

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790856

研究課題名(和文) カテプシンL・カテプシンDのポドサイトにおける役割と蛋白尿発現メカニズムの解明

研究課題名(英文) The role of lysosomal proteases in podocytes

## 研究代表者

高木 美幸 (TAKAGI, Miyuki)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：80599895

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)：リソソームプロテアーゼは細胞の恒常性維持に重要な役割を果たす。終末分化細胞であるポドサイトにおいて、その役割は大きいと考えられる。本研究では、リソソームプロテアーゼの中で特にカテプシンLとカテプシンDに注目した。カテプシンLは腎障害時にポドサイトで発現が亢進し、スリット膜や細胞骨格関連蛋白を過剰に分解し蛋白尿をもたらす。本研究ではカテプシンLノックアウトマウスの腎炎モデルを作製し、カテプシンL欠損が腎