した。虚血再灌流障害を与えたオートファジー不全マウスの尿細管細胞の細胞質にはユビキチンおよびp62陽性の封入体が蓄積していた。このことから、オートファジーは、尿細管障害において、虚血再灌流障害に対抗して細胞保護的に働くことが判明した。

(2)同様の実験をシスプラチン腎症モデルでも行った。GFP-LC3マウスにシスプラチン(15mg/kg)を投与したところ、投与後約6時間から近位尿細管においてGFP-LC3のdotが出現し、投与3日目をpeakとして増加したことから、シスプラチン投与によるオートファジーの誘導が確認された。

8週齢、雄のノックアウトマウスならびに对照マウスにシスプラチン(15mg/kg)ならびにvehicle(生食)を腹腔内単回投与して3日後に腎障害について評価した。Vehicle投薬群では有意差がなかったが、シスプラチン投与群では、ノックアウトマウスにおいて有意に組織傷害が悪化していた。また、腎機能の評価として血漿中のBUN, Crを測定したところ、Vehicle投薬群では有意差は見られなかったが、シスプラチン投与群では、ノックアウトマウスにおいて有意に腎機能が悪化していた。

シスプラチン腎症において重要な機序であるDNA損傷について、gamma-H2AXの免疫染色を用いて評価したところ、シスプラチン投与群では、ノックアウトマウスにおいて有意にgamma-H2AX陽性細胞数が多く、DNA損傷が悪化していると考えられた。また、p53の免疫染色、TUNEL染色を施行したところ、シスプラチン投与群では、ノックアウトマウスにおいて、p53およびTUNEL陽性細胞数が有意に増加しており、KOマウスにおいて、DNA損傷からp53が活性化されてアポトーシスに至る経路が亢進していると考えられた。

次に、3週齢のノックアウトマウスから単離した近位尿細管細胞（以下、Atg5(-)近位尿細管細胞）と、Atg5(-)細胞にAtg5を遺伝子導入して revertant とした Atg5(+)近位尿細管細胞をシスプラチン存在下に培養し(50mM、24時間)、MitoSOXRedを用いてミトコンドリアでのROS産生を評価したところ、Atg5(-)近位尿細管細胞においては、Atg5(+)近位尿細管細胞と比べて、ミトコンドリアにおける

ROS産生が有意に多かったことから、シスプラチン腎症におけるミトコンドリアでのROS産生をオートファジー(マイトファジー)が抑制している可能性が考えられた。

最後に中枢神経や肝臓においてオートファジー不全下で蓄積し傷害を起こすと報告されている蛋白凝集塊について、ユビキチンならびにp62の免疫染色を用いて評価したところ、ノックアウトマウスにおいて、对照マウスと比べてシスプラチン投与後の蛋白凝集塊の蓄積が有意に多いという結果が得られ、蛋白凝集塊の蓄積が組織傷害の悪化につながっている可能性が考えられた。

移譲の結果からオートファジーは、DNA損傷、ミトコンドリアにおけるROS産生、蛋白凝集塊の蓄積を抑制することによって、シスプラチンによる急性腎障害を防御すると考えられた。今後、オートファジーの活性を亢進させることによって、シスプラチンによる急性腎障害を軽減できる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

(1)Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Isaka Y. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res.* 2013, 1; 73(1):3-7.

(2)Takahashi A, Kimura T, Takabatake Y, Namba T, Kaimori J, Kitamura H, Matsui I, Niimura F, Matsusaka T, Fujita N, Yoshimori T, Isaka Y, Rakugi H. Autophagy guards against cisplatin-induced acute kidney injury. *Am J Pathol.* 2012, 180(2):517-25.

(3)Isaka Y, Kimura T, Takabatake Y. The protective role of autophagy against aging and acute ischemic injury in kidney proximal tubular cells. *Autophagy.* 2011, 7(9):1085-7.

(4)Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Kaimori JY, Matsui I, Namba T, Kitamura H, Niimura F, Matsusaka T, Soga T, Rakugi H, Isaka Y. Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury. J Am Soc Nephrol. 2011, 22(5):902-13.

〔学会発表〕(計4件)

高橋 篤史 「オートファジーはシスプラチンによる急性腎障害の進行を防御する」 第55回日本腎臓学会学術総会 2012年6月12日横浜

高島 義嗣 「オートファジーは近位尿細管細胞のホメオスタシスを維持する」 第54回日本腎臓学会学術総会 2011年6月17日横浜

木村友則 「急性腎障害に対抗するオートファジー」 第54回日本腎臓学会学術総会 2011年6月17日 横浜

木村友則 「腎尿細管でのオートファジー」 第1回オートファジー研究会 2011年1月13日 静岡県掛川市

〔図書〕(計1件)

猪阪善隆、木村友則、高島義嗣 「オートファジー不全による尿細管障害」 中外医学社 「Annual Review 腎臓2013」 所収 2013年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/kid/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 温美 (KITAMURA HARUMI)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号：60570356

(2) 研究分担者

猪阪 善隆 (ISAKA YOSHITAKA)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00379166

高島 義嗣 (TAKABATAKE YOSHITSUGU)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30403075

