

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460274

研究課題名(和文)腎系球体ポドサイトでのミトコンドリア細胞内分布の意義

研究課題名(英文)Glycolysis, but not Mitochondria, responsible for intracellular ATP distribution in cortical area of podocytes

研究代表者

仲川 孝彦(Nakagawa, Takahiko)

奈良県立医科大学・医学部・研究教授

研究者番号：60641595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：この慢性腎臓病の発症・進展の機序の一つが腎系球体構成細胞の1つであるポドサイトの機能異常である。正常なポドサイト形態維持におけるミトコンドリアと解糖系の役割を検討した。解糖系を阻害するとlamellipodiaの消失や運動能の減少が認められたが、ミトコンドリア阻害ではその現象が認められなかった。また、解糖系を阻害すると細胞辺縁部のATPのみが消失し、ミトコンドリア阻害ではその部位のATPは保持された。したがって、細胞内ATP分布は解糖系とミトコンドリアの両者がそれぞれの役割を担っており、特に細胞辺縁部では解糖系由来のATPが優位に存在すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Differentiated podocytes maintain glomerular physiology and require substantial levels of energy. Mitochondria and glycolysis are two major producers of ATP, but the precise roles of each in podocytes remain unknown. Mitochondria in differentiated podocytes are present in the central part of cell body. However, blocking mitochondria had minor effects on cell shape and migratory ability. In contrast, blocking glycolysis significantly reduced the formation of lamellipodia, a cortical area of these cells, and decreased cell migratory ability. Intracellular ATP distribution in lamellipodia was regulated only by glycolysis. Inhibiting glycolysis resulted in apoptosis, prevented differentiation, and impaired lamellipodia formation while inhibition of mitochondria reduced synaptopodin expression. These data suggest that mitochondria and glycolysis play parallel but distinct roles in differentiated and differentiating podocytes.

研究分野：腎臓病

キーワード：腎臓病 ポドサイト ミトコンドリア 解糖系

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病は年々罹患率が増加の一途を辿り、現在では 1330 万人の患者が国内には存在すると推測されている。この慢性腎臓病の発症・進展の機序の一つが腎糸球体構成細胞の 1 つであるポドサイトの機能異常である。正常なポドサイトは血液濾過や原尿生成に関与しているため、その異常が腎臓機能を障害するのである。それらの重要な役割を可能にしているのはその特殊な細胞形態であるが、現時点ではその細胞形態がどのように維持されているのかは不詳である。

一般的に、細胞の機能・構造維持に必須なエネルギー供給分子はアデノシン三リン酸 (ATP) であり、それは二つの経路、すなわち解糖系及びミトコンドリア酸化的リン酸化経路から産生される。ミトコンドリア経路では ATP が効率的に産生されるのに対し、解糖系における ATP 産生は非効率的である。しかしながら、解糖系では ATP 産生過程で種々の生物学的な副産物を産生するので、ミトコンドリアとは異なる役割を担っている可能性がある。ポドサイトではミトコンドリア酸化的リン酸化と解糖系の両者により ATP 産生が行われていることが報告されているが、細胞内におけるそれぞれの役割は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、ポドサイトの特殊形態における、ミトコンドリアと解糖系のそれぞれの役割を検討した。

### 3. 研究の方法

培養ポドサイトにおいて、ミトコンドリアと解糖系のそれぞれを抑制し、その機能を検討した。ミトコンドリアの機能を抑制するために、10  $\mu$ M Antimycin を用いた。また解糖系を抑制するために 2-deoxyglucose

(2-DG)を投与した。さらには解糖系律速酵素 Phosphofructokinase (PFK) の遺伝子発現を抑制することで、解糖系抑制の効果を確認した。細胞形態の評価として、辺縁部の lamellipodia の運動と形態の変化を観察した。メカニズムを明らかにするために、解糖系由来 ATP が細胞内 ATP 分布に与える影響を検討した。検討には、FRET を原理とした ATP プローブ (ATeam) を用いた。

### 4. 研究成果

まず、培養ポドサイトにおいて、ミトコンドリア経路あるいは解糖系経路のそれぞれを個別に阻害する条件を検討した。その結果、10  $\mu$ M Antimycin によりミトコンドリア経路を阻害できることを、また 10mM 2-deoxyglucose (2-DG) あるいは 100mM 2-DG により解糖系を部分的あるいは完全に阻害できることが明らかとなった。

そこで培養ポドサイトの辺縁部に存在する lamellipodia の形成とその機能の一つである細胞運動能におけるエネルギー代謝の影響を検討した。その結果、解糖系阻害では lamellipodia の消失や運動能の減少が認められたが、ミトコンドリア阻害ではその現象が認められなかった。またこの現象は解糖系の律速酵素 Phosphofructokinase (PFK) の遺伝子発現を抑制することで確認された。さらにミトコンドリア経路阻害と解糖系部分的阻害の影響を比較すると、細胞内 ATP 量は同程度の場合であっても、その両者には有意な差が認められた。これらの結果より、ミトコンドリア経路ではなく解糖系が lamellipodia 形成及び運動能を制御していると考えられた。一方で、ミトコンドリアの細胞内分布を Mitotracker にて検討してみると、それは核周辺に集合し lamellipodia が存在する細胞辺縁部には存在しないことも明らかとなった。

メカニズムを明らかにするために、解糖系由来 ATP が細胞内 ATP 分布に与える影響を検討した。検討には、FRET を原理とした ATP プローブ (ATeam) を用いた。細胞辺縁部の ATP は、解糖系を阻害すると消失したが、ミトコンドリア経路阻害による影響は認められなかった。したがって、細胞内 ATP 分布は解糖系とミトコンドリアの両者がそれぞれの役割を担っており、特に細胞辺縁部では解糖系由来の ATP が優位に存在すると考えられた。

最後に、これらの現象がマウスにおいても認められるかどうかを検討した。電子顕微鏡で観察すると、マウス腎臓ポドサイトのミトコンドリアは、細胞体やその近傍に存在するが、末端部である足突起には認められなかった。一方、免疫組織学的検討では解糖系律速酵素 PFK は足突起マーカーの Nephryn と共局在していた。生体内ポドサイト先端にミトコンドリアが存在しない所見は、培養細胞と類似していた。

最後に、糸球体構成細胞の 1 つであるメサンギウム細胞においても検討した。細胞間で異なる ATP 産生システムを利用していることが示唆された。以上のことから、ポドサイトの細胞内辺縁部における ATP 供給に重要な役割を担っているのは解糖系であり、その役割はミトコンドリアと異なることが明らかとなった。

## 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)

[雑誌論文](計 1 件)

Ozawa S., Ueda S., Imamura H., Mori K., Asanuma K., Yanagita M., Nakagawa T. Glycolysis, but not Mitochondria, responsible for intracellular ATP distribution in cortical area of

podocytes

Scientific Rep. 2015 Dec 18;5:18575. doi: 10.1038/srep18575

[学会発表](計 4 件)

Shota Ozawa, Kiyoshi Mori, Katsuhiko Asanuma, Motoko Yanagita, Takahiko Nakagawa

Distinct Roles of Glycolysis and Mitochondria in Podocytes.

48th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, USA, 2015

Takahiko Nakagawa

“ENOS and diabetic nephropathy”

48th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, USA, 2015

小沢将太、上田修子、今村博臣、森 潔、浅沼克彦、柳田素子、仲川孝彦

腎臓糸球体構成細胞ポドサイト細胞における、ATP 産生に注目した解糖系とミトコンドリアの異なる役割

第 38 回日本分子生物学会年回 第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2015. 12

小沢将太、上田修子、今村博臣、森 潔、浅沼克彦、柳田素子、仲川孝彦

ポドサイト細胞 cell cortex 部位での細胞内 ATP 分布は解糖系が担う

第 27 回日本糖尿病性腎症研究会, 東京, 2015. 12

[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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

(1)研究代表者 仲川孝彦

( Nakagawa, Takahiko )

奈良県立医科大学・医学部・研究教授

研究者番号：60641595

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )