

機関番号：32620

研究種目：若手研究 B

研究期間：2009～2010

課題番号：21790821

研究課題名（和文） 腎糸球体上皮細胞におけるオートファジー関連蛋白の機能解析

研究課題名（英文） The analysis of the role of autophagy related proteins in glomerular epithelial cell

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

研究成果の概要（和文）：

我々は、オートファジー関連蛋白である GABARAP、Atg7 に注目して腎糸球体上皮細胞における機能解析を行った。GABARAP Tg マウスの観察により、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、GABARAP のプロセッシングに必要な Atg7 について、ポドサイト特異的 Atg7 欠損マウスの観察により、ポドサイト障害時に Atg7 が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We analysed the role of autophagy related proteins, GABARAP and Atg7, in the glomerular epithelial cells (podocytes). The observation of GABARAP transgenic mice showed that GABARAP was responsible for an impairment of glomerular function. Atg7 was essential for processing of GABARAP, and we generated podocyte-specific Atg7 deficient mice. The observation of these mice revealed that Atg7 also related to the mechanism of podocyte injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：糸球体上皮細胞、糸球体硬化、ネフローゼ症候群、オートファジー、GABARAP、P62、細胞内蛋白凝集、Atg7

1. 研究開始当初の背景

ポドサイト（糸球体上皮細胞）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。糸球体係蹄壁は内皮細胞、

基底膜、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としての機能を果たしている。その障害はこれらのバリアの破綻を

来し、その結果蛋白尿を引き起こす。ポドサイトは終末分化細胞であり再生しないことから、その障害が大き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、神経特異的蛋白が発現しているなど神経細胞と多くの共通点をもっていることから、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。オートファジーでは、自己消化にあたり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 にて分解された後 Atg7 と Atg3 により気質であるリン脂質と結合し、この LC3-リン脂質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 LC3 と同様の過程を経てリン脂質と結合することはわかっているが、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。当教室では LC3 のホモログである GABARAP のトランスジェニック (Tg) マウスを入手し、GABARAP がポドサイトに強く発現していることを確認しており、GABARAP も LC3 と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る。また、LC3、GABARAP のプロセッシングに必要な 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る。

2. 研究の目的

本研究は、すでに入手済みのオートファジー関連蛋白遺伝子改変マウス (Atg7 FLOX/FLOX, GFP-GABARAP Tg) を利用した実験腎炎モデルの観察と、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腎糸球体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

GABARAPのTgマウスにおける蛋白尿惹起後の組織学的変化の観察および、培養ポドサイトにおけるGABARAP強発現、またはノックダウン後の機能解析、GABARAPの細胞内局在をin vivo, in vitro両面より免疫電顕にて詳細に観察。

さらに、ポドサイト特異的Atg7ノックアウトマウスの作成を行い、表現系の観察と、蛋白尿惹起後の組織学的変化の解析、また培養ポドサイトにおけるAtg7の発現変化後の形態・機能解析を中心に行う。

4. 研究成果

GABARAP Tg マウスの観察により、腎糸球体内においてはGFP-GABARAPが主にポドサイトに発現していることを確認し、GABARAP Tg マウスにおける蛋白尿惹起後の組織学的変化の観察を行った。生理的条件下において明らかな異常はなく、病的条件下での観察を行うためアドリアマイシン(ADR)腎症を惹起したところ、Tgマウスにおいて蛋白尿の遷延と硬化糸球体の増加を認めた。しかし、GFP-GABARAPはLC3と異なりオートファゴソーム上に発現せず、さらにはp62と細胞質内で凝集体を形成していた。GFP-GABARAP/p62の凝集体が糸球体機能の低下に関与しており、GABARAPが糸球体硬化にいたるメカニズムに関与しポドサイト障害からの回復を阻害していることが考えられた。上記は現在論文投稿中である。

また、LC3, GABARAPのプロセッシングに必要な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*, 2006)、さらにオートファゴソームの形成に必要なAtg5について、こ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(Hartleben B et al, *J Clin Invest*, 2010)。Atg7においてもポドサイト

における同様の役割が期待され、Atg7がポドサイトに存在することを確認し、はじめにポドサイト特異的Atg7欠損マウスを作製したところ、生理的条件下で明らかな蛋白尿は認めなかったが、Atg7のポドサイト障害時の役割を検討するため、アドリアマイシン腎症モデルを用いて尿蛋白量の比較を行ったところ、欠損マウスに蛋白尿の有意な増悪を認めたことから、ポドサイト障害時にオートファジーが関与している可能性が示唆された(現在投稿準備中)。

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1件)

- 1) Katsuhiko Asanuma, Miyuki Akiba-Takagi, Fumiko Kodama, Rin Asao, Yoshiko Nagai, Aida Lydia, Hiromitsu Fukuda, Eriko Tanaka, Terumi Shibata, Hisatsugu Takahara, Teruo Hidaka, Etsuko Asanuma, Eiki Kominami, Takashi Ueno, Yasuhiko Tomino; Dendrin location in podocytes is associated with the disease progression in animal and human glomerulopathy. *American Journal of Nephrology*. 2011 accepted on March, 査読:有

[学会発表] (計2件)

- 1) 高木 美幸、浅沼 克彦、浅沼 悦子
他:ポドサイトにおけるGABARAPの役割の検討. 第52回 日本腎臓学会. 2009年6月3日, 横浜
- 2) 高木 美幸、浅沼 克彦、浅沼 悦子
他:GFP-GABARAP (Gamma aminobutyric acid A receptor associated protein)Tgマウスにおけるアドリアマイシン腎症の観察. 第12回 東京腎炎ネフローゼ研究会. 2010年7月24日, 東京・大手町

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

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・非常勤助教

研究者番号：30508172

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし