

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893137

研究課題名(和文)オートファジーによる糸球体内皮細胞のホメオスタシス維持機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of glomerular capillary homeostasis by means of autophagy KO in endothelial cells

研究代表者

難波 倫子 (Tomoko, Namba)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30734420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞におけるオートファジーの機能解明のため、血管内皮特異的オートファジー不全マウス(以下KOマウス)を作成したところ、糸球体糸蹄にのみ異常を認めた。KOマウスは4週令で糸球体内皮に活性酸素種が蓄積し始め、8週令で糸球体基底膜の二重化およびメサンギウム基質の増生を呈した。KOマウスは貧血により9週令で死亡するため、骨髄移植を施し1年令まで観察したところ、腎機能低下、尿蛋白増加、糸球体硬化および間質線維化を認めた。ヒト糸球体内皮細胞でオートファジー関連因子Atg5をノックダウンすると内皮機能および生存率の低下を認めた。以上よりオートファジーは糸球体糸蹄の統合性維持に必須であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of Autophagy in vascular endothelial cells, we generated the vascular endothelial cell-specific Autophagy deficient mouse (KO mouse). KO mice had an abnormality in only glomerular capillary endothelial cells. At 4-week-old reactive oxygen species started to accumulate and, at 8-week-old double contour and accumulation of mesangial matrix were observed in the glomerulus of KO mouse. We conducted bone marrow transplantation because KO mouse died of anemia at 9-week-old. One-year-old KO mouse presented renal dysfunction and small amount of urine protein with glomerular sclerosis and interstitial fibrosis. Our in vitro study using human glomerular endothelial cells showed that siRNA-mediated knockdown of Atg5, which is involved in autophagic vesicle formation brought about endothelial dysfunction and resultant lowered survival rate. In conclusion, our data suggested that endothelial autophagy is essential for the integrity of the glomerular capillaries.

研究分野：腎臓

キーワード：オートファジー 糸球体内皮細胞 酸化ストレス ミトコンドリア 糸球体硬化

1. 研究開始当初の背景

近年腎疾患の成因・進展過程における血管内皮傷害の役割が注目されている。特に、糖尿病性腎症や加齢では、ミトコンドリアや NADPH oxidase 由来の酸化ストレスによる糸球体内皮傷害が糸球体疾患の発症原因として重要であることが知られている (Ozeki M, et al. J Physiol Sci. 2009, Meyer M R, et al. Life Sciences 2013)。さらに、内皮細胞由来の酸化ストレスは糸球体硬化の原因となるという報告もある (Daehn I, et al. The Journal of Clinical Investigation, 2014)。また傍髄質糸球体輸入細動脈のような緊張性の高い strain vessel は傷害を受けやすく、慢性腎臓病の原因となるばかりでなく、その結果生じる微量アルブミン尿は心血管疾患のマーカーとして認知されており (Ito S, et al. Hypertens Res. 2009)、内皮細胞傷害は臨床的にも大きな意義を持つと言える。

血管内皮傷害の誘因となる糖尿病や加齢ではオートファジー機能が低下することが報告されている。オートファジーはユビキチン-プロテアソーム系と並ぶ細胞内の主要な分解機構であり、日々一定の割合で細胞質やオルガネラを消化し細胞成分の代謝回転に貢献している。各種組織特異的オートファジー不全マウスの作成・解析により、各臓器や疾患におけるオートファジーの役割が解明されつつある。申請者はこれまで腎臓におけるオートファジーの役割に注目し、オートファジーが尿細管細胞に対する様々なストレスに対抗していることを証明してきた (虚血再灌流 : Kimura T, et al. JASN. 2011、シスプラチン腎症 : Takahashi A, et al. Am J Pathol. 2012、シクロスポリン腎症 : Kimura T, et al. Autophagy. 2013、代謝性アシドーシス : Namba T, et al. JASN. 2014)。

以上の背景から申請者らは腎内皮細胞におけるオートファジーの役割に注目した。尿細管細胞と異なり、ATP 産生におけるミトコ

ンドリアに対する依存度は相対的に低いとされているが、ミトコンドリア由来の活性酸素が内皮細胞傷害の原因として注目されている (Kluge M. A, et al. Circ Res. 2013)。ミトファジーはミトコンドリアを選択的に分解するオートファジーであり、傷害ミトコンドリアを除去することでミトコンドリアの品質管理を行う。また内皮細胞の NAD(P)H oxidase 活性化による活性酸素は NO を消去し、eNOS のアンカップリングを介して内皮細胞傷害を惹起する。酸化ストレスはオートファジーの強力な誘導因子であることから、申請者は、「**オートファジーはミトファジーによる傷害ミトコンドリアの除去や活性酸素によって傷害されたオルガネラを除去することで内皮細胞の redox state を維持し、機能障害を回避することで糸球体傷害の進行を阻止する**」(次頁図) という仮説をたてるに至った。

2. 研究の目的

内皮傷害は慢性腎疾患の成因として重要である。内皮傷害の際にはミトコンドリアや NADPH oxidase 由来の酸化ストレスが重要な役割を果たすこと、酸化ストレスはオートファジーの強力な誘因となりうることから着想を得て、申請者は「**オートファジーはミトファジーによる傷害ミトコンドリアの除去や活性酸素によって傷害されたオルガネラを除去することで内皮細胞の redox state を維持し、機能障害を回避することで腎傷害の進行を阻止する**」という仮説を証明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 「**血管内皮細胞特異的**」オートファジー不全マウスの樹立とその表現型の解析
tie2-CreマウスとAtg5^{flox}マウスを交配することにより**内皮細胞特異的オートファジー不全マウス(KOマウス)**を作成し、**経時的に各臓器の血管構築の相違を解析する。**

HE染色や血管内皮細胞の染色（PECAM-1など）のほか、ホルマウント染色と組織透明化技術を組み合わせて血管構築を3次元で評価する。予備実験にてK0マウスの腎組織所見を評価したところ、4週令では野生型マウスと比較して有意な変化は認められなかったが、9週令では糸球体に係蹄の閉塞、基質の増生、係蹄基底膜の二重化などの変化を認めた。したがって今後糸球体内皮の解析に力点を置く。糸球体構成細胞（糸球体内皮細胞、メサンギウム細胞、足細胞）の多寡や形態（電子顕微鏡レベル）、糸球体内皮細胞のアポトーシスの有無・程度、免疫グロブリンの沈着、内皮細胞傷害時に発現する細胞接着因子（ICAM-1）の発現、WGA染色（糸球体濾過障壁を構成するグリコカリックスで、内皮傷害時に減少する）のほか、尿タンパク量や腎機能についても解析する。

tie2は内皮細胞のみでなく、血球系細胞にも広く発現する(Fumio A, et. al, Cell, 2004)。実際K0マウスは生後より汎血球減少が進行し、9週令で著明な貧血(Hb1-2g/dl)を呈し死亡する。糸球体の変化が血球系細胞のオートファジー不全に起因する可能性を除外する目的で、**骨髄移植により血管内皮細胞特異的にオートファジー不全を呈するマウスを作成する。**具体的にはK0マウスに野生型マウスの骨髄を移植したマウスと野生型マウスにK0マウスの骨髄を移植したマウスを作成し、と同様の解析を行うほか、生存率も解析する。前者のマウスでK0マウスと同様の糸球体糸球体硬化が認められること、後者のマウスでそれが認められないことを確認できれば、K0マウスの表現型が純粋に血管内皮細胞のオートファジー不全に起因することが結論できる。

(2)オートファジーによる糸球体内皮細胞のホメオスタシス維持機構の解明

in vitro実験系を構築する。K0マウスおよび野生型マウスをマグネットビーズ含有PBSで灌流し、マグネットでビーズを含んだ糸球体のみを精製する。内皮細胞条件下で培養したのち、PECAM-1発現細胞(内皮細胞)をソートしてオートファジー不全糸球体内皮細胞およびコントロール細胞を得る。

上記の培養細胞系あるいは単離糸球体、組織標本を用いて、オートファジーによる糸球体内皮細胞のホメオスタシス維持機構を多方面から解析する。

内皮細胞より分泌される一酸化窒素(NO)の評価（単離糸球体で可視化可能：例えば Kidokoro K *et al.* J Am Soc Nephrol. 2013）

内皮細胞から分泌されるPDGFB、SDF-1、von Willebrand factorなどこれまで報告されている内皮由来分泌因子をELISAやウェスタンブロット法で定量する。

酸化ストレスを評価する：ペントシジン・CMLの免疫染色、DCFH染色、尿中8-OHdGなど。申請者の予備実験では、K0マウスの糸球体に、終末糖化合物(advanced glycation end products; AGE)の一種で、酸化ストレスのマーカーでもあるペントシジンの蓄積を認めたことからオートファジー不全糸球体内皮細胞では酸化ストレスを除去できず、機能不全・細胞死に至っていると推測された。さらに申請者は「糸球体内皮細胞においてオートファジーはミトファジー（ミトコンドリア特異的オートファジー）により生体内の主要な活性酸素供給源であるミトコンドリアの恒常性維持を担っており、オートファジー不全では傷害ミトコンドリアが蓄積した結果、酸化ストレスが亢進する」との仮説を立てるに至った。今後培養糸球体内皮細胞や単離糸球体で、蛍光染色インジケータを用いてミトコンドリア機能の低下(TMRE)やミトコンドリア由来の活性酸素(MitoSOX)の増加を示したい。

K0マウスでの内皮細胞傷害と足細胞傷害との連関についても、K0マウスと野生マウスの経時的な変化を検討するとともに、K0マウスおよび野生型マウスの単離糸球体より抽出したmRNAについてマイクロアレイを施行し、内皮傷害が糸球体硬化病変を誘導するメカニズムを解明する。

(3) オートファジーによる糸球体内皮細胞のホメオスタシス維持機構の *in vivo*での検証と疾患との関わり

(2) で述べた仮説を *in vivo*で検証するため、K0マウスおよび野生型マウスに抗酸化剤 (tempolなど) を与え、K0マウスの糸球体病変が改善するかを検証する。さらにその逆にSTZ投与により糖尿病を惹起し(これにより酸化ストレスが亢進する) K0マウスの糸球体病変が悪化するかを検証する。

糖尿病はオートファジーが抑制された状態であるとの観察がある。糖尿病性腎症では糸球体硬化が進行し、その機序として糸球体内皮傷害の存在が示唆されている。本研究での予備実験の結果と合わせ、糖尿病性腎症では本来機能するはずのオートファジーが抑制されており、糸球体内皮傷害が顕在化すると推察される。これを検証するためオートファジーを亢進する薬剤(mTOR阻害剤、レスベラトロールなど既存の薬剤、あるいは開発中の新規の薬剤)を糖尿病マウス(db/dbマウスやAkitaマウスを予定している)に投与して、糸球体病変の発症・進行が抑制されるのかを検証したい。

4. 研究成果

オートファジーは細胞内の主要な分解機構であり、細胞成分の代謝回転に貢献している。我々は血管内皮細胞におけるオートファジーの機能を調べるため、血管内皮特異的オートファジー不全マウス(Tie2-Cre;Atg5^{fllox}マウス、以下K0マウス)を作成したところ、腎糸球体係蹄特異的に異常を認めた。K0マウスでは1ヶ月齢

以降糸球体内皮において活性酸素種の蓄積と炎症が目立ち、2ヶ月齢以降糸球体基底膜の二重化およびメサンギウム基質の増生を呈した。K0マウスは貧血により2-3ヶ月齢で死亡するため、同マウスに野生型マウスの骨髄を移植し12ヶ月齢まで観察した。移植K0マウスの糸球体ではアポトーシス細胞の増加を認め、12ヶ月齢では有意な腎機能低下、尿蛋白増加、メサンギウム融解を伴う糸球体硬化および間質線維化の悪化を認めた。ヒト糸球体内皮細胞においてAtg5をノックダウンしたところ、同様に内皮機能および生存率の低下を認めた。以上よりオートファジーは糸球体係蹄の統合性維持に必須であることが明らかとなった。血管内皮障害は慢性腎疾患の成因として重要であることから、今後オートファジー活性を調節することにより、各種糸球体疾患の治療が可能になると期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

2016年日本腎臓学会総会

「内皮細胞におけるオートファジーは糸球体の統合性維持に必須である」

〔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:

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

難波 倫子 (Namba Tomoko)

大阪大学医学部附属病院・血液浄化部・

医員

研究者番号：30734420

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：