

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790201

研究課題名(和文) 虚血再灌流傷害における腎尿細管上皮のリソゾーム酵素の役割について

研究課題名(英文) Roles of lysosomal proteinases in ischemia reperfusion mediated renal proximal tubules injury.

研究代表者

鈴木 ちぐれ (Suzuki, Chigure)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40536629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：腎虚血再灌流(I/R)傷害は腎移植時の重要課題である。尿細管上皮のI/R傷害におけるオートファジー(AP)リソゾーム系の関与を近位尿細管特異的カテプシンD欠損(CDK0)マウスで解析した。野生型マウスではI/R負荷後、近位尿細管上皮細胞(RPTEC)にAPの誘導とCD活性の増強を認めた。CDK0マウスでは、非I/R下でも様々な小胞体異常やオートファゴソーム像を認めた。I/R負荷にてRPTECのこのような変化が特に細胞死の形態を示す細胞で増強し、野生型に比べ尿細管傷害が強かった。腎I/R傷害はRPTECに誘導されるAPの強さに依存し、その下流にあるリソゾームプロテアーゼの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ischemia reperfusion (I/R) injury is inevitable in kidney transplantation. Here show roles of lysosomal proteinases in renal I/R injury. For this, we prepared CDflox/-:Cre-Spink3 in which CD is deficient in renal proximal tubular epithelial cells (RPTECs). Even under physiological conditions, CD-deficient RPTECs contain a lamellarly arranged endoplasmic-reticulum (LER), fingerprint profiles, and autophagosomes (AP), although these changes were detected in the RPTECs of wild-type (wt) mice after I/R injury. After I/R, damage in CD-deficient RPTECs was much severer than in wt mice. Moreover, these CD-deficient RPTECs had more increased numbers of AP and LER after I/R and dying cells occupied with these AP and aberrant membrane structures appeared in the lumen of RPT. These results suggest that RPTECs deficient in CD may largely undergo cell death, because of excess of autophagy. Taken together, lysosomal proteinases as well as autophagy was largely involved in IR-induced death of RPTECs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 解剖学一般

キーワード：リソゾーム 腎虚血再灌流傷害 カテプシンDノックアウトマウス オートファジー

1. 研究開始当初の背景

リソソームへの経路をタンパク質の分解で見ると、エンドサイトーシス、ヘテロファジーやオートファジーに伴うタンパク質の取り込みのみならず、一緒に動く膜タンパク質の動態を反映して、多彩な生体機能に関わっている。細胞内のタンパク質の多くはオートファジー/リソソーム系で分解される。細胞質の不要なオルガネラを含む高分子は、細胞質の一部と共に小胞構造の隔離膜によって包み込まれる。この構造体は、オートファゴソームと呼ばれ、リソソーム酵素を含む小胞と融合してオートリソソームとなり、分解が始まる。この一連の機構をオートファジーと呼ぶ。リソソーム系での分解にはカテプシンと総称されるタンパク質分解酵素群が関わり、これまでに 20 種類以上の酵素が同定されている。これらの酵素を見ると、分布範囲が広い酵素、またその分布と基質に特異性のある酵素の存在も知られている。近年、カテプシン B, L, C, S, K などのシステインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼのカテプシン D、セリンプロテアーゼのトリペプチдилペプチダーゼ I などの遺伝子欠損マウスが作成・解析されている。申請者はヒト腎移植後早期の腎生検サンプルを電子顕微鏡的に解析して尿細管上皮細胞にオートファジーが誘導されること、マウス腎虚血再灌流モデルで、尿細管上皮細胞がオートファゴソームのマーカである LC3 陽性顆粒が認められ、オートファジーが亢進すること、が示された。また、ヒト尿細管細胞株に対する低酸素や過酸化水素付加刺激による *in vitro* の虚血再灌流モデルを用いて、これらの刺激によるオートファジーの亢進と阻害剤や siRNA を用いてオートファジーを阻害することで細胞死を抑制できることを報告した (Suzuki et al., BBRC (2008))。腎臓の近位尿細管上皮細胞は、エンドサイトーシスによる物質の取り込みが盛んであり、リソソームが豊富な細胞である。正常腎では糸球体からろ過されたアルブミンの一部は近位尿細管で再吸収されリソソーム内で分解される。Puromycin 誘導性ネフローゼ動物モデルでは、尿細管上皮内のリソソームの増加を認め、アルブミン分解の場として重要な働きを担っている。腎臓の虚血時にも尿細管上皮細胞にリソソームが増加し、申請者が作成した正常マウスの腎虚血再灌流傷害モデルにおいても尿細管上皮にリソソームが増加することを認めた。しかし、**正常の尿細管上皮細胞におけるオートファジーやリソソームプロテアーゼの個別の役割について、遺伝学的手法を用いた詳細な検討は行われていない。**また、**腎臓の虚血再灌流モデルにおけるリソソームプロテアーゼがいかなる役割を果たすかについても直接的な研究はない。**リソソームカテプシン群のうち、代表的なカテプシン B, D, L (CB, CD, CL) についてはそれぞれのノックアウトマウスが作成され詳細に解析されて

