

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17279

研究課題名（和文）リソソーム機能不全としての肥満関連尿細管症の病態解明

研究課題名（英文）Understanding the pathogenesis of obesity-related tubulopathy from the perspective of lysosomal dysfunction

研究代表者

南 聡（Minami, Satoshi）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：00791592

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は肥満関連尿細管症（ORT; obesity-related tubulopathy）の病態を詳細に検証した。その結果、飽和脂肪酸負荷下で最も活性化される転写因子としてTFEBを同定し、その活性化は飽和脂肪酸のもつmTORC1非古典的経路の抑制作用によること、またORTで活性化するTFEBはリソソームエクソサイトーシスの促進に伴う内部に蓄積する未消化物の尿細管腔内放出を介して腎臓病進展抑制に働くことを明らかにした。他にも本研究ではORTにおいてFGF21の産生が亢進し、このFGF21がオートファジー停滞改善・ミトコンドリア生合成促進を介して腎臓病進展に対抗するという機構を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりORTの病態では尿細管でTFEBが活性化しリソソームエクソサイトーシスを亢進することによりリソソーム恒常性を維持しORTに対抗していること、ORTの病態では尿細管でFGF21の産生が亢進しミトコンドリア生合成促進ならびにオートファジー停滞改善を介してORTに対抗していること、が明らかとなり、これまで大部分が未解明であったORTの病態メカニズムの一端を解明することができた。以上から今後は肥満関連腎症や糖尿病関連腎臓病に対して、TFEB-リソソームエクソサイトーシス経路の活性化やFGF21産生の促進を標的としたORTの病態に即した治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study examined the pathogenesis of obesity-related tubulopathy (ORT; obesity-related tubulopathy) in detail. The results revealed that 1) TFEB is the most activated transcription factor under saturated fatty acid load, 2) its activation is due to the suppression of the mTORC1 non-classical pathway, and 3) TFEB activated during ORT suppresses the progression of kidney disease through the release of undigested material accumulated inside lysosomes into the tubular lumen by promoting lysosomal exocytosis. In addition, this study identified a mechanism by which the production of FGF21 is enhanced during ORT and this FGF21 counteracts the progression of kidney disease through improving autophagy stagnation and promoting mitochondrial biosynthesis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：肥満関連尿細管症 リソソーム オートファジー 飽和脂肪酸 TFEB FGF21

### 1. 研究開始当初の背景

肥満腎症は、従来糸球体内圧の増加等の要因により巣状分節性に糸球体硬化をきたすことがその本態であると考えられてきた。これに対し、申請者らはメタボリックシンドロームを模した高脂肪食負荷マウスの腎尿細管では、リソソームに層状の物質が蓄積するとともにオートファジー活性が低下することを見出し、肥満関連尿細管症 (obesity-related tubulopathy; ORT) と名付けた。ORT においてリソソーム機能異常はオートファジー活性の低下を引き起こすことにより、尿細管細胞が本来オートファジーにより処理すべき傷害オルガネラの蓄積を助長し尿細管を傷害する。一方で ORT の病態メカニズムの大部分は不明である。近年申請者は ORT の病態を明らかとするために培養尿細管細胞に飽和脂肪酸であるパルミチン酸を負荷し RNAseq データによるエンリッチメント解析を行ったところリソソーム関連遺伝子が PA 負荷により著明に発現亢進していた (図 1)。さらに PA 負荷により発現の亢進する転写因子を解析したところ PA はリソソームの主要転写因子である TFEB を著明に活性化することが明らかとなり、このことから ORT の病態において TFEB が重要な役割を果たしていることが示唆された。

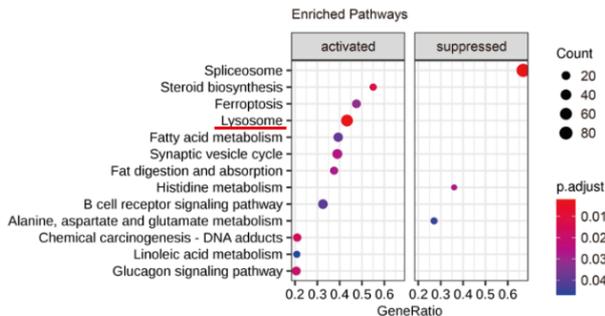


図 1. 培養尿細管細胞にパルミチン酸を負荷した RNAseq 解析。エンリッチメント解析によりパルミチン酸はリソソーム関連遺伝子群の発現を著明に亢進させることが明らかとなった。

### 2. 研究の目的

以上の背景より本研究は ORT をリソソームの機能障害として捉え、ORT の病態メカニズムならびに ORT における TFEB の役割を検証することにより、ORT の治療への道筋をつけることにある。

### 3. 研究の方法

- (1) 飽和脂肪酸負荷モデルを用いた、培養尿細管細胞での TFEB 活性の変化
- (2) 高脂肪食負荷 ORT マウスモデルを用いた、腎尿細管細胞での TFEB 活性の変化
- (3) 高脂肪食負荷下での腎尿細管における TFEB の働き・分子基盤の検証
- (4) 肥満関連腎症患者での TFEB 活性の変化
- (5) ORT においてオートファジー活性低下に対抗する機構の解明

### 4. 研究成果

(1) 飽和脂肪酸負荷モデルを用いた、培養尿細管細胞での TFEB 活性の変化: 培養尿細管細胞に PA を負荷後経時的な TFEB の局在を検証したところ、PA 負荷後 TFEB の著明な核内移行を認めたことから PA 負荷に対して TFEB が活性化することが示唆された (図 2)。

(2) 高脂肪食負荷 ORT マウスモデルを用いた、腎尿細管細胞での TFEB 活性の変化: 次に高脂肪食 2 ヶ月負荷下でのマウス腎尿細管における TFEB の発現を検証したところ、高脂肪食群では TFEB の核内移行が亢進し、TFEB の活性化が示唆された (図 3)。

従来 TFEB の活性は主に mTORC1 により制御されることが知られている [PMID: 22343943] ため mTORC1 の活性を検証したところ PA 負荷は TFEB の脱リン酸化が促進

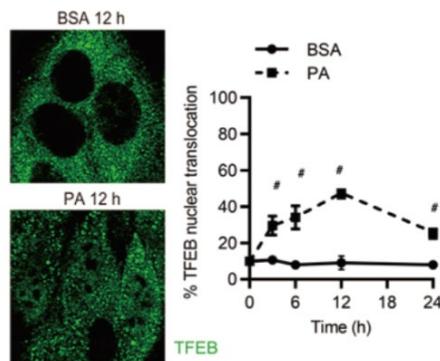


図 2. 培養尿細管細胞にパルミチン酸を負荷すると TFEB が核内移行する。

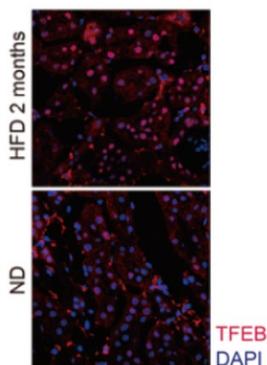


図 3. 高脂肪食 (HFD) を 2 ヶ月負荷するとマウス腎尿細管における TFEB の核内移行が亢進する。

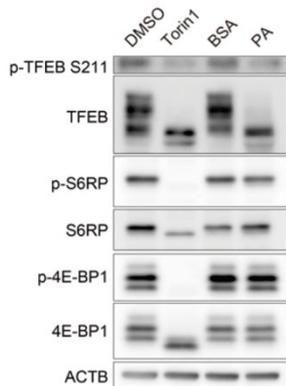


図 4. パルミチン酸負荷は TFEB を脱リン酸化するが mTORC1 の古典的な下流因子 (S6RP, 4E-BP1) のリン酸化には影響を与えない。

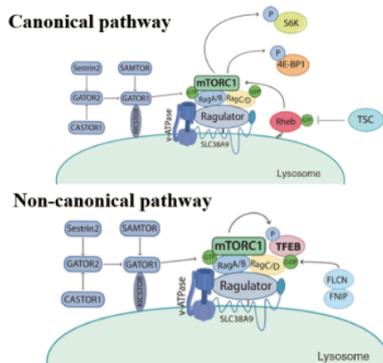


図 5. 近年 mTORC1 による TFEB のリン酸化・活性化には、Rheb 依存性の古典的経路 (canonical pathway; 上段) ではなく、Rag GTPase 依存性の非古典的経路 (non-canonical pathway; 下段) を介することが明らかとなっている。

される一方で、mTORC1の古典的な下流因子(S6RP、4E-BP1)のリン酸化には影響を与えず、PA負荷によるTFEBの活性化はmTORの古典的経路を介さないことが明らかとなった(図4)。近年TFEBのmTORC1によるリン酸化・活性抑制にはRHEB非依存性Rag GTPase依存性の非古典的経路を介することが明らかになっている(図5, [PMID: 35654731])。そこでPAによるTFEB活性化がRag GTPase依存性の非古典的経路の活性化により抑制されるか検証した。PAによるTFEBの核移行は非古典的経路が持続的に活性化しているRagC過剰発現細胞においては認めなかった(図6)。このことからPAによるTFEB活性化がRag GTPase依存性の非古典的経路の抑制を介することが明らかとなった。

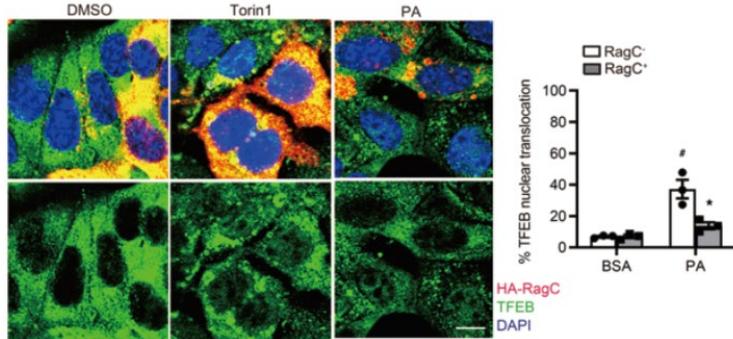


図6. パルミチン酸によるTFEBの核移行は非古典的経路が持続的に活性化しているRagC過剰発現細胞では認めない。このことからパルミチン酸によるTFEB活性化はRag GTPase依存性の非古典的経路の抑制を介することが明らかとなった。

### (3) 高脂肪食負荷下での腎尿細管におけるTFEBの働き・分子基盤の検証

次にORTにおけるTFEBの役割を検証するために近位尿細管特異的TFEBノックアウトマウスを樹立し、高脂肪食を2カ月負荷したところ、野生型マウスに比して近位尿細管のリソソーム拡張・リソソーム内リン脂質蓄積が著しく増加した(図7)。一方でTFEBを活性化することの知られているトレハロースやレスベラトロールを高脂肪食負荷マウスに投与すると尿細管のリソソーム拡張が改善した。

次にTFEBがリソソーム恒常性維持に働く機構を検討した。まずTFEBはリソソームバイオジェネシスを介して様々な病態を改善することが知られている[PMID: 29782848]ため、野生型マウスと近位尿細管特異的TFEBノックアウトマウスとでリソソームバイオジェネシスの程度を検証したところ変化は認めなかった。次にTFEBはリソソーム蓄積病においてリソソームマルエクソサイトーシスを介して病態を改善することが報告されている[PMID: 23606558]ことから、リソソームマルエクソサイトーシスに着目した。まず高脂肪食負荷マウスの腎組織および尿の電子顕微鏡解析にて尿細管のリソソーム内に蓄積したリン脂質が尿細管腔内へ放出されている像が認められ、また尿中にもリン脂質の排泄を認めた(図8)。一方で近位尿細管特異的TFEBノックアウトマウスにおいては尿細管細胞でのリソソーム内リン脂質蓄積が増悪する一方で、尿中リン脂質の排泄低下を認めていた。このことからTFEBはリソソームマルエクソサイトーシスを介して高脂肪食下での腎尿細管細胞のリソソーム恒常性を維持することが示唆された。

