

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08610

研究課題名(和文) アルギニン代謝とオートファジー～腎臓のミトコンドリア保護機構の解明

研究課題名(英文) Arginine metabolism and autophagy, elucidation of mitochondrial protection mechanism in kidney

研究代表者

鳥巢 久美子 (TORISU, KUMIKO)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：20448434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は一側尿管結紮モデルマウス(UUO)の腎臓線維化においてメタボローム解析によりアルギニン代謝が大きく変化し、アルギニン代謝物の中ではスベルミジンが最も増加することを見出した。ヒトの慢性糸球体腎炎では腎臓線維化とスベルミジン量は相関することを示した。ヒト近位尿細管細胞ではスベルミジンによりNrf2が活性化した。酸化ストレスによる線維化シグナルやミトコンドリアの膜電位低下はスベルミジンで抑制された。Arg2 KOマウスはスベルミジンが少なく、UUOによる線維化が野生型より増悪し、Nrf2の活性も低減していた。スベルミジンを投与するとArg2 KOマウスにおける線維化の増悪も軽快した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルギニンの代謝物であるスベルミジンは抗加齢因子として以前から注目されていたが、スベルミジンの加齢変化を抑制する作用機序はわかっていない。腎臓線維化はすべての腎臓病の最終形態であるが、その線維化をスベルミジンにより抑制できることを見出したことは、慢性腎臓病の治療薬の可能性を広げる発見である。スベルミジンは生体内にある代謝物であるため、安全に治療応用ができる。生体内でスベルミジンの量を増やすこと、もしくはスベルミジンの摂取をすることで慢性腎臓病の進行を抑制できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Here we report that arginine metabolism was the most altered in unilateral ureteral obstruction (UUO)-induced fibrosis of the kidneys in metabolomic analysis. Spermidine was the most increased metabolite of arginine. In human glomerulonephritis, the amount of spermidine was associated with the amount of fibrosis. In human proximal tubule cells, spermidine induced nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), and its induction was partly attenuated by the autophagy inhibitor, hydroxychloroquine and Atg5 knockdown. Subsequently, fibrotic signals, collagen 1 mRNA, and oxidative stress, represented by a decrease in mitochondrial membrane potential were suppressed by spermidine. UUO kidneys of Arg2 knockout mice showed less spermidine and significantly exacerbated fibrosis compared with wild-type mice. Nrf2 activation was reduced in Arg2 knockout UUO kidneys. Spermidine treatment prevented significant fibrosis progression in Arg2 knockout mice.

研究分野：腎臓内科

キーワード：腎臓線維化 慢性腎臓病 アルギニン代謝 スベルミジン オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎臓の線維化は大部分の進行性腎臓病の最終形態であり、最終的には末期腎不全に至る。慢性腎臓病において、腎臓内の脂肪酸代謝やリシン代謝が変化することが報告された。腎臓はアミノ酸の合成、分解、濾過、再吸収を介して恒常性を保つのに重要な役割を果たしている。アルギニンはタンパク合成の材料となるだけでなく、尿素や一酸化窒素、ポリアミン、グルタミン酸などの前駆物質でもあり、様々な生理現象に関与する。アルギニンの代謝物にスペルミジンがあるが、スペルミジンはアポトーシス細胞が放出するシグナルとなったり、抗加齢因子として有名である。アルギニン代謝に重要なアルギナーゼ2を欠損すると、マウスの腎虚血再灌流障害が軽減したが、慢性腎障害でどうなるのか、代謝物であるスペルミジンがどういう働きをするのかはわかっていない。

2. 研究の目的

腎臓の線維化の過程で生じる代謝の変化を調べ、線維化腎においてアルギニン代謝物であるスペルミジンの量を調べる。またスペルミジンを減少させたり、またスペルミジンを増加させたマウスモデルでの腎臓線維化の変化を調べる。

3. 研究の方法

1) 8週齢 C57Bl/6J マウスオスをを用いて一側尿管結紮(UUO)モデルを作成し、コントロールとの腎臓の代謝物の変化をメタボローム解析で調べる。

2) UUO モデルマウス、およびヒト慢性糸球体腎炎での腎臓のアルギニン代謝物であるスペルミジンの量を免疫染色で明らかにする。

3) ヒト尿細管細胞に酸化ストレスを与え、スペルミジン、ポリアミンの量の変化を免疫染色で調べる

4) スペルミジンを投与したときの細胞応答を Nrf2 の活性化、オートファジーの活性化の面から western blot, 免疫染色を用いて解析する。

5) アルギナーゼ2 (*Arg2*) KO マウスではスペルミジンが減少していることを免疫染色で証明し、同マウスでの UUO による腎線維化を調べる。また UUO マウスにスペルミジンを投与して線維化が抑制できるかを調べる。

4. 研究成果

1) UUO による腎臓線維化ではアルギニン代謝が大きく変化する

偽手術マウスと UUO マウスの腎臓をメタボローム解析したところ、110 の代謝物のうち UUO 腎で有意に増加した代謝物を pathway 解析したところ、アルギニン、プロリン代謝とアルギニン生合成の経路が優位に変化していた(図1)。

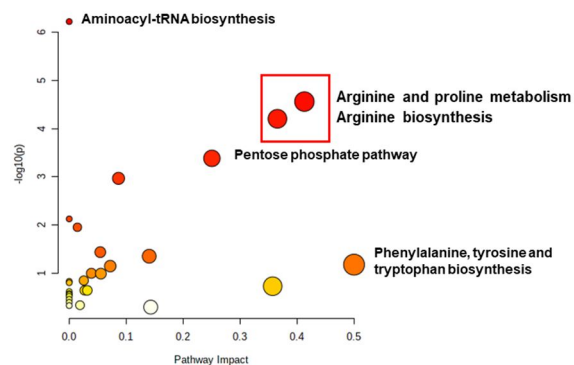


図1 偽手術腎と UUO 腎のメタボローム解析において有意に増加した代謝物のネットワーク解析

2) 腎臓線維化でスペルミジンが増加する

メタボローム解析ではアルギニン代謝物のうちスペルミジンが最も増加していた。免疫染色においても UUO 腎ではスペルミジンとスペルミジンの上流に位置する ARG2 が増加した。ヒト IgA 腎症の組織においても間質の線維化が強くなるにつれ、スペルミジンが増加した(図2)。

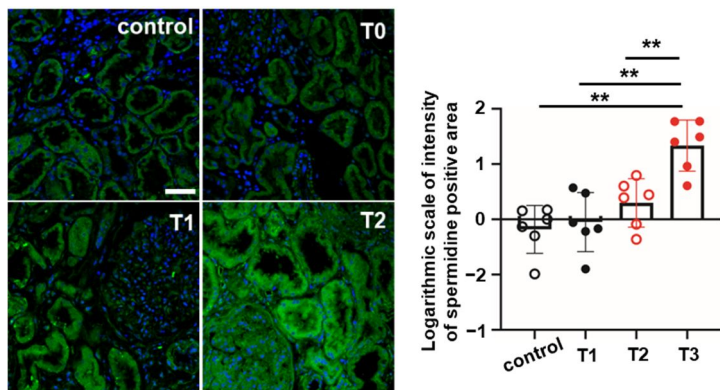


図2 ヒト生体腎移植ドナー腎(control)と IgA 腎症 Oxford 分類に従って間質線維化グレード T0-T2 に分類しスペルミジン染色の強度を比較した。

3) 尿細管細胞に酸化ストレスを与えると ARG2、スペルミジンが増加する

ヒト尿細管細胞(HK-2)に過酸化水素により酸化ストレスを与えると、免疫染色において ARG2 やスペルミジンを含むポリアミンが細胞内に増加した。また細胞内のスペルミジン量は ARG2 過剰

発現により増加し、ARG2 ノックダウンにより減少し、ARG2 に依存することがわかった。

4) スペルミジンは Nrf2 を活性化

HK-2 細胞にスペルミジンを添加すると、抗酸化転写因子である Nrf2 が活性化することが western blot、免疫染色による Nrf2 の核内移行、Nrf2 の標的遺伝子群 (HO-1 mRNA) などの発現増加で確認した (図 3)。

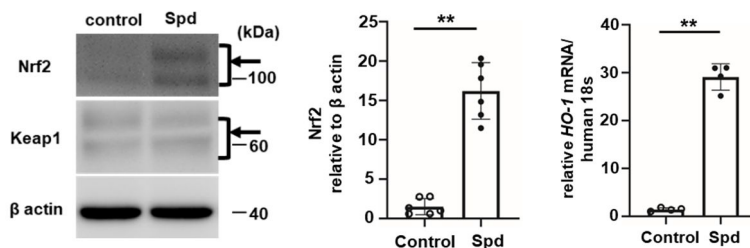


図 3 HK-2 細胞にスペルミジン(Spd)を添加し細胞内の Nrf2 と Keap1 を western blot で調べた (左、中央)。Nrf2 標的遺伝子の HO-1 mRNA の realtime PCR での解析 (右)

5) スペルミジンの Nrf2 活性化には一部オートファジーが関与している

スペルミジンによりオートファジーが活性化することは報告されている。HK-2 でもスペルミジンによりオートファジーは活性化した。この際、p62 と Nrf2 の抑制因子である Keap1 の共局在が増加することを見出した。オートファジーにより Keap1 が分解され、Nrf2 の活性化が起きている機序が考えられた。しかしオートファジー阻害薬のヒドロキシクロロキンやオートファジー必須遺伝子の Atg5 をノックダウンした場合の Nrf2 の活性化抑制は、オートファジーを阻害していない場合の 1/2 弱であったため、Nrf2 活性化へのオートファジーの関与は一部であることが予想された。

6) スペルミジンにより尿細管細胞の線維化シグナルや酸化ストレスは抑制される

次にスペルミジンにより Nrf2 が活性化することで尿細管の線維化シグナルや酸化ストレスは抑制できるのかを調べた。HK-2 細胞に TGFβ を投与するとコラーゲン 1 mRNA の発現は顕著に増加するが、スペルミジンはコラーゲン 1 mRNA の発現を 1/2 に抑制した。また過酸化水素投与によりミトコンドリアが障害を受け、ミトコンドリア膜電位が低下するが、スペルミジンを加えると正常の膜電位の 6 割に回復した (図 4)。

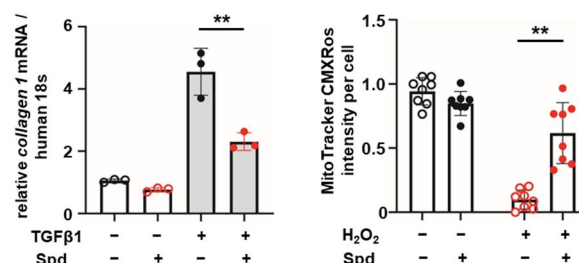


図 4 HK-2 細胞に TGFβ で線維化刺激を与えたときのスペルミジン (Spd) のコラーゲン 1 mRNA 発現量への影響 (左)。HK-2 細胞に過酸化水素で酸化ストレスを与えた時のミトコンドリア膜電位の評価 (右)

7) Arg2 KO マウスでは UUO による腎臓の線維化が促進し、スペルミジンの投与で改善する

スペルミジンが腎臓で減少するとどうなるかを明らかにするため、スペルミジン産生に關与するアルギナーゼ 2 を欠損する Arg2 KO マウスを解析した。Arg2 KO マウスでは予想通り腎臓内のスペルミジンが減少していた。またこのマウスを UUO モデルにすると腎臓の線維化が明らかに増悪した (図 5)。そこでこのマウスにスペルミジン 10 mg/kg で腹腔内投与した。野生型と Arg2 KO マウス間で観察された線維化の有意差がスペルミジン投与により消失した (図 6)。つまりスペルミジンを補充することで線維化を抑制できることがわかった。

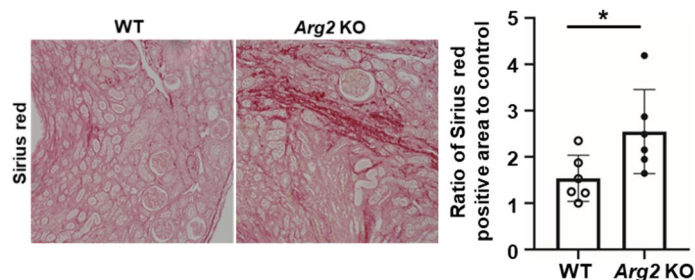
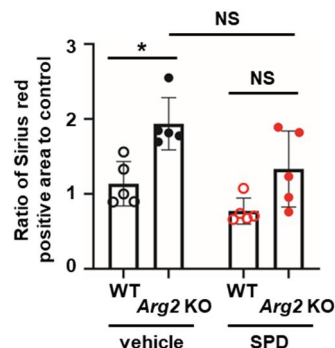


図 5 野生型と Arg2 KO マウスのシリウスレッド染色 (左) シリウスレッド陽性面積の定量結果 (右)

図 6 野生型と Arg2 KO マウスにスペルミジンを投与した時のシリウスレッド陽性面積の定量結果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Seishi Aihara, Kumiko Torisu, Yutaro Hirashima, Takanari Kitazono, Toshiaki Nakano	4. 巻 666
2. 論文標題 Acrolein produced during acute kidney injury promotes tubular cell death	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 137-145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.05.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鳥巢久美子、相原成志、中野敏昭、北園孝成
2. 発表標題 Arginine metabolism regulates the transcription factor Nrf2 and prevents renal interstitial fibrosis.
3. 学会等名 日本薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相原成志
2. 発表標題 アルギナーゼ2はスペルミジン産生を介して腎間質線維化を制御する
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鳥巢久美子、相原成志、中野敏昭、北園孝成
2. 発表標題 アルギナーゼ2を介する抗線維化作用
3. 学会等名 第52回日本腎臓学会西部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Torisu K, Aihara S, Nakano T
2. 発表標題 Arginine metabolism is activated in kidney fibrosis to produce spermidine, which acts in actifibrosis through induction of Nrf2
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院医学研究院 病態機能内科学 腎臓研究室 https://www.kcu.med.kyushu-u.ac.jp/

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
研究分担者	中野 敏昭 (Nakano Toshiaki) (10432931)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	土本 晃裕 (Tsuchimoto Akihiro) (50572103)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	原 雅俊 (Hara Masatoshi) (60626092)	福岡歯科大学・口腔歯学部・助教 (37114)	

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
---------	---------