

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15999

研究課題名（和文）転写因子MAFBによる糸球体上皮細胞のオートファジー制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of autophagy in podocyte by the transcription factor MAFB

研究代表者

山原 康佑（Yamahara, Kosuke）

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：50731915

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝子組み換え技術を用いた転写因子MAFBの制御により、MAFBがオートファジー活性化を介した細胞保護的な作用を有することを明らかとした。MAFBによりポリアミン代謝酵素が誘導される結果、スペルミジンの濃度が上昇し、スペルミジンによりオートファジーが誘導されることを確認した。本結果により、糸球体上皮細胞においてMAFB-スペルミジン-オートファジーという分子機構の存在が明らかとなり、新たな治療標的となりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸球体上皮細胞におけるオートファジーの活性化は、慢性腎臓病に対する有望な治療標的と考えられている。しかしながら、オートファジーの制御機構については不明な点が多かった。本研究により、糸球体上皮細胞で強く発現する転写因子MAFBが、ポリアミン経路の代謝を変化させることで細胞保護的なオートファジーを制御していることが明らかとなった。ポリアミンによる糸球体上皮細胞オートファジーの活性化が慢性腎臓病の新たな治療法となる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：By regulating the transcription factor MAFB using recombinant technology, we found that MAFB has a cytoprotective effect through autophagy activation. We confirmed that MAFB induced polyamine metabolizing enzymes, increased spermidine levels, and spermidine induced autophagy. These results revealed the existence of a molecular mechanism of MAFB-spermidine-autophagy in podocytes, suggesting that it may be a new therapeutic target.

研究分野：腎臓内科

キーワード：ポドサイト オートファジー MAFB ポリアミン

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性腎臓病の患者数は増加しているが、有効な治療法に乏しいことが問題となっており、新たな治療法の開発が待たれている。糸球体上皮細胞は、血中から原尿中へ蛋白質の漏出を防ぐ役割を持つ終末分化細胞であり、糸球体上皮細胞の障害は、蛋白尿の原因となる。その結果として、腎機能が低下することが知られており、糸球体上皮細胞の保護は慢性腎臓病の重要な治療戦略と考えられている。

これまで、糸球体上皮細胞の保護は様々な機序から検討がなされており、それらの中でもオートファジーは大きく期待されている分子機構である。オートファジーは、不要となった細胞内小器官を加水分解し、アミノ酸として再利用する細胞内蛋白質分解機構の1つである。糸球体上皮細胞は、高いオートファジー活性を有していることから、オートファジーの重要性が示唆されてきた。申請者らは、マウスの糸球体上皮細胞特異的にオートファジーを欠損させると、高脂肪食負荷による糖尿病刺激に対して尿蛋白量がより増加することを明らかにした。この結果は、糸球体上皮細胞の高いオートファジー活性は細胞保護にとって重要であり、オートファジーの活性を高く保つことが、新たな治療標的となることを示唆するものである。

一方で、申請者らは、糸球体上皮細胞のオートファジーは、他の細胞とは異なる制御を受けていることを明らかとしてきた。各種遺伝子組み換えマウスを用いた検討の結果、糸球体上皮細胞には栄養感知経路 mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex1) によるリン酸化機構に依存しない特有のオートファジー制御機構が存在し、この未知の制御機構が糸球体上皮細胞のオートファジーの活性化に大きな役割を担っていることを明らかとした。

糸球体上皮細胞におけるオートファジーの制御機構を明らかとし、オートファジーを高く保つことができれば、有望な治療戦略となると考えられてきた。

2. 研究の目的

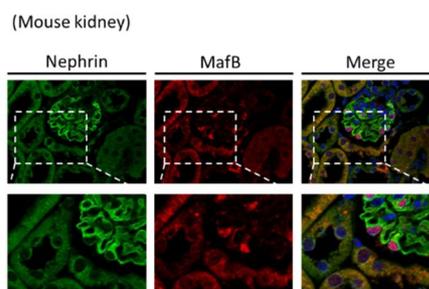
オートファジーの活性化による糸球体上皮細胞の保護を目指す場合、未知のオートファジー制御機構の同定は必要不可欠である。そこで、申請者は糸球体上皮細胞のオートファジーを制御する新たな候補分子として、糸球体上皮細胞で強く発現している転写因子 V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (以下: MAFB) に着目した。転写因子データベースからの検索によると、MAFB は一部のオートファジー関連遺伝子の upstream に結合する。そこで、糸球体上皮細胞では MAFB によりオートファゴソームの材料となるオートファジー関連蛋白質の発現が上昇し、転写レベルでオートファジーを活性化しているという仮説を立てた。

本研究を通じ、転写因子 MAFB とオートファジーの関連性について明らかとし、新たな治療標的として確立することを目指した。

3. 研究の方法

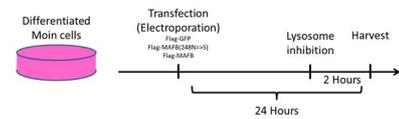
MAFB 発現個所の確認

糸球体上皮細胞において MAFB が発現しているのかどうか、マウス腎組織と初代糸球体上皮細胞培養細胞に対して免疫染色・ウェスタンブロッティングを施行した。
→腎組織・初代培養細胞の両方において、核内に MAFB 蛋白質が発現していることを確認した。

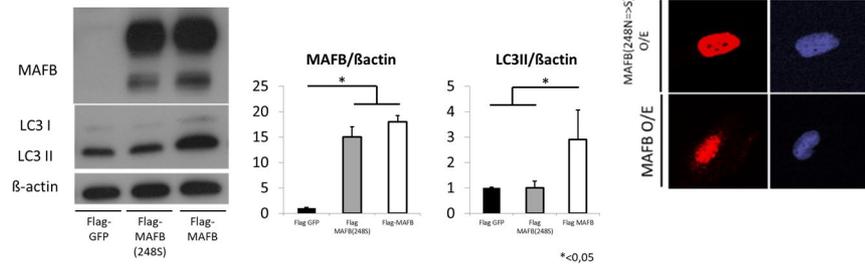


MAFB の遺伝子導入によるオートファジー活性化の確認

エレクトロポレーション法を用いて MAFB 遺伝子ならびに不活化 MAFB 遺伝子 (248N>S: ドミナントネガティブ) を分化系球体上皮細胞に導入し、オートファジーの活性を確認した。

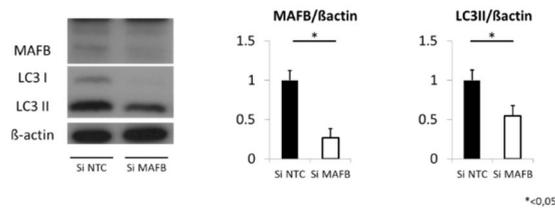


→MAFB は核内に存在し、過剰発現した MAFB でオートファジーが活性化することを確認した。



さらにエレクトロポレーション法を用い MAFB 抑制遺伝子を導入し、オートファジー活性を確認した。

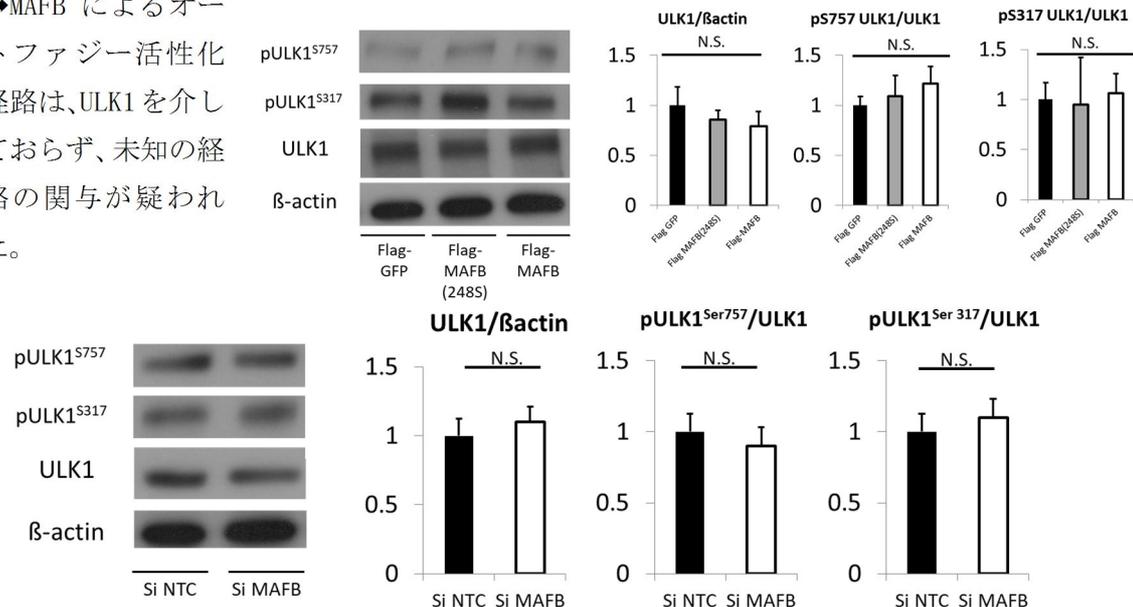
→MAFB の抑制でオートファジーが抑制されることを確認した。



MAFB によるオートファジー活性化経路の検討

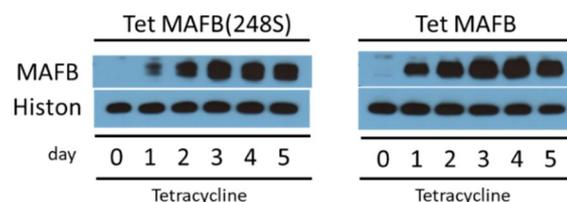
オートファジー活性化経路として、栄養感知経路 mTORC1-ULK1 経路が知られているが、MAFB 発現調整により ULK1 のリン酸化が変化するか検討した。

→MAFB によるオートファジー活性化経路は、ULK1 を介しておらず、未知の経路の関与が疑われた。



薬剤誘導性系球体上皮細胞 MAFB 発現変化株の作製

通常、培養系球体上皮細胞は、33 環境で増殖させ、37 環境で分化をさせ検討を行う。しかし、37 で分化させた細胞は、リポフェクタミン法によるベクター感染が難しく、エレクトロポレーション法でのベクター導入が必要である。しかしながら、エレクトロポレーション法は、分化培養細胞を大きく障害するため、細胞の恒常性は安定しない。より細



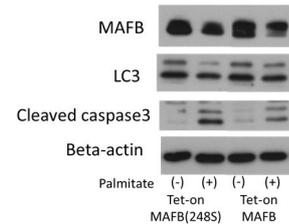
胞が安定した状態を検討できるように、薬剤誘導性に MAFB の発現調整が可能となる細胞株を、レンチウイルスを用いたベクター導入法で作製した。

➡テトラサイクリン誘導性 MAFB 過剰発現細胞株 (MAFB 活性化株)、テトラサイクリン誘導性不活型 MAFB 過剰発現細胞株 (248N>S: ドミナントネガティブ株) の作製に成功した。

MAFB 過剰発現による細胞毒性の検討

薬剤誘導性 MAFB 発現調整細胞に対し、パルミチン酸による脂肪毒性刺激を与え、アポトーシスを評価した。

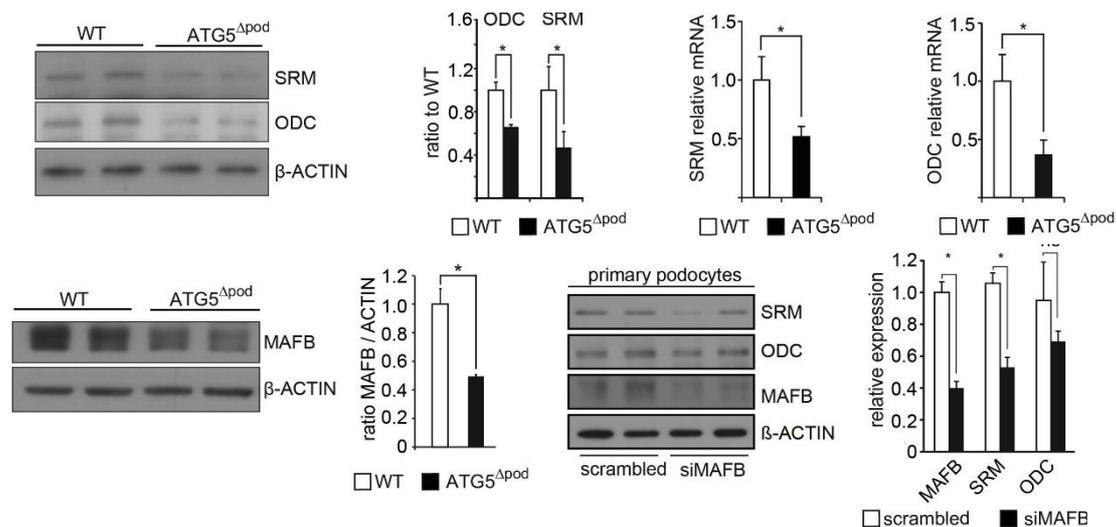
➡MAFB 過剰発現によりオートファジーが活性化し、アポトーシスが抑制された。



MAFB によって誘導される分子の検討

MAFB によって誘導される分子機構について Motif map を用いて検索し、モノアミン代謝経路が候補として明らかとなった。オートファジー・モノアミン代謝物・MAFB の関連性について検討した。

➡モノアミン代謝物の一種であるスペルミジンがオートファジーの活性化を引き起こし、さらに MAFB によってモノアミン代謝酵素が誘導され、スペルミジンが産生されていることが判明した。



4. 研究成果

糸球体上皮細胞において、転写因子 MAFB はポリアミン経路を制御することによってオートファジーを活性化し細胞保護的な作用を有することが示唆された。MAFB-ポリアミン代謝経路は新たな治療標的となりうることが示唆された。

共同研究者らとともに本業績をまとめ、下記雑誌に掲載された。

Liang, W., **Yamahara, K.**, Hernando-Erhard, C., Lagies, S., Wanner, N., Liang, H., ... & Bork, T. (2020). A reciprocal regulation of spermidine and autophagy in podocytes maintains the filtration barrier. *Kidney International*, 98(6), 1434-1448.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山原康佑、TillmannBork、WeiLiang、ChristophSchell、吉林護、久米真司、荒木信一、Tobias BHuber、前川聡
2. 発表標題 転写因子Mafblは糸球体上皮細胞のオートファジー活性を制御する
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 Kosuke Yamahara, Tillmann Bork, Wei Liang, Christoph Schell, Shinji Kume, Mamoru Yoshibayashi, Shin-ichi Araki, Hiroshi Maegawa, Tobias B. Huber.
2. 発表標題 Transcription factor MAFB is a new key regulator of podocyte autophagy
3. 学会等名 Kidney week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
	ドイツ	フライブルク大学	ハンブルク・エッペンドルフ大学	
中国	武漢大学人民病院			