

特集：腎障害における老化のかかわり

腎臓の老化とオートファジー

Autophagy and kidney aging

高 島 義 嗣 木 村 友 則 猪 阪 善 隆

Yoshitsugu TAKABATAKE, Tomonori KIMURA, and Yoshitaka ISAKA

はじめに

1960年代初頭に発見されたオートファジーは、長らくその生理的意味や分子機構が不明な時期が続いたが、1990年代の酵母におけるオートファジー不能株の取得を契機に分子基盤の解明が急速に進んだ。オートファジーは、酵母からヒトに至るまで真核動物が普遍的に備える大規模タンパク分解系であり、細胞飢餓時におけるエネルギー源確保以外にも予想外の多彩な生理機能が次々と発見されている。老朽化した細胞質成分を少しずつ無害化処理しながらリサイクルしていくことによって細胞内の品質管理を担うことから、オートファジーの抗老化作用としての役割が注目されている。

本稿ではオートファジーについて概説し、腎臓を含めた諸臓器の老化とオートファジーのかかわりについて最新の知見を交えて解説する。

オートファジーとは何か

オートファジーは「自己の細胞質構成成分をリソソームの酸性コンパートメント内で分解するシステム」と定義される^{1,2)}。少なくとも3種類のシステム、①マクロオートファジー(後述)、②ミクロオートファジー(リソソームが直接基質を取り囲んで分解するシステム)、③シャペロン介在性オートファジー³⁾(特定のシグナル配列を持ったタンパク質が分子シャペロンの助けを借りてリソソーム膜上の透過装置を介して直接リソソームへ送り込まれるシステム)、が知られている。後二者に関してはその重要性に関して十分に確立されたとは言えず、通常、オートファジーとはマ

クロオートファジーを指す。

(マクロ)オートファジーは以下のように進行する(図1)。まず細胞質に隔離膜(isolation membrane)あるいはphagophoreと呼ばれる扁平な膜構造が現われ(小胞体やミトコンドリアがその由来とされる)、分解されるべきオルガネラやタンパク質を囲むようにその両端が伸長し、最終的に末端同士が融合する(オートファゴソーム)。隔離膜は空気の抜けたボールのような形態を持つので、結果的にオートファゴソームは二重膜を持つ。オートファゴソームはリソソームと融合しオートリソソームとなる。オートリソソームの内部ではリソソーム由来の加水分解酵素群により排他的に内包物が分解され、アミノ酸、脂肪酸、グルコースなどの分解産物が産生され、細胞に必要なタンパク合成の材料やエネルギーとして再利用される。

従来、オートファジーはユビキチン-プロテオソーム系と対比されてバルク分解系と称され、非特異的で大量の細胞内分解を担うと考えられてきたが、最近、傷害されたミトコンドリアの分解など選択的なオートファジーが知られるようになり重要な研究対象になっている⁴⁾。オートファジーそのものは1960年代初頭の電子顕微鏡による観察を契機に発見され⁵⁾、腎臓においても特に尿細管において時期を経ずして存在が報告されていた。以後数十年間その分子メカニズムが不明な時期が続いていたが、1990年代に大隅良典らによる酵母のオートファジーの発見とオートファジー変異株の取得を契機に、その分子機構の理解が進み爆発的に研究が進展した⁶⁾。得られた変異株の解析から、今日、Atg (autophagy-related proteins) と呼称されるオートファジーに必須のタンパク質群が同定されている。酵母ではAtg1 から Atg35 まで同定され、これらがユビキチン様結合反応系を構成しオートファジーの進行にかかわる。これらの約半数はオートファジーに必須で、特に Atg5 あるいは

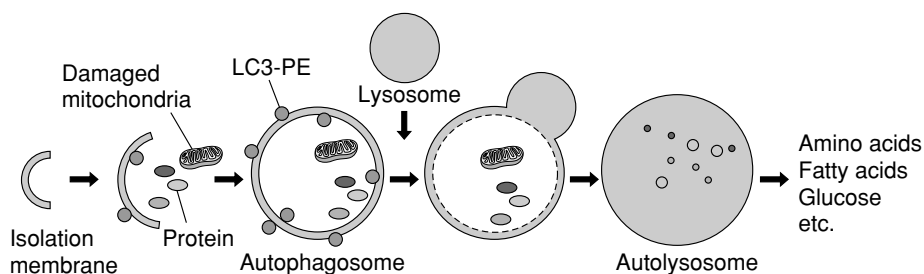


図 1 (マクロ)オートファジーのメカニズム

Atg7 のノックアウトあるいはノックダウンはオートファジー不全を実現するために繁用される。ただし、最近 Atg5 あるいは Atg7 非依存性のオートファジーも報告されている⁷⁾。また、一部の Atg はオートファジー以外の機能を有するため注意が必要である〔例えば Beclin1 (酵母 Atg6 ホモログ) はオートファジーに必須であるが、エンドサイトーシスなどにもかかわる〕。

