

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16162

研究課題名（和文）エネルギー代謝ダイナミクスからみた腎臓病の病態解明と薬剤スクリーニング法の確立

研究課題名（英文）Elucidation of the pathophysiology of kidney disease and establishment of drug screening methods based on energy metabolism dynamics

研究代表者

山本 伸也（Yamamoto, Shinya）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90837105

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：急性腎障害における糸球体のATPイメージングに成功し、急性期のATP回復と慢性期のポドサイトの形態異常が逆相関することを見出しました。急性期のATP低下が慢性期の糸球体病変の出現に強く関わることを示しました。次に、ATP可視化マウスを用いた腎スライス培養系を樹立し、全領域でのATPの観察が可能になりました。また各ネフロンセグメントにおける解糖や酸化的リン酸化によるATP産生のそれぞれの依存度を明らかにしました。さらに腎スライス培養に腎毒性物質を投与し、ネフロンセグメントによってATP挙動が異なることを見出し、エネルギー代謝の側面から、細胞特異的な薬理作用が存在することを見出しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATP可視化マウスと二光子顕微鏡を用いて、急性腎障害時の糸球体のATPイメージングに続き、腎全領域でのATPの観察に世界で初めて成功しました。急性期のATP低下が慢性期の糸球体病変の出現や腎機能低下の進行に強く関わることを示し、この結果は、急性期に細胞内ATPを保つことが、腎予後を改善するために重要であることを示唆しました。さらに腎スライス培養に腎毒性物質を投与し、ネフロンセグメントによってATP挙動が異なることを見出し、エネルギー代謝の側面から、細胞特異的な薬理作用が存在することを見出しました。ATP可視化技術が、腎病態解明や腎保護薬や腎障害物質のスクリーニング法の確立に資すると期待できます。

研究成果の概要（英文）：We have successfully visualized ATP dynamics of glomeruli in acute kidney injury and found that ATP recovery in the acute phase is inversely correlated with abnormal morphology of podocytes in the chronic phase. We showed that ATP reduction in the acute phase is strongly associated with the glomerular lesions in the chronic phase. We also established a renal slice culture system using ATP visualized mice, which enabled us to observe ATP in all nephron segments. Next, we clarified the respective dependence of ATP production by glycolysis and oxidative phosphorylation in each nephron segment. Furthermore, we administered nephrotoxic drugs to renal slice cultures and found that ATP behavior differed by nephron segment, indicating the cell-specific pharmacological effects from the aspect of energy metabolism.

研究分野：腎臓

キーワード：ATP 二光子顕微鏡 糸球体 腎臓

## 1. 研究開始当初の背景

急性腎障害は、高齢化や慢性腎臓病の増加などを背景に近年その発症頻度は上昇しており、対策が急務となっている。急性腎障害後、一定の頻度で、慢性腎臓病へと進展することが報告され、莫大な医療費を要することが疫学研究でも示されている。その一方、急性腎障害から慢性腎臓病への移行メカニズムには不明点が多く、有効な治療法の開発も十分に進んでいない。

申請者は、腎臓は極めて ATP 要求性が高いことから、急性腎障害から慢性腎臓病への移行メカニズムに ATP 動態が関与していると考え、ATP 可視化マウスと二光子顕微鏡を用いた生体 ATP 可視化技術を世界で初めて確立した (Shinya Yamamoto, Motoko Yanagita. J Am Soc Nephrol 2020)。申請者らが開発した ATP 可視化技術は、細胞レベルでの形態観察及び細胞内機能評価を同時に可能にし、信頼性も高い。この技術により急性腎障害時の近位尿細管の ATP 回復不良が慢性期の腎の線維化を促進する予後不良因子であることを明らかにした。

尿細管機能に ATP が必須であるのと同様に、糸球体は、蛋白濾過障壁であるスリット膜の構造維持のために ATP を必要とする。急性腎障害が慢性腎臓病に進行する際、糸球体障害が起こることが知られているが、そのメカニズムは不明である。申請者の先行研究と合わせて、急性腎障害時の尿細管、糸球体の ATP 動態を解明することは、虚血性の腎障害時の治療ターゲットを明らかにすることに繋がり意義深いものと思われる。さらに、尿細管や糸球体を含む全領域の ATP 動態解析は、腎毒性物質のスクリーニング検査法の確立や急性腎障害の新規の治療薬開発につながることを期待される。

## 2. 研究の目的

申請者は、上記の生体 ATP 可視化技術を開発し、急性腎障害の代表的なモデルである虚血再灌流モデルを用いて、腎表面の急性腎障害時の ATP 動態の時間的・空間的解析に成功したが、生体の腎表面からの ATP 可視化技術には、二つの技術的限界があった。深部まで励起光が到達せず、糸球体や深部ネフロンセグメントの評価が出来ない点と、全身への影響が強い薬剤投与下では腎への効果判定が困難である点であった。本申請では ATP 可視化技術を、糸球体とスライス培養に応用することで急性腎障害における腎全領域におけるエネルギー動態の解明を目標とする。また ATP 産生阻害薬投与下で、それぞれの機能部位におけるエネルギー代謝の相違を検証する。さらに薬剤性腎障害を惹起し、腎全領域の ATP の時間的・空間的変動を明らかにすることによって薬剤スクリーニング法に応用できるかどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

生体 ATP 可視化技術を用いて、急性腎障害モデルである虚血再灌流時の糸球体の ATP 動態を可視化し、急性期のエネルギー障害と慢性期における糸球体の機能障害の相関を検証する。次に、ピプラトームを用いて ATP 可視化マウスの腎臓切片を作成し、ATP 産生が保たれる培養条件

