

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16082

研究課題名(和文)腎尿細管のマイトファジーの選択性を規定する分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms which determine selectivity of mitophagy in kidney tubular cells.

研究代表者

南 聡 (Minami, Satoshi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00791592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、自己の細胞質成分をリソソームで分解するシステムであり、特にミトコンドリアのオートファジー(=マイトファジー)はミトコンドリア品質維持に重要な役割を果たす。本研究では、組織特異的にマイトファジーをモニタリングするマウスを作成したと同時に腎尿細管におけるオートファジーは1型糖尿病や高リン負荷、急性腎傷害から慢性腎不全への移行時において活性化しミトコンドリア保護的に働く一方で、2型糖尿病モデルではオートファジーが抑制されていることが明らかとなった。またマイトファジーの一部はPINK1/Parkin依存性であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では組織特異的にマイトファジーをモニタリングするマウスを作成したが、このマウスを使用することで今後腎疾患に限らず様々な疾患においてマイトファジー活性を正確にモニターすることが可能である。更に遺伝学的スクリーニングや化合物ライブラリーを用いたスクリーニングと併用することによりマイトファジー制御分子機構の解明やマイトファジー活性化薬の開発の一助となることが期待される。また本研究では2型糖尿病の腎尿細管ではマイトファジーが抑制されていることが明らかとなり今後2型糖尿病性腎症に対してマイトファジーを活性化する治療法が有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a self-degradation system in lysosomes. Especially, autophagic elimination of mitochondria, referred to as mitophagy, plays an important role to maintain mitochondrial quality. In this study, we established tissue-specific mitophagy monitoring mice. We also elucidated that autophagy was activated and protected mitochondrial function in kidney tubules under type 1 diabetes, hyperphosphatemia and AKI-CKD transition, whereas autophagy was repressed under type 2 diabetes. Moreover, our study suggested that mitophagy in kidney tubules was dependent at least in part on PINK1/Parkin pathway.

研究分野：腎臓内科

キーワード：オートファジー マイトファジー 尿細管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、ユビキチン-プロテアソーム系と並ぶ主要な細胞内分解システムであり、リソソームにおける細胞質成分(タンパク質や細胞内器官)分解の総称である。オートファジーの最も重要な役割は、飢餓に陥ったときの栄養源確保であるが、飢餓以外の低酸素や酸化ストレスによってもオートファジーが誘導され、生体にとって有害な物質の除去・分解を通じて細胞内品質管理の役割を果たしている。

腎近位尿細管細胞はエネルギー要求性が高く、ミトコンドリアを豊富に含有する。種々のストレス下(加齢、虚血再灌流、シスプラチン投与、アシドーシス)において、オートファジー不全状態(Atg5 ノックアウト)の尿細管では、変形し機能の低下したミトコンドリアが散見されること、培養近位尿細管細胞においてこれらの負荷をかけると、ミトコンドリアとオートファゴソームの局在が観察されることから、これらの負荷下ではミトコンドリア特異的オートファジー(マイトファジー)が惹起されていると推測された。また最近の論文でマイトファジーのレポーターマウス(mito-QC マウス)が樹立・解析され、腎近位尿細管では他の臓器に比較してもマイトファジーが極めて活発に生じていると報告された。しかしマイトファジーの機構そのものの詳細は明らかでない。

2. 研究の目的

腎尿細管におけるマイトファジーの分子機構、特に傷害ミトコンドリアのマイトファジーによる認識機構を解明、その病態生理学的意義を探求し、最終的に薬剤によりマイトファジーを調節することにより腎保護を実現する道筋をつけることにある。

3. 研究の方法

mitoQC マウスを用いて近位尿細管にマイトファジーが活発に起こる条件を探索する。

マイトファジーが活発に起こる条件においてマイトファジーの病態生理学的意義を探求する。

マイトファジーが活発に生じている条件下において、近位尿細管を単離し、マイトファジーにかかわる受容体を同定する。

4. 研究成果

(1)研究当初はmitoQC マウス(GFP-mCherry-Fis1 発現マウス[Fis1はミトコンドリア構成因子])を用いて腎近位尿細管のマイトファジー活性を検証する予定であった。本マウスはミトコンドリアがリソソームに取り込まれた時点で、酸性環境によりGFPの蛍光強度が消失し、mCherryの蛍光が残ることでマイトファジーの検出を可能にする(McWilliams TG, et al. J Cell Biol.). 既報の通り定常状態では近位尿細管でGFP陰性mCherry陽性のdotの蓄積を著明に認めただ一方、電子顕微鏡での観察では定常状態ではほとんどマイトファジーを認めず、結果に矛盾が生じた。mitoQC マウスで尿細管にmCherry陽性dotの蓄積を認めるのは、他臓器から排泄されたmCherryを尿細管が取り込んでいることによる可能性を考え、尿細管特異的にmCherry-GFP-MTS[MTSはミトコンドリアの構成因子]を発現するマウスを作製し、現在解析中である(図1参照)。

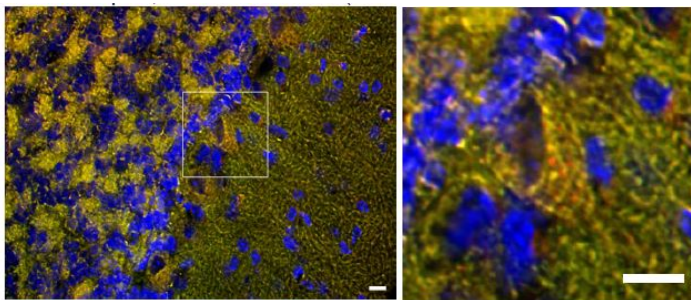


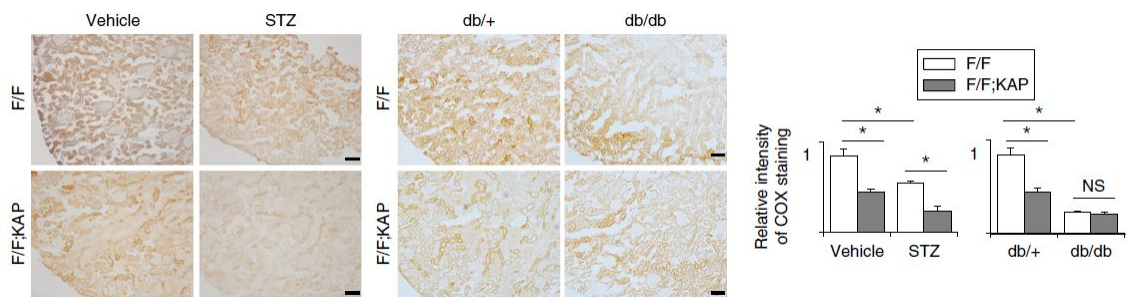
図1: 神経細胞特異的にmCherry-GFP-MTSを発現するマウスの大脳切片。ミトコンドリアはmCherryとGFPを共発現し黄色にみえるが一部のミトコンドリアはGFP陰性mCherry陽性のdotを認め定常状態でのマイトファジーが大脳において存在することが明らかとなった。現在腎近位尿細管細胞特異的にmCherry-GFP-MTSを発現するマウスを作成し解析中である。

(2)上記の通り、mitoQC マウスでは腎近位尿細管のマイトファジー活性を検証するのは難しいと考えられたため、野生型マウスと近位尿細管特異的Atg5 ノックアウトマウス(オートファジー不全マウス)それぞれに対して種々の病態条件下で、ミトコンドリア機能評価や電顕によるマイトファジーの観察を行うことにより、マイトファジーが活発に起こる条件を探索することとした。その成果として下記 ~ の通りである。

糖尿病における近位尿細管でのマイトファジーの役割

1型糖尿病モデルマウス(STZ; ストレプトゾトシン投与マウス)において、オートファジーが活性化していること、またオートファジーを欠損させたところミトコンドリア傷害が顕著になることを明らかとした一方で、2型糖尿病モデルマウス(db/db マウス)では、オートファジーを欠損させてもミトコンドリア傷害が顕著にはならないことを明らかとした。更なる検討により1型糖尿病では高血糖・低インスリンによりオートファジー、マイトファジー活性が平常時より亢進し、保護的に作用している一方で、2型糖尿病は、高インスリン血症によりオートファジー、マ

イトファジーの誘導が必要時においても抑制されている病態であることが判明した。

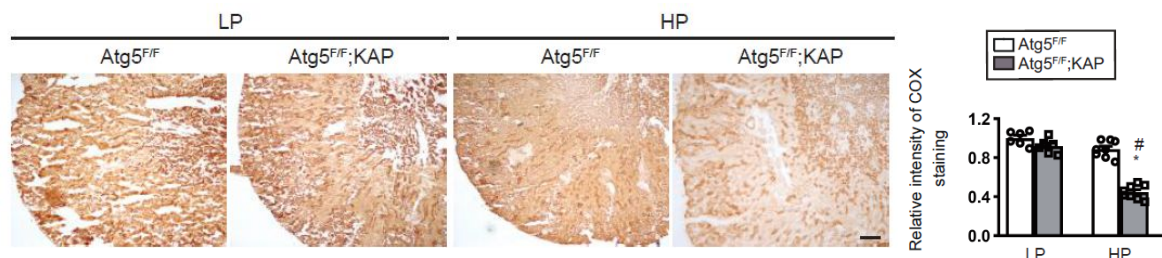


(図 2)COX 染色

ミトコンドリア機能を COX 染色で評価した。1 型糖尿病モデルマウス(STZ 投与マウス)では野生型マウス(F/F)に比してオートファジー不全マウス(F/F;KAP)のミトコンドリア機能が顕著に低下している一方で、2 型糖尿病モデルマウス(db/db マウス)では野生型マウス(F/F)とオートファジー不全マウス(F/F;KAP)のミトコンドリア機能は不変であった。

高リン負荷における近位尿細管でのマイトファジーの役割

高リン負荷モデルマウスにおいて、野生型マウスに比してオートファジー欠損マウスではミトコンドリア傷害が顕著になること、腎傷害が進行することを明らかとし、高リン負荷下におけるオートファジー、マイトファジーの重要性が明らかとなった。



(図 3)COX 染色:高リン負荷モデルマウスにおいて、野生型マウス($Atg5^{F/F}$)に比してオートファジー欠損マウス($Atg5^{F/F};KAP$)ではミトコンドリア傷害が顕著となった。

急性腎傷害から慢性腎不全への移行時のマイトファジーの役割

急性腎傷害から慢性腎不全への移行時にオートファジーが活性化していること、またその時期にのみオートファジーを欠損させたところミトコンドリア傷害が顕著になることを明らかとした。更に電子顕微鏡検査にて著明なマイトファジー像をとらえることができた。

上記 ~ の病態において既知のマイトファジー関連分子である PINK1/Parkin の活性化を確認していることから、腎尿細管におけるマイトファジーの一部は PINK1/Parkin 依存性であると考えている。しかし腎尿細管におけるマイトファジーが PINK1/Parkin によってのみ生じるのか、あるいは別の分子によって生じるのかが今後の課題である。この問題については今後 PINK1 あるいは Parkin の欠損マウスとマイトファジーモニタリングマウスを交配することで解決可能と考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakai Shinsuke, Yamamoto Takeshi, Takabatake Yoshitsugu, Takahashi Atsushi, Namba-Hamano Tomoko, Minami Satoshi, Fujimura Ryuta, Yonishi Hiroaki, Matsuda Jun, Hesaka Atsushi, Matsui Isao, Matsusaka Taiji, Niimura Fumio, Yanagita Motoko, Isaka Yoshitaka	4. 巻 30
2. 論文標題 Proximal Tubule Autophagy Differs in Type 1 and 2 Diabetes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 929 ~ 945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2018100983	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujimura Ryuta, Yamamoto Takeshi, Takabatake Yoshitsugu, Takahashi Atsushi, Namba-Hamano Tomoko, Minami Satoshi, Sakai Shinsuke, Matsuda Jun, Hesaka Atsushi, Yonishi Hiroaki, Nakamura Jun, Matsui Isao, Matsusaka Taiji, Niimura Fumio, Yanagita Motoko, Isaka Yoshitaka	4. 巻 524
2. 論文標題 Autophagy protects kidney from phosphate-induced mitochondrial injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 636 ~ 642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ryuta Fujimura, Takeshi Yamamoto, Yoshitsugu Takabatake, Satoshi Minami, Atsushi Takahashi, Tomoko Namba, Jun Matsuda, Shinsuke Sakai, Isao Matsui, Fumio Niimura, Taiji Matsusaka, Yoshitaka Isaka.
2. 発表標題 Autophagy Protects Kidney Proximal Tubules from Phosphate-Mediated Mitochondrial Dysfunction
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤村龍太、山本毅士、高島義嗣、南聡、酒井晋介、高橋篤史、難波倫子、松田潤、松井功、坂口悠介、濱野高行、新村文男、松阪泰二、猪阪義隆
2. 発表標題 オートファジーは高リン負荷による腎尿細管ミトコンドリア傷害に対抗する
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Fujimura R, Yamamoto T, Takabatake Y, Minami S, Sakai S, Takahashi A, Namba-Hamano T, Matsuda J, Matsui I, Sakaguchi Y, Hamano T, Niimura F, Matsusaka T, Yoshimori T, Isaka Y.
2. 発表標題	Autophagy protects kidney proximal tubules from phosphate-mediated mitochondrial dysfunction
3. 学会等名	ISN Frontiers 2018 (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Satoshi Minami, Takeshi Yamamoto, Yoshitsugu Takabatake, Atsushi Takahashi, Tomoko Namba, Jun Matsuda Ryuta Fujimura, Shinsuke Sakai, Taiji Matsusaka, Fumio Niimura, Motoko Yanagita, and Yoshitaka Isaka
2. 発表標題	Autophagy Suppresses Progression of AKI to CKD
3. 学会等名	ISN frontiers Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Shinsuke Sakai, Takeshi Yamamoto, Yoshitsugu Takabatake, Atsushi Takahashi, Tomoko Namba, Satoshi Minami, Ryuta Fujimura, Jun Matsuda, Tomonori Kimura, Taiji Matsusaka, Fumio Niimura, Yoshitaka Isaka.
2. 発表標題	Distinct Patterns of Dysregulated Autophagy in Type 1 and 2 Diabetic Nephropathy
3. 学会等名	American Society of Nephrology Kidney Week 2017 (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	酒井晋介、山本毅士、高畠義嗣、高橋篤史、難波倫子、木村友則、松田潤、南聡、藤村龍太、新村文男、松阪泰二、猪阪善隆
2. 発表標題	糖尿病性腎症における腎尿管オートファジー活性は1型糖尿病と2型糖尿病において異なる
3. 学会等名	第60回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年	2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----