

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591200

研究課題名(和文)腎系球体疾患におけるオートファジーの意義と分子制御機構の解明

研究課題名(英文)Significance of Podocyte Autophagy and Elucidation of Its Mechanism in Human Glomerular Diseases

研究代表者

杉山 斉 (Sugiyama, Hitoshi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：60325090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト腎組織を電子顕微鏡で評価し腎疾患の進展におけるAutophagyの意義を明らかにした。年齢に伴いPodocyteのAutophagyの増加が見られた。微小変化型ネフローゼ症候群(MCNS)においては足突起融合率、尿蛋白と有意な相関が認められた。膜性腎症やMCNSではIgA腎症やループス腎炎など増殖性疾患に比しAutophagyの出現が有意に増加した。腎組織において恒常的にある一定レベルのAutophagyが生じているが、系球体ではPodocyteに出現頻度が高く、なかでもMCNSではPodocyteのAutophagyと尿蛋白、足突起癒合率が連関している事が示された。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a cellular process involved in the bulk degradation of proteins and organelle turnover. This study aimed to elucidate the morphological evidence for autophagy and its association with ultrastructural alterations of podocytes and clinical parameters in patients with minimal change nephrotic syndrome (MCNS). Autophagic vacuoles were particularly detected in podocytes. Overall, the number of autophagic vacuoles in podocytes was significantly correlated with age. In the patients with MCNS, the number of autophagic vacuoles in podocytes was significantly correlated with the podocyte foot process effacement (FPE) score, the amount of proteinuria and the level of serum albumin. The number of autophagic vacuoles in podocytes was significantly increased in the patients with MCNS and MN in comparison to that observed in the patients with IgAN and LN. The data indicate that the autophagy of podocytes is associated with FPE and massive proteinuria in patients with MCNS.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：オートファジー 系球体上皮細胞 ネフローゼ症候群

## 1. 研究開始当初の背景

(1) オートファジーは細胞の自己成分を細胞内消化器官であるリソソームに運び込み分解する生体防御機構の一つである。現象自体は既に 1960 年代初頭に動物細胞の観察から知られていたが、その分子制御機構については長らく不明であった。近年、出芽酵母におけるオートファジーとその制御蛋白質群 Atg (autophagy-related proteins) が 30 個以上発見され、さらに哺乳類における Atg ホモログが同定されたのをきっかけに高等動物のオートファジー制御機構が明らかにされている。

(2) オートファジーの上流には mTOR (mammalian target of rapamycin) による抑制機構が存在し mTORC1, mTORC2 複合体による調節が明らかとなり (Inoki JCI 2011, Ito Lab Invest 2011)、細胞内で蛋白合成とオートファジーによる蛋白分解が同時に活性化される TASC モデルが提唱されている (Narita Science 2011)。抗アポトーシス因子 Bcl-2 が Beclin-1 抑制を介してオートファジー抑制に働くことから細胞の生存と細胞死は表裏一体のバランスの上に制御されている可能性がある (Sarkar Mol Cell 2011)。

(3) 慢性腎臓病の進行を規定するのは糸球体障害および尿細管間質障害である。このうち尿細管間質障害とオートファジーについては、動物実験モデルや培養尿細管上皮細胞を用いた研究結果が最近多数報告されている (A~D)。

(A) 腎虚血再還流障害モデル (Chien Transplantation 2007, Suzuki BBRC 2008, Jiang Am J Pathol 2010, Kimura J Am Soc Nephrol 2011)

(B) シスプラチン腎症モデル (Periyasamy-Thandavan Kidney Int 2008, Yang Am J Physiol Renal Physiol 2008)

(C) シクロスポリン腎症モデル (Pallet Autophagy 2008)

(D) 腎線維化モデル (尿管結紮: Li Am J Pathol 2010、尿管上皮特異的 TGF- $\beta$ 1 過剰発現: Koesters Am J Pathol 2010)

(4) 一方で、ヒト腎系球体疾患におけるオートファジー研究の論文は申請者が検索した限り 2 報のみである (IgA 腎症: Sato Pathobiology 2009、Fabry 腎症: Chevrier Autophagy 2010)。

(5) 慢性腎臓病の主要な原疾患には糖尿病性腎症やネフローゼ症候群など多量の蛋白尿の出現により腎系球体障害を来す疾患群が存在する。これら疾患群におけるオートファジー制御機構の障害やその破綻が病態形成に果たす意義については全く不明である。

(6) 腎系球体疾患におけるオートファジー研究は端緒についたばかりの状況であり、特にヒト系球体疾患におけるオートファジーの意義については全く不明であることから、本現象の持つ臨床的意義やバイオマーカーの開発、治療応用を含む研究を行うことは非常に重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

オートファジーは細胞の自己成分をリソソームに運び込み分解する生体防御機構の一つである。本研究では、慢性腎臓病の腎系球体におけるオートファジーとその制御分子 (Atg およびその関連蛋白) の発現および発現制御機構を明らかにすることにより、腎系球体疾患におけるオートファジーの意義と分子制御機構の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究では、ヒト腎組織を電子顕微鏡で評価し腎疾患の進展における Autophagy の意義を明らかにした。電子顕微鏡で腎生検組織 126 例 (MCNS: 38 例、膜性腎症: 32 例、IgA 腎症: 21 例、ループス腎炎 10 例、その他: 25 例) の Podocyte での Autophagy を観察し、その頻度を半定量化した。

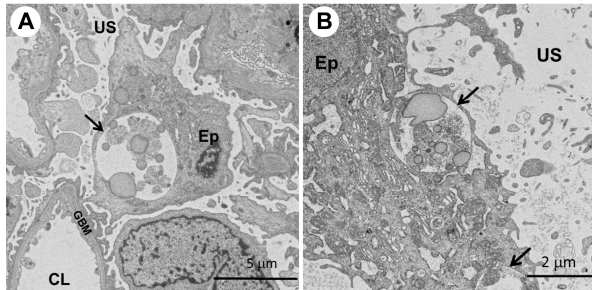
(2) 上記データと臨床検査データとの関連について統計学的解析を行った。

(3) パラフィン包埋された生検組織より薄切切片を作成し、特異抗体を用いた免疫組織染色により、LC3 (酵母 Atg8 の mammalian homologue)、Beclin 1 (Atg6, class III PI3kinase-complex)、p62/SQSTM1 (LC3 結合スキャフォールドタンパク質)、mTOR (mammalian target of rapamycin) の糸球体における発現、およびそれらの発現細胞を検出した。SMA (メサンギウム細胞)、WT-1 (糸球体上皮細胞)、vWF (糸球体内皮細胞) との共染色によりそれぞれ発現細胞の同定を行い、さらに Ubiquitin (Ubiquitin $\cdot$ p62 陽性封入体)、LAMP-2 (lysosome marker) との共染色により細胞内発現部位を検出した。

(4) オートファジー (type I, type II) およびオートファジー関連分子蛋白および関連分子遺伝子発現と、原疾患 (ネフローゼ症候群、IgA 腎症、糖尿病性腎症) との関連性、病理組織障害スコア (糸球体硬化、足突起融合、細胞増殖、尿管間質障害)、蛋白尿 $\cdot$ アルブミン尿 (g/日)、腎機能 (eGFR) との相関について臨床病理学的な検討を施行した。

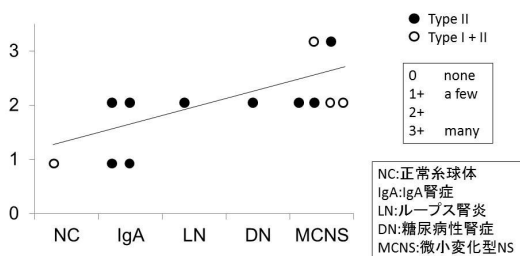
#### 4. 研究成果

(1) 年齢の上昇に伴い Podocyte の Autophagy の増加が見られた ( $p = 0.0049$ )。微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) においては足突起融合率 ( $r = -0.477$ ,  $p = 0.002$ )、尿蛋白 ( $r = 0.410$ ,  $p = 0.013$ )と有意な相関が認められた。



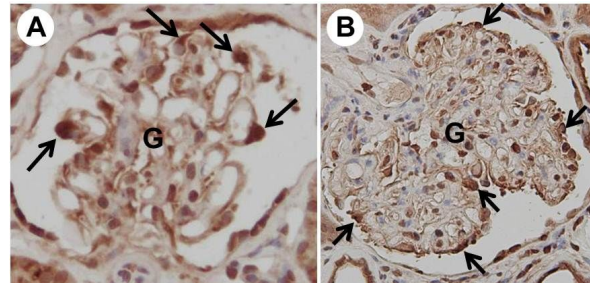
(2) 疾患別でみると、膜性腎症や MCNS では IgA 腎症やループス腎炎など増殖性疾患に比し Autophagy の出現が有意に増加していた ( $p = 0.037$ )。

糸球体疾患別オートファジーの頻度(電顕)



(3) 糖尿病性腎症における検討 (4 例、平均年齢は 48.0 歳、eGFR 75.3 mL/min/1.73m<sup>2</sup>、血清 Alb 2.3 g/dL、総コレステロール 259 mg/dL、尿蛋白 5.0 g/dL) において、糸球体上皮細胞のオートファジーが観察された。糸球体オートファジー数と年齢、尿蛋白、血清 Alb 値との相関関係の検討では、有意差は認められなかったが、年齢と正相関、血清 Alb 値と負相関の傾向が認められた。

(4) オートファジー関連分子の検出においては、糸球体内に LC3 陽性所見が見られ、一部は糸球体上皮細胞のマーカーである WT1 染色と一致した。



(5) 以上より、腎組織において恒常的にある一定レベルの Autophagy が生じているが、糸球体では Podocyte に出現頻度が高く、なかでも MCNS では Podocyte の Autophagy と尿蛋白、足突起癒合率が相関している事が示された。

(6) Podocyte の Autophagy 誘導機構と足突起融合機序の連関を更に解明することが重要であると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 小川愛由、杉山 斉、北川正史、森永裕士、山成俊夫、大西章史、菊本陽子、喜多村真治、前島洋平、榎野博史. 微小変化型ネフローゼ症候群における糸球体ポドサイトのオートファジーは足突起融合の程度と有意に相関する. \*優秀演題賞受賞. 第 57 回日本腎臓学会学術総会. 2014 年 7 月 4 日. パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

2. 小川愛由、杉山 斉、山成俊夫、北川正史、森永裕士、菊本陽子、喜多村真治、前島洋平、榎野博史. 微小変化型ネフローゼ症候群における糸球体ポドサイトのオートファジーの検討. 第 56 回日本腎臓学会学術総会. 2013 年 5 月 10 日. 東京国際フォーラム (東京都、千代田区)

3. 小川愛由、杉山 斉、北川正史、瀧上慶一、森永裕士、菊本陽子、喜多村真治、前島洋平、榎野博史. ネフローゼ症候群における糸球体ポドサイトのオートファジーと関連蛋白発現の検討. 第 55 回日本腎臓学会学術総会. 2012 年 6 月 1 日. パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等：該当なし

6．研究組織

(1)研究代表者

杉山 斉（SUGIYAMA Hitoshi）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60325090

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし