

令和 5 年 10 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670430

研究課題名（和文）腎臓の発生・障害・再生におけるエネルギー代謝時空間ダイナミクスの解析

研究課題名（英文）Energy dynamics during kidney development, injury and regeneration

研究代表者

柳田 素子（Yanagita, Motoko）

京都大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：70378769

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：アデノシン三リン酸（ATP）はすべての生物に共通するエネルギー代謝の中心的役割を担う重要な物質である。腎臓はATPを大量に産生、消費する臓器であり、ATP量の恒常性の破綻は腎臓病の病態形成メカニズムに寄与すると考えられるが、これまで生体内のATPを動的に観察する手段はなくその詳細は謎に包まれていた。本提案では生体内ATP濃度をリアルタイムに可視化するバイオセンサーを全身に発現したマウスを用いたATPのライブイメージングの手法によって、腎障害時や、腎臓形成時におけるATP濃度の時空間的变化を初めて明らかにすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓病は今や成人8人に1人が罹る国民病であるが、その治療法はまだ確立されていない。腎臓病の病態形成に腎臓のエネルギー代謝異常が関わる可能性が報告されているが、次々と産生と消費とを繰り返すエネルギーのダイナミックな動態を正確に評価する技術がこれまで存在しなかったため、その詳細は謎に包まれていた。本研究では、高い解像度でのエネルギー動態の可視化を実現する遺伝子改変マウスを用いて、腎臓形成期や、腎障害時にエネルギー代謝の変化が重要な役割を担っていることを明らかにした。これらの成果は、腎臓病の病態形成メカニズムの解明や、エネルギー代謝を標的とした新たな治療法の確立に繋がる大きな一歩と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Adenosine 5' triphosphate (ATP) is an important substance that plays a central role in energy metabolism in all living organisms. The kidney constantly produces and consumes a large amounts of ATP and the disruption of ATP homeostasis is thought to contribute to the pathogenesis of kidney diseases. However, there has been no technology that effectively monitored in vivo ATP dynamics. We have developed a novel mouse line expressing an ATP biosensor systemically that visualizes ATP dynamics in vivo in real time. We, for the first time, succeeded in clarifying the spatiotemporal ATP dynamics during renal injury and renal organogenesis by using a live ATP imaging technique.

研究分野：腎臓病学

キーワード：エネルギー代謝

## 1. 研究開始当初の背景

アデノシン三リン酸 (ATP) はすべての生物に共通するエネルギー代謝の中核分子であり、「エネルギー通貨」とも呼ばれている重要な物質である。腎臓の機能単位であるネフロンは、血液を濾過する糸球体と、糸球体で濾過された原尿から溶質を取捨選択する尿細管から成り立っており、糸球体の構造維持や、尿細管に発現する様々なトランスポーターやチャネルの駆動に多量の ATP が消費される。実際に腎臓は脳、心臓と並びエネルギー需要の非常に高い臓器であり、それを裏付けるように腎臓の尿細管には細胞内 ATP の産生の中心的な役割を担うミトコンドリアが多量に存在していることが知られている。腎障害時にミトコンドリアの機能が低下すると、腎臓における広範な物質輸送が低下し、体液電解質バランスや老廃物の排泄が機能不全に陥ることが知られている。またミトコンドリア機能不全マウス (FASEB J 2013) や、ミトコンドリア異常の一家系 (Pediatr Nephrol 2013) は種々の腎機能障害を呈することが報告されており、腎臓の機能維持における ATP を含むエネルギー代謝や、ミトコンドリア機能の重要性が示唆される。また、腎臓の発生期においても、エネルギー代謝は重要な役割を果たすと考えられている。ヒトの腎臓の形態形成は妊娠後期に完了すると報告されており、出生後、生涯にわたって新しいネフロンが形成されることはない。したがって母体の環境は腎臓の発達に非常に重要な影響を及ぼすと考えられる。母体の栄養不良はネフロン数の減少と関連し、その後の人生において高血圧や慢性腎臓病のリスクが増加することも報告されている。しかし、何がネフロン数を決定するのか、またネフロン形成時の代謝状態についてもほとんどこれまで研究されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

「1. 研究開始当初の背景」で述べたように、腎臓の障害時や発生期における ATP 動態やその制御機構を解明することは、腎臓の病態メカニズムを理解する上で非常に重要であると考え、細胞内 ATP 濃度の臓器機能との関連を明らかにする本研究を着想した。しかしながら、これまで、腎臓の間質液中 (Am J Physiol 2006) や管腔内 (JASN 2006) に分泌された細胞外 ATP 濃度は測定が可能であったが、細胞機能を直接的に調節する細胞内 ATP 濃度は、組織抽出物中 ATP 濃度測定による研究手法でしか測定することができず、細胞・組織内における ATP の濃度勾配や経時的な動態の解明する手段がなかったため、その詳細は謎に包まれていた。しかも、腎臓は非常に多種多様な細胞から構成される臓器で

あり、それぞれの細胞毎での解析が必要とされるため、その解明は技術的に困難であった。分担研究者の今村博臣らは細胞内 ATP 濃度を可視化する FRET バイオセンサー (ATeam) を開発し、ATP を生きた細胞内でリアルタイムに可視化することを世界で初めて可能にした (PNAS 2009)。本研究の目的は、このバイオセンサー ATeam を全身に発現させた R26ATeam マウスを作成し、二光子顕微鏡を用いて腎臓の発生・障害・再生における生体内 ATP イメージングを行い、胎生期・生理的・病理的条件下における ATP の時間的・空間的な変動を明らかにするとともに、その変動が発生や臓器機能にもたらす影響を解明することを目標とする。また、腎臓病におけるエネルギー代謝変化の可視化が可能になれば、腎臓病進展・回復の新たな側面が明らかになり、腎臓病の治療介入の新たな可能を探るブレイクスルーになると考えた。

## 3. 研究の方法

本提案では生体内 ATP 濃度をリアルタイムに可視化する FRET バイオセンサー (ATeam) を全身に発現した R26ATeam マウスを用いて、成体腎、胎児腎の器官培養を用いた ATP ライブイメージングによって、生理的条件下、腎障害時、器官形成時における ATP 濃度の時空間的变化を初めて明らかにする。さらにその ATP 濃度変化が臓器機能に与える影響を解明する。成体腎では、生理的・病理的条件下の ATP の時空間的变化を検証し、ATP 濃度変化が臓器機能に与える影響を解明する。具体的には、一般的によくマウスにおける急性腎障害のモデルとして用いられる虚血再灌流を惹起して、傷害前後の経時的な ATP 変化とその後の腎傷害に関しての検証を行った。また二光子顕微鏡におけるライブイメージングの手法を用いて、同様に腎臓の間質領域を還流する傍尿細管毛細血管の血流量に関する評価を行った。さらには、この傷害を軽減しうる介入実験に関する検討を行った。器官培養を用いた実験では胎児プログラミングを惹起する低栄養や低酸素状態による ATP の時空間的变化を検証し、ATP 濃度変化が腎発生に与える影響の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 生体腎臓内 ATP 濃度と腎障害生体腎臓内 ATP 濃度と腎障害・修復の関連性の検討  
本項目では成体 R26ATeam マウス (図 1) を用いて腎障害と修復に伴う ATP 変動と組織内分布の検証を行った。まず我々は二光子顕微鏡を用いることで生体腎臓における一細胞レベルの細胞内 ATP 動態のリアルタイムな評価系を確立した (図 2)。急性腎傷害モデルとし

て虚血再灌流傷害モデルを用い、腎臓の虚血とともに腎臓の近位尿細管（急性腎障害時に最も障害を受けやすい部位）のATPが速やかに低下することを認めた（図3）。

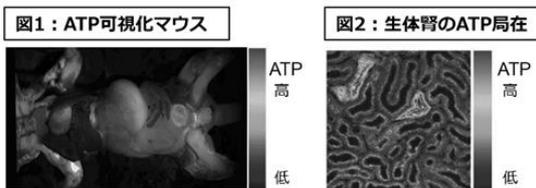
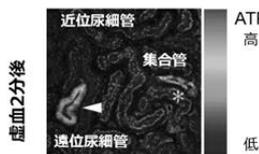


図3：虚血で近位尿細管は速やかに低下する



一方、他の遠位尿細管や、集合管では虚血後のATP低下が遅く、比較的長期間の虚血においてもATPが保たれることを発見した。再灌流後にはATP低下を認めた近位尿細管で、部分的なATP回復を認めるが、虚血時間が長くなるほど近位尿細管のATP回復は不良であり、ATPの回復の程度と回復速度が不良であることが、慢性期の腎線維化を促進する予後不良因子であることを見出した（図4）。このATPの回復不良の原因に関しては、再灌流後の近位尿細管のミトコンドリアに関して電子顕微鏡による形態評価と、再灌流後の尿細管領域の血流評価を行い、両者がともに関与している可能性が考えられた（J Am Soc Nephrol 2020）。また低体温療法（33℃）がこの急性腎障害時の近位尿細管のATP回復とATP回復速度を改善し、慢性期の線維化を抑制することを示した（図5）。この結果は、実臨床における低体温療法の有用性の論理的根拠を示すものであり、またエネルギー消費抑制および障害時のATP保持が腎保護に有益であることを示唆していると考えられる。

図4：急性期の近位尿細管ATP回復と慢性期の線維化領域は強い負の相関を示す

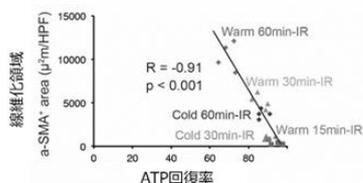
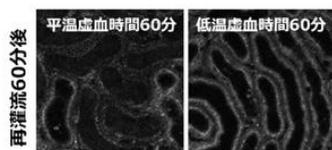


図5：低温条件下の虚血では平温条件下に比べてATPの回復は著明に改善する



この結果を踏まえ、我々は次に虚血再灌流モデルにおける糸球体上皮細胞（ポドサイト）のATPを観察した。ポドサイトは糸球体濾過障壁の維持のために安定したATP供給を必要とすると考えられてきたが、腎障害時のポドサイトのATP動態については未解明である。雄よりも糸球体が腎表面に存在する雌のATeamマウスを用いて観察を行ったところ、虚血中のポドサイトのATP低下は遠位尿細管同様に緩徐であり、虚血中に解糖によってATPを産生していることが示唆された。さらに、虚血時間が長くなると再灌流直後のポドサイトのATP回復が悪化すること、この急性期のATP回復が悪いと障害慢性期には足突起の癒合やミトコンドリア断片化といった異常所見がポドサイトに出現すること、ミトコンドリア断片化を薬理的に抑制すると足突起の癒合も軽減することが示された。

以上より、虚血性腎障害モデルにおいては、障害急性期のATP変動が尿細管障害および糸球体障害と密接に関連することが示唆された。

## (2) 胎児腎における *ex-vivo* imaging

前述のように、腎臓は胎児プログラミングを受けやすい臓器であり、低酸素や低栄養、様々な薬物が腎発生に影響を与えうると考えるが、その詳細な分子基盤は明らかではない。我々はR26ATeamマウスの胎児腎器官培養を用いて、発生の過程で胎児腎のどの部位でATP濃度がどのように変動するのか検証を行った。まず我々は、R26ATeam妊娠マウスから取り出した胎生E11.5~12.5の腎臓を培養下で経時的に観察することが可能な系を確立した（JSN 2016）。臓器培養下で、腎臓の前駆組織である尿管芽（集合管、尿管のもと）は後腎間葉（糸球体、尿細管のもと）に向かって伸長し、分岐を繰り返すことが経時的に観察された。この間の細胞内ATPに関して観察を行ったところ、腎発生時における、尿管芽や後腎間葉の1細胞レベルでの細胞内ATPの可視化に成功した。また尿管芽細胞は先端細胞と幹部細胞から構成されるが、尿管芽先端細胞のATPレベルは尿管芽幹部および後腎間葉細胞のそれよりも有意に低いことがわかった（JSN 2017）。

## 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. Yamamoto S, Yamamoto M, Nakamura J, Mii A, Yamamoto S, Takahashi M, Kaneko K, Uchino E, Sato Y, Fukuma S, Imamura H, Matsuda M, Yanagita M. Spatiotemporal ATP Dynamics during AKI Predict Renal Prognosis. J Am Soc Nephrol. 2020 Dec;31(12):2855-2869. doi:10.1681/ASN.2020050580. 査読有

[学会発表] (計 22 件)

1. 山本 伸也, 中村 仁, 三井 亜希子, 山本恵則, 今村 博臣, 山本 正道, 柳田 素子. 尿細管上皮細胞内ATPの in vivo imaging(急性腎傷害時のATP変動解析). 第59回日本腎臓学会学術総会 横浜 2016. 6. 17
2. 三井 亜希子, 山本 伸也, 中村 仁, 山本恵則, 今村 博臣, 山本 正道, 柳田 素子. 胎生期腎臓のATPイメージング. 第59回日本腎臓学会学術総会 横浜 2016. 6. 17
3. 山本 伸也, 中村 仁, 三井 亜希子, 今村 博臣, 山本 正道, 柳田 素子. 腎臓におけるエネルギー代謝の in vivo imaging. 第59回日本腎臓学会学術総会 横浜 2016. 6. 17
4. 三井 亜希子, 山本 伸也, 山本 恵則, 今村 博臣, 山本 正道, 柳田 素子. 腎発生過程におけるエネルギー代謝の検討. 第60回日本腎臓学会学術総会 仙台 2017. 5. 26
5. 山本 伸也, 三井 亜希子, 山本 正道, 柳田 素子. 急性腎障害における近位尿細管のエネルギー代謝回復が腎予後を決定する. 第60回日本腎臓学会学術総会 仙台 2017. 5. 26
6. 山本 伸也, 三井 亜希子, 山本 恵則, 今村 博臣, 山本 正道, 柳田 素子. 腎障害とATP in vivo imaging. 第60回日本腎臓学会学術総会 仙台 2017. 5. 26
7. Shinya Yamamoto, Masamichi Yamamoto, Motoko Yanagita. New intravital imaging technique visualizes renal dynamics during AKI predicting renal prognosis. ASN Kidney week New Orleans, U.S.A 2017 11. 2
8. 山本 伸也, 今村 博臣, 山本 正道, 柳田 素子. 急性腎障害における生体腎ATPイメージング法の確立. 第8回腎不全研究会 東京 2017. 12. 10
9. 山本 伸也, 山本 正道, 柳田 素子. Visualization of renal ATP dynamics during AKI. ISN Frontiers Meetings 2018 東京 2018. 2. 22
10. 山本 伸也, 山本 正道, 柳田 素子. 腎ATPライブイメージング法の確立及びATP動態と腎予後の関連性の解析. 第61回日本腎臓学会学術総会 新潟 2018. 6. 8
11. 山本 伸也, 山本 恵則, 高橋 昌宏, 今村 博臣, 山本 正道, 柳田 素子. 生体腎におけるATPイメージング法の確立及びATP動態と腎予後の関連性の解析. 日本内科学会総会 名古屋 2019. 4. 26
12. Masahiro Takahashi, Shigenori Yamamoto, Masamichi Yamamoto, Motoko Yanagita. Spatiotemporal dynamics of ATP in podocytes during ischemia reperfusion injury predicted foot process effacement. ASN Kidney week Washington DC, U.S.A 2019 11. 5-10
13. 高橋昌宏, 山本恵則, 山本正道, 柳田素子. 生体内ATPイメージングを用いた虚血

再灌流障害時のポドサイト障害の病態解明. 第5回ポドサイト研究会 オンライン 2021 3. 6

14. 高橋昌宏, 山本恵則, 山本正道, 柳田素子. ATPライブイメージングを用いた虚血再灌流障害時のポドサイト障害の病態解明. 日本腎臓学会学術総会 横浜 2021 6. 18-20
15. 山本 伸也, 山本 正道, 柳田 素子. 生体イメージング法からせまる急性腎障害病態. 第94回日本生化学会大会 横浜 2021. 11. 3-5
16. 山本 伸也, 山本 正道, 柳田 素子. 急性腎障害におけるATPダイナミクスは腎予後を規定する. 第44回日本分子生物学会 横浜 2021. 12. 1-3
17. 高橋昌宏, 山本恵則, 山本伸也, 山本正道, 柳田素子. ATPライブイメージングを用いた虚血後ポドサイト障害の病態解析. Japan Kidney Council オンライン 2021. 12. 18-19
18. 高橋昌宏, 山本恵則, 山本伸也, 山本正道, 柳田素子. 虚血再灌流障害はポドサイトにATP代謝異常とミトコンドリア断片化を来し、足突起癒合を惹起する. 第6回ポドサイト研究会 千葉 2022. 3. 26
19. 高橋昌宏, 山本恵則, 山本正道, 柳田素子. 腎糸球体ATPライブイメージングと虚血後ポドサイト障害の病態解明. 日本内科学会総会 京都 2022. 4. 15-17
20. 高橋昌宏, 大久保明紘, 山本恵則, 山本伸也, 柳田素子. ATP動態とミトコンドリア形態変化から虚血後ポドサイト障害を解明する. 日本腎臓学会学術総会 神戸 2022. 6. 10-12
21. 山本 伸也, 高橋 昌宏, 山本 恵則, 大久保 明紘, 三井 亜希子, 柳田 素子. 腎全領域のATPイメージングからせまる腎病態. 日本腎臓学会学術総会 神戸 2022. 6. 11
22. Masahiro Takahashi, Shinya Yamamoto, Shigenori Yamamoto, Akihiro Okubo, Masamichi Yamamoto, Motoko Yanagita. Dynamic ATP changes and mitochondrial fragmentation in podocytes during ischemia reperfusion injury determines their future structure and function. ASN Kidney week Orland Florida 2022 11. 1-6

[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

URL <http://www.kidney.kuhp.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳田 素子 (YANAGITA Motoko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・  
教授

研究者番号：70378769

(2) 研究分担者

今村 博臣 (IMAMURA Hiromi)

京都大学・白眉センター(生命科学研究  
科)・准教授

研究者番号：20422545

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：