

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461227

研究課題名(和文)腎尿細管におけるAMPキナーゼのオートファジーを介した細胞保護作用の検討

研究課題名(英文)Analysis of AMPK for cell protective function in renal tubular epithelial cells

研究代表者

長田 太助(Nagata, Daisuke)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：40393194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：獨協医科大学において実施した予備実験で、尿細管特異的にAMPKを導入してから尿細管結紮後5日目では対照と比べて、dnでは間質線維化が増強し、caではやや減弱していた。一方、8日目では有意な差を検出できなかった。自治医科大学でさらに違うタイミングでアポトーシス、オートファジーの関連因子の測定を実施する予定であったが、尿細管特異的にdnAMPK、caAMPKをドキシサイクリンで誘導できなくなっていることが明らかとなった。異動時のSPF化の際になんらかの異常が起きたと予想されるが、現在トラブルシューティング中である。問題解決後、課題をさらに実施する予定である。

研究成果の概要(英文)：Preliminary experiments conducted at Dokkyo Medical University, which the primary investigator Dr. Nagata was belonging to when this study started, revealed that interstitial fibrosis was enhanced in dnAMPK mice and decreased in caAMPK. On the other hand, on day 5 after tubule ligation, no significant difference could be detected on the 8th day. I planned to measure the relevant factors of apoptosis and autophagy at a different timing in Jichi Medical University, however it became clear that neither dnAMPK nor caAMPK can be induced with doxycycline specifically in the renal tubular epithelial cells. Although it is expected that some abnormality occurred during SPF conversion at the time of moving, I am now performing some basic troubleshooting. After this problem solving, I hope to further carry out the current tasks.




研究分野：内科学・腎臓・高血圧

キーワード：AMPK アポトーシス オートファジー 腎間質線維化

1. 研究開始当初の背景

腎間質の線維化は、腎不全に至る final common pathway と言われるが、その詳細な形成機序は未だに明らかではない。2002 年に Iwano M, Neilson EG ら (Iwano M, et al. *J Clin Invest* 110:341;2002) が Epithelial-mesenchymal Transition (EMT) つまり尿細管細胞が筋線維芽細胞に再分化し、コラーゲン線維等を産生して線維化することがその原因であるとの報告をしてから、それを裏付ける報告が相ついで。しかし最近ではそれに否定的な結果も散見され、尿細管は再分化することはなく、筋線維芽細胞は間質線維芽細胞から分化したものであるとの報告もある (Picard N, et al. *Histochem Cell Biol* 130:141;2008)。一方、片側尿管結紮 (UUO) モデルで持続的に圧負荷や虚血ストレスなどの障害を受けた尿細管細胞では、アポトーシスだけではなくオートファジーも観察されることが報告されている (Li L, et al. *Am J Pathol* 176:1767;2010)。オートファジーは障害を受けて利用できない不要なオルガネラを細胞内で消化・分解することで細胞の生き残りに資すると考えられている。一方、ある条件下ではそのような自己消化的な働きがかえって細胞死を誘導することが知られている。アポトーシスは type programmed cell death と呼ばれ、オートファジーは type programmed cell death と呼ばれているのはそのためであるが、一部共通の分子機序で制御されていることが知られている。Bcl-2 family や AMP-activated protein kinase (AMPK) がその例である (Levine B, et al. *Autophagy* 4:600;2008, Liang J, et al. *Nat Cell Biol* 9:218;2007)。アポトーシスを引き起こす自己消化の限度はどこなのか、切り替えはどのようにして行われるか、などについてはほとんどわかっていない。オートファジーの分子機序としては mTOR と Ulk1 がその調節に重要な働きをしていることが明らかとなってきたが、その両者とも AMPK により制御されているところから、AMPK はオートファジーにおいても重要な因子であると認識されている我々はオートファジーとアポトーシスを制御する AMP キナーゼ (AMPK) の dominant negative (dn) 体と constitutively active (ca) 体を尿細管に発現できる遺伝子改変マウスを開発したので、それを用いて尿細管細胞にけるアポトーシスおよびオートファジーにおける AMPK の役割を検討することにした。

2. 研究の目的

AMPK は、 の 3 つの subunit からなるヘテロトリマー蛋白であり (Kemp BE et al. *Trends Biochem Sci* 24:22;1999)、キナーゼ活性があるのは  である (図 3 参照)。 のキナーゼ領域内 172 番目の Thr が上位キナーゼによってリン酸

化されると活性は増加する。低酸素や代謝障害にともなう酸化ストレスなどで AMPK が活性化されて様々な作用を発現する。以前の我々の検討により AMPK は血管内皮細胞において NO 産生を介して血管新生を促進させる作用があること (Nagata D et al. *J Biol Chem* 278:31000;2003)、AMPK が新生内膜増殖抑制作用をもつこと (Nagata D et al. *Circulation* 2004;110:444)、無酸素状態での血管内皮細胞のアポトーシスは AMPK を特異的に活性化できる恒常活性化型 AMPK 変異体の過剰発現により有意に抑制できること (Nagata D et al. *Hypertens Res* 32:133;2009) などを示してきた。AMPK のサブユニットは 2 つ存在し、互いに相補的に働くことが分かっており、臓器特異的にその機能を knock-out させるのが困難である。我々は以前の研究の成果として、Tet on/off システムによりドキシサイクリン (DOX) で AMPK の優性阻害型変異体 (dominant negative: dn, Lys45 Arg) と恒常活性化型変異体 (constitutively active: ca, Thr172 Asp, aa313-392 欠損) を Pax8 プロモータによって尿細管特異的に発現誘導可能なトランスジェニック (TG) マウスを開発した。in vivo での AMPK の作用の特異性を示すためにはこのトランスジェニックマウスのシステムを使用するのが最も効率と思われる。これらに片側尿管結紮 (UUO) モデルを作製し、尿細管オートファジーとアポトーシスを誘導するが、その前に飲水で DOX の投与を開始して AMPK mutants の発現を誘導しておく。caAMPK/ dnAMPK についてそれぞれ 1) 尿細管細胞のオートファジーの頻度、2) アポトーシスの頻度、3) TBM 外の間質線維化の程度、を AMPK 活性の増強された条件 / 抑制された条件、の両面から野生型マウス UUO 腎臓と比較して検討する。また一般的に臓器保護効果があるといわれる薬剤のうち内因性の AMPK を活性化すると考えられているテルミサルタン (Myojo M, Nagata D. *PLoS One* 9, e96948, 2014) またはバルサルタン (AMPK 活性化なし) を、DOX で誘導をかけた dnAMPK マウス UUO に投与して、野生型マウス UUO に投与したときと比較して上記 1) ~ 3) の項目を検討する。テルミサルタンの AMPK を介した尿細管細胞保護作用の有無と間質線維化の制御作用があるかについて検討する。アポトーシスは type programmed cell death と呼ばれ、オートファジーは type programmed cell death と呼ばれている。それらは一部共通の分子機序で制御されていることが知られている。Bcl-2 family や AMP-activated protein kinase (AMPK) がその例である。アポトーシスを引き起こす自己消化の限度はどこなのか、切り替えはどのようにして行われる

か、については未解明である。オートファジーの分子機序としてはmTORとUlk1がその調節に重要な働きをしていることが明らかとなってきたが、その両者ともAMPKにより制御されているところから、AMPKはオートファジーにおいても重要な鍵因子であると考えられる。今回のこの研究では、その腎尿細管特異的にAMPKの機能を調節可能なマウスを用いて、AMPKの役割を解明するのが目的であった。