して LC3-II の蓄積を評価することにより flux の程度を推定することは可能であるが、*in vivo* では一般的でない。このように、オートファジーの亢進・減弱を捉えることは必ずしも容易ではない。(オートファジーの評価方法に関するガイドラインが作成されているので参照されたい¹⁰⁾。)

オートファジーの検出と評価方法

最も古典的かつ生化学的なアプローチは、オートファジーが長寿命タンパク質を分解することを利用する方法で、あらかじめアイソトープ標識した分岐鎖アミノ酸をタンパク質に取り込ませたあと、種々の刺激下で遊離するアミノ酸を定量する方法がある⁸⁾。オートファゴソームを形態学的に検出する基本は電子顕微鏡で脂質二重膜に取り囲まれた構造物を観察することであるが、容易に想像されるように効率の良い方法ではない。現在では、LC3 (Atg8 のホモログ) がオートファゴソーム形成の過程で PE (ホスファチジルエタノールアミン) と結合し (LC3-II) オートファゴソーム膜上に局在することを利用して (図 1)、蛍光標識した LC3 のドット形成 (オートファゴソームに相当する) を蛍光顕微鏡で観察したり、SDS-PAGE での移動度の差を観察したりする (LC3-II は移動が速い) 方法が一般に採用されている⁹⁾。

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り、そのターンオーバーの速度をフラックス (flux) と呼んでいる。「オートファジーが亢進していること」を証明するにはこの flux を捉えることが重要である。顕微鏡下でオートファゴソームが多数観察されたとしても、それが「オートファジーが何らかの原因で停滞している」ことを意味しているのか、「亢進している」のを意味しているのかは不明である。*in vitro* では、細胞に一定時間オートファジー阻害剤を添加

オートファジーの役割と老化とのかかわり

オートファジーは定常的に低レベルで起こっており (基底レベルのオートファジー; basal autophagy)、低栄養・虚血など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) (図 2 上段)。Atg タンパク質のノックアウトマウスの解析から、哺乳動物におけるオートファジーの多様な生理機能が判明している (図 2 下段)。最も重要な機能は栄養飢餓に対する栄養源の確保であり、オートファジーによる分解産物を栄養素として確保し、再利用することにある¹¹⁾。神経細胞特異的にオートファジー不全にすると、神経細胞の細胞質にユビキチン陽性のタンパク凝集体が蓄積し神経変性疾患様症状を呈する^{12,13)}。肝特異的オートファジー不全マウスでも同様に、ユビキチン陽性の封入体が観察され肝機能障害を認める¹⁴⁾ ことから、基底レベルのオートファジーが各臓器で細胞内タンパク質の品質管理を担っていることが推測されている。オートファジーはオルガネラの品質管理にも重要であり、前述のように、傷害ミトコンドリアを選択的に分解するオートファジー (マイトファジー) が出芽酵母や哺乳動物細胞で証明されており、活性酸素の産生を通じて細胞に傷害を与えるミトコンドリアを除去する役割を担う⁴⁾。このほかオートファジーは、発生¹⁵⁾、抗原呈示¹⁶⁾、炎症反応の制御¹⁷⁾、抗腫瘍原性^{18,19)} への関与が証明されている。

オートファジーは細胞内品質管理を担うことから、「オートファジーの経年的な減弱→細胞内老廃物の蓄積→老化」という仮説が成り立つ²⁰⁾。個体老化でオートファジーが減弱しているとする報告は複数存在する。代表的な報告を紹