次に培養尿細管細胞にパルミチン酸を負荷し電子顕微鏡観察を行ったところリソソーム内容物が細胞外に放出されるリソソームマルエクソサイトーシスが盛んに行われていることが明らかとなった。さらにリソソーム酵素が細胞培養液中に著明に放出されていたこと、リソソーム膜タンパクであるLAMP1が細胞膜上に著明に蓄積していたことからパルミチン酸によるリソソームマルエクソサイトーシスの活性化が示唆された。次にTFEBノックアウト培養尿細管細胞を樹立しパルミチン酸を負荷しリソソームマルエクソサイトーシスを評価したところ、TFEBノックアウト細胞ではリソソーム酵素の細胞上清中への放出やLAMP1の細胞膜上への蓄積が抑制されていた

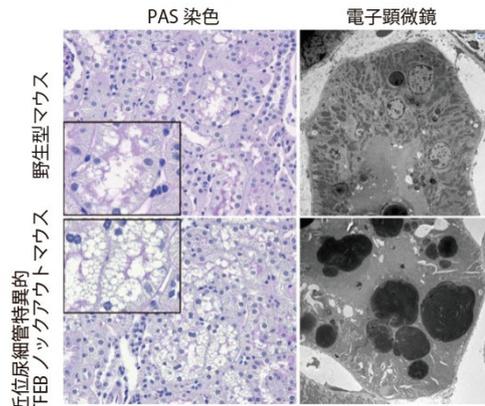


図7. 近位尿細管特異的TFEBノックアウトマウスに、高脂肪食を2カ月負荷すると、野生型マウスに比して近位尿細管のリソソーム拡張(左)・リソソーム内リン脂質蓄積(右)が著しく増悪した。

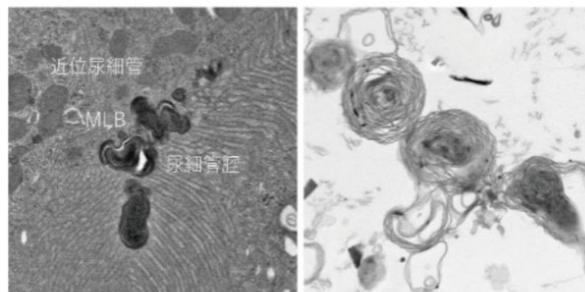


図8. 高脂肪食を負荷した肥満マウスの電子顕微鏡画像(左:腎臓、右:尿)。尿細管のリソソーム内に蓄積したリン脂質はリソソームマルエクソサイトーシスにより尿細管腔へ放出され、尿中に排泄される。

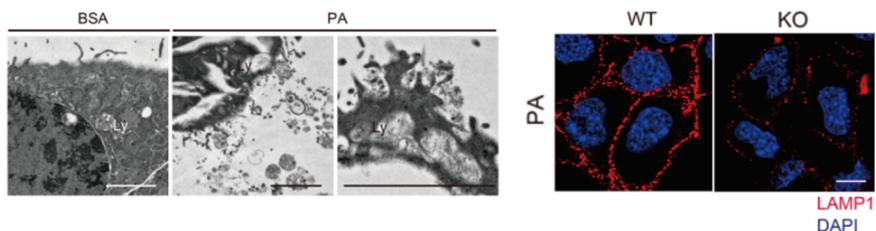


図9. (左) 培養尿細管細胞にパルミチン酸を負荷した電子顕微鏡画像。パルミチン酸を負荷した尿細管細胞ではリソソーム内容物を細胞外に放出するリソソームマルエクソサイトーシスが盛んに行われている。(右) 野生型尿細管細胞(WT)とTFEBノックアウト尿細管細胞(KO)の細胞膜上のLAMP1(リソソームマーカー)染色。細胞膜上のLAMP1の存在はリソソームマルエクソサイトーシスを示す。WTではパルミチン酸負荷後リソソームマルエクソサイトーシスが盛んに生じているが、KOではリソソームマルエクソサイトーシスはほとんど起こっていない。

(図9)。さらに TFEB ノックアウト細胞ではパルミチン酸負荷によるリソソームの拡張が増悪していた。このことから TFEB は培養尿細管細胞においてもリソソームエクソサイトーシスを介してリソソーム恒常性を維持していることが示された。

#### (4) 肥満関連腎症患者での

**TFEB 活性の変化:** さらに肥満関連腎症患者における TFEB の発現を検討した。その結果、肥満関連腎症患者においては尿細管細胞のリソソーム機能異常を示す空胞病変の程度と相関して TFEB の発現低下を認めた(図10)。このことから肥満関連腎症では TFEB 活性の低下により、肥満関連尿細管症が増悪する可能性が示唆された。

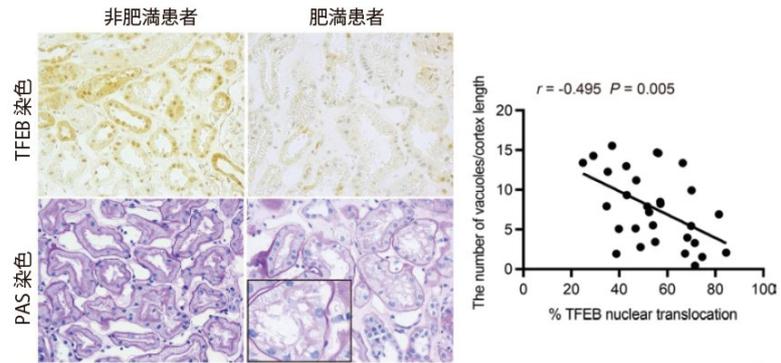


図 10. 肥満関連腎症の患者では尿細管細胞のリソソーム機能異常を示す空胞病変の程度と相関して TFEB の発現低下を認める。

(5) ORT においてオートファジー活性低下に対抗する機構の解明: 次に ORT においてオートファジー活性低下に対抗して働く代償機構を検証した。その結果抗肥満因子としてよく知られている FGF (fibroblast growthfactor) 21 を腎尿細管細胞が ORT 時において著明に産生するようになることを明らかとした。そこで近位尿細管特異的 FGF21 ノックアウトマウスを作成し、加齢・肥満モデルで検証したところ、FGF21 ノックアウトマウスでは尿細管の空胞病変として観察される巨大リソソームが著しく増加していることから、ORT の増悪が示された。次にオートファジー不全マウス・オートファジー不全かつ FGF21 ノックアウトマウスを作製し肥満モデルで検証したところ、オートファジー不全かつ FGF21 ノックアウトマウスはオートファジー不全マウスと比べても腎臓病が進展していた。またこのマウスではミトコンドリア生合成低下、ミトコンドリア異常を認めていた。これらのことから近位尿細管においてオートファジー不全下で産生される FGF21 はオートファジーの停滞の改善、ミトコンドリア生合成促進を介して腎保護的に働くことを明らかとした。

以上より本研究において ORT の病態メカニズムを検証した結果、1) ORT の病態では尿細管において TFEB が活性化しリソソームエクソサイトーシスを亢進することによりリソソーム恒常性を維持し ORT に対抗していること、2) ORT の病態では尿細管における FGF21 の産生が亢進しミトコンドリア生合成促進ならびにオートファジー停滞の改善を介して ORT に対抗していること、が明らかとなった。以上から、ORT の病態に即した治療法として TFEB-リソソームエクソサイトーシス経路の活性化や FGF21 産生の促進を目指す治療法の開発が期待される。一方で近年 TFEB の過剰活性化は発癌とも関連していることが報告されていることから単純な TFEB の活性化は発癌の危険性が高い。そのため今後 TFEB-リソソームエクソサイトーシス経路の活性化による ORT の制御においては、TFEB がリソソームエクソサイトーシスを制御する特異的な分子機構の解明を進めていくことにより、その経路の特異的な活性化を介した新規治療法の開発が副作用の少ない治療法開発の上で望まれる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Nakamura J, Yamamoto T, Takabatake Y, Namba-Hamano T, Minami S, Takahashi A, Matsuda J, Sakai S, Yonishi H, Maeda S, Matsui S, Matsui I, Hamano T, Takahashi M, Goto M, Izumi Y, Bamba T, Sasai M, Yamamoto M, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Nakamura S, Yoshimori T, Ballabio A, Isaka Y. | 4. 巻<br>8             |
| 2. 論文標題<br>TFEB-mediated lysosomal exocytosis alleviates high-fat diet-induced lipotoxicity in the kidney.   | 5. 発行年<br>2023年       |
| 3. 雑誌名<br>JCI Insight.   | 6. 最初と最後の頁<br>e162498 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1172/jci.insight.162498   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する          |
| 1. 著者名<br>Minami Satoshi, Yamamoto Takeshi, Yamamoto-Imoto Hitomi, Isaka Yoshitaka, Hamasaki Maho  | 4. 巻<br>179           |
| 2. 論文標題<br>Autophagy and kidney aging  | 5. 発行年<br>2023年       |
| 3. 雑誌名<br>Progress in Biophysics and Molecular Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>10~15   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.pbiomolbio.2023.02.005   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)  | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Minami Satoshi, Nakamura Shuhei, Yoshimori Tamotsu   | 4. 巻<br>9             |
| 2. 論文標題<br>Rubicon in Metabolic Diseases and Ageing  | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Cell and Developmental Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>816829  |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fcell.2021.816829  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)  | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Minami Satoshi, Nakamura Shuhei  | 4. 巻<br>101           |
| 2. 論文標題<br>Therapeutic potential of Beclin1 for transition from AKI to CKD: autophagy-dependent and autophagy-independent functions  | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>Kidney International   | 6. 最初と最後の頁<br>13~15   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.kint.2021.10.021   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)  | 国際共著<br>-             |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Minami Satoshi, Sakai Shinsuke, Yamamoto Takeshi, Takabatake Yoshitsugu, Namba-Hamano Tomoko, Takahashi Atsushi, Matsuda Jun, Yonishi Hiroaki, Nakamura Jun, Maeda Shihomi, Matsui Sho, Matsui Isao, Isaka Yoshitaka | 4. 巻<br>20              |
| 2. 論文標題<br>FGF21 and autophagy coordinately counteract kidney disease progression during aging and obesity   | 5. 発行年<br>2024年         |
| 3. 雑誌名<br>Autophagy  | 6. 最初と最後の頁<br>489 ~ 504 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/15548627.2023.2259282  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中村隼, 山本毅士, 高畠義嗣, 難波倫子, 南聡, 高橋篤史, 松田潤, 酒井晋介, 前田志穂美, 松井翔, 新村文男, 松阪泰二, 猪阪善隆 |
| 2. 発表標題<br>TFEBは尿中へのリン脂質排出促進により肥満関連尿細管症に対して保護的に働く                                   |
| 3. 学会等名<br>第65回日本腎臓学会学術総会   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中村隼, 山本毅士, 高畠義嗣, 難波倫子, 南聡, 高橋篤史, 松田潤, 酒井晋介, 余西洋明, 前田志穂美, 新村文男, 松阪泰二, 猪阪善隆 |
| 2. 発表標題<br>TFEBはリソソームエクソサイトーシスを介したリン脂質蓄積抑制により腎保護的に働く                                 |
| 3. 学会等名<br>第64回日本腎臓学会学術総会  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yamamoto T, Nakamura J, Takabatake Y, Minami S, Nakamura S, Yoshimori T, Ballabio A, Isaka Y   |
| 2. 発表標題<br>TFEB-Mediated Lysosomal Exocytosis Alleviates High Fat Diet-Induced Lipotoxicity in the Kidney |
| 3. 学会等名<br>2022 The 10th International Symposium on Autophagy (国際学会)                                      |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山本 毅士, 南 聡, 酒井 晋介, 高橋 篤史, 難波 倫子, 松田 潤, 余西 洋明, 中村 隼, 前田 志穂美, 松井 翔, 河合 秀亮, 高畠 義嗣, 猪阪 善隆 |
| 2. 発表標題<br>FGF21とオートファジーは協調的に加齢や肥満による腎臓病進展に対抗する  |
| 3. 学会等名<br>第66回日本腎臓学会学術総会  |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|                                |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名<br>猪阪 善隆, 南 聡, 山本 毅士   |
| 2. 発表標題<br>腎線維化のメカニズム 尿細管細胞の関与 |
| 3. 学会等名<br>第66回日本腎臓学会学術総会      |
| 4. 発表年<br>2023年                |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|  |
|--|
| 肥満に伴う腎臓病に対抗するメカニズムを発見<br><a href="https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2023/20230130_4">https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2023/20230130_4</a><br>加齢や肥満に伴う腎臓病に対抗する機構を解明<br><a href="https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2023/20230921_2">https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2023/20230921_2</a> |
|--|

|                           |                       |    |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織                   |                       |    |
| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|