

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659416

研究課題名(和文)オートファジー欠損関連蛋白から創薬を探る

研究課題名(英文) Investigating a new therapeutic approach from autophagy-deficient associated protein

研究代表者

猪阪 善隆 (Isaka, Yoshitaka)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00379166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は腎障害進展に対するオートファジーの保護作用について、オートファジー不全マウスおよび培養尿細管細胞を用いて、シスプラチン腎症、尿酸腎症、シクロスポリンによる代謝ストレス、代謝性アシドーシスのモデルにより検討した。オートファジーの保護作用のメカニズムとしては、傷害を受けたミトコンドリアや破たんしたリソソームあるいは凝集蛋白を除去することによりDNA障害や酸化ストレスの軽減などをきたすことが考えられた。これらのデータは慢性腎障害進展抑制薬の新規治療法を考えるうえで有効と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Macroautophagy is a highly evolutionarily conserved degradation process by which cytosolic materials and damaged organelles are broken down to their basic component. We investigated the role of autophagy in proximal tubular epithelial cells using autophagy-deficient mice and cultured tubular cells. Autophagy guarded proximal tubular cells against kidney injury by cisplatin, cyclosporine, urate crystal, or metabolic acidosis. The protective mechanism is to alleviate DNA damage, reactive oxygen species by eliminating damaged mitochondria, ruptured lysosomes, or aggregated protein. In addition, autophagy acts to ameliorate the chronic metabolic stress induced by cyclosporine or metabolic acidosis. These data provide new therapeutic perspective in chronic kidney diseases.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓内科学 オートファジー 尿細管傷害 活性酸素 ミトコンドリア リソソーム 酸化ストレス
急性腎障害

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、飢餓への適応であり、エネルギー産生や蛋白質新生のために、細胞内の蛋白質やオルガネラを分解し、蛋白質の原料であるアミノ酸を供給するとともに、飢餓以外の低酸素や酸化ストレス等によっても誘導され、細胞保護作用を有すると推測されている。我々は近位尿細管細胞特異的オートファジー不全マウスを作成し、老化に伴い尿細管細胞が肥大し、機能的にもアミノ酸尿や糖尿などを呈することを明らかとした。また、虚血・再灌流負荷により、尿細管細胞の傷害の程度がより高度になることを確認している(J Am Soc Nephrol 2011; 22: 902-913)。

加齢や糖尿病により、オートファジー機能が低下することも報告されており、慢性腎臓病に対する新規治療法を開発する上においても、腎障害進展に対するオートファジーの関与のメカニズムを検討することは重要である。

2. 研究の目的

真核生物は「自己の細胞質構成成分を隔離し、リソソームの酸性コンパートメント内で分解するシステム」として、オートファジー・リソソーム系を有している。オートファジーは飢餓時に強く誘導され、エネルギー産生や生存に必須な蛋白質合成のために、細胞内の変性蛋白質などを分解し、アミノ酸などを供給するシステムである。また、傷害を受けたミトコンドリアなどのオルガネラのリサイクリングにも寄与している。

近位尿細管細胞は、糸球体で濾過された電解質や糖、アミノ酸などの小分子の再吸収を行っており、その再吸収のために ATP を大量に消費する。このため、ミトコンドリアが豊富に存在するが、活性酸素(ROS)を産生するミトコンドリアは傷害を受けやすく、傷害をうけたミトコンドリアはオートファジーにより消去される。

オートファジーはエネルギーやアミノ酸などの供給の点において重要であるが、凝集した蛋白や傷害をうけたオルガネラをリサイクルすることにより細胞の恒常性維持にも関与する。さらに、虚血傷害な

どに対して保護的作用を有するなど、病態への関与も報告されている。そこで、本研究では、腎障害進展におけるオートファジーの関与を検討し、治療法を見出すために、近位尿細管細胞特異的オートファジー不全マウスを用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) 近位尿細管細胞特異的オートファジー不全マウスを用いた検討

我々は、kidney androgen-regulated protein(KAP) Cre マウスとオートファジーに必須の分子である Atg5 flox マウスを交配することにより近位尿細管細胞特異的オートファジー不全マウスを作成している。

この近位尿細管特異的オートファジー不全マウスを用いて、シスプラチン腎症モデル、シクロスポリン腎症モデル、尿酸腎症モデル、アシドーシスモデルを作成し、病態におけるオートファジーの関与を検討する。

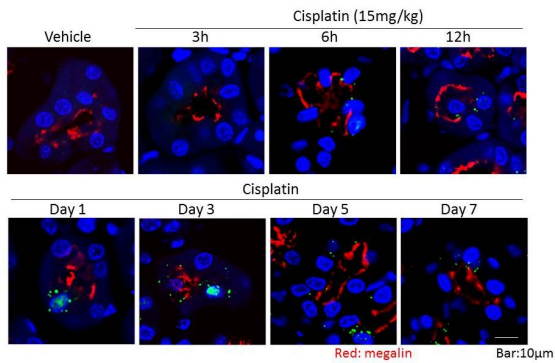
(2) オートファジー不全近位尿細管細胞を用いた検討

前述した近位尿細管特異的オートファジー不全マウスから単離したオートファジー不全近位尿細管細胞(Atg5(-)PTEC)およびオートファジー機能を回復させた細胞(Atg5(+))PTECを用いて、シスプラチン負荷、シクロスポリン負荷およびアシドーシス負荷の影響を検討する。

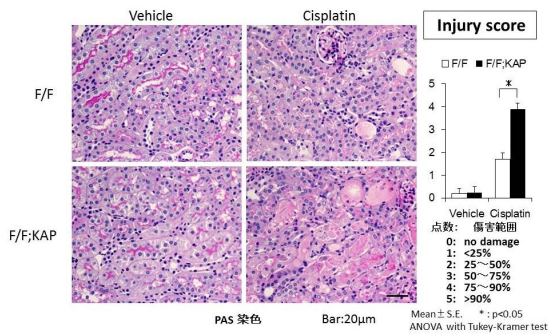
4. 研究成果

(1) シスプラチン腎症におけるオートファジーの検討

薬剤性腎傷害は、急性腎障害の重要な要因であるが、オートファジーが薬剤性腎傷害に対して保護的に作用するかを検討した。オートファゴソームが形成されると、GFP の dot が形成されることにより、オートファジーの活性化を可視化できる GFP-LC3 トランスジェニックマウスにシスプラチンを投与すると、近位尿細管においてオートファジーが亢進することが確認された。



また、近位尿細管特異的オートファジー不全マウスでは、野生型に比べてシスプラチン投与により、著明な腎傷害を認めることも確認された。



また、シスプラチンを投与すると、ミトコンドリアが活性酸素により障害を受けることが知られている。そこで活性酸素を産生するミトコンドリアのマーカである mito-SOX を用いて、オートファジーによる活性酸素を産生するミトコンドリアの除去機能を検討したところ、オートファジー不全細胞では活性酸素を産生するミトコンドリアが除去されずに、細胞傷害へとつながる可能性が示唆された。

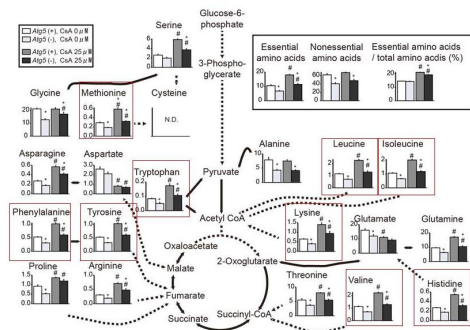
(2) シスプラチン腎症による代謝ストレスに対するオートファジーの関与

エネルギーや代謝の調節もオートファジーの重要な役割であり、分解したオルガネラや蛋白をエネルギーや蛋白源などとして再利用できるようにしている。近位尿細管は代謝の影響を強く受けることから、オートファジーと慢性腎臓病の進展について検討を行った。シクロスポリン(CsA)の副作用として慢性腎臓病が臨床問題になるが、その一因としてCsAがミトコンドリアの膜電位を低下させることにより酸化リン酸化を抑制し、尿細管に強い代謝ストレスを与えることが報告されていることから、近位尿

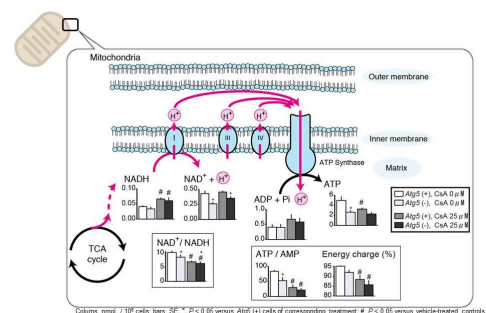
細管細胞における代謝ストレスへの関与を検討した。

GFP-LC3 マウスに CsA を投与すると、近位尿細管細胞でオートファジーが亢進することが確認できたことから、近位尿細管特異的オートファジー不全マウスに CsA を投与すると、野生型マウスに比べて腎障害 (BUN, Cr の上昇) や組織傷害、線維化が増悪した。その機序を解明するためにオートファジー不全マウスから単離したオートファジー不全近位尿細管細胞 (Atg5(-)PTEC) およびオートファジー機能を回復させた細胞 (Atg5(+)-PTEC) に CsA を添加しても同様の結果が得られたことから、CsA 添加による近位尿細管細胞内の代謝変化をメタボローム解析したところ、CsA 負荷により両細胞において様々な代謝産物が変化することを見出した。

具体的には CsA 負荷で細胞内アミノ酸濃度が低下するが、Atg5(-) PTEC では Atg5(+)-PTEC と比べて、必須アミノ酸を中心にアミノ酸レベルがさらに低下していた。



CsA 負荷で ATP をはじめとする細胞内エネルギーレベルが低下するが、Atg5(-) PTEC では Atg5(+)-PTEC と比べてさらに低下していた、CsA 負荷で、解糖系の亢進を認めたが、Atg5(-) PTEC では Atg5(+)-PTEC と比べて、それがさらに顕著であった。

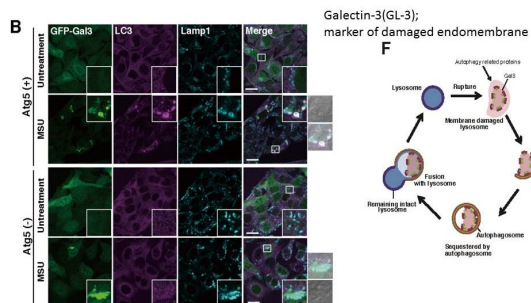


このような結果から、オートファジーは代謝ストレスに対してもアミノ酸やエネルギー低下を補完するように作用することが明らかとなった。

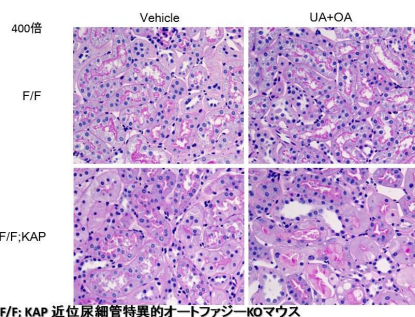
(3) 尿酸腎症による慢性炎症に対するオートファジーの関与

近位尿細管特異的オートファジー不全マウスを用いて、高尿酸血症が近位尿細管細胞のリソソーム破綻を介して、尿細管傷害をきたしうるかについて検討した。尿細管細胞は高尿酸血症に暴露されると、オートファジーが亢進する。

オートファジー機構が保たれている場合は、尿酸塩によりリソソームが破綻しても、オートファゴソームがカテプシン等を漏出したリソソームを取り囲むことにより、細胞保護的に働くが、オートファジー機能が低下すると、漏出したカテプシン等が細胞質内に広がってしまい、炎症が惹起される。



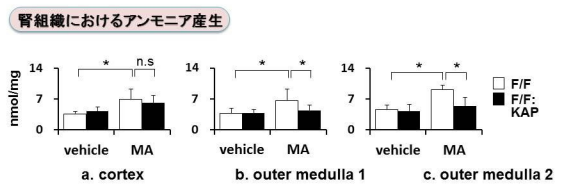
オートファジーは活性酸素を産生したミトコンドリアを消去することにより、尿細管細胞に対して保護的に作用することも報告しているが、老化等によりオートファジー機能が低下すると、尿酸塩によるリソソーム破綻から尿細管細胞を保護することができなくなり、尿細管障害が進展する。



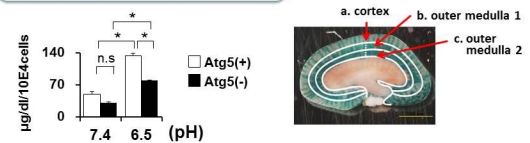
F/F: KAP 近位尿細管特異的オートファジーKOマウス

(4) アシドーシスに対するオートファジーの関与
アシドーシスになると、近位尿細管細胞のミトコンドリアではグルタミン代謝が亢進し、重炭酸やアンモニアを産生することによりアシドーシスに対する代償機構が亢進する。しかし、アシドーシスによりミトコンドリア負荷が増加すると、ミトコンドリアが傷害を受けやすいため、オートファジーを亢進させることにより、傷害されたミトコンドリアを消去し、尿細管傷害を防止する。しかし、オートファジー機能が低下すると、この傷害ミトコンドリアの消去ができず、アシドーシス時に重炭酸やアンモニアの産生が低下し、尿細管機能異常も起こる。

オートファジーは代謝性アシドーシスに対する代償反応を促進する

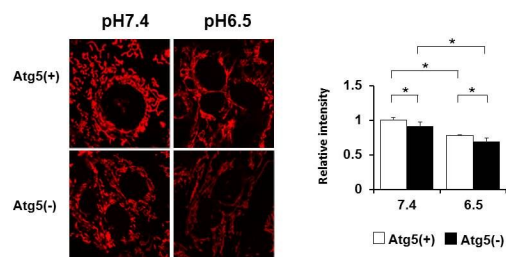


培養近位尿細管細胞におけるアンモニア産生



代謝性アシドーシスではミトコンドリア膜電位が低下し、オートファジーが機能しないとさらに顕著になる

ミトコンドリア膜電位 (TMRE)



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

- (1) Takahashi, A., Kimura, T., Takabatake, Y., Namba, T., Kaimori, J., Kitamura, H., Matsui, I., Niimura, F., Matsusaka, T., Fujita, N., Yoshimori, T., **Isaka, Y.**, and Rakugi, H. Autophagy guards

against cisplatin-induced acute kidney injury.

Am J Pathol 180: 517-525. 2012. doi:
10.1016/j.ajpath.2011.11.001.

[産業財産権]なし

- (2) Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Isaka Y. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res.* 2013; 73(1):3-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2464.
- (3) Maejima, I., Takahashi, A., Omori, H., Kimura, T., Takabatake, Y., Saitoh, T., Yamamoto, A., Hamasaki, M., Noda, T., **Isaka, Y.**, and Yoshimori, T. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. **EMBO J** 32: 2336-2347. 2013. doi: 10.1038/emboj.2013.171.
- (4) Kimura, T., Takahashi, A., Takabatake, Y., Namba, T., Yamamoto, T., Kaimori, J.Y., Matsui, I., Kitamura, H., Niimura, F., Matsusaka, T., Soga, T., Rakugi, H., and **Isaka, Y.** Autophagy protects kidney proximal tubule epithelial cells from mitochondrial metabolic stress. **Autophagy** 9: 1876-1886. 2013. doi: 10.4161/auto.25418.
- (5) Takabatake Y, Kimura T, Takahashi A, **Isaka, Y.** Autophagy and the kidney: health and disease. **Nephrol Dial Transplant.** 2014 Sep;29(9):1639-47. doi: 10.1093/ndt/gft535.
- (6) Namba, T., Takabatake, Y., Kimura, T., Takahashi, A., Yamamoto, T., Matsuda, J., Kitamura, H., Niimura, F., Matsusaka, T., Iwatani, H., Matsui, I., Kaimori, J., Kioka, H., **Isaka, Y.**, and Rakugi, H. Autophagic clearance of mitochondria in the kidney copes with metabolic acidosis. **J Am Soc Nephrol** 25: 2254-2266. doi: 10.1681/ASN.2013090986.2014.
- (7) **Isaka, Y.**, Takabatake Y, Takahashi A, Saitoh T, Yoshimori T. Hyperuricemia-induced inflammasome and kidney diseases. **Nephrol Dial Transplant.** 2015 . [Epub ahead of print] PMID: 25829326

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

高畠 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