いる。特に、申請者らのグループでは、これまでに中枢神経系でのオートファジー・リソソームの役割に着眼し、CD 欠損マウスが神経性セロイドリポフスチン蓄積症のモデルマウスであることを報告している (Koike et al. J. Neurosci. 2000)。CB 欠損マウスの表現型は全く正常であるが、CL 欠損マウスは周期性脱毛症、心筋の変性を認める。しかし、現時点ではこれらノックアウトマウスを用いた腎臓の研究は一切なされていない。申請者らは正常マウスへの CD, CL, CB の特異的阻害剤を投与して腎虚血再灌流傷害を加えると尿細管上皮細胞の傷害が緩和されること、また虚血後早期の電顕像で、傷害を受けた尿細管上皮細胞に多数のオートファゴソーム・リソソームが出現することを確認している。

2. 研究の目的

申請者はこれまでの研究をさらに発展させるため、当研究室で維持されている、オートファジー・リソソーム系に関する様々なノックアウトマウス (詳細は「方法」参照) を用いて、**正常時および腎虚血再灌流傷害などの病態時における尿細管上皮細胞**について以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1) 個々のカテプシンの欠損によって腎臓尿細管上皮に見られる変化の有無を解析する

CB, CD, CL を欠損した際に、通常条件下の腎に与える影響を個々の欠損マウスを用いて、形態学的・組織細胞化学的に解析すると共に、血液・尿の生化学的な解析を行ない、総合的に腎機能を評価する。その際、CB, CL 欠損マウスは成獣における解析が可能であるが、CD 欠損マウスは生後 26 日で死に至るので使用できない。それ故、腎臓において同酵素が欠損した影響をより長期的に観察するため、腎臓尿細管上皮細胞特異的 CD 欠損マウスの作成および解析する。さらにカテプシン類には相補作用があるとも報告されておりこれらの影響を検討するため、上記マウスと CB あるいは CL ノックアウトマウスを交配し、腎臓特異的 CD / CB, CD / CL ダブルノックアウトマウスの作成および解析を行う。

(2) 腎虚血再灌流という病態下における各種リソソームカテプシンの影響についての検討

腎虚血再灌流モデルにおいてリソソーム酵素の抑制が、腎保護的に働くのか傷害促進的に働くのかについて、CB あるいは CL 欠損マウス、あるいは腎特異的カテプシン D 欠損マウスを用いて、腎虚血再灌流傷

害モデルにより検討する。各種欠損マウスおよび対照群における腎臓の傷害について形態学的・組織細胞化学的解析を主体とした検討を行い、血液・尿による腎機能評価との関わりや、PCR やウェスタンブロットなどの分子生物学的手法によりリソソーム・オートファジー系の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

平成 24 年度の具体的な計画・方法

CB-KO、CL-KO マウスの腎組織の解析：成獣（8 週齢前後）の CB-KO、CL-KO マウスおよびその対照群（同腹仔ないし C57BL/6J マウス）のマウスの腎組織で、電子顕微鏡による解析と、lamp-1 などのリソソームマーカー、オートファゴソームのマーカーである LC3 の免疫組織化学的解析を行った。また、各種カテプシンに特異的な基質を用いて、これら KO マウスの腎組織における各種カテプシンの活性の変化の有無について生化学的に検討する。さらに血液、尿サンプルを採取し腎機能を評価した。

CB-KO、CL-KO マウスを用いた腎虚血再灌流モデルの作成：これまでの申請者らの行ったマウスを用いた腎虚血再灌流モデルの研究より、正常マウスにおいては、48 時間以降の顕著な腎組織傷害に先行して、術後 6 時間目の早期よりリソソームの増加が認められることがわかっている。具体的には、8 週齢の CB-KO ないし CL-KO マウスおよび同腹仔の対照群に対し、左腎動静脈の血流をクリップで遮断し、30 分後に再灌流を行ない、24 時間後、48 時間後、96 時間後の腎臓について、腎組織傷害の程度やオートファゴソーム・リソソームの量の変化について、電子顕微鏡観察、オートファジーマーカー(LC3)や尿細管傷害マーカー(Kim-1)による免疫組織化学、HE 染色などの各種組織学的手法により評価し、正常マウス並びに各カテプシン阻害剤投与下の虚血腎との比較を行った。同時に、血液、尿サンプルによる腎機能の評価とウェスタンブロットによりオートファジー・リソソーム関連蛋白の挙動を評価した。

臓特異的 CD-KO マウスの作成と解析：CD 欠損マウスは生後約 26 日で死亡し本研究には使用できないため、すでに作成済みの CD^{flox/flox} マウスと尿細管特異的に Cre を発

現するトランスジェニックマウス(熊本大学・熊本大学生命資源研究センターのご協力)を交配し、尿細管特異的 CD 欠損マウスを作成した。

得られたマウスについて、と同様な超微形態学的、組織化学的、生化学的検討、血液・尿検査を行った。CD の欠損により中枢神経系ではミトコンドリアのサブユニット c など様々なタンパク質がリソソーム内に蓄積する事が知られている。

虚血時に傷害を受けやすい尿細管細胞もミトコンドリアに富んだ細胞であり、これらの蛋白の蓄積の有無の評価は病態の解明に重要である。そこでこれらに対する抗体を用いて、免疫組織化学的手法により蓄積の有無を検討した。

平成 25 年度の具体的な計画・方法

臓特異的カテプシン D ノックアウトマウスの腎組織の解析：平成 24 年度の に引き続き、尿細管特異的 CD 欠損マウスを量産し、これら に記された解析の続きを行った。

臓特異的 CD-KO マウスを用いた腎虚血再灌流モデルの作成：平成 24 年度の と同様に、尿細管特異的 CD-KO マウスについて腎虚血再灌流モデルの作成および腎組織傷害の程度の比較検討を行った。

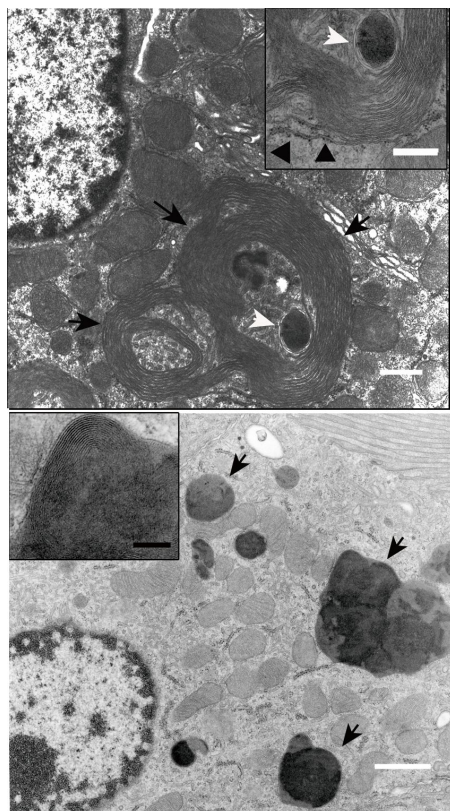
研究のまとめ：①～⑤により上記 5 系統の各種 KO マウスより得られた各種結果について比較検討を行った。正常時の腎臓ではどのカテプシンの欠損が腎の構造と機能に変化を及ぼすか、一方病態時ではどのカテプシンの欠損がその傷害を促進あるいは軽減するかを明らかにすることで、正常および虚血再灌流傷害時での尿細管上皮細胞における各種カテプシン群の相対的な重要性とオートファジー・リソソーム系の関わりについて考察を行い、結果を論文の形でまとめる。

4. 研究成果

1/R 負荷後、近位尿細管上皮細胞(RPTEC)にオートファジー(AP)の誘導と、CD 活性の増強が認められた。1/R 負荷時にプロテアーゼ阻害剤を用いてシステインおよびアスパラギン酸系 LP 活性を抑制したところ、3 日後の腎傷害は有意に抑制された。カテプシン B、L 単独ノッ

