

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870281

研究課題名(和文)腎尿細管障害における細胞内Na⁺制御とミトコンドリア分裂・融合の役割の解明

研究課題名(英文)Reveal for the role of intracellular control of sodium ion and mechanism of mitochondrial fission and fusion on renal tubular disorder

研究代表者

齊藤 成 (SAITOH, Sei)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：10456444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：通常食(STD)と高脂肪食(HFD)のC57BL6Jマウスを作製した。STD群に比べHFD群で体重・血糖値が有意に増加し、HFD群にPLZ(フロリジン)投与群では血糖値が投与前に比べ有意に低下した。SBF-SEMで近位尿細管セグメント1の3次元超微形態解析を行った。STD群では尿細管細胞に巨大なMitと頂上部にLyが認められたが、HFD群では小型のMitとオートファゴソーム(At)が認められた。HFD群にPLZを投与すると巨大Atは減少し分枝状Mitと小型～中型のLyがみられた。ヒト尿細管培養細胞の高濃度D-glucose400mg/dlで分断化したMitにPLZを投与して再構成が確認された。

研究成果の概要(英文)：The C57BL6J mice were divided two groups fed with standard (STD) and high fat diet (HFD). The mouse body weights and blood glucose levels of HFD group were significantly higher than STD group's at 20 weeks of age. And after administration of phlorizine (adPLZ) of HFD group, the blood glucose levels were significantly decreased than before. The proximal tubule segment1 were 3 demential analyzed with serial block face-scanning electron microscope (SBF-SEM). In STD group, the numerous lysosome (Ly) apical on the huge size of mitochondria(Mit) were confirmed in the epithelium of the proximal tubule segment 1. The giant autophagosome (At) and, small fragmented Mit were in HFD group. After adPLZ of HFD group, the giant At were decreased, but small and medium size of Ly were increased, and secondly the branched Mit were found. On high glucose culture condition (D-glucose 400mg/dl) the fragmented Mit were re-branched after adPLZ of human primary culture of proximal tubular epithelial cells.

研究分野：人体解剖学

キーワード：糖尿病性尿細管障害 SBF-SEM ミトコンドリア ヒト尿細管培養細胞 フロリジン SGLT阻害剤 オートファジー SGLT2

1. 研究開始当初の背景

近位尿細管におけるミトコンドリアの機能維持の破綻は、細胞内 Na⁺貯留を招き、腎機能障害の増悪に關与すると考えられる。

腎機能障害を招く高血糖では、近位尿細管のグルコースの再吸収は Na⁺-Glucose 共輸送体(SGLT)を介して行われる。SGLT の選択的阻害剤(フロリジン)は、SGLT による Na⁺-Glucose の近位尿細管での再吸収をおさえ、尿中への排泄を促進する事により、血糖値が低下する事は良く知られていた。

しかし、腎疾患における尿細管細胞のミトコンドリアの形態、分布、および輸送の変化はよくわかっていなかった。

2. 研究の目的

Na⁺/glucose 共輸送体阻害剤などによる近位尿細管細胞内 Na⁺の上昇の抑制や、ミトコンドリアの形態や分布に対する積極的な改変が、慢性腎機能障害や虚血・再還流にみられる近位尿細管障害において尿細管細胞機能の改善に有用であることが予測されていた。

そこで、糖尿病性腎障害における近位尿細管細胞の Na⁺貯留、そして同時に引き起こされるミトコンドリアの形態や分布の変化とその役割を明らかにするために、マウスによる動物とヒトの尿細管培養細胞の両者で実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

2 型糖尿病マウスモデルの腎組織を用いて SBF-SEM による解析を行い、腎近位尿細管上皮細胞内の複雑なオルガネラ動態と超微形態学的変化を検討した。

4 週齢雄マウスに 20 週齢まで通常食もしくは高脂肪食を与え、体重と血糖値を測定した。一部のマウスでは、固定 1 日前より Na⁺・グルコース共輸送体(SGLT)阻害剤の一種であるフロリジン、もしくは DMSO(コントロール)を投与した。灌流固定後、OTO 法とウラン・鉛のブロック染色を行い、樹脂包埋した。

SBF-SEM により近位曲尿細管の連続断面画像を取得し、形態学的特徴やオルガネラの体積を解析した。

また、これらの実験群の腎臓組織のパラフィンブロックを作製し、免疫染色で SGLT2 の発現を確認した。

(2) 培養細胞実験

ヒト尿細管培養細胞に無血清培地(RELAR medium)を用いて、D-glucose 濃度 100mg/dl と 400mg/dl で 4 日間培養した。次に、培養 3 日目の段階でフロリジン(PLZ 0.1~0.5mM)とコントロール DMSO(0.5%培養液)を加えて、SGLT を阻害した条件を設定し、同様に合計 4 日間培養した。

3%パラフォルムアルデヒド(0.1M PB)で固定し、ミトコンドリアのマーカー(Tom20 と VDAC)およびオートファジーマーカー(LC3)で免疫染色後、蛍光顕微鏡で 2 次元もしくは 3 次的に観察した。

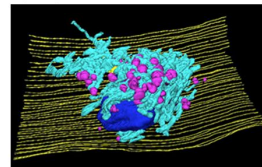
4. 研究成果

(1) 動物実験

通常食(STD)と高脂肪食(HFD)の C57BL6J マウスを作製した。STD 群に比べ HFD 群で体重・血糖値が有意に増加し、HFD 群に PLZ(フロリジン)投与群では血糖値が投与前に比べ有意に低下した。糖尿病性近位尿細管障害を示す、尿中 L-FABP も STD 群に比べて HFD 群では有意に増加していた。

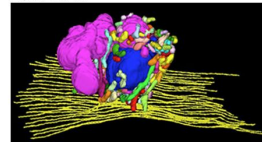
SBF-SEM で近位尿細管セグメント 1 の 3 次元超微形態解析を行った。STD 群では尿細管細胞に巨大なミトコンドリアと頂上部にライソゾームが認められたが、HFD 群では小型のミトコンドリアとオートファゴソームが認められた。HFD 群に PLZ を投与すると巨大オートファゴソームは減少し分枝状ミトコンドリアと小型~中型のライソゾームがみられた。

マウス近位尿細管上皮細胞—Segment1—3次元立体再構築像
20W STD



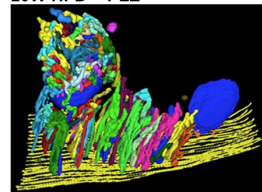
シアン—ミトコンドリア
マゼンダーライソゾーム
青—核
黄色—基底側

20W HFD



マゼンダーオートファゴソーム
青—核
黄色—基底側
その他—ミトコンドリア

20W HFD + PLZ



マゼンダーライソゾーム
青—核
黄色—基底側
その他—ミトコンドリア

各実験群の近位尿細管上皮細胞では、Segment1 と 2 の前半部の頂上部刷子縁に SGLT2 が発現している事を確認した。その際に、近位尿細管の Segment1&2 のマーカー Carbonic anhydrase IV と比較した。

(2) 細胞培養実験

生理的 D-glucose100mg/dl の培養条件下では、ミトコンドリアの分枝立体構造が認められた。一方、高濃度 D-glucose400mg/dl の培養条件では、ミトコンドリアは分断化し、オートファジーが多く認められた。

培養 3 日目の段階で D-glucose 濃度 400mg/dl にフロリジンを加えた培養条件では、DMSO をコントロールにした培養条件に比べて、フロリジンの SGLT 阻害の影響により、ミトコンドリアが再度伸張して、分枝立体構造を再形成していた。

結論

近位尿細管上皮細胞において、高血糖状態がミトコンドリア動態とオートファジーの異常を惹起するとともに、SGLT 阻害剤であるフロリジンが尿細管上皮細胞内のミトコンドリアに対して保護的に作用する事が示された。

すなわち、糖尿病性尿細管障害に対して、SGLT 阻害剤を投与する事により、尿細管のミトコンドリアの機能が改善されるフロリジンの薬理作用の一端がしめされた。

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 0 件)

投稿準備中(2015.5.27 現在)

[学会発表](計 5 件)

1. 齊藤成、大野伸彦、呉宝、志茂聡、齊藤百合花、藤井靖久、大野伸一

SBF-SEM を用いた 2 型糖尿病モデルマウスにおける腎組織の 3 次元的超微形態解析 (公益社団法人日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会 国立京都国際会館(京都市左京区), 2015 年 5 月 15 日)

2. 齊藤成、大野伸彦、呉宝、志茂聡、齊藤百合花、藤井靖久、大野伸一

11 型糖尿病性尿細管細胞内ミトコンドリア構造とオートファジー形成の SBF-SEM による 3 次元的超微形態解析 (生理研研究会「電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用」, 岡崎カンファレンスセンター (愛知県岡崎市), 2014 年 11 月 12 日)

3. 大野伸彦、齊藤成、齊藤百合花、井上朋大、加藤良平、大野伸一

SBF-SEM の応用による疾病モデルおよびヒト組織の 3 次元微細構造観察 (第 46 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, TKP 市ヶ谷カンファレンスセンター(東京都新宿区), 2014 年 10 月 18 日)

4. 齊藤成、大野伸彦、呉宝、志茂聡、齊藤百合花、藤井靖久、大野伸一

2 型糖尿病性腎障害モデルマウス近位尿細管上皮細胞内ミトコンドリアの SBF-SEM による 3 次元的超微形態解析 (第 46 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, TKP 市ヶ谷カンファレンスセンター (東京都新宿区), 2014 年 10 月 18 日)

5. 齊藤成、大野伸彦、齊藤百合花、寺田信生、會田薫、藤井秀樹、小林哲郎、大野伸一

ヒト膵臓ランゲルハンス島における免疫組織化学染色と電顕像の比較検討 (第 54 回日本組織細胞化学学会総会・学術集会, 航空会館(東京都港区), 2013 年 9 月 27 日)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
山梨大学研究者総覧(齊藤成)

http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_DisplayInfo.Scholar/3_50/19216A7DE11B6673.html

山梨大学 大学院総合研究部
解剖学講座分子組織学教室 HP
<http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/anat01/member.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

齊藤 成 (SAITOH, Sei)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号 : 10456444