

YIA 受賞記念講演 2

加齢によるオートファジー活性の変化がミトコンドリア機能低下を介して腎老化を引き起こす

Time-dependent dysregulation of autophagy: implications in aging and mitochondrial homeostasis in the kidney proximal tubule

山本 毅 士

Takeshi YAMAMOTO

はじめに

オートファジーは細胞内の主要な分解機構の一つであり、栄養飢餓、活性酸素、低酸素などが引き金となって、以下のように進行する(図1)。まず、細胞質に隔離膜が形成され、分解されるべき蛋白質やオルガネラを囲むようにその両端が伸長し融合する。これをオートファゴソームと呼び、この時、autophagy-related protein 5 (Atg5)が必須であり、LC3 (Atg8 のホモログ)が目印となる。このオートファゴソームがリソソームと融合しオートリソソームとなり、内部の物質を分解することによりアミノ酸、脂肪酸、グルコースなどが産生され、細胞に必要な蛋白質合成の材料や

エネルギーとして再利用される¹⁾。

オートファジーは不断に形成されたオートファゴソームが消失し再び形成されるきわめて動的な過程である。また、定常的に低いレベルで起こっている基底レベルのオートファジー(basal autophagy)と、種々のストレスに呼応して誘導される誘導性オートファジー(induced autophagy)があり(図2 上段)、その活性をフラックス(autophagic flux)と呼ぶ。ある時点でのオートファゴソームの多寡とオートファジー活性は必ずしも相関しない。autophagic flux を厳密に評価するには、バフィロマイシン、クロロキンといった薬剤を投与することで一定時間リソソームでの分解を阻害し、蓄積したオートファゴソームやオートファジーの選

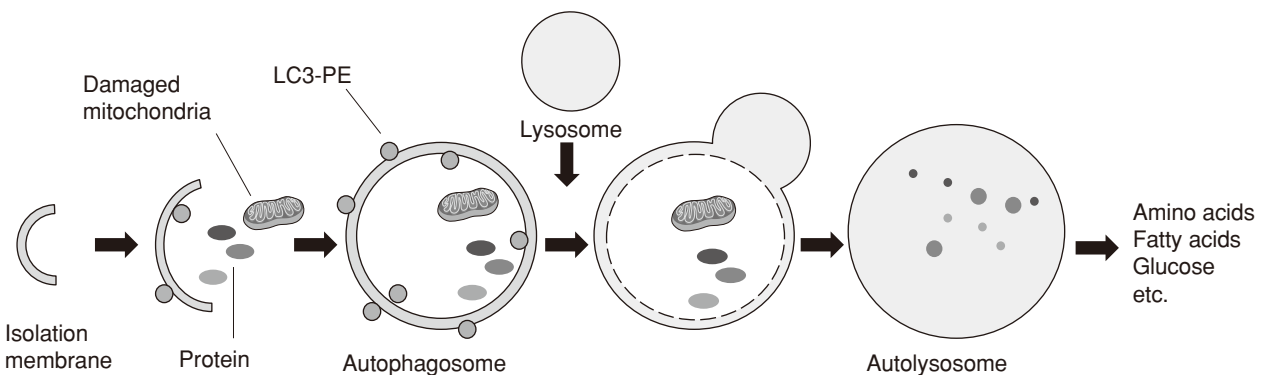


図1 オートファジーのメカニズム(文献1より引用)

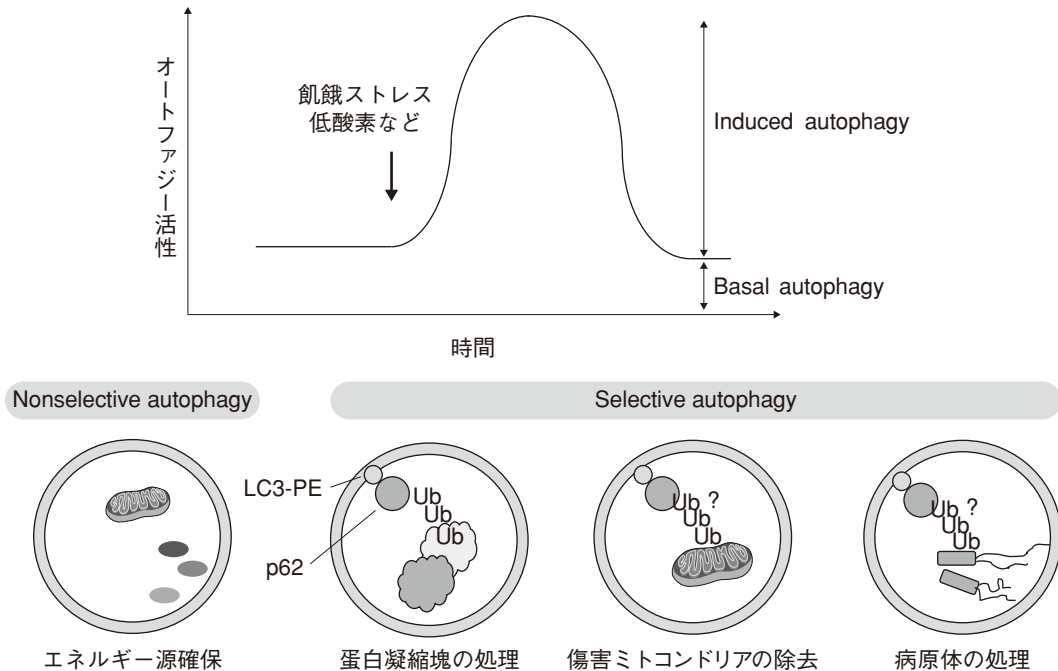


図2 基底レベルのオートファジーと誘導性のオートファジー(上段), およびオートファジーの生理的役割(下段) オートファジーは上記のほか, 抗原呈示, 発癌抑制, 発生分化など多彩な生理機能を持つ。
Ub: ユビキチン (文献1より引用)

担の基質である p62 陽性蛋白凝集塊の数を評価する方法が知られている。しかしながら, 手技や定量方法が煩雑であり *in vivo* では一般的ではない。さらにオートファジー活性の亢進・減弱を評価する際には, 分解すべき基質の量とのバランスが重要であり, それらを *in vivo* において総合的に評価することは容易ではない。

オートファジーは, 栄養飢餓時に非選択的に蛋白質やオルガネラを分解してエネルギー源を確保するのが基本的な役割だが, 近年, 蛋白凝集塊や傷害ミトコンドリア, 病原体などがオートファゴソームに取り囲まれ分解される選択的なオートファジーが注目されている(図2下段)。何らかの要因でオートファジー不全があると, それぞれに応じた障害(神経変性疾患, 活性酸素の産生, 炎症反応など)が発生する。また, 尿細管はミトコンドリアが豊富でエネルギー要求性が高いため, オートファジーが重要な役割を果たすと推測される。

このようにオートファジーは細胞内品質管理を担うことから, 「オートファジーには抗老化作用があり, オートファジー活性の経年的な減弱により, 細胞内老廃物の蓄積が起こり老化につながる」という仮説が成り立つ²⁾。個体老化でオートファジーが減弱するかどうかは, 前述の通り, *in vivo* でオートファジー活性を厳密に評価する方法が確立されて

おらず, また長期の飼育・観察が必要となるため, 結論は得られていない。一方, オートファジーに抗老化作用があるかどうかに関しては, 線虫やショウジョウバエでカロリー制限などの寿命を延長させる操作によりオートファジーが活性化されること, その寿命延長効果にオートファジーが重要な役割を担っていることが判明している。ただし, マウスやヒトで同じことがあてはまるかどうかはやはり不明である。

以上の背景から, 本研究では新たに確立した遺伝子改変マウスを用いた検討により, 「腎尿細管オートファジーは, ①加齢により減弱するか, ②腎臓の老化に対抗するか」を検証した。

腎尿細管オートファジーは加齢によって減弱するか

まず, 「①加齢により減弱するか」の課題に取り組むために, オートファジーに必須である *Atg5 flox* マウスと薬剤誘導性近位尿細管特異的 Cre 発現マウス (*NDRG1-Cre* マウス: 京都大学柳田素子先生作製) との交配により薬剤(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を作製し, 若年(2カ月齢)・中年(12カ月齢)・老年マウス(24カ月齢)を用いた。それぞれのマウスにタモキシ

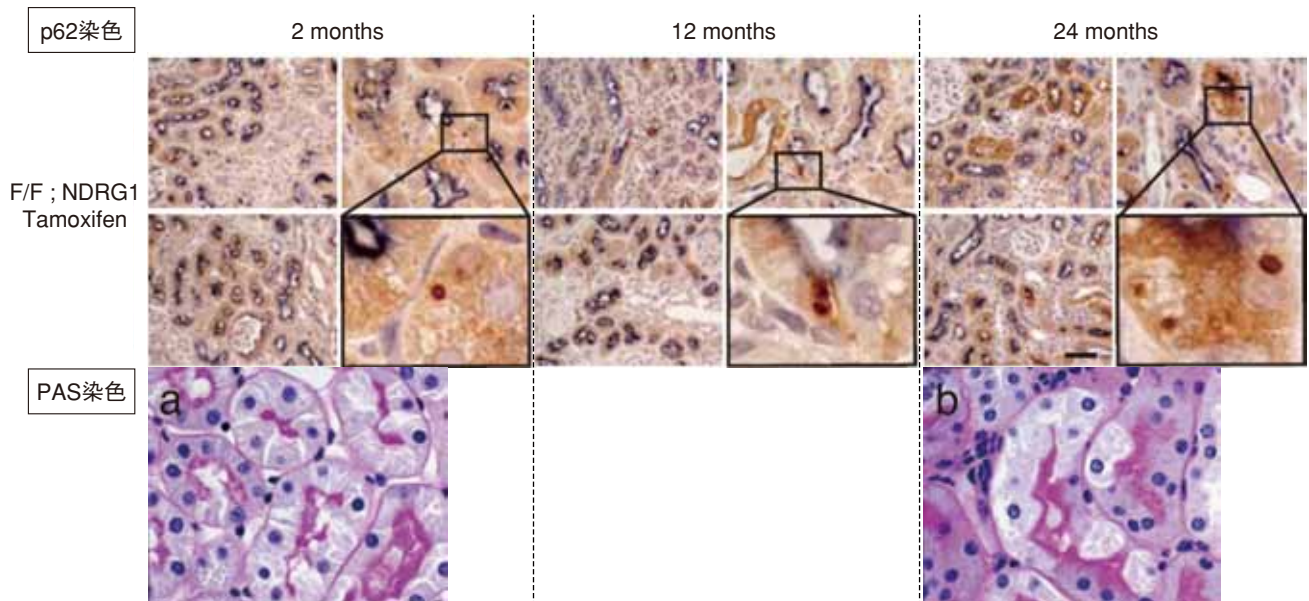


図3 加齢により腎尿細管ではオートファジーの仕事量が増加し、不全によるダメージが若年マウスと比較して相対的に大きくなる (文献3より引用)

フェンを投与し、2週間近位尿細管特異的にオートファジー不全状態にした。オートファジー不全となった尿細管は細胞腫大がみられたが、若年マウスに比し老年マウスでは高度に腫大・変形し、老年マウスほどオートファジー依存性が高いことが示唆された。次にオートファジーの選択的基質である p62 の免疫染色を行ったところ、老年マウス尿細管では p62 陽性凝集塊蓄積が著増した。以上より、老年マウス尿細管においてオートファジーがより多くの基質を処理していることが判明した(図3)³⁾。

加齢によるオートファジー活性の変化を示すもう一つの実験として、オートファゴソーム可視化マウス(オートファゴソームが GFP 陽性ドットとして可視化できる GFP-LC3 マウス)を用い、自由摂取下あるいは24時間絶食、クロロキン投与あり、あるいは投与なしの条件下で評価した。若年マウス腎尿細管では自由摂食下においてオートファジー亢進は認めず、絶食に反応してオートファジー亢進がみられた。それに対して、老年マウス腎尿細管では自由摂取下でもオートファジー亢進がみられた。一方、若年マウスでみられた絶食に対するオートファジー亢進は欠如していた。

2種類の遺伝子改変マウスを用いた検討により、老年マウスでは種々の加齢ストレスに対抗すべく、基底レベルのオートファジーが亢進していることが判明した。一方、更なるストレスが加わった際にオートファジーは若年マウス

