

【要約】

Influence of autophagy on acute kidney injury in murine sepsis model  
(マウス敗血症モデルにおける Autophagy の急性腎傷害への影響)

千葉大学大学院医学薬学府  
先端医学薬学専攻  
(主任：織田 成人教授)  
砂原 聡

## 【要旨】

敗血症の病態下の腎における autophagy の役割を盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture; CLP) モデルマウスを用いて検討した。CLP モデルマウスの腎では時間経過とともに autophagy flux が抑制されており、また、autophagy の促進により腎機能の回復が認められた。Autophagy の臓器保護的な役割が示唆されたが、治療への応用には autophagy の促進方法やタイミングなどに関して更なる検討が必要である。

## 【背景・目的】

Autophagy は、自食を意味する細胞内の障害されたもしくは老朽化したオルガネラや変性した蛋白を分解する反応であり [1-3]、そもそも飢餓応答としての生命維持に必須のシステムである。分解の結果生じた高分子は、細胞質に還元され、同化作用経路とエネルギー生産に用いられる [4,5]。また autophagy には、不要な organelle の分解や飢餓時の栄養供給以外にも、腫瘍抑制 [6,7] や、病原微生物の排除 [8,9] など生体防御上の役割などが確認されている。さらに、autophagy が重症感染症の病態におけるシグナル伝達機構により発動することや、病原微生物の捕捉を行うことから、敗血症の病態においてもこのシステムが重要な役割を担っていると考えられる。実際、心 [10, 11]、肺 [12]、肝 [13,14] などに関しては、敗血症の病態下における autophagy の役割について報告がある。そして、その多くは autophagy には臓器保護的作用があるとしている。しかし、敗血症の病態下における腎と autophagy の関係に関する報告はほとんどないため、本研究では、これを明らかにすべく、CLP モデルマウスを用いて検証した。

## 【方法】

### ・ CLP モデルマウスの作成

C57BL/6N マウス (雄, 6-8 週齢) を用いた。23 ゲージ針を用いた 2 punctures とした。手術後は絶食で、水分摂取は可とした。コントロールには sham (単開腹) を用いた。

I. CLP, sham 施行後より 6-8 時間および 24 時間後にマウスを犠死せしめ、腎を採取し、以下の評価を行った。

#### (1)腎における autophagy 解析

①電子顕微鏡を用いた autophagy 構造 (autophagosome, autolysosome) のカウント

②western blotting による autophagy 関連蛋白 (p62, Rubicon) の測定

II. Autophagy を促進する薬剤である rapamycin 投与モデルを作成した。すなわち, sham, CLP 施行から 1 時間後に腹腔内に rapamycin 200 $\mu$ g を投与した。コントロールとして、溶媒である DMSO を同様に投与した群も作成した。I.と同様のタイムコースでマウスを犠死せしめ、血液を採取し以下の評価を行った。

#### (1)腎機能評価

①血清 Blood Urea Nitrogen (BUN) , creatinine, cystatin C の測定

## 【結果】

電子顕微鏡による autophagy 構造のカウントでは、CLP 6-8 時間後群に比し、CLP 24 時間後群では autolysosome 数が有意に増加していた ( $p<0.05$ )。一方、Autophagy プロセスの停滞により増加する蛋白である p62 は、CLP 6-8 時間後群に比し、CLP 24 時間後群において有意に増加していた ( $p<0.05$ )。また、autophagosome と lysosome の癒合を阻害することで、autophagy を阻害する蛋白である Rubicon も同様に、CLP 6-8 時間後群に比し、24 時間後群において有意に増加していた ( $p<0.01$ )。さらに、CLP24 時間後マウスにおいて、rapamycin 投与群では、DMSO 投与群に比し血清 cystatin C 値が有意に低かった ( $p<0.05$ )。BUN, creatinine においては有意差を認めなかった。

## 【考察】

CLP マウスでは、6-8 時間後に比し 24 時間後で autolysosome の増加を認めたが、一方で、時間経過とともに autophagy が阻害され、停滞する傾向を認めた。そして、CLP マウスで autophagy を促進すると、腎機能が改善した。

敗血症患者の剖検腎検体において autophagosome が増加しているという報告[15]や、敗血症モデルの動物実験において、autophagy が臓器保護的であるとの報告[10-14]がなされている。また、虚血再灌流モデルなどによる敗血症以外の原因の AKI において、autophagy が腎保護的に作用しているとする報告[16]がある。これらの報告や今回の結果を踏まえると、敗血症の病態において autophagy は腎保護的作用があると考えられる。Autophagy には、障害ミトコンドリアを認識して選択的に分解する機能がある (Mitophagy) [17]。また、敗血症による急性腎障害の主な機序の 1 つは、障害ミトコンドリアの増加により惹起される細胞傷害とされる。この障害ミトコンドリアを autophagy が処理することが腎保護作用の機序として考えられる。

Rapamycin は autophagy を促進する薬剤であるが、それ自体に腎障害を惹起する作用もあるとされる[18]。今回、敗血症の病態において autophagy の促進は腎機能を改善することが示唆されたが、これを臨床応用する為には、どのようなタイミングで、またどのような方法で autophagy を促進すべきであるかについては、今後更なる検討が必要である。

## 【References】

1. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE: Cell death. N Engl J Med 2009, 361(16):1570-1583.
2. Levine B, Klionsky DJ: Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Dev Cell 2004, 6(4):463-477.
3. Levine B: Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell 2008, 132(1):27-42.
4. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T: Autophagosome formation in mammalian cells.

Cell Struct Funct 2002, 27(6):421-429.

5. Levine B, Mizushima N, Virgin HW: Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011, 469(7330):323-335.

6. Choi KS: Autophagy and cancer. *Exp Mol Med* 2012, 44(2):109-120.

7. Kimmelman AC: The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev* 2011, 25(19):1999-2010.

8. Amano A, Nakagawa I, Yoshimori T: Autophagy in innate immunity against intracellular bacteria. *J Biochem* 2006, 140(2):161-166.

9. Yoshimori T, Amano A: Group a Streptococcus: a loser in the battle with autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009, 335:217-226.

10. Hsieh CH, Pai PY, Hsueh HW, Yuan SS, Hsieh YC: Complete induction of autophagy is essential for cardioprotection in sepsis. *Ann Surg* 2011, 253(6):1190-1200.

11. Ikeda Y, Shirakabe A, Brady C, Zablocki D, Ohishi M, Sadoshima J: Molecular mechanisms mediating mitochondrial dynamics and mitophagy and their functional roles in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol* 2015, 78:116-122.

12. Savva A, Plantinga TS, Kotanidou A, Farcas M, Baziaka F, Raftogiannis M, Orfanos SE, Dimopoulos G, Netea MG, Giamarellos-Bourboulis EJ: Association of autophagy-related 16-like 1 (ATG16L1) gene polymorphism with sepsis severity in patients with sepsis and ventilator-associated pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014, 33(9):1609-1614.

13. Takahashi W, Watanabe E, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Yoshidome H, Swanson PE, Tokuhisa T, Oda S, Hatano M: Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Crit Care* 2013, 17(4):R160.

14. Chien WS, Chen YH, Chiang PC, Hsiao HW, Chuang SM, Lue SI, Hsu C: Suppression of autophagy in rat liver at late stage of polymicrobial sepsis. *Shock* 2011, 35(5):506-511.

15. Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, To K, Fagley RE, Sato B, Jarman S, Efimov IR, Janks DL, Srivastava A et al: Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2013, 187(5):509-517.

16. Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Kaimori JY, Matsui I, Namba T, Kitamura H, Niimura F, Matsusaka T, Soga T et al: Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2011, 22(5):902-913.

17. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ: Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 2008, 183(5):795-803.

18. Godel M, Hartleben B, Herbach N, Liu S, Zschiedrich S, Lu S, Debreczeni-Mor A, Lindenmeyer MT, Rastaldi MP, Hartleben G et al: Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice. *J Clin Invest* 2011, 121(6):2197-2209.