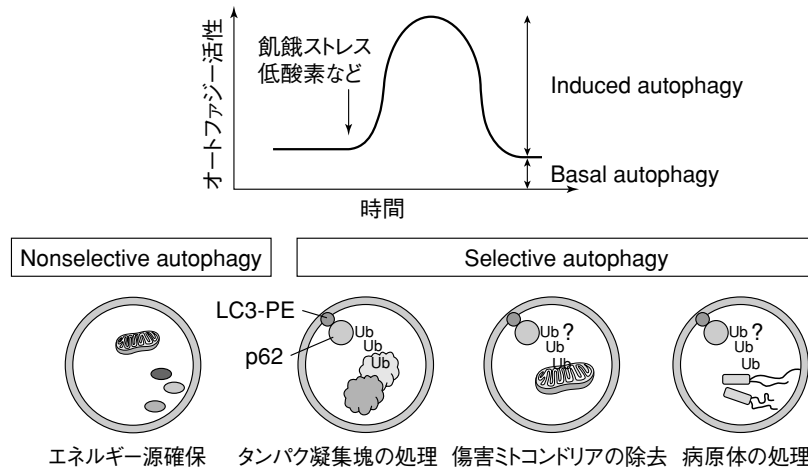


図 2 基底レベルと誘導性のオートファジー(上段)とオートファジーの生理的役割(下段)

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

介すると、Bergamini らは、種々の年齢のラットから肝細胞を単離し、アイソトープ標識したバリンを細胞に取り込ませ一定時間後に培養液中への放出量を測定する方法でオートファジーを評価したところ、6カ月齢をピークにオートファジーの程度が経時的に低下することを報告している²¹⁾。加齢によるオートファジー減弱のメカニズムに関しては、加齢に伴ってリソソーム内に蓄積したりポフスチンや有害なタンパク凝集塊がオートファゴソームとリソソームの融合を阻害する可能性²²⁾や、活性酸素によりインスリン受容体がインスリン非依存的に活性化されるため、グルカゴンによるオートファジー活性化が阻害される可能性²³⁾が指摘されている。一方でこれらの言説に相反する報告もある。Wohlgemuth らは、心臓や肝臓の基底レベルのオートファジーは加齢で変化がないと述べている²⁴⁾。また、ヒトの早老症 (Hutchinson-Gilford 症候群) モデルである *Zmpste24* ノックアウトマウスではオートファジーがむしろ亢進しており、それが老化の促進につながっているとの報告もある²⁵⁾。分裂疲弊による細胞の老化に関しては、慢性的な酸化ストレスに対抗するために老化によりオートファジーが亢進するというデータがある²⁶⁾。今日、オートファジーに関する総説で「オートファジーが加齢により減弱する」という言説が当たり前のように記載されているが、オートファジー flux を正確に評価できている報告は少なく、単にオートファジー関連タンパクの発現量の低下やオートファゴソームの数の減少を根拠に推定しているなど、信頼性に乏しいのが現状である。

次に、オートファジーが実際に老化に対抗しているのかをみてみよう。老化を予防する(あるいは寿命を延長させる)とされている種々の regimen や遺伝子操作で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、主に線虫やショウジョウバエを中心に報告されている。例えば、線虫では哺乳動物のインスリン経路に相当する *daf-2* の変異体では寿命が延長するが、このときオートファジーが亢進しており、RNAi によりオートファジー不全にするとこの効果がなくなる²⁷⁾。ショウジョウバエでもラパマイシンやスペルミジン投与で寿命が延長するが、RNAi でオートファジーを不全にするとこの効果がなくなることが示されている^{28,29)}。また、通常飼育下の線虫でもオートファジー不全にすると短命になるとの報告がある^{30,31)}。ショウジョウバエで *sestrin* (オートファジーを誘導する) を働かなくするとトリグリセリドの蓄積、ミトコンドリアの異常、筋変性、心不全など老化に類似した症状・所見を呈する³²⁾。

下等生物とは対照的にマウスでは検証が難しいため報告が少ない。Harrison らはラパマイシンの投与(生後 270 日あるいは 600 日から開始)によりマウスの寿命が雌雄ともに延長することを報告した³³⁾。ラパマイシンは mTOR を阻害することによってオートファジーを亢進させるが、寿命延長効果には別の要因(抗腫瘍効果など)も関与していることが予想される。マウスでオートファジー関連タンパク質を全身でノックアウトすると、出生直後の一時的な飢餓状態を乗り越えることができず直ちに死亡する¹¹⁾ので、マウス

表 組織特異的オートファジー不全マウスと老化に関連する表現型

マウスの種類 (遺伝子型)	表現型	参考文献
神経特異的 Atg5 (Atg7) ノックアウト <i>Atg5^{F/F} (Atg7^{F/F}) ; Nestin-Cre</i>	<ul style="list-style-type: none"> ・神経変性疾患様症状 ・大脳および小脳の神経細胞死 ・ユビキチン化タンパクの蓄積 	12, 13
肝特異的 (IFN γ 誘導性) Atg7 ノックアウト <i>(Atg5^{F/F} ; CAG-Cre, Atg7^{F/F} ; Alb-Cre, Atg7^{F/F} ; Mx1-Cre)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ・肝腫大, 良性腫瘍 ・変形ミトコンドリア ・DNA 傷害 ・p62 およびユビキチン陽性タンパク封入体 	14, 18, 19
骨格筋特異的 Atg7 ノックアウト <i>(Atg7^{F/F} ; Myosin light chain-Cre)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ・加齢に伴う筋力の低下および萎縮 ・異常ミトコンドリア, 筋小胞体の変形を伴った筋細胞の変性 ・サルコメアの構造異常 ・飢餓や脱神経による筋萎縮加速 	34
心筋特異的 Atg5 ノックアウト <i>(Atg5^{F/F} ; MLC2v-Cre, Atg5^{F/F} ; MerCreMer)</i>	<p>(constitutive)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ベースラインでは変化ないが圧負荷下で左室拡張と心収縮力低下 <p>(タモキシフェン誘導性)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・心肥大, 左室の拡張, 心収縮力低下 ・心筋肥大 ・サルコメアの構造異常 ・異常ミトコンドリアの蓄積 ・心筋細胞のアポトーシス 	35
血球細胞特異的 Atg7 ノックアウト <i>(Atg7^{F/F} ; Vav-Cre)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ・約 12 週で死亡 ・重度の貧血, リンパ球減少, 造血幹細胞数の減少 ・造血幹細胞で異常ミトコンドリアの蓄積, 活性酸素の増加, DNA 傷害の増加 	36
近位尿細管特異的 Atg5 ノックアウト <i>(Atg5^{F/F} ; KAP-Cre)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ・腎腫大, 尿糖・アミノ酸尿 (6 カ月齢以降) ・PAS 弱陽性の均質な沈着物およびユビキチン・p62 陽性のタンパク凝集塊 ・異常な形態のミトコンドリアの集積 	43
ポドサイト特異的 Atg5 ノックアウト <i>(Atg5^{F/F} ; Podocin-Cre)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ・アルブミン尿およびポドサイトの嚢胞性変化 (8~12 カ月齢) ・タンパク尿, ポドサイトの脱落・糸球体硬化 (20~24 カ月齢) ・酸化タンパクおよび p62 およびユビキチン陽性タンパクの蓄積, ER ストレスの亢進, リポフスチン蓄積, 変形ミトコンドリアの蓄積 	48

でオートファジーと老化の関連を調べるには、臓器特異的にオートファジー不全にして検証する必要がある。現在までに作製されている種々の組織特異的オートファジー不全マウスのうち老化に関連した表現型を呈するものを表にまとめた。臓器によって相違はあるが、ユビキチンや p62 陽性異常タンパク凝集塊の蓄積, 異常ミトコンドリア (およびこれに起因すると思われる活性酸素の増加と DNA 傷害) などが共通している。腫瘍の発生^{18,19)}, サルコペニア³⁴⁾, 心肥大・拡大, 心機能低下³⁵⁾, 造血幹細胞の減少や機能の

低下³⁶⁾も老化に伴って観察される所見である。オートファジーは恒常的に低い活性を維持しており、老朽化した細胞質成分を少しずつ分解しながら新しいものと置き換えることで細胞内の環境を一定に保っているのは間違いないと思われるが、加齢によってオートファジーの減弱が起こり、そのため処理しきれなくなったタンパク凝集塊や異常ミトコンドリアが直接老化の進展に加担しているか否かを検証するのが今後の課題であろう。

オートファジーと腎臓の老化

前述のように、腎臓においても1960年代後半には(特に尿細管において)オートファジーが生じていること、1970年代にはドイツのPfeiferらにより精力的に尿細管細胞におけるオートファジーの制御機構に関する研究が行われていた。近位尿細管細胞でミトコンドリアがオートファジーの主なターゲットになっていること(まさしくマイトファジーそのもの)もこの頃すでに報告されている³⁷⁾。この頃の研究はもっぱら電子顕微鏡による形態学的な検索に依存していたため停滞していたが、1990年以後オートファジーにかかわる遺伝子群の同定および分子メカニズムの理解と相まって、腎臓におけるオートファジーに関しても大きく研究が進展した。

