

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16240

研究課題名（和文）転写因子MondoによるPodocyte代謝調整機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of Renal Metabolic Regulation Mechanisms by Transcription Factor MondoA

研究代表者

酒井 晋介（Sakai, Shinsuke）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60817360

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：転写因子MondoAの腎構成細胞における代謝制御機構につき詳細に検討した。MondoA蛋白の腎組織分布の検討では、皮質に有意に染色され、髄質や糸球体への染色性は低かった。Podocyte特異的MondoA不全マウス(KOマウス)の検討では、若年・高齢・糖尿病モデルにおいて組織学的に有意な変化はみられなかったが、単離糸球体の検討で解糖系代謝物であるPyruvateやLactateに変化がみられた。尿細管細胞の評価では、同様のモデルにおいて組織学的変化は認めなかったが、オートファジーフラックスの有意な低下と、解糖系代謝物に変化がみられた。虚血再灌流において尿細管保護に重要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MondoAはオートファジーを制御する転写因子として注目されているが、腎組織において詳細な検討を行ったものは初めてである。Podocyteおよび近位尿細管ともにMondoAは解糖系を制御することが明らかになったが、予想に反して解糖系代謝の低い近位尿細管でのMondoAの分子機構が、腎傷害やオートファジー活性につながり、CKDへの進行に深くかかわることが明らかになった。老化において発現変動する蛋白であることから、腎不全の進展を抑制を抑制する新たなターゲット分子として寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We extensively investigated the metabolic control mechanism of transcription factor MondoA in renal constituent cells. Examination of the renal tissue distribution of MondoA protein revealed significant staining in the cortex, with lower staining observed in the medulla and glomeruli. Evaluation of Podocyte-specific MondoA-deficient mice (KO mice) did not show significant histological changes in young, aged, or diabetic models; however, changes were observed in glycolytic metabolism intermediates such as Pyruvate and Lactate in isolated glomeruli. Evaluation of tubular cells in similar models did not reveal histological changes, but there was a significant decrease in autophagic flux and changes in glycolytic metabolism intermediates. This was crucial for tubular protection during ischemia-reperfusion injury.

研究分野：代謝

キーワード：オートファジー 解糖系 代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) Mondo は bHLH-Zip 型の転写因子であり、グルコースに反応し細胞の代謝シグナル経路の調整に関わる。さらに、共同研究者らにより Mondo はオートファジーを制御することが報告された(Nakamura et al, Nat Commun. 2016)。オートファジーは、細胞内分解システムであり、細胞質成分(タンパク質や細胞内器官)をリソソームで消化し細胞成分の代謝回転に貢献している(Mizushima N, et al. Nature. 2008)。研究代表者らのグループは近位尿細管オートファジーに着目し、様々な疾患に関わることを報告してきた。その後、オートファジーをターゲットとした創薬の実現を目指す中で、オートファジー活性にかかわる Mondo に着目した。MondoA は腎構成細胞においても、オートファジーにかかわるとともに、解糖系によるエネルギー代謝に関わることが予想され Podocyte や遠位尿細管細胞といった解糖系に依存する構成細胞では、その恒常性維持に関わっている可能性が考えられるものの、今まで詳細に検討されたものはなかった。

(2)Mondo とエネルギー代謝(解糖系)との関わり

MondoA は主として筋細胞や脂肪細胞で発現し、高血糖やエネルギー過剰を感知するとインスリンシグナルや解糖系を負に制御する。そのため、糖尿病状態では Mondo 活性の抑制がインスリン抵抗性を緩和させ病態の改善に寄与すると考えられてきた(Byungyong A, et al. JCI Insight. 2019)。しかし、Mondo の低下による異常解糖系はミトコンドリア ROS を助長し、傷害を助長することも報告されており、解糖系の盛んな Podocyte や遠位尿細管細胞において Mondo は解糖系代謝のレギュレーターとして重要な役割を担う可能性が考えられた、Podocyte における代謝に関する詳細な報告はなかった。

2. 研究の目的

(1)MondoA がどの腎構成細胞で主として働くかをそれぞれのノックアウトモデルを用いて明らかにする

(2)腎構成細胞(尿細管細胞、糸球体構成細胞(Podocyte)など)における分子機構を、特にオートファジーおよび解糖系との関連に着目して解明する。

3. 研究の方法

(1)糸球体構成細胞の評価

・ Podocin-Cre(Podocyte 特異的に Cre を発現するマウス)と MondoA flox マウスを交配させて Podocyte 特異的 MondoA 不全マウス(KO マウス)を作成する。KO マウスの糸球体病変の変化および蛋白尿などの変化を経時的に評価する。定常状態で変化に加えて、高脂肪食負荷 2 型糖尿病モデルでの検討を行う。

・ 野生型マウスおよび KO マウスより単離糸球体を回収し、解糖系代謝物(乳酸やピルビン酸濃度)を測定する。測定に違いが出た場合には、RNA-Seq を施行し、MondoA がどの過程で解糖系に影響するかを検証する。

・ 野生型マウスおよび KO マウスと、オートファジーモニターマウス(GFP-LC3 マウス)を交配させ、オートファジー活性を評価する。また、野生型マウスおよび KO マウスからの単離糸球体の培養細胞において、パフィロマイシンの有無によるオートファジーフラックスの評価を行う

・ 糖尿病疾患モデルの野生型マウスおよび KO マウスの一般的な糸球体病変の組織評価を行う。電子顕微鏡検査においてミトコンドリアやリソソーム形態異常がみられれば、リソソーム機能評価(CathepsinD 活性)、ミトコンドリア機能評価(SDH 染色)、リソソームレギュレーター因子(TFEB や Rubicon など)の評価を組織染色や Western blot により行う。

(2) 近位尿細管細胞の評価

・ KAP-Cre(近位尿細管特異的に Cre を発現するマウス)と MondoA flox マウスを交配させて近位尿細管特異的 MondoA 不全マウス(KO マウス)を作成し、KO マウスの尿細管病変の有無を経時的に評価する。定常状態で変化に加えて高脂肪食負荷 2 型糖尿病モデルでの検討を行う。

・ 野生型マウスおよび KO マウスより尿細管を回収し、解糖系代謝物(乳酸やピルビン酸濃度)を

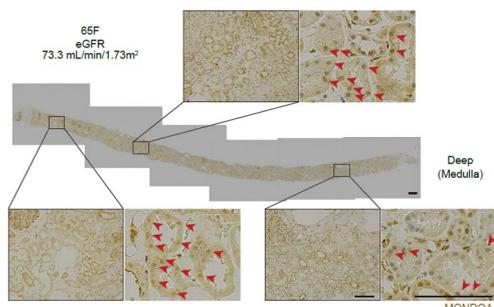
測定する。

- ・野生型マウスおよび KO マウスと、オートファジーモニターマウス(GFP-LC3 マウス)を交配させ、オートファジー活性を評価する。また、野生型マウスおよび KO マウスからの単離した培養細胞において、バフィロマイシンの有無によるオートファジーフラックスの評価を行う
- ・オートファジーフラックスの有無が疾患に与える影響について、各種モデル(糖尿病モデルや腎傷害モデル)で検証し、差があったものに対してその詳細なメカニズムを検証する

4 . 研究成果

MondoA の蛋白発現は、近位尿細管で主として発現し、糸球体や髄質での発現は少ない (Figure1)

MondoA 蛋白の腎組織分布について、ヒト腎生検検体を用いて染色性を確認したところ、S1・S2 セグメント(皮質)に有意に染色され、S3 セグメントはやや低下、髄質や糸球体への染色性は低いことが判明した。



(Figure1)

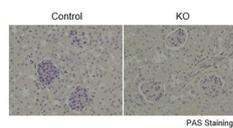
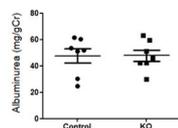
(A)糸球体構成細胞での評価

(1)Podocyte 特異的 KO マウスは、組織学的所見に違いがみられない(Figure2)

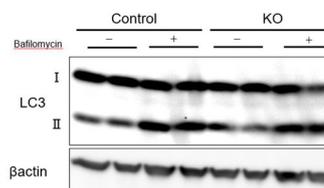
Podocyte においても RNA 発現はみられることから、Podocyte 特異的 MondoA 不全マウス(KO マウス)を交配作成し、その組織学的変化を確認した。2 か月齢および 6 か月齢、さらには 15 か月齢まで飼育したところ、KO マウスにおいては 6 か月齢時点で体重の減少(29g vs 33g Wild type)体重変化がみられ、15 か月時点においても、同様の結果であった(33g vs 37g Wild type)。しかしながら、尿蛋白に有意差がなく(両軍ともにアルブミン尿として 50 ~ 55mg/gCr)、尿糖出現などの尿所見はみられなかった。

(2)Podocyte 特異的 KO マウスより単離した培養細胞のオートファジー変化は乏しい(Figure3)

野生型マウスおよび KO マウスより単離糸球体を回収し、オートファジー停止因子であるバフィロマイシンを付加し、LC3 蛋白を用いた WB でオートファジーフラックスを評価した。Podocyte においては軽度の低下傾向を確認はできたが、優位なオートファジーフラックスの低下は確認できなかった。GFP-LC3 マウスとの交配によるオートファジーフラックスの評価も試みたが、蛍光が強く評価困難であった。



(Figure1)

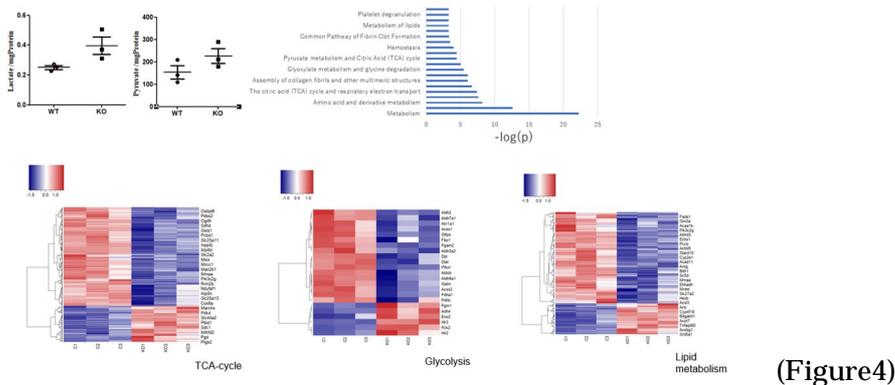


(Figure2)

(3) Podocyte 特異的 KO マウスより単離した培養細胞では解糖系が亢進する(Figure4)

代謝物を測定したところ、仮説通り解糖系因子の亢進はみられ、培養細胞のメディウム中の Lactate 濃度や Pyruvate 濃度が上昇していたことから、MondoA の低下により解糖系が亢

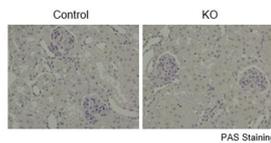
進し Glucose 代謝が亢進していることは示唆された。そこで同検体の RNA-Seq を施行したところ、metabolism が変動し、Lipid や Amino 酸代謝、TCA cycle の遺伝子変動が起こっていることが明らかとなった。



(Figure4)

(4) Podocyte 特異的 KO マウス・糖尿病モデルは、組織学的所見に違いがみられない (Figure5)

代謝の違いが糖尿病モデルに与える影響を検討すべく、KO マウスに高脂肪食負荷を行い、6 か月齢での腎組織を採取し評価した。尿細管細胞は空胞変性をきたしていたものの、野生型と比較して変化はみられず、糸球体硬化などの所見に有意な所見は認められなかった。

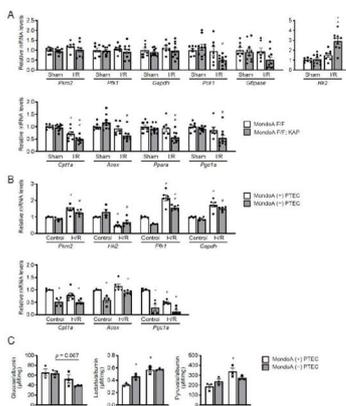


(Figure5)

(B) 近位尿細管細胞での評価

(1) 近位尿細管特異的 KO 細胞においても、解糖系の変化および解糖系が変化する虚血再灌流モデルでより変化がみられる (Figure6)

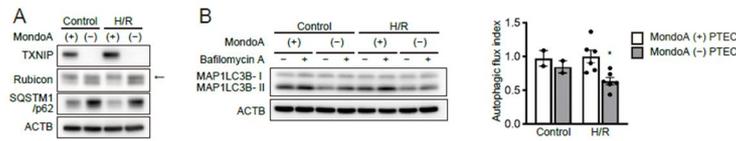
糸球体構成細胞において、代謝の変化はみられたものの、病態への影響は強くなく、マウスモデルにおいて変化が乏しかったことから、その他の腎構成細胞である近位尿細管に着目した。同部位は MondoA の発現が多いことを免疫染色で同定している (Figure1)。近位尿細管特異的 MondoA ノックアウトモデルを作成し、尿細管細胞を単離し、定常状態および解糖系に代謝がシフトすると考えられている低酸素/再酸素化モデル (H/R) を作成し、同細胞の代謝の qPCR、代謝物の測定を行った。その結果、尿細管細胞においても MondoA 欠損にて解糖系が亢進することが明らかになった。(Figure6)



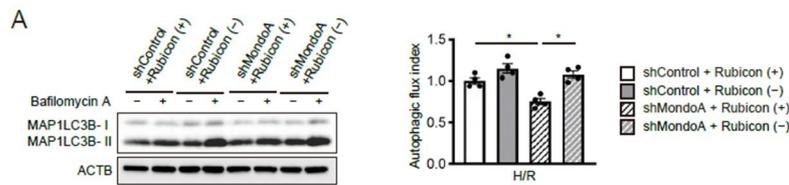
(Figure6)

(2) 近位尿細管特異的 KO 細胞においてオートファジー抑制因子である Rubicon が亢進し、オートファジーフラックスが停滞する (Figure7, 8)

Podocyte と同様、近位尿細管 KO 細胞にバフィロマイシンを付加し、オートファジーフラックスを確認したところ有意にオートファジーフラックスが低下し、Rubicon が上昇することが判明した。(Figure7) MondoA および Rubicon の両方をノックアウトした細胞を作成してオートファジーフラックスを評価したところ、オートファジーフラックスの停滞が改善することが判明した。(Figure8)



(Figure7)



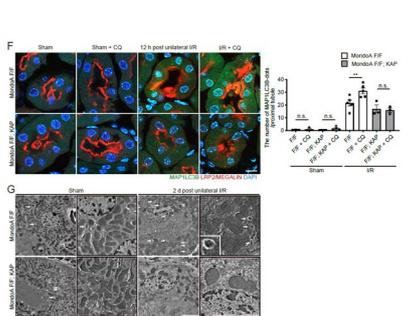
(Figure8)

(3)近位尿細管特異的 KO マウスにおいてもオートファジーが停滞する(Figure9)

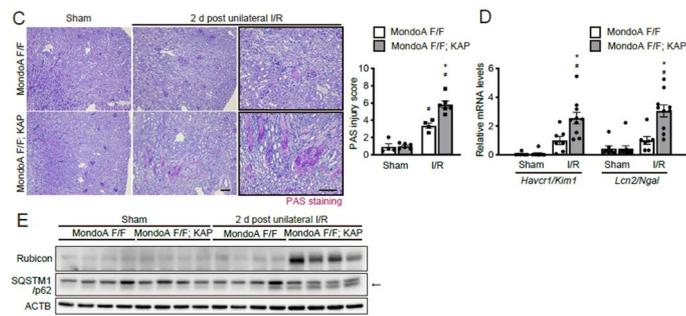
GFP-LC3 可視化マウスと KO マウスを交配させ、オートファジー抑制薬剤であるクロロキンを投与したマウスでフラックスを評価したところ、細胞実験と同様マウスにおいても MondoA ノックアウトでオートファジーが抑制され、Rubicon が亢進することが明らかになった。(Figure9)

(4)近位尿細管特異的 KO マウスでは、ミトコンドリア傷害にて虚血時の腎傷害が増悪し、Rubicon を抑制することで改善を認める(Figure10、11)

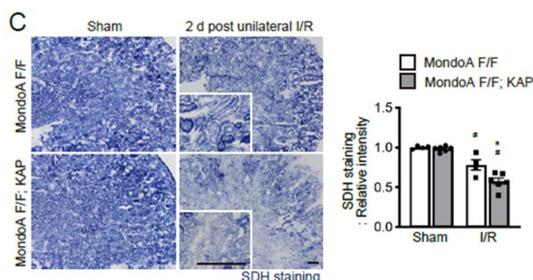
KO マウスに I/R 処置を施行したところ、腎組織の傷害 (PAS injury score) が増悪し (Figure10)、ミトコンドリア障害をきたすことが判明した (Figure11)。これらの変化は、Rubicon 同時ノックアウトモデルにおいて軽減がみられた (Figure12)



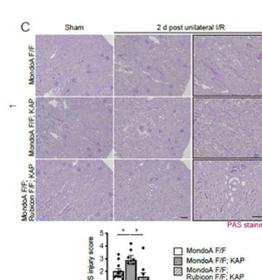
(Figure9)



(Figure10)



(Figure11)



(Figure12)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------