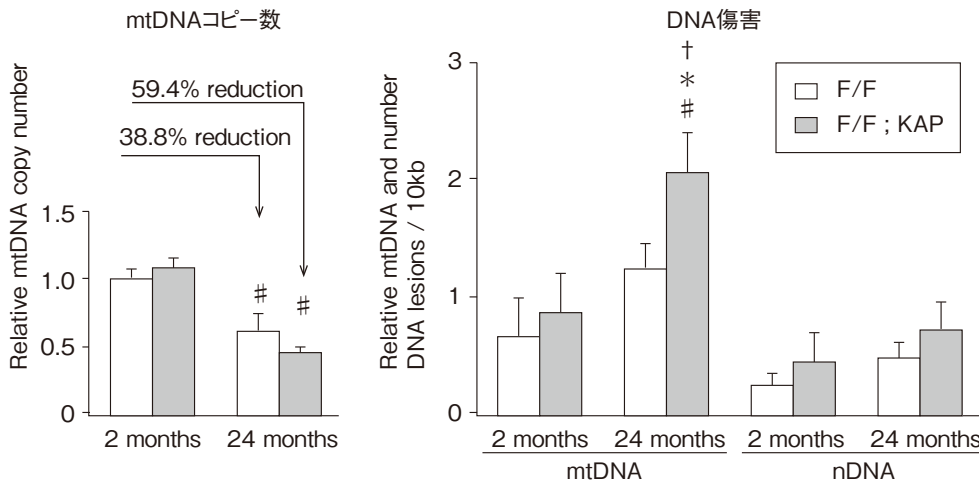
ほど亢進することができず、ストレスに適切に対抗できないことが判明した。

腎尿細管オートファジーは腎臓の老化に対抗するか

次に、「②オートファジーが実際に老化に対抗しているのか」を検討した。われわれのグループでは、以前、KAP-Cre マウス(東海大学新村文男先生、松阪泰二先生作製)と Atg5 flox マウスを交配することにより尿細管特異的オートファジー不全マウスを作製し報告した⁴⁾。今回、腎臓の老化への影響をみるために、このノックアウトマウスを24カ月飼育し解析を行った。

若年ノックアウトマウスの腎臓は若年コントロールマウスに比べやや腫大する一方、老年ノックアウトマウスの腎臓は萎縮がみられた。また、老年ノックアウトマウスでは尿中アルブミン排泄、血漿クレアチニン値が有意に増加した。PAS 染色では、老年ノックアウトマウスの尿細管細胞は高度に腫大・変形し、核の不規則な配列、管構造の破綻を認め、オートファジーが近位尿細管の極性維持に影響を与えていることが示唆された。老年ノックアウトマウスでは、コラーゲン I 免疫染色およびコラーゲン I mRNA 発現が有意に増加しており、Masson's Trichrome 染色で腎線維化の進行がみられた。古典的な老化のマーカーである SA β gal 染色では、老年ノックアウトマウスで強い染色を認め、

単離尿管細胞での解析



Mean ± SE * : p<0.05 vs F/F, # : p<0.05 vs 2 months, † : p<0.05 vs nDNA

図4 老年のオートファジー不全マウスは、ミトコンドリアDNAコピー数減少およびミトコンドリアDNA損傷が野生型マウスに比較して悪化する
mtDNA : ミトコンドリアDNA, nDNA : 核DNA (文献3より引用)

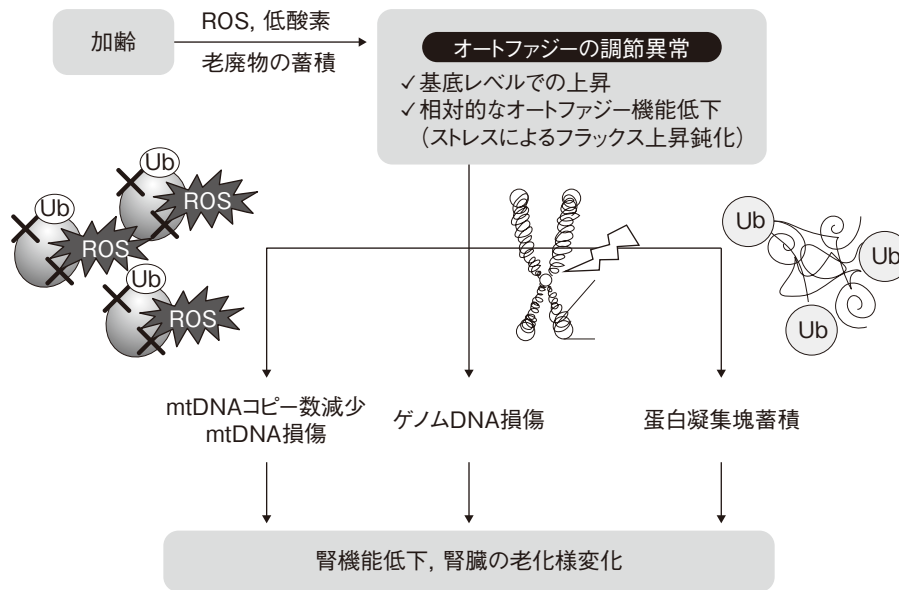


図5 オートファジーと腎老化のかかわり

加齢によるストレスに抗すべくオートファジーは持続的に活性化され、オートファジー依存性が増す。しかし新たなストレスに対しては適切なストレス応答ができない。このような反応性の低下は、おそらく日常臨床でも高齢者におけるストレスに対する適応性低下の一因であると思われる。オートファジーが低下することで、ミトコンドリアDNA損傷、数の減少、機能低下、またゲノムDNA損傷などが生じ、腎臓の老化を加速させる。

Ub : ユビキチン, ROS : reactive oxygen species, 活性酸素

オートファジー不全が老化を加速させることが判明した。続いて、電子顕微鏡による観察を行ったところ、老年コントロールマウスの近位尿管ではミトコンドリアが比較的

密に存在しクリステ構造を保っている一方で、老年ノックアウトマウスでは、ミトコンドリア密度が低下しており分布異常がみられ、クリステ構造が消失した大小不同のミト

ミトコンドリアが散在していた。

そこで、「腎尿細管オートファジーがミトコンドリアの品質管理を介して老化に対抗している」という仮説に対しさらに検証を進めた。老年ノックアウトマウスでは、酸化ストレスマーカーである尿中 8OHdG の増加, 4HNE, dityrosine 染色の染色性増強を認め、傷害ミトコンドリアが活性酸素を産生し老化を加速させていることが示唆された。次に、ミトコンドリア呼吸鎖酵素活性を表わす COX 染色を施行したところ、老年コントロールマウスにおいて軽度の染色性低下がみられる一方、老年ノックアウトマウスでは著明に低下していた。

さらに、単離した近位尿細管からミトコンドリア DNA を抽出し評価したところ、ミトコンドリア DNA コピー数は、加齢に伴いコントロールマウスにおいて 38.8% の減少を、ノックアウトマウスにおいては 59.4% の減少を認めた。ミトコンドリア DNA 傷害も増悪した(図 4)³⁾。核 DNA 傷害を表わす γ H2AX 染色では、老年ノックアウトマウス尿細管で γ H2AX 陽性細胞が著増していた。以上の結果をまとめると、老年の近位尿細管特異的オートファジー不全マウスでは、腎機能低下、腎萎縮を認め、さらにミトコンドリア DNA コピー数の減少、ミトコンドリア DNA 損傷、ミトコンドリア機能低下、ゲノム不安定性といった老化様所見の進行が認められた。

本研究により、オートファジーは加齢ストレスに抗すべく持続的に活性化され、経年的にオートファジー依存性が増すこと、しかし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、腎臓の老化につながる事が明らかになった(図 5)。このような加齢に伴う反応性低下は、日常臨床における、高齢者のストレスに対する適応性低下の一因であると思われる。オートファジー活性を低下させない医学的戦略が老化、慢性腎臓病の防止に貢献する可能性が示された。

謝 辞

最後にこの研究を支えてくださった、高嶋義嗣先生、木村友則先生、猪阪善隆先生をはじめ、すべての研究室と関係者の方々に心より感謝致します。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Takabatake Y, Kimura T, Isaka Y. Autophagy and kidney aging. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* 2012 ; 54 : 78-85.
2. Cuervo AM. Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends Genet* 2008 ; 24 : 604-612.
3. Yamamoto T, Takabatake Y, Kimura T, Takahashi A, Namba T, Matsuda J, Minami S, Kaimori JY, Matsui I, Kitamura H, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Isaka Y, Rakugi H. Time-dependent dysregulation of autophagy: Implications in aging and mitochondrial homeostasis in the kidney proximal tubule. *Autophagy* 2016 ; 12 : 801-813.
4. Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Kaimori JY, Matsui I, Namba T, Kitamura H, Niimura F, Matsusaka T, Soga T, Rakugi H, Isaka Y. Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2011 ; 22 : 902-913.