1. 尿細管におけるオートファジーと老化

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。実際、虚血再還流モデル^{38,39)}、シスプラチン腎症^{40,41)}、シクロスポリン腎症⁴²⁾を含めた種々の尿細管傷害モデルでオートファジーが「亢進」していることが報告されてきたが、その役割の解明に関しては特異性の乏しい「オートファジー阻害剤」の使用に依存しており、結果に関しても細胞傷害性に働くというものから、細胞保護性に働くというものまであって整合性を欠いていた。長期的に確実かつ特異的にオートファジー不全にすることが必要であるとの観点から、筆者のグループは、Cre-LoxPシステムを用いた尿細管特異的オートファジー不全マウスを樹立してその表現型を解析した⁴³⁾。具体的には、近位尿細管のS3セグメントを中心にCreレコンビナーゼを発現する*KAP-Cre*マウスと*Atg5 flox*マウスを交配することによりマウスを作製した。ノックアウトマウスはメンデルの法則に従って出生し、若齢では目立った異常は認めなかったが、8週齢以降軽度の腎腫大を、6カ月齢で軽度の尿糖とアミノ酸尿を認めた。9カ月齢までの観察では腎機能、生存率の差はなかったものの、組織学的検索ではノックアウトマウスの近位尿細管細胞の細胞質においてPAS弱陽性の均質な沈着物およびユビキチン陽性・p62陽性のタンパク凝集塊を認め、また、電子顕微鏡レベルで異常な形態のミトコンドリアの集積を認めた。以上より、基底レベルのオートファジーは尿細管のホメオスタシスの維持を担うことが判明した。われわれは、今後、このマウスを2年以上飼育し解析する予定にしている。もし野生型の老齢マウスの腎臓において(例えば9カ月齢の)ノックアウトマウスに類似した所見が認めら

れば、「加齢によるオートファジーの減弱により尿細管細胞の細胞内品質管理が破綻し腎臓の老化につながる」ことの傍証になると考えている。

滋賀医科大学のKumeらは、12カ月齢のマウスに以後12カ月にわたってカロリー制限(自由給餌群の60%)を加えると、自由給餌の場合加齢により減少する腎臓でのSirt1の発現が増加し、Foxo3の脱アセチル化を介してBnip3依存性にオートファジーが活性化し、ミトコンドリア由来の活性酸素が減少することを示した⁴⁴⁾。さらにSirt1のノックアウトマウス(ヘテロ)ではカロリー制限によるミトコンドリア傷害軽減効果が減少することから、カロリー制限による細胞保護効果にSirt1が大きく寄与していることが示されたことになる。しかし、オートファジーの亢進が重要なか他のSirt1のターゲットが重要なかを解明することが今後の課題である。

2. ポドサイトにおけるオートファジーと老化

糸球体では特にポドサイトにおいてオートファゴソームが多数観察される[マウス⁴⁵⁾、ラット⁴⁶⁾、ヒト(腎生検サンプル)⁴⁷⁾]。これがポドサイトにおけるオートファジーの「亢進」を意味するの否かは結論が出ていないが、ポドサイトは終末細胞であることから、細胞分裂による老廃物の希釈が起こらずオートファジーによる細胞内浄化が重要であると推測されていた。ドイツのHuberのグループは、ポドサイト特異的にAtg5をノックアウトすることによりオートファジー不全にすると、若年～壮年マウス(8～12カ月齢)で軽度のアルブミン尿およびポドサイトの嚢胞性変化を認め、高齢マウス(20～24カ月齢)では酸化タンパクおよびp62・ユビキチン陽性タンパクの蓄積、ERストレスの亢進、リポフスチン蓄積、変形ミトコンドリアの蓄積を伴って、タンパク尿を認め、最終的にはポドサイトの脱落から糸球体硬化に至ることを報告した(腎機能に関しては記載されていない)⁴⁸⁾。また、不要タンパクの分解にはこれまで全く独立したルートであると考えられていたオートファジーとユビキチン-プロテオソーム系が協調しており、オートファジー不全にした若年マウスではユビキチン-プロテオソーム系が亢進して代償しているが、老年マウスではそれが破綻して糸球体硬化に至ることが示されている。糸球体硬化は老化したヒトの腎臓においても認められる所見で⁴⁹⁾、本マウスで認められた所見はヒトの老化腎の糸球体の特徴と共通している。

おわりに

この 10 年間におけるオートファジーの研究の進展には目覚ましいものがあり、オートファジーが以前では想像もつかなかった多彩な役割を担うことがわかってきた。オートファジーが老化の進展にどのようにかかわっているかに関しても、ノックアウトマウスを用いた解析から多くの知見が得られつつある。一方で、今後はオートファジーを制御することが重要になってくると思われる。本稿でもマウスに対するラパマイシンの寿命延長効果を示した論文を紹介したが³³⁾、低分子化合物ライブラリーや既存薬剤のなかからオートファジーを亢進させる薬剤をスクリーニングする試みも精力的に行われている⁵⁰⁾。将来的に、このような薬剤を使用することにより腎臓の老化を遅延させることが可能になるかもしれない。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008 ; 451 : 1069-1075.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy : renovation of cells and tissues. *Cell* 2011 ; 147 : 728-741.
- Kon M, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in health and disease. *FEBS Lett* 2010 ; 584 : 1399-1404.
- Wang K, Klionsky DJ. Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy* 2011 ; 7 : 297-300.
- Ashford TP, Porter KR. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* 1962 ; 12 : 198-202.
- Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms : lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009 ; 10 : 458-467.
- Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, Komatsu M, Otsu K, Tsujimoto Y, Shimizu S. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 2009 ; 461 : 654-658.
- Ueno T, Sato W, Horie Y, Komatsu M, Tanida I, Yoshida M, Ohshima S, Mak TW, Watanabe S, Kominami E. Loss of Pten, a tumor suppressor, causes the strong inhibition of autophagy without affecting LC3 lipidation. *Autophagy* 2008 ; 4 : 692-700.
- Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010 ; 140 : 313-326.
- Klionsky DJ, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 2008 ; 4 : 151-175.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiisa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004 ; 432 : 1032-1036.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006 ; 441 : 880-884.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006 ; 441 : 885-889.
- Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 2005 ; 169 : 425-434.
- Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* 2008 ; 321 : 117-120.
- Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011 ; 469 : 323-335.
- Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* 2008 ; 456 : 264-268.
- Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K, Mizushima N. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 2011 ; 25 : 795-800.
- Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, Kouno T, Nakada K, Hino O, Watanabe S, Ando J, Iwadate M, Yamamoto M, Lee MS, Tanaka K, Komatsu M. Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biol* 2011 ; 193 : 275-284.
- Cuervo AM. Autophagy and aging : keeping that old broom working. *Trends Genet* 2008 ; 24 : 604-612.
- Donati A, Cavallini G, Paradiso C, Vittorini S, Pollera M, Gori Z, Bergamini E. Age-related changes in the autophagic proteolysis of rat isolated liver cells : effects of antiaging dietary restrictions. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001 ; 56 : B375-383.
- Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging : accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 2002 ; 269 : 1996-2002.
- Dröge W, Kinscherf R. Aberrant insulin receptor signaling and amino acid homeostasis as a major cause of oxidative stress in aging. *Antioxid Redox Signal* 2008 ; 10 : 661-678.
- Wohlgemuth SE, Julian D, Akin DE, Fried J, Toscano K, Leeu-

- wenburgh C, Dunn WA Jr. Autophagy in the heart and liver during normal aging and calorie restriction. *Rejuvenation Res* 2007 ; 10 : 281-292.
25. Mariño G, Ugalde AP, Salvador-Montoliu N, Varela I, Quirós PM, Cadiñanos J, van der Pluijm I, Freije JM, López-Otín C. Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction. *Hum Mol Genet* 2008 ; 17 : 2196-2211.
 26. Gamerding M, Hajieva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, Behl C. Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J* 2009 ; 28 : 889-901.
 27. Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, Eskelinen EL, Hall DH, Levine B. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 2003 ; 301 : 1387-1391.
 28. Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, Slack C, Jacobson J, Foley A, Partridge L. Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab* 2010 ; 11 : 35-46.
 29. Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Büttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, Fussi H, Deszcz L, Hartl R, Schraml E, Criollo A, Megalou E, Weiskopf D, Laun P, Heeren G, Breitenbach M, Grubeck-Loebenstien B, Herker E, Fahrenkrog B, Fröhlich KU, Sinner F, Tavernarakis N, Minois N, Kroemer G, Madeo F. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* 2009 ; 11 : 1305-1314.
 30. Hars ES, Qi H, Ryazanov AG, Jin S, Cai L, Hu C, Liu LF. Autophagy regulates ageing in *C. elegans*. *Autophagy* 2007 ; 3 : 93-95.
 31. Tóth ML, Sigmond T, Borsos E, Barna J, Erdélyi P, Takács-Vellai K, Orosz L, Kovács AL, Csikós G, Sass M, Vellai T. Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* 2008 ; 4 : 330-338.
 32. Lee JH, Budanov AV, Park EJ, Birse R, Kim TE, Perkins GA, Ocorr K, Ellisman MH, Bodmer R, Bier E, Karin M. Sestrin as a feedback inhibitor of TOR that prevents age-related pathologies. *Science* 2010 ; 327 : 1223-1228.
 33. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller RA. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 2009 ; 460 : 392-395.
 34. Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, Metzger D, Reggiani C, Schiaffino S, Sandri M. Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab* 2009 ; 10 : 507-515.
 35. Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med* 2007 ; 13 : 619-624.
 36. Mortensen M, Soilleux EJ, Djordjevic G, Tripp R, Lutteropp M, Sadighi-Akha E, Stranks AJ, Glanville J, Knight S, Jacobsen SE, Kranc KR, Simon AK. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med* 2011 14 ; 208 : 455-467.
 37. Pfeifer U, Scheller H. A morphometric study of cellular autophagy including diurnal variations in kidney tubules of normal rats. *J Cell Biol* 1975 ; 64 : 608-621.
 38. Suzuki C, Isaka Y, Takabatake Y, Tanaka H, Koike M, Shibata M, Uchiyama Y, Takahara S, Imai E. Participation of autophagy in renal ischemia/reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 ; 368 : 100-106.
 39. Jiang M, Liu K, Luo J, Dong Z. Autophagy is a renoprotective mechanism during *in vitro* hypoxia and *in vivo* ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 2010 ; 176 : 1181-1192.
 40. Periyasamy-Thandavan S, Jiang M, Wei Q, Smith R, Yin XM, Dong Z. Autophagy is cytoprotective during cisplatin injury of renal proximal tubular cells. *Kidney Int* 2008 ; 74 : 631-640.
 41. Inoue K, Kuwana H, Shimamura Y, Ogata K, Taniguchi Y, Kagawa T, Horino T, Takao T, Morita T, Sasaki S, Mizushima N, Terada Y. Cisplatin-induced macroautophagy occurs prior to apoptosis in proximal tubules *in vivo*. *Clin Exp Nephrol* 2010 ; 14 : 112-122.
 42. Pallet N, Bouvier N, Legendre C, Gilleron J, Codogno P, Beaune P, Thervet E, Anglicheau D. Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity. *Autophagy* 2008 ; 4 : 783-791.
 43. 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.
 44. Kume S, Uzu T, Horiike K, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, Araki S, Sugimoto T, Haneda M, Kashiwagi A, Koya D. Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *J Clin Invest* 2010 ; 120 : 1043-1055.
 45. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. *In vivo* analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2004 ; 15 : 1101-1111.
 46. Asanuma K, Tanida I, Shirato I, Ueno T, Takahara H, Nishitani T, Kominami E, Tomino Y. MAP-LC3, a promising autophagosomal marker, is processed during the differentiation and recovery of podocytes from PAN nephrosis. *FASEB J* 2003 ; 17 : 1165-1167.
 47. Sato S, Kitamura H, Adachi A, Sasaki Y, Ghazizadeh M. Two types of autophagy in the podocytes in renal biopsy specimens : ultrastructural study. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2006 ; 38 : 167-174.

48. Hartleben B, Gödel M, Meyer-Schwesinger C, Liu S, Ulrich T, Köbler S, Wiech T, Grahammer F, Arnold SJ, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Pavenstädt H, Kerjaschki D, Mizushima N, Shaw AS, Walz G, Huber TB. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *J Clin Invest* 2010 ; 120 : 1084-1096.
49. Wiggins J. Podocytes and glomerular function with aging. *Semin Nephrol* 2009 ; 29 : 587-593.
50. Sarkar S, Perlstein EO, Imarisio S, Pineau S, Cordenier A, Maglathlin RL, Webster JA, Lewis TA, O'Kane CJ, Schreiber SL, Rubinsztein DC. Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models. *Nat Chem Biol* 2007 ; 3 : 331-338.