クアウトマウスに関しては通常条件下でHEや電子顕微鏡的観察において近位尿細管に明らかな異常は認めなかった。また、同様にIR実験を試みたが明らかな傷害抑制効果は認められなかった。次に、私達が作成したコンディショナルにCDを欠損させることのできる *Cdflox/flox* と *Spink3-Cre-CDK0recombinase* マウスとを交配し、腎臓の皮髄境界部特異的にCDを欠損したマウス (RPTEC-CDK0マウス) を作成した。

RPTEC-CDK0 マウスの皮髄境界部上皮細胞を電顕的に観察すると、オートファゴソーム (AV) を始め (下図) fingerprint 像 (FP) や輪状に集積した小胞構造 (LER) が認められ、LER の中央部にはしばしば AV が見られた。



RPTEC-CDK0 マウスの尿細管電顕像。上段：輪状に集積した小胞構造 (LER) (黒矢印) 内部に AV を含有している (白矢頭)。下段：fingerprint 像 (FP) 矢印。
Bar: 2 μ m、挿入図 0.5 μ m

RPTEC-CDK0 マウスの腎臓免疫組織染色では CD 欠損マウスの中樞神経系と同様に CD 欠損近位尿細管にサブユニット C の蓄積を認めた。野生型マウスを用いた虚血再灌流傷害モデルにおいては、抗カテプシン D 抗体による Western blot で、IR 負荷後 8 時間で活性型の重鎖が増加しており、活性測定では IR 負荷後 16 時間の腎臓で CD 活性が上昇していた。RPTEC-CDK0 マウスに I/R 負荷をかけると、I/R 負荷 3 日後の HE 染色腎組織所見および I/R 負荷 24 時間後の Kim-1 染色所見においても組織傷害の定量化により RPTEC-CDK0 マウスでは野生型に比べ有意に傷害が強かった。RPTEC-CDK0 マウスの I/R 負荷 24 時間後の電子顕微鏡像では皮髄境界部の RPTEC には AV、FP、LER が増加し、特に、細胞死の形態を示す細胞では細胞質全域がこれら構造物に占められ、野生型に比べ有意に傷害の程度が高いことが分かった。今回の研究からは、腎 I/R 傷害は尿細管上皮に誘導される AP の強さに依存すること、またその下流にあるリソソームプロテアーゼも関与することが示唆された。年度内には CB, CD, CL のダブルまたはトリプルノックアウトによるマウス腎尿細管への影響を検討するには至らなかったが薬物により CB, CD, CL をすべて抑制した場合は IR 傷害軽減傾向を認めており CB, CD, CL のダブルあるいはトリプルノックアウトマウスを用いて各カテプシン間の相互作用を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 5 件)

1. Chigure Suzuki, Masaki Ohmuraya, Masahiro Shibata, Yasuo Uchiyama. Roles of Lysosomal proteinases in ischemia reperfusion-mediated renal proximal tubules injury. 第 23 回国際形態科学シンポジウム、2013.9.10. 朱鷺メッセ (新潟)
2. Chigure Suzuki, Masaki Ohmuraya, Masahiro Shibata, Yasuo Uchiyama. Roles of Lysosomal proteinases in ischemia

reperfusion-mediated renal proximal tubules injury. ISN world congress of Nephrology 2013.5.31.Hong Kong

3. 鈴木ちぐれ、砂堀毅彦、小池正人、柴田昌宏、内山安男。オートファジー・リソソームプロテアーゼの腎虚血再灌流傷害における役割について、第 56 回 日本腎臓学会総会、2013.5.10、東京国際フォーラム（東京）
4. 鈴木ちぐれ、砂堀毅彦、小池正人、柴田昌宏、内山安男。オートファジー・リソソームプロテアーゼの腎虚血再灌流尿細管傷害における役割について、第 118 回日本解剖学会、2013.3.28、高松
5. Chigure Suzuki ,Masaki Ohmuraya, Masahiro Shibata, Yasuo Uchiyama.Roles of lysosomal proteinase in ischemia reperfusion-mediated renal proximal tubules injury.第 6 回オートファジー国際会議、2012.10.28、沖縄

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木ちぐれ (SUZUKI, CHIGURE)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40536629