

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591196

研究課題名(和文)オートファジーの慢性腎疾患進行に対する防御機構の解明

研究課題名(英文)Role of autophagy in kidney aging and metabolic acidosis

## 研究代表者

高畠 義嗣 (TAKABATAKE, Yoshitsugu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30403075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題ではオートファジーの腎臓の老化および(慢性腎臓病の合併症の一つである)代謝性アシドーシスにおける役割に焦点を絞り、腎尿細管オートファジーが加齢や代謝性アシドーシスによりどう変化するか、それらに如何に対抗するかを検証した。その結果、オートファジーは加齢ストレスに抗すべく活性化され、経年的にその依存性が増すが、オートファジーが亢進されるべき新たなストレスに対し適切な応答ができず、相対的オートファジー低下状態となり老化につながることを、近位尿細管細胞においてオートファジーは、酸負荷により障害されたミトコンドリアの分解を介してミトコンドリア機能の恒常性維持に貢献すること、が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Autophagy plays an essential role for cellular homeostasis. We have previously demonstrated that autophagy protects against ischemia-reperfusion or nephrotoxic injury. Here we tested whether autophagy is involved in kidney aging. Age-dependent high basal autophagy plays a crucial role in counteracting kidney aging through mitochondrial quality control but that lack of up-regulation of autophagic flux in response to metabolic stress with age is associated with age-related kidney diseases. Furthermore, we tested whether autophagy is involved in cellular adaptations of the proximal tubular cell against chronic metabolic acidosis through mitochondrial homeostasis. Metabolic acidosis induces autophagy in the proximal tubular cell, which is indispensable for maintaining proper mitochondrial functions including ammoniogenesis, and thus for adapted urinary acid excretion. These two results provide a new therapeutic option for age-related kidney disease and acidosis by modulating autophagy.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：オートファジー 近位尿細管 老化 アシドーシス ミトコンドリア 慢性腎臓病

### 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分解の総称である。オートファジーは、日々ある一定の割合で細胞質やオルガネラを消化し細胞成分の代謝回転に貢献している。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(アミノ酸・ATP)確保であるが、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・分解に関与する、いわば細胞内品質管理の役割を果たしている。申請者らはオートファジーの腎疾患における機能に注目し、腎虚血再還流およびシスプラチン腎症など急性ストレス下のオートファジーの尿細管保護効果について報告してきた。恒常的で比較的低レベルのオートファジーが腎臓の老化に防御的に関与することが推測されるが、腎臓の老化とオートファジーの関係はほとんど未知の領域である。また慢性腎疾患(不全)およびそれに付随する合併症(代謝性アシドーシス)におけるオートファジーの役割もほとんど知られていない。

### 2. 研究の目的

(1) オートファジーと腎臓の老化の関わりを明らかにする。老化腎においてオートファジー活性がいかに変化しているのかを探索し、尿細管細胞特異的オートファジー不全マウスを長期観察し、解析することにより、オートファジーが腎の老化に対抗しているメカニズムを調べる。

(2) 慢性腎疾患にしばしば付随する代謝性アシドーシスに対する適応反応として腎近位尿細管におけるアンモニアの生成・排泄がある。研究代表者らは先行研究においてこの過程にオートファジーが深く関与し、アンモニア産生に必要な ATP やアミノ酸の補給を補助していると推測した。尿細管細胞特異的オートファジー不全マウスに酸負荷を行い、アシドーシスの程度やアンモニアの産生量の比較、尿細管の組織学的観察を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1)

タモキシフェン誘導性近位尿細管特異的オートファジー不全マウス(8週齢および2年齢) Cre マウスは京都大学柳田素子らが作製)にタモキシフェンを投与して2週間オートファジー不全状態にしたのち、オートファジーの基質である p62 の蓄積を腎組織上で評価する。次に GFP-LC3 トランスジェニックマウス(8週齢および2年齢)にクロロキンを投与しオートファジーを休止させ、腎組織上で GFP 陽性ドットの数を測定する。さらにその系にオートファジーの強力な刺激である絶食負荷を与え、オートファジー亢進の程度を両者で比較する。

尿細管細胞特異的オートファジー不全マウス(Atg5F/F ;KAP)を2年齢まで観察する。腎機能、腎重量(萎縮の程度)、腎線維化、ミトコンドリア DNA コピー数・DNA 損傷、ミトコンドリア機能(COX、SDH 染色)、ゲノム不安定性、アポトーシス増加(タネル染色)、酸化ストレスの程度を評価する。

(2) GFP-LC3 マウスに塩化アンモニウム投与により酸負荷を加え、オートファゴソームに相当する LC3 の dot の数およびオートファジーの選択的基質である p62 の分解の程度を評価する。続いて、近位尿細管細胞選択的オートファジー不全マウス(Atg5F/F ;KAP)およびコントロールマウスに酸負荷を行い、アシドーシスの程度とその代償反応であるアンモニアの産生量の相違を評価する。酸負荷時の近位尿細管細胞のミトコンドリア機能を COX 染色、SDH 染色で評価する。また同マウスから単離したオートファジー不全細胞(とコントロール細胞)を用いて酸負荷時のアンモニアの産生量の相違、ミトコンドリア膜電位や呼吸機能の変化などミトコンドリア機能を評価する。近位尿細管培養細胞に酸負荷を行い、オートファジーの選択的基質のマーカであるユビキチン、オートファゴソームに相当する LC3 のドット、ミトコンドリアの局在を調べる。

### 4. 研究成果

#### (1)

8週齢および2年齢のタモキシフェン誘導性近位尿細管特異的オートファジー不全マウスで2週間オートファジー不全状態にすると2年齢マウスの腎では p62 陽性凝集塊が著増しオートファジー活性が亢進している(高齢マウス腎の方でオートファジーが多く基質を処理している)ことが判明した。次に GFP-LC3 トランスジェニックマウス(2年齢)では自由摂取下でも若年マウスとは対照的にオートファジー亢進が見られる一方、8週齢で見られる絶食に対するオートファジー活性の増加は鈍っていた。

尿細管細胞特異的オートファジー不全マウス(Atg5F/F ;KAP)を2年齢まで観察した。老年では腎機能低下、腎萎縮、腎線維化、さらにミトコンドリア DNA コピー数減少・DNA 損傷、ミトコンドリア機能低下、ゲノム不安定性、アポトーシス増加、酸化ストレスの亢進が認められた。すなわちオートファジーは加齢ストレスに抗すべく活性化され、経年的にその依存性が増す。しかしオートファジーが亢進されるべき新たなストレスに対し適切な応答ができず、相対的オートファジー低下状態となり老化につながる事が明らかとなった。

(2) GFP-LC3 トランスジェニックマウスに酸

を負荷すると、オートファゴソームに相当する GFP 陽性の dot が非負荷時に比較して有意に増加していた。また、酸負荷により近位尿細管細胞でオートファジーの選択的基質である p62 の分解が促進したことから、酸負荷でオートファジーが亢進することが示された。オートファジー不全マウスに酸負荷を行うと、コントロールマウスに比較してアンモニアの産生減少とアシドーシスの増悪を認めた。アンモニアは近位尿細管細胞のミトコンドリアで産生されるが、オートファジー不全マウスの腎組織では COX 染色、SDH 染色の染色性の低下を認め、ミトコンドリア機能の低下が示唆された。さらにこれらの所見は酸負荷により増悪した。オートファジー不全細胞でも、コントロール細胞に比べて酸負荷に対するアンモニアの産生は低下し、ミトコンドリア膜電位や呼吸機能の低下などミトコンドリア機能の低下を示唆する所見と、酸負荷による増悪を認めた。ミトコンドリアとオートファジーの関連を示すために近位尿細管培養細胞に酸負荷を行うと、オートファジーの選択的分解基質のマーカーであるユビキチンは LC3、ミトコンドリアと共局在した。この結果から、酸負荷により機能が低下したミトコンドリアはオートファジーで選択的に分解されると推測された。以上より近位尿細管細胞においてオートファジーは、酸負荷により障害されたミトコンドリアの分解を介してミトコンドリア機能の恒常性維持に貢献しており、これが酸塩基平衡に対する代償反応を維持するうえで重要な役割を有することが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Autophagic clearance of mitochondria in the kidney copes with metabolic acidosis. Namba T, Takabatake Y, Kimura T, Takahashi A, Yamamoto T, Matsuda J, Kitamura H, Niimura F, Matsusaka T, Iwatani H, Matsui I, Kaimori J, Kioka H, Isaka Y, Rakugi H. J Am Soc Nephrol.(査読あり) 2014 Oct;25(10):2254-66.  
doi:10.1681/ASN.2013090986.

Autophagy and the kidney: health and disease. Takabatake Y, Kimura T, Takahashi A, Isaka Y. Nephrol Dial Transplant. (査読あり) 2014 Sep;29(9):1639-47.  
doi:10.1093/ndt/gft535.

腎臓の老化とオートファジー, 高島義嗣, 木村友則, 猪阪善隆, 日本腎臓学会誌(査読なし)2012年54号:78-85.  
PMID: 22590960

〔学会発表〕(計 7 件)

American Society of Nephrology Kidney Week 2014 Annual Meeting  
Yamamoto T, Takabatake Y, Kimura T, Takahashi A, Namba T, Matsuda J, Fumio N, Taiji M, Motoko Y, Rakugi H, Isaka Y. Altered Autophagy Flux Contributes to Kidney Aging via Mitochondrial Dysfunction. 2014年11月14日, Philadelphia

第5回分子腎臓フォーラム

難波倫子, 高島義嗣, 猪阪善隆  
腎臓におけるオートファジーはミトコンドリアの品質管理を介して代謝性アシドーシスに対して防御的な役割を有する, 2014年9月6日, 東京

第6回腎疾患と高血圧研究会

難波倫子, 高島義嗣, 猪阪善隆  
腎臓におけるオートファジーはミトコンドリアの品質管理を介して代謝性アシドーシスに対して防御的な役割を有する, 2014年7月12日, 東京

第14回日本抗加齢医学会総会

高島義嗣  
加齢による腎障害の分子機序: オートファジーの関与, 2014年6月7日, 大阪

第14回日本抗加齢医学会総会

猪阪善隆  
オートファジーとミトファジー  
2014年6月6日, 大阪

第51回日本臨床分子医学会学術集会

難波倫子, 高島義嗣, 猪阪善隆  
腎臓におけるオートファジーはミトコンドリアの品質管理を介して代謝性アシドーシスに対して防御的な役割を有する, 2014年4月14日, 東京

American Society of Nephrology Kidney Week 2013 Annual Meeting

Namba T, Takabatake Y, Kimura T, Takahashi A, Yamamoto T, Matsuda J, Niimura F, Matsusaka T, Rakugi H, Isaka Y.  
Quality control of mitochondria by autophagy in the kidney has an essential role for the adaptation to metabolic acidosis.  
2013年11月7日, Atlanta

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
大阪大学腎臓内科ホームページ  
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/kid/kid/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高島義嗣 (TAKABATAKE, Yoshitsugu)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：30403075

### (2) 研究分担者

猪阪善隆 (Isaka, Yoshitaka)  
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：00379166