

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790955

研究課題名(和文)ポドサイト障害とオートファジーからみた糸球体硬化のメカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the relationship between autophagy and glomerulosclerosis caused by podocyte injury

研究代表者

浅沼 悦子 (Asanuma, Etsuko)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：30508172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジー関連蛋白であるGABARAPについて、GFP-GABARAP Tgマウスに糸球体硬化モデルであるADR腎症を惹起すると、Tgマウスがコントロールに比べてポドサイト障害の増悪を来し、GABARAPが糸球体硬化にいたるメカニズムに関与している可能性が考えられた。

またオートファジーをポドサイトにのみ起こさなくするポドサイト特異的Atg7ノックアウト(KO)マウスを作成し、そのマウスにADR腎症を惹起したところ、KOマウスの方がポドサイト障害が強く惹起され、硬化糸球体数の増加を認めた。現在オートファジー不全におけるポドサイト障害増悪のメカニズムを解析中である。

研究成果の概要(英文)：GABARAP (gamma-aminobutyric acid A receptor-associated protein) has recently been characterized as an autophagy related protein, though its precise role in autophagy remains unclear. We recently generated green fluorescent protein (GFP)-GABARAP transgenic (Tg) mice, in which GFP-GABARAP is abundantly expressed in glomerular podocytes. Adriamycin (ADR) treatment which causes glomerulosclerosis resulted in a significant increase in proteinuria and sclerotic glomeruli in Tg mice when compared to wild type (WT) mice. Our results indicate that GABARAP is responsible for the impairment of glomerular function, and that it retards recovery from the effects of ADR.

Next, we produced podocyte-specific Atg7 knockout (KO) mice in which autophagy is suppressed. ADR treatment produced significantly worse podocyte injury to KO mice than to WT mice.

Presently, we are continuing to elucidate the relationship between podocyte injury and autophagy deficiency in the podocyte.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：ポドサイト オートファジー アポトーシス アドリアマイシン腎症 Atg7 GABARAP デンドリン

1. 研究開始当初の背景

ポドサイトは、糸球体基底膜を外側より覆う高度に分化した上皮細胞である。糸球体糸蹄壁は内皮細胞、基底膜 (GBM)、上皮細胞の3層構造を成しており、この3層構造で血清蛋白が尿中に漏れ出るのを防ぐバリア機能を果たしている。それらの障害はバリアの破綻を来し、尿中に蛋白質が漏れ出る。ポドサイトは終末分化細胞であり再生しないことから、その障害が激しい場合には不可逆的な構造変化を引き起こし、最終的には糸球体硬化に導かれる。

オートファジーは酵母を使った解析をもとに、哺乳類の全ての細胞に存在する細胞内小器官等の蛋白処理機能であることが解剖学的、分子生物学的に解明されてきており、細胞内で取り込んだ空間をまるごと消化するため、バルク分解系と呼ばれている。オートファジーは type II programmed cell death、心筋症、悪性腫瘍等に大きく関与し、神経変性疾患との関与も知られている。ポドサイトが終末分化細胞であること、神経特異的蛋白を多く発現していることなど神経細胞と多くの共通点をもっている。以上より、ポドサイト障害にもオートファジーが関与していることが推測されるが、腎疾患との関連性についてはいまだ報告は少なく、研究の余地が多く残されている。

オートファジーは、自己消化のときには消化物を隔離する隔離膜 (オートファゴソーム) の形成が不可欠であるが、オートファゴソームの形成に必要な幾つかのグループの一つに酵母ではユビキチン様因子 Atg8 の結合反応系がある。この Atg8 の哺乳類のホモログとして LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3)、GABARAP (GABAA-receptor-associated protein)、GATE-16 (Golgi-associated ATPase enhancer) がある。中でも LC3 の研究が最も進んでおり、LC3 (Atg8) は Atg4 により分解された後、E1 (Atg7) と E2 (Atg3) により基質であるリン脂質 (PE) と結合し、この LC3-PE 結合体はオートファゴソームの膜成分の一部として機能する。GABARAP、GATE-16 についても *in vitro* においては LC3 と同様の過程を経て PE と結合することはわかっているが、*in vivo* におけるそれぞれの詳しい機能、オートファジーへの関与はいまだ不明である。

これまでポドサイトにおけるオートファジーの役割はほとんどわかっていなかったが、当教室では LC3 がポドサイトに多く発現し、さらにポドサイト障害の回復過程において LC3 が著明に増加することを報告した (*FASEB J* 17, 2003)。これはポドサイト障害の回復時にオートファジーが活

性化している可能性を示唆するものであった。LC3 のホモログである GABARAP も、同様にポドサイトにおいて何らかの役割を持っていることが予想され、これまでに当教室では、GABARAP のトランスジェニック (Tg) マウスの解析を行ってきた。

また、LC3、GABARAP のプロセシングに必要な Atg7 の脳特異的な欠損マウスが神経疾患を引き起こすことが報告されており (Komatsu M et al, *Nature* 441(7095), 2006)、神経細胞とポドサイトの形態学的・機能的な共通点から、ポドサイトにおいても Atg7 の欠損によりポドサイト障害や障害からの回復遅延等が予想された。最近、オートファゴソームの形成に必要なオートファジー関連蛋白である Atg5 について、この蛋白の腎特異的な欠損マウスが高齢になると蛋白尿を来し、糸球体硬化を来すことが報告された。さらには薬剤誘発性糸球体障害モデルの観察において、この欠損マウスがコントロールに比べて有意に糸球体障害を増悪させることが報告された (Hartleben B et al, *J Clin Invest* 120(4), 2010)。今まで、腎糸球体におけるオートファジーに関する報告はほとんどなかったが、先の Atg5 の報告は、腎糸球体障害時のポドサイトとオートファジーの関与を強く示唆する報告であり、同様に Atg7 においてもポドサイト障害・糸球体硬化とオートファジーの関連性の検討に重要な因子となりうると考えられた。現在当教室では、すでに Atg7 がポドサイトに存在することを確認しており、Atg7 のポドサイトにおける役割を検討するため、ポドサイト特異的 Atg7 欠損マウスを作製し、糸球体硬化モデルを使った実験に着手している。Atg7 マウスを使った、ポドサイト障害による糸球体硬化へのオートファジーの関与の解明、さらには細胞レベルでのポドサイト障害とオートファジーの観察により、蛋白尿・糸球体硬化の進展抑制への治療の手がかりをつかむことが出来ると確信している。

2. 研究の目的

本研究は、マウスを利用した実験ネフローゼ・糸球体硬化モデル・腎硬化症モデルの観察と培養ポドサイトにおけるオートファジーの細胞障害時の観察を中心に、オートファジー関連蛋白のポドサイトにおける機能解析を行うことを目的とする。この解析により、糸球体硬化進展メカニズムの解明から腎保護さらには生命予後の改善につながる診断・治療へ発展させることが期待できる。

3. 研究の方法

ポドサイト障害の観察のためにネフローゼモデル、糸球体硬化モデルや腎硬化症モデルを使った組織学的・生化学的な評価を行う、ポドサイト障害におけるオートファジーの関連性を解明するため、オートファジー関連蛋白である GABARAP、Atg7 に注目して、それぞれの遺伝子改変マウスである GABARAP トランスジェニック (Tg) マウス、ポドサイト特異的 Atg7 欠損マウスを使用し生理的条件・病的条件下の観察を行う、*in vivo* の結果を裏付けるため、*in vitro* では、マウス培養ポドサイトを使ったオートファジー関連蛋白のノックダウン細胞株の確立とこの細胞を使った薬剤刺激や飢餓への応答を観察する、以上のような方針で、オートファジー関連蛋白のポドサイトにおける機能解析を進めた。

具体的には、初年度は、*in vivo* では、ポドサイト障害モデルの観察・確立を目的として、各種糸球体障害モデル、特にアドリアマイシン (ADR) 腎症におけるポドサイト障害の詳細な観察を行い、ポドサイト障害の評価としてポドサイト関連蛋白であるデンドリンの発現・局在に注目し、デンドリンとポドサイト障害・糸球体硬化との関連性について、ヒト腎生検組織も用いて各種糸球体腎症におけるデンドリンの役割について検討した。さらに糸球体硬化への治療薬の解析として、ADR 腎症に対する活性化ビタミン D のポドサイト障害に対する効果を観察した。*in vitro* では、Atg7 欠損によるオートファジーの細胞障害への影響を観察するために、Atg7 欠損ポドサイトの cell line の作成を行うことを中心に研究を進めた。次年度以降は、*in vivo* では、オートファジー関連蛋白である GABARAP Tg マウスにおける ADR 腎症の組織学的・生化学的観察から、GABARAP のポドサイト障害への役割について検討した。さらにはポドサイト特異的 Atg7 欠損マウスの作成・観察と、その組織学的・生化学的評価を行うことから、Atg7 のポドサイト障害への役割について検討した。*in vitro* では、前年に引き続き Atg7 欠損ポドサイトの確立と、その細胞を使って飢餓への応答、薬剤によるポドサイト障害への応答、アポトーシスの観察などを行った。

4. 研究成果

ポドサイトにおけるオートファジーの役割を解明するために、ポドサイト障害モデルの観察・確立を目的として、我々はまず糸球体硬化モデルである ADR (アドリアマイシン) 腎症におけるポドサイト障害について解析した。

ADR 腎症は薬剤の単回静脈投与で 1 か月以上の長期的な蛋白尿を来し、経過中、徐々

に硬化糸球体が増加するという、慢性的なネフローゼ症候群・糸球体硬化モデルとして有用であることを確認した。また、ADR 腎症を用いたスリット膜関連タンパクデンドリンの糸球体硬化時の役割について、通常デンドリンはスリット膜蛋白として有名なネフリンと同様にスリット膜上に存在するが、ADR 投与によりデンドリンがスリット膜から核へ局在変化することでポドサイトアポトーシスが起りやすくなっている可能性を確認した。さらに、種々のヒト腎生検組織を使ったデンドリンの発現の観察により、糸球体硬化を来し得る糸球体疾患においてデンドリンの核移行所見が優位に増加することを確認し、デンドリンの核移行がポドサイト障害のマーカーとなりうることを報告した (*Am J Nephrol.* 23: 537-549, 2011)。

前述のごとくデンドリンの核移行所見がポドサイトアポトーシスと関連があり、ヒト糸球体疾患においてもデンドリンの局在変化と糸球体硬化の関連があることから、次に我々はヒト糸球体疾患における組織障害度とデンドリンの核移行率の観察による腎予後の予測の可否について検討した。ヒト腎組織所見とヒト尿沈渣中ポドサイトを用いたデンドリンの染色所見から、同じ糸球体腎炎の組織障害度別の観察において、糸球体硬化がより多いグループで尿中ポドサイトのデンドリンの核内染色率が高いこととアポトーシスに陥ったポドサイトが優位に増加することを確認し、ヒト糸球体腎炎においても、ポドサイト障害時のデンドリンの核への移行はポドサイトアポトーシスを高めている可能性があり、さらにデンドリン核移行率が高いことが糸球体腎炎の急性期障害を予測しうることを報告した (*Nephrol Dial Transplant.* 28: 1762-72. 2013)。

また、糸球体硬化への治療法の検討として、種々のマウス腎症モデルにおいてビタミン D 投与が蛋白尿や腎障害の進行を抑制しているということから、ADR 腎症における活性化ビタミン D 投与による糸球体硬化への薬剤効果を観察したところ、無治療群と比較して活性化ビタミン D 投与群では蛋白尿やポドサイトアポトーシスが減少し、硬化糸球体数が減少することを確認し、ADR 腎症において、活性化ビタミン D にはポドサイト障害の軽減と腎保護効果があることを報告した (*Am J Nephrol.* 35: 58-68. 2012)。さらに糸球体硬化に対する多剤併用治療法の検討として、ADR 腎症に対する活性化ビタミン D とレニンアンジオテンシン受容体阻害薬の投与により、腎症におけるポドサイト障害が単剤投与群と比較してさらに改善することを確認している (現在投稿中)。

オートファジー関連タンパクの解析につ

いては、まずはオートファジー関連タンパク LC3 のホモログの一つである GABARAP に注目して観察した。GFP-GABARAP Tg マウスの観察により、腎臓においては GABARAP がポドサイトに強く発現するものの、生理的条件下で若いマウスは野生型と比較して明らかな表現型の違いを認めなかった。しかしながらこの Tg マウスが高齢になると腎系球体の一部に構造異常を来すことを確認した。さらに病的条件下の観察として Tg マウスに ADR 腎症を惹起させたところ、Tg マウスが野生型コントロールに比べて尿蛋白と硬化系球体数の有意な増加を来すことを確認した。ポドサイト障害時の GABARAP の発現・局在変化について観察したところ、GABARAP は同じ Atg8 ホモログである LC3 と違い、膜構造上になく、蛋白凝集体として細胞質に存在することを認めた。これらの結果により、GABARAP の発現がポドサイト障害の増悪、系球体硬化にいたるメカニズムに関与していること、さらにその役割は LC3 とは異なる可能性があることが示唆された (*Am J Physiol Renal Physiol.* 302. F380-389. 2012)。以上の障害モデルとオートファジー関連蛋白の観察により、ポドサイト障害におけるオートファジーの役割が大きいことが過去の報告同様に確認された。

これらの研究結果をもとに、より確信的なポドサイト障害におけるオートファジーの役割を解明するために、Atg7 に注目して研究を行った。先のポドサイト特異的 Atg5 欠損マウスの報告は、腎系球体障害時のポドサイトとオートファジーの関与を強く示唆しており、同様に Atg7 においてもポドサイト障害・系球体硬化とオートファジーの間に重要な関連因子となりうると考えられた。研究開始当初、Atg7 がポドサイトに多く存在することを確認しており、次に Atg7 のポドサイトにおける役割を検討するためポドサイト特異的 Atg7 欠損マウス (以後 Atg7KO マウス) を作製し、このマウスについて観察・解析を行った。Atg7KO マウスは、生理的条件下では野生型と比較して表現型に明らかな違いは認めなかった。そこで Atg7KO マウスに ADR 腎症を惹起したところ、KO マウスにおいてポドサイト障害の増悪を認め、硬化系球体数の増加を確認した。

現在はポドサイト障害時のオートファジーの役割について、マウス組織を使って組織学的・生化学的にさらなる解析を行っている。*in vivo* の結果を裏付けるため、動物実験と並行して、マウス培養ポドサイトを使った細胞障害時のオートファジー関連蛋白の発現・局在の観察を行っており、ポドサイト障害時にオートファジーが活性化することは確認している。また Atg7 ノックアウトポドサイト株の樹立についても現在進行中であ

り、今後は培養 Atg7 ノックアウトポドサイトを使った、オートファジー関連蛋白の飢餓への応答、薬剤によるポドサイト障害への応答、アポトーシスの観察などを行う予定である。

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)

Kodama F, Asanuma K, Takagi M, Hidaka T, Asanuma E, Fukuda H, Seki T, Takeda Y, Hosoe-Nagai Y, Asao R, Horikoshi S, Tomino Y. Translocation of dendrin to the podocyte nucleus in acute glomerular injury in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 28: 1762-72. 2013 (査読有)

Lydia A, Asanuma K, Nonaka K, Takagi M, Jeong K-H, Kodama F, Asao R, Asanuma E, Prodjosudjadi W, Tomino Y. Effects of 22-oxa-calcitriol on podocyte injury in adriamycin-induced nephrosis. *Am J Nephrol.* 35. 58-68. 2012 (査読有)

Takagi-Akiba M, Asanuma K, Tanida I, Tada N, Trejo JAO, Nonaka K, Asanuma E, Eiki Kominami E, Ueno T, Tomino Y. Doxorubicin-induced glomerulosclerosis with proteinuria in GFP-GABARAP transgenic mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 302. F380-389. 2012 (査読有)

Asanuma K, Akiba-Takagi M, Kodama F, Asao R, Nagai Y, Lydia A, Fukuda H, Tanaka E, Shibata T, Takahara H, Hidaka T, Asanuma E, Kominami E, Ueno T, Tomino Y. Dendrin location in podocytes is associated with the disease progression in animal and human glomerulopathy. *Am J Nephrol.* 23: 537-549, 2011 (査読有)

[学会発表](計 2 件)

高木 美幸、浅沼 克彦、児玉 史子、浅尾 りん、永井 佳子、福田 裕光、田中 絵里子、浅沼 悦子、木南 英紀、上野 隆、富野 康日己：ネフローゼ症候群・系球体硬化モデルとヒト系球体疾患におけるスリット膜関連蛋白-デンドリンの核移行と系球体病変との関連性第 12 回東京腎炎・ネフローゼ研究会 (2011/7/23 東京大手町 経団連会館)
高木 美幸、浅沼 克彦、谷田 以誠、児玉 史子、浅尾 りん、野中 香苗、多田 昇弘、浅沼 悦子、上野 隆、木南 英紀、富野 康日己：GABARAP トランスジェニックマウスの系球体足細胞

(ポドサイト)における GABARAP の役割
の検討、第 2 回分子腎臓フォーラム
(2012/1/21 京都 京都リサーチパーク)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浅沼 悦子 (ASANUMA, Etsuko)

順天堂大学・医学部医学科・非常勤助教

研究者番号 : 23790955