

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860683

研究課題名(和文)急性腎障害の病態におけるミトコンドリア機能とマイトファジーの意義の解明

研究課題名(英文)The role of mitochondrial function and mitophagy in the pathogenesis of acute kidney injury

研究代表者

大出 佳寿(Oode, Kazu)

高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40589537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、急性腎障害において、オートファジーとアポトーシスが病態に関与することを報告してきたが、腎臓病の病態におけるオートファジー/マイトファジーの役割については、十分に明らかにされていない。近位尿細管はミトコンドリアの含有量が高く、オートファジー/マイトファジーによりアポトーシスを回避し生存した尿細管は脱分化、再生に関与する可能性は高い。我々は、オートファジーをin vivoで検出できるGFP-LC3-TGマウスを使用した急性腎障害モデルにおいて、p53関連遺伝子であるSestrinが虚血により近位尿細管細胞で誘導されアポトーシスを抑制し、オートファジーを促進する事を報告した。

研究成果の概要(英文)：We have reported that both autophagy and apoptosis were related to the pathogenesis in acute kidney injury (AKI). However, the roles of autophagy and mitophagy in the pathogenesis of renal disease are poorly understood. Because proximal tubules highly include mitochondria, the tubules that could prevent apoptosis by autophagy and mitophagy might be possibly related to dedifferentiation and regeneration. We reported that sestrin, p53-related gene, which induced by ischemia-reperfusion in proximal tubules, suppressed apoptosis and further progressed autophagy in AKI model using GFP-LC3-TG mice that could recognize autophagy in vivo.

研究分野：腎臓病学

キーワード：急性腎障害 尿細管障害 オートファジー マイトファジー

#### 1. 研究開始当初の背景

現在、透析療法に至っている患者数は全国で30万人を越え、特に急性腎障害は患者の高齢化などにより発症頻度は高まっており、全入院患者の5%、ICU入院患者の20%で発症すると言われている。急性腎障害を起こした場合長期的な腎機能低下と生命予後の悪化が生じる。

#### 2. 研究の目的

尿細管細胞のミトコンドリア機能の保持及びミトコンドリアのオートファジーを調節することにより、腎機能の保護、回復・再生を目標とする。具体的には、1)尿細管細胞におけるマイトファジー系の腎保護への関与、2)急性腎障害におけるミトコンドリアの機能保持の薬物による調節、3)急性腎障害腎生検検体でのオートファジー/マイトファジー検出とその意義の検討である。

#### 3. 研究の方法

GFP-LC3-TG マウスを使用し、急性腎障害でオートファジーが引き起こされる新規遺伝子 Sestrin に注目し、Sestrin が急性腎障害回復期に近位尿細管細胞で誘導され、LC3-GFP で観察される Autophagosome との局在を共焦点顕微鏡で観察する。また Sestrin 遺伝子と BNIP3 遺伝子の強制発現及び siRNA による遺伝子発現抑制系を用いて、LC3-GFP 遺伝子を安定発現させた培養尿細管細胞でオートファジーの変化とミトコンドリアのマーカーである Mitochondria-Red を共発現して、ミトコンドリアで Autophagosome が起こるマイトファジーを現在確認しつつある。同時に RT-PCR、Western blot を用いた遺伝子とタンパク発現の両面から Sestrin のオートファジー系への作用を検討する。

#### 4. 研究成果

急性腎不全では、細胞は栄養飢餓状態になり、急速に誘導されるオートファジーと ATP レベルの低下によるアポトーシスの病態への関与を報告したが、しかしながら腎臓病の病態におけるオートファジー/マイトファジーの役割については、急性腎障害でオートファジーが保護的な作用をするという報告以外は不明であり尿細管の再生との関与は不明であった。上記の近位尿細管はミトコンドリアの含有量が高く、オートファジー/マイトファジーによりアポトーシスを回避し生存した尿細管は脱分化、再生に関与する可能性は高い。我々はオートファジーを in vivo で検出できる GFP-LC3-TG マウスを使用し、急性腎障害でオートファジーを起こす新規の p53 関連遺伝子として Sestrin と HIF-1 関連遺伝子 BNIP3 に注目し、Sestrin が虚血で近位尿細管細胞で誘導されアポトーシスを抑制し、オートファジーを促進する事を見いだし、アメリカ腎臓学会で口述発表をした。また、アメリカ腎臓学会には毎年多くの演題

を発表し、英語の原著論文、日本語の総説を初めとする多くの論文を発表した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計17件)

Matsumoto T, Urushido M, Ide H, Ishihara M, Hamada-ode K, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Taguchi T, Horino T, Fujimoto S, Terada Y: Small Heat Shock Protein Beta-1 (HSP1) Is Upregulated and Autophagy and Apoptosis of Renal Tubular Cells in Acute Kidney Injury. PLOS one, 10: e0126229, 2015, 査読有.

DOI: 10.1371/journal.pone.0126229

島村芳子, 松本竜季, 大出佳寿, 緒方巧二, 井上紘輔, 谷口義典, 堀野太郎, 寺田典生: 急性腎不全から急性腎障害へのパラダイムシフト. 特集 集中治療室 (ICU と CCU) における急性腎障害 (AKI) ICU と CCU Vol. 39 (1): 3-8, 2015, 査読無.

緒方巧二, 松本竜季, 大出佳寿, 島村芳子, 井上紘輔, 谷口義典, 堀野太郎, 寺田典生: 高齢者の慢性腎臓病 (CKD). 高齢者外来診察 スーパー総合医 352 (259-266), 2014. 査読無.

大出(瀨田)佳寿, 谷口義典, 島村芳子, 松本竜季, 緒方巧二, 井上紘輔, 堀野太郎, 寺田典生: 高血圧と(プロ)レニン受容体. 循環器内科 76(4): 410-413, 2014, 査読無.

Hamada K, Taniguchi Y, Shimamura Y, Inoue K, Ogata K, Ishihara M, Horino T, Fujimoto S, Ohguro T, Yoshimoto Y, Ikebe M, Yuasa K, Hoshino E, Iiyama T, Ichihara A, Terada Y: Serum level of soluble (pro)renin receptor is modulated in chronic kidney disease. Clinical and Experimental Nephrology, 17 (6) 848-56, 2013. 査読有. DOI: 10.1007/s10157-013-0803-y

Terada Y, Inoue K, Matsumoto T, Ishihara M, Hamada K, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Horino T, Karashima T, Tamura K, Fukuhara H, Fujimoto S, Tsuda M, Shuin T : 5-Aminolevulinic acid protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising the anticancer efficiency of cisplatin in rats in vitro and in vivo. PLoS one, 2013, 8(12):e80850, 査読有 . DOI:10.1371/journal.pone.0080850

Ishihara M, Urushido M, Hamada K, Matsumoto T, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Horino T, Fujieda M, Terada Y: Sestrin-2 and BNIP3 regulate autophagy and mitophagy in renal tubular cells in acute kidney injury. Am J Physiol Renal Physiol, 305(4):F495-509, 2013, 査読有 . DOI:10.1152/ajprenal.00642.2012

濱田佳寿, 松本竜季, 堀野太郎, 寺田典生 : 臨牀透析 . 特集 わが国における AKI 診療の現状と課題 臨牀透析 Vol.29 11 : 1553-1558, 2013, 査読無 .

島村芳子, 濱田佳寿, 緒方巧二, 井上紘輔, 谷口義典, 堀野太郎, 寺田典生 : 高 Na 血症の原因と治療は? 特集 最新の知識で答える水電解質 106 の疑問 腎と透析 74(4) : 650-652, 2013, 査読無 .

緒方巧二, 松本竜季, 濱田佳寿, 井上紘輔, 谷口義典, 堀野太郎, 寺田典生 : 急性腎障害の診断と治療 . 特集 最近の腎疾患診療 臨牀と研究 90(5) : 568-571, 2013, 査読無 .

島村芳子, 濱田佳寿, 松本竜季, 緒方巧二, 井上紘輔, 谷口義典, 堀野太郎, 寺田典生 : AKI (急性腎障害), CKD (慢性腎臓病) の概念とバイオマーカー . 特集 進行性腎障害 : 診断と治療の進歩 日本内科学会雑誌 102 : 1092-1097, 2013, 査読無 .

Shimamura Y, Hamada K, Inoue K, Ogata K, Ishihara M, Kagawa T, Inoue M, Fujimoto S, Ikebe M, Yuasa K, Yamanaka S, Sugiura T, Terada Y : Serum levels of soluble secreted -Klotho are decreased in the early stages of chronic kidney disease, making it a probable novel biomarker for early diagnosis. Clinical and Experimental Nephrology (2012) 16 : 722-729, 査読有 .

DOI:10.1007/s10157-012-0621-7

Ogata K, Shimamura Y, Hamada K, Hisa M, Bun M, Okada N, Inoue K, Taniguchi Y, Ishihara M, Kagawa T, Horino T, Fujimoto S, Terada Y: Upregulation of HNF-1 during experimental acute kidney injury plays a crucial role in renal tubule regeneration. Am J Physiol Renal Physiol 303:F689-699, 2012, 査読有 .

DOI:10.1152/ajprenal.00086.2012

Terada Y, Ueda S, Hamada K, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Kagawa T, Horino T, Takao T : Aldosterone Stimulates NF- $\kappa$ B Activity and Transcription of ICAM-1 and CTGF in Rat Mesangial Cells via SGK (Serum and Glucocorticoid-inducible Protein Kinase)-1 . Clinical and Experimental Nephrology 16:81-88, 2012, 査読有 .

DOI:10.1007/s10157-011-0498-x

島村芳子, 濱田佳寿, 近江訓子, 緒方巧二, 次田誠, 香川亨, 寺田典生 : トルバプタンを併用することで心不全症候を呈した微少変化型ネフローゼ症候群において限外濾過による除水を回避し得た一例 . 医薬ジャーナル 2月号 Vol.48 No2 : 164-166, 2012, 査読無 .

緒方巧二, 松本竜季, 濱田佳寿, 谷口義典, 寺田典生 : AKI の病態, 管理と予後 . 医薬ジャーナル 11月号 Vol.48 11 : 85-88,

査読無 .

寺田典生 , 安藤亮一 , 泉山肇 , 濱田佳寿 ,  
安藤進 : CKD 診療の最近の話題 . 日本内  
科学会雑誌 101 : 1354-1371 , 2012 , 査読無 .

[学会発表] (計 24 件)

Natsuki Maeda , Tatsuki Matsumoto , Kazu  
Hamada-Ode , Yoshiko Shimamura , Koji  
Ogata , Kosuke Inoue , Yoshinori  
Taniguchi , Shimpei Fujimoto , Yoshio  
Terada : Role of Thioredoxin-Interacting  
Protein(TXNIP) in Mitochondrial  
Function of Renal Tubular Cells in  
Ischemia Reperfusion Injury AKI Model.  
The 48th Annual Meeting of American  
Society of Nephrology , San Diego USA , Nov  
3-8 , 2015 .

Yuki Osakabe , Tatsuki Matsumoto , Kazu  
Hamada-Ode , Yoshiko Shimamura , Koji  
Ogata , Kosuke Inoue , Yoshinori  
Taniguchi , Taro Horino , Shimpei  
Fujimoto , Yoshio Terada :  
PNUTS(Phosphatase 1 Nuclear-Targeting  
Subunit)Is Down-Regulated in Acute  
Kidney Injury and Aging, and Regulates  
Cell Cycle, Fibrosis, DNA Damage of Renal  
Tubular Cells: A Longitudinal Follow-Up  
Study. The 48th Annual Meeting of  
American Society of Nephrology , San  
Diego USA , Nov 3-8 , 2015 .

Taro Horino , Yutaka Hatakeyama , Hiromi  
Kataoka , Tatsuki Matsumoto , Kazu  
Hamada-Ode , Yoshiko Shimamura , Koji  
Ogata , Kosuke Inoue , Yoshinori  
Taniguchi , Yoshio Terada : Incidence of  
Acute Kidney Injury Among Patients with  
Chronic Kidney Disease ; A Single-Center  
Retrospective Database Analysis . The  
48th Annual Meeting of American Society  
of Nephrology , San Diego USA , Nov 3-8 ,  
2015 .

Tatsuki Matsumoto , Kazu Hamada-Ode ,  
Yoshiko Shimamura , Koji Ogata , Kosuke  
Inoue , Yoshinori Taniguchi , Shimpei  
Fujimoto , Yoshio Terada : Small Heat  
Shock Protein Beta-1(HSPB1)Is  
Upregulated and Regulates Mitophagy and  
Apoptosis of renal Tubular Cells in  
Acute Kidney Injury . The 48th Annual  
Meeting of American Society of  
Nephrology , San Diego USA , Nov 3-8 , 2015 .  
大出佳寿 , 谷口義典 , 刑部有紀 , 西川浩文 ,  
島村芳子 , 松本竜季 , 緒方巧二 , 井上紘輔 ,  
堀野太郎 , 寺田典生 : 慢性腎臓病患者にお  
ける血清 Dickkopf-1 および Sclerostin は  
異なる動態を示す . 第 58 回日本腎臓学会  
学術総会 6 , 5-7 , 2015 . 名古屋国際会議  
場 , 名古屋市 .

Horino T , Otomo K , Miki T , Kataoka H ,  
Hatakeyama T , Matsumoto T , Ode K ,  
Shimamura Y , Ogata K , Inoue K , Taniguchi  
Y , Terada Y , Okuhara Y : High and low level  
of serum uric acid is a novel risk  
factors for acute kidney injury : A  
retrospective database analysis by  
using the Integrated Medical  
Information System at Kochi Medical  
School Hospital . ASN Kidney Week 2014 .  
Philadelphia , USA , November 11-16 , 2014 .  
大出佳寿 , 谷口義典 , 島村芳子 , 井上紘輔 ,  
堀野太郎 , 湯浅健司 , 吉本幸生 , 藤本新平 ,  
市原淳弘 , 寺田典生 : CKD 患者における血  
漿可溶性プロレニン受容体の臨床的意義  
について . 第 111 回日本内科学会総会・講  
演会 4 , 11-13 , 2014 . 東京国際フォーラ  
ム , 東京都 .

大出佳寿 , 堀野太郎 , 島村芳子 , 谷口義典 ,  
松本竜季 , 緒方巧二 , 井上紘輔 , 寺田典生 :  
クリオグロブリン血管炎を合併した限局  
型強皮症の一例 . 第 58 回日本リウマチ学  
会総会・学術集会 4 , 24-26 , 2014 . グラ

ンドプリンスホテル新高輪,東京都.

Terada Y, Oode K, Matsumoto T, Taniguchi Y, Horino T: DRUG THERAPY FOR ACUTE RENAL INJURY : WE NEED BETTER THERAPY FROM BENCH TO BEDSIDE. The Abstracts of the 14<sup>th</sup> Asian Pacific Congress of Nephrology 5, 14-17, 2014. Hotel Shinagawa Prince, Tokyo.

Yoshio Terada, Masayuki Ishihara, Kazu Hamada, Tatsuki Matsumoto, Yoshiko Shimamura, Kosuke Inoue, Yoshinori Taniguchi, Taro Horino, Keiji Inoue, Taro Shuin, Koji Ogata : 5-Aminolevulinic Acid (ALA) Protects against Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury via Protection of Mitochondrial Viability and Prevention of Tubular Apoptosis without Compromising Its Anticancer Efficiency In Vitro and In Vivo. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, Nov 5-10, 2013.

Koji Ogata, Tatsuki Matsumoto, Kazu Hamada, Yoshinori Taniguchi, Yoshiko Shimamura, Kosuke Inoue, Taro Horino, Yoshio Terada : Arginase2 Is Up-Regulated in Renal Tubular Cells of AKI and Regulated NO In Vitro and In Vivo. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, Nov 5-10, 2013.

Yoshiko Shimamura, Kazu Hamada, Koji Ogata, Kosuke Inoue, Yoshinori Taniguchi, Masayuki Ishihara, Taro Horino, Kenji Yuasa, Shigeo Yamanaka, Tetsuro Sugiura, Yoshio Terada, N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide Is a Novel Valuable Biomarker for Progression of CKD Patients: A Longitudinal Follow-Up Study. The 46th

Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, Nov 5-10, 2013.

Taro Horino, Kazunori Otomo, Kazu Hamada, Yoshiko Shimamura, Koji Ogata, Kosuke Inoue, Yoshinori Taniguchi, Yoshio Terada, Yoshiyasu Okuhara. Retrospective Analysis of 30 Years' Data Base, over 68000 Patients Using IMIS (Integrated Medical Information System in Kochi University) to Search Risk Factor of Acute Kidney Injury. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, Nov 5-10, 2013.

Tatsuki Matsumoto, Yoshinori Taniguchi, Yoshiko Shimamura, Kosuke Inoue, Taro Horino, Kazu Hamada, Yoshio Terada, Kenji Yuasa, Shimpei Fujimoto, Koji Ogata. The Role of Inflammatory Marker MRP8/14 in CKD Patients. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, Nov 5-10, 2013.

Kazu Hamada, Yoshiko Shimamura, Koji Ogata, Kosuke Inoue, Yoshinori Taniguchi, Masayuki Ishihara, Taro Horino, Kenji Yuasa, Yoshio Terada, Serum Level of Soluble (Pro)renin Receptor Is Modulated in Chronic Kidney Disease (CKD) and a Novel Valuable Biomarker for Progression of CKD: A Longitudinal Follow-Up Study. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, Nov 5-10, 2013.

Masayuki Ishihara, Madoka Urushido, Kazu Hamada, Yoshiko Shimamura, Koji Ogata, Kosuke Inoue, Yoshinori Taniguchi, Taro Horino, Mikiya Fujieda, Yoshio Terada. : Crosstalk between p53-Sestrin2 and Hypoxia-BNIP3 (Bcl-2/Adenovirus E1B 19kDa-Interacting Protein3) Pathways in

Regulating Autophagy, Mitophagy and Apoptosis in Renal Tubular Cells in Acute Kidney Injury. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, Nov 5-10, 2013.

濱田佳寿, 谷口義典, 島村芳子, 堀野太郎, 大黒隆司, 吉本幸生, 湯浅健司, 市原淳弘, 寺田典生: 血清可溶性プロレニン受容体濃度は CKD 患者の腎機能を反映する. 第 56 回日本腎臓学会学術総会 5, 10-12, 2013 東京.

Terada Y, Shimamura Y, Hamada K, Inoue K, Ogata K, Ishihara M, Kagawa T, Inoue M, Fujimoto S, Ikebe M, Yuasa K, Yamanaka S, Sugiura T, Nishiyama M: Serum levels of soluble secreted  $\alpha$ -Klotho are decreased in the early stages of chronic kidney disease, making it a probable novel biomarker for early diagnosis. 15<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology. 14<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology. May 5-9, 2012. Florence, Italy

Shimamura Y, Hamada K, Ogata K, Inoue K, Kagawa T, Ishihara M, Yuasa K, Terada Y: Serum Level of Soluble Secreted  $\alpha$ -Klotho Is a Novel Predictor for Renal Prognosis in CKD Patients. KIDNEY WEEK 2012. Oct30-Nov4, 2012 San Diego USA

Inoue K, Ogata K, Ishihara M, Urushido M, Okada N, Shimamura Y, Hamada K, Kagawa T, Takao T, Terada Y: Small Heat Shock Protein beta-1 (HSPB1 or HSP27) Is Up-Regulated and Regulates Autophagy and Apoptosis of Renal Tubular Cells in the Acute Kidney Injury In Vitro and In Vivo. KIDNEY WEEK 2012. Oct30-Nov4, 2012 San Diego USA

②1 Hamada K, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Kagawa T, Ishihara M, Yuasa K, Ichihara A, Terada Y: Serum Levels of

Soluble Prorenin Receptor and Prorenin Are Modulated in Chronic Kidney Disease Patients. KIDNEY WEEK 2012. Oct30-Nov4, 2012 San Diego USA

②2 濱田佳寿, 島村芳子, 緒方巧二, 井上紘輔, 香川 亨, 井上眞理, 石原正行, 池辺弥夏, 湯浅健司, 吉本幸生, 大黒隆司, 藤本新平, 高尾俊弘, 市原淳弘, 寺田典生: CKD 患者における血漿可溶性 (プロ) レニン受容体濃度と (プロ) レニン濃度測定 of 臨床的意義. 第 35 回日本高血圧学会総会 9 20-22, 2012. ウェスティンナゴヤキャッスル他, 名古屋市.

②3 寺田典生, 緒方巧二, 石原正行, 漆戸まどか, 岡田奈月, 島村芳子, 濱田佳寿, 井上紘輔, 堀野太郎: BNIP3 は急性腎障害において誘導され近位尿細管細胞の Autophagy と Mitophagy を調整する. 第 44 回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会 9, 28-29, 2012. 高知市文化プラザかるぼーと, 高知市.

②4 濱田佳寿, 島村芳子, 緒方巧二, 井上紘輔, 香川 亨, 井上眞理, 石原正行, 渡辺弥夏, 湯浅健司, 吉本幸生, 有井 薫, 寺田典生: CKD 患者における血漿プロレニン濃度測定 of 臨床的意義. 第 55 回 日本腎臓学会学術総会. 6, 1-3, 2012. パシフィコ横浜, 横浜市.

[ 図書 ] ( 計 1 件 )

谷口義典, 濱田佳寿, 島村芳子, 寺田典生: 3 薬物治療 利尿薬. 腎不全治療レシピ. 慢性腎不全治療 ( 保存期および透析 ), 丹羽利充編 304 ( 188-194 ), 医学出版, 2013.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大出 佳寿 ( ODE, Kazu )  
高知大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 4 0 5 8 9 5 3 7