を確立し、二光子顕微鏡にて ATP イメージングを行う。この手法では、尿細管や糸球体を含めた全領域での観察が容易であり、低酸素状態や ATP 産生阻害薬（酸化的リン酸化阻害薬および解糖系阻害薬）投与下で、それぞれの機能部位におけるエネルギー代謝の相違を検証する。さらに、腎スライスに腎毒性物質の代表であるシスプラチンを投与し、尿細管と糸球体の ATP 動態を観察することで腎毒性物質のスクリーニング法になるか検証する。

#### 4. 研究成果

マウスの虚血性急性腎障害における糸球体の ATP イメージングに世界で初めて成功した。糸球体ポドサイトの ATP は、虚血後 20 分で底値まで低下し、再灌流後 5 分以内に回復した。虚血時間が長いほど再灌流 30 分後の ATP 回復度は虚血時間依存性に低下した。さらに急性期の ATP 回復度は慢性期のポドサイトのミトコンドリア円形度や足突起幅と逆相関することを見出し、急性期の ATP 回復度と慢性期の糸球体ポドサイトの形態異常が強く関連していることを明らかにした。急性期の ATP 低下が慢性期の糸球体病変の出現に強く関わることを示し、この結果は、急性期にポドサイト細胞内 ATP を高く保つことが、腎予後を改善するために重要であることを示唆している。

次に、ATP 可視化マウスを用いた腎スライス培養系を樹立し、全ネフロンセグメントの ATP 動態の観察が可能な系の確立に成功した。虚血再灌流障害を模倣した系においては、低酸素培養導入後に近位尿細管の ATP が速やかに低下し、その後、再灌流によって ATP は回復するが、近位尿細管の ATP 回復は、遠位尿細管と比較して不良であった。虚血時間が長くなるほど再灌流 1 時間後の近位尿細管の ATP 回復は不良であり、電子顕微鏡所見でも虚血時間に応じたミトコンドリアの形態異常を認めた。また再灌流後 6 時間後には、虚血時間が長いサンプルでは、尿細管上皮脱落などの強い組織障害が観察された。虚血再灌流障害を模した培養系における ATP 動態と組織学的変化は、申請者が以前に行った生体における虚血再灌流時の ATP 動態解析結果と類似しており、虚血再灌流障害の病態をよく再現していることが確認された。

この腎スライス培養系と ATP 産生阻害薬を用いて、それぞれの機能部位におけるエネルギー代謝の相違を検証した。酸化的リン酸化単独阻害時に、遠位尿細管、集合管主細胞では ATP がよく保たれるのに対し、近位尿細管では著明に ATP が枯渇し、ポドサイトでも ATP の低下を認めた。解糖系単独阻害時にはポドサイトの ATP 低下が最も著明であった。本培養系を用いることで、ネフロンセグメント毎の ATP 産生経路の相違が明らかになった。近位尿細管は ATP 産生を酸化的リン酸化に依存しており、解糖系の寄与が極めて少ない一方、ポドサイトは酸化的リン酸化、あるいは解糖系の単独阻害によって ATP が低下し、両系に依存することが明らかになった。

さらに腎スライス培養に腎毒性物質であるシスプラチンを投与し、各ネフロンセグメントの ATP 挙動を観察した。シスプラチンの濃度依存的に尿細管の ATP 低下が観察された。特に、近位尿細管の ATP 低下が最も著明である一方、遠位尿細管では ATP 低下は軽微であった。近位尿細管へのシスプラチン取り込みを担う OCT2 の阻害剤であるシメチジン同時投与により、シスプラチンによる近位尿細管の ATP 低下が軽減される一方、遠位尿細管の ATP 低下には変化を認めなかった。ネフロンセグメントによって ATP 挙動が異なることを明らかにし、エネルギー

一代謝の側面から、細胞特異的な薬理作用が存在することを示した。

腎臓の各ネフロンセグメントにおける ATP 産生機構に関する知見や腎全領域の ATP 可視化技術が、腎病態解明や腎保護薬や腎障害物質のスクリーニング法の確立に資すると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本伸也*、山本正道、柳田素子
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 山本伸也*、山本正道、柳田素子
2. 発表標題 生体イメージング法からせまる急性腎障害病態
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 山本恵則*、高橋昌宏、山本伸也、豊原敬文、阿部高明、山本正道、柳田素子
2. 発表標題 腎スライス培養を用いたATPイメージング法の確立
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 高橋昌宏*、山本恵則、山本伸也、山本正道、柳田素子
2. 発表標題 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析
3. 学会等名 Japan Kidney Council 2021
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 山本伸也*、高橋昌宏、山本恵則、大久保明紘、三井亜希子、山本正道、柳田素子
2. 発表標題 ATPイメージングからせまる腎病態の解明
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 腎全領域のATPイメージングからせまる腎病態
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 山本伸也、柳田素子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本腎臓学会	5. 総ページ数 7
3. 書名 【腎臓の細胞と形態Update-機能と病態の可視化-】生体腎における細胞内ATPイメージング法の確立	

1. 著者名 科学評論社	4. 発行年 2021年
2. 出版社 山本伸也、柳田素子	5. 総ページ数 9
3. 書名 腎臓におけるATP dynamics： in vivo ATPイメージング解析	

1. 著者名 科学評論社	4. 発行年 2022年
2. 出版社 山本伸也、柳田素子	5. 総ページ数 10
3. 書名 生体腎におけるATPイメージング	

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院医学研究科腎臓内科学 <a href="https://www.kidney-kyoto-u.jp/yanagi-tagroup">https://www.kidney-kyoto-u.jp/yanagi-tagroup</a>
--

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