

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08609

研究課題名(和文) ミトコンドリアターンオーバー制御に基づく糖尿病性腎症新規治療戦略の探索

研究課題名(英文) An investigation of novel therapeutic strategy for diabetic nephropathy based on control of mitochondrial turnover

研究代表者

田蔭 昌憲 (TAMAKI, Masanori)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：90528902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症におけるParkinの意義を解析した。ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウス腎臓ではParkin発現低下とParkin-PARIS-PGC-1 軸変調が惹起され、ミトコンドリアが障害された。メサンギウム基質増加因子である骨形成因子4(BMP4)の浸透圧ポンプ持続投与マウス腎臓では糖尿病マウス腎臓と同様の結果であった。培養メサンギウム細胞ではBMP4添加およびParkinノックダウンが糖尿病と同様のミトコンドリア障害を惹起し、Parkin過剰発現はBMP4添加によるミトコンドリア障害を軽減した。BMP4は糖尿病と同様のミトコンドリア障害を惹起し、Parkinはその治療標的となり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症では腎ミトコンドリア機能低下が惹起される。ミトコンドリアの品質管理はミトコンドリア生合成・マイトファジーで制御されるターンオーバーでなされるが、糖尿病性腎症におけるミトコンドリアターンオーバーの意義解明は不十分であり、特に糖尿病性腎症における主要なメサンギウム基質増加因子である骨形成因子4(BMP4)との関連は不明であった。本研究を通じて、糖尿病性腎症ではマイトファジー鍵分子Parkinの発現低下に関連したマイトファジー障害とミトコンドリア生合成障害の両者が惹起され、BMP4も同様の作用を示すことが明らかとなった。BMP4やParkinが治療標的となり得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：The role of parkin on diabetic nephropathy was analyzed. Mitochondrial dysfunction was caused in streptozotocin induced diabetic mice, associated with decrease in parkin and PGC-1 expression. Similar findings were observed in mice treated with BMP4-continuous administration by use of osmotic pump. Mitochondrial dysfunction was observed in BMP4-treated cultured mesangial cells associated with decrease in parkin and PGC-1 expression. In parkin-knock down cultured mesangial cells, decrease in PGC-1 expression and mitochondrial dysfunction was observed. Conversely, mitochondrial dysfunction and decrease in parkin and PGC-1 expression after treatment with BMP4 were attenuated in parkin-overexpressed cultured mesangial cells. These findings indicated that BMP4 caused mitochondrial dysfunction which was similar to diabetic mice, and parkin was suggested as a new therapeutic target for mitochondrial dysfunction.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糖尿病性腎症 ミトコンドリア Parkin BMP4

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症治療の社会的需要は大きいですが、いまだに根本的な治療法がない。糖尿病性腎症の初期病理学的病変であるメサンギウム基質拡大は糸球体硬化と腎機能低下を惹起するので、メサンギウム病変への介入は治療標的となる。近年、腎臓病とミトコンドリアの関係が着目されている(J Am Soc Nephrol. 28: 2856-2865, 2017)。糖尿病では高血糖や終末糖化産物(AGE)によるミトコンドリア障害が ATP の減少や酸化ストレスの増加を介してメサンギウム病変を惹起する(Kidney Int. 58: S19-S25, 2000, Mediators Inflamm. 604208, 2015)。ミトコンドリアは修復機構であるオートファジー(マイトファジー)と、ミトコンドリア生合成による「ミトコンドリアターンオーバー」でミトコンドリア量と質を維持する。近年、低回転性ミトコンドリアターンオーバー障害が Parkinson 病の発症原因となることが明らかとなったが(Cell. 144: 689-702, 2011)、糖尿病性腎症におけるミトコンドリアターンオーバー障害の意義は未解明である。

研究代表者の研究室では糖尿病性腎症において骨形成蛋白質 4(BMP4)が転写因子 Smad1 を介して主要メサンギウム基質である IV 型コラーゲンを増加し、BMP4 制御が糖尿病性腎症治療標的となることを報告している(J Biol Chem. 279: 14201-14206, 2004, J Biol Chem. 286: 20109-20116, 2011)。実際に、研究代表者は全トランス型レチノイン酸がメサンギウム細胞 BMP4 を直接制御し、糖尿病性腎症を軽減することを見出した(Am J Physiol Endocrinol Metab. 316: E418-431, 2019)。また、糸球体上皮細胞 BMP4 もメサンギウム基質拡大に関与する可能性を見出した(Sci Rep. 8: 13011, 2018)。BMP4 はミトコンドリア障害因子である AGE や高血糖にて増加し、BMP4 活性化は脂肪細胞においてミトコンドリアマスターレギュレーターである PGC-1 $\alpha$  の発現を低下する(Cell Rep. 16: 2243-2258, 2016)。しかし、糖尿病性腎症における BMP4 とミトコンドリア障害との関連および意義は未解明である。

## 2. 研究の目的

研究代表者は糖尿病性腎症における BMP4 とミトコンドリア障害の関連およびミトコンドリアターンオーバーの意義の解明、「ミトコンドリア治療」による新規糖尿病性腎症治療戦略の開発を目指した。特に、本研究期間内では糖尿病性腎症におけるミトコンドリアターンオーバー障害の意義解明と、ミトコンドリア障害における BMP4 の役割について解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖尿病マウス腎臓におけるミトコンドリア障害の評価

8 週齢 ICR マウスにストレプトゾトシン(STZ) 50  $\mu$ g/gBW を連続 5 日間投与し、10 週齢時点で血糖値 400 mg/dl 以上の個体を糖尿病マウスとした。6 か月後の腎ミトコンドリアおよびミトコンドリア関連シグナルと、メサンギウム基質量を評価した。

### (2) BMP4 持続投与マウス腎臓におけるミトコンドリア障害の評価

7 週齢 ICR マウスに BMP4 (10  $\mu$ g: 0.25mg/kg 相当)または PBS を含有した浸透圧ポンプを背部皮下に埋設し、2 週間後に腎ミトコンドリアおよびミトコンドリア関連シグナルと、メサンギウム基質量を評価した。

### (3) BMP4 添加培養メサンギウム細胞におけるミトコンドリア障害の評価

培養メサンギウム細胞に 24 時間の starvation を行い、BMP4 15 ng/ml または PBS を添加し、24 時間後のミトコンドリアおよびミトコンドリア関連シグナルを評価した。さらに、BMP4 は受容体 ALK を介して転写因子 Smad1 を活性化させ、様々な働きがなされるので、ALK 受容体阻害剤である LDN193189 5nM を添加し、ミトコンドリアへの影響を評価した。細胞外基質量も評価した。

### (4) マイトファジー鍵分子 Parkin を介した培養メサンギウム細胞におけるミトコンドリア障害の評価

Parkin はマイトファジーにおいて重要な役割を担う鍵分子である。そこで、培養メサンギウム細胞の Parkin をノックダウンまたは過剰発現し、ミトコンドリア障害への影響を評価した。

培養メサンギウム細胞の Parkin を siRNA 法(vehicle および Parkin の siRNA をそれぞれ 10 nM ずつトリポフェクションにて投与)にてノックダウンし、血清含有メディアウムにて 48 時間培養し、その後 24 時間 starvation を行った。また、培養メサンギウム細胞に Parkin 発現ベクターをトランスフェクションし、Parkin 過剰発現細胞を単離培養し、BMP4 15 ng/ml 添加した。それぞれミトコンドリアおよびミトコンドリア関連シグナルを評価した。細胞外基質量も評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 糖尿病マウス腎臓ではミトコンドリアターンオーバーを伴うミトコンドリア障害が惹起される

糖尿病マウス腎臓において、マイトファジーに関連するシグナルである PINK1 および Parkin と、ミトコンドリア生合成シグナルである PGC-1 $\alpha$  および Tfam の発現はともに低下した。Parkin

は亜鉛蛋白質 PARIS の増加を介して PGC-1 $\alpha$  を減少することが知られており、本検討においても PARIS が増加した。ウェスタンブロット解析にて、マイトファジー障害の指標であるミトコンドリア蛋白 TOM 20 の減少と VDAC 20 の増加がともに認められた。ミトコンドリア量、電子伝達系酵素発現および単離ミトコンドリア Cytchrome c oxidase 活性も減少した。以上より、糖尿病マウス腎臓ではミトコンドリアターンオーバーが障害され、ミトコンドリア障害が惹起されることが示された。糸球体のメサンギウム基質は糖尿病マウスにて増加した。

(2) BMP4 持続投与マウス腎臓ではミトコンドリアターンオーバーを伴うミトコンドリア障害が惹起される

BMP4 持続投与マウス腎臓において、糖尿病マウス腎臓と同様に、マイトファジー関連シグナルとミトコンドリア生合成シグナルがともに低下し、ミトコンドリアターンオーバー障害が惹起され、ミトコンドリア量や電子伝達系酵素活性も低下した。以上より、腎臓において BMP4 は糖尿病と同様のミトコンドリア障害を惹起することが示された。糸球体のメサンギウム基質は BMP4 持続投与マウスにて増加した。

(3) BMP4 添加は培養メサンギウム細胞のミトコンドリアターンオーバーを伴うミトコンドリア障害を惹起する

BMP4 添加培養メサンギウム細胞において、In vivo での検討と同様に、マイトファジー関連シグナルとミトコンドリア生合成シグナルがともに低下し、ミトコンドリアターンオーバー障害が惹起された。ミトコンドリア量、電子伝達系酵素活性、ミトコンドリア膜電位、酸素消費量、ATP 量も低下した。一方、これらの作用は受容体阻害剤 LDN193189 の添加にて消失した。以上より、BMP4 は受容体との結合および下流シグナル Smad1 活性化を介してミトコンドリアターンオーバー障害を伴うミトコンドリア障害を惹起することが示唆された。細胞外基質量は BMP4 添加にて増加し、受容体阻害剤の添加にて改善した。

(4) マイトファジー鍵分子 Parkin ノックダウンは培養メサンギウム細胞のミトコンドリアターンオーバー障害を伴うミトコンドリア障害を惹起する

培養メサンギウム細胞における Parkin ノックダウン処理により、Parkin 発現は約 50%低下した。PARIS の増加を伴うミトコンドリア生合成シグナルの低下と、ミトコンドリアターンオーバー障害が惹起された。ミトコンドリア量、電子伝達系酵素活性、ミトコンドリア膜電位、酸素消費量、ATP 量も低下した。

培養メサンギウム細胞における Parkin 過剰発現により、(3)で確認された BMP4 添加によるミトコンドリアターンオーバー障害と、ミトコンドリア量、電子伝達系酵素活性、ATP 量の低下はいずれも改善した。

酸化ストレスはメサンギウム細胞の細胞外基質を増加させることが知られている。そこで、これらの細胞における細胞外基質量を評価すると、Parkin ノックダウン細胞では増加し、Parkin 過剰発現細胞への BMP4 添加では細胞外基質量の増加が抑制された。

以上より、Parkin は培養メサンギウム細胞におけるミトコンドリアターンオーバーに重要な役割を担い、治療標的となり得ることが示唆された。

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 0件）

1. 発表者名 田蒔昌憲、西村賢二、柴田恵理子、上田紗代、越智ありさ、富永辰也、安部秀斉、長井幸二郎、脇野修
2. 発表標題 Parkinはメサンギウム細胞におけるBMP4由来ミトコンドリア障害の新規治療標的である
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田蒔昌憲、越智ありさ、富永辰也、柴田恵理子、長谷川一宏、長井幸二郎、脇野修
2. 発表標題 Parkinは糖尿病やBMP4が惹起するミトコンドリアターンオーバー障害の治療標的である
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会
4. 発表年 2023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
---------	---------