3. 研究の方法

野生型 C57BL6 マウス、
Pax8-rtTA/TRE-**ca**AMPK、
Pax8-rtTA/TRE-**dn**AMPK

の3種類のマウスにDOX 0.2mg/mL入りの飲水を片側尿管結紮術(UUO)施行1日前から開始。野生型とdnAMPKの群の半分ではテルミサルタン(2.5mg/kg)とバルサルタン(5.0mg/kg)投与による腎保護効果を比較するために、それぞれの薬剤をUUO術直前からgavage投与で開始する。UUO施行後、両側腎臓を3, 7, 14日後に摘出する。組織用のサンプルを採取する場合には、sacrificeする。両側腎臓を摘出して、RNA・蛋白サンプルを調整しそれぞれの実験に供する。この研究の場合、TGマウスで健側と比較した結紮側での変化の割合を野生型マウスでのそれと較べることで結果が判定できる。薬剤を使った実験系ではsacrifice前にマウスの血圧をテールカフ法で測定する。

a)【組織学的解析】 HE, PAS, PAM, Masson-trichrome 染色。免疫染色としてはオートファジー細胞を抗LC3抗体にて染色する。Henleの太い上行脚:抗Na-K-Cl共輸送体抗体、遠位尿管:抗NCX1抗体、集合管:抗AQP3抗体が市販されているので尿管部位別に判別可能な二重染色も可能である。またアポトーシスを検討するためTUNEL染色も実施する。

b)【分子生物学的・生化学的解析】 組織学的なオートファジーを分子生物学的に補完するためにウエスタンブロット法でLC3とBeclin1の量を検討する。またBeclin1に関してはmRNAレベルでの変化の方が検出しやすいとの報告(Am J Pathol 176:1767;2010)もあるのでrealtime PCRも実施する。アポトーシスに関してはウエスタンブロット法でPARPのcleavageを評価する方法(Hypertens Res 32:133;2009)がCaspase活性化の検出能が高いのでこれを実施する。

電子顕微鏡を使った微細構造の観察とサイトカインの測定

1) 透過型電子顕微鏡による観察 透過型電子顕微鏡用のサンプルを取る場合、図7のサンプル採取の時の灌流固定を3%

glutardialdehyde, 0.1M cacodylate, 0.1% ouruc acidで行う(Nat Med 14:979,2008)。オートファジーではautophagic vacuoleが観察され、アポトーシスでは著明な核の凝縮、細胞質の断片化と周辺細胞による貪食像が観察されると予想される。

2) サイトカインの測定

尿管と(筋)線維芽細胞のオートファジーと細胞数減少、間質線維化の間には様々なサイトカインの関与が予想されている。腎髄質組織をminceして代表的サイトカインの濃度をELISAで測定し、総蛋白量で補正して他の組織学的、生化学的パラメータと比較検討することにより、その役割を推定する。

4. 研究成果

研究代表者の長田が、この研究申請時に所属していた獨協医科大学循環器・腎臓内科の准教授から自治医科大学腎臓内科の教授で異動し、自治医科大学において遺伝子改変動物を人工授精でSPF化して導入するのに2年弱の時間を要した。また獨協医科大学において実施した予備実験では、尿管特異的に遺伝子を導入してから尿管結紮後5日目では対照と比べて、dnでは間質線維化が増強し、caではやや減弱していたが、8日目ではどの群でも間質線維化の程度が高度で、有意な差を検出できなかった。このようなプレリミナリーな結果が得られていたので、自治医科大学でさらに違うタイミングでアポトーシス、オートファジーの関連因子の測定を実施する予定であった。しかし、尿先感特異的にdn, caをドキシサイクリンで誘導できなくなっていることが、自治医科大学における予備的検討で明らかとなった。異動時のSPF化の際になんらかの遺伝子変異が入ったのかどうかは不明であるが、現在トラブルシューティングをしているが、未だに解決できていない。途中で、血管内皮細胞特異的にdnを発現する遺伝子改変マウスも作成したので、トラブルシューティングをしつつも、そちらの方でトランスジェンが臓器特異的に発現するかを確認し、確認出来たときには今回の課題をその系でも実施する予定である。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(4) 研究協力者

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 2 件)

長田太助、瀧史香、前嶋明人、田中哲洋 内科【慢性腎臓病 (CKD) 診療を極める】2016 年 南江堂

長田太助 高齢者 CKD の特徴と管理 循環 plus【動脈硬化と臓器障害】2016 年 メディカルトリビューン

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.jichi.ac.jp/usr/neph/nephrology.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 太助 (NAGATA, Daisuke)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：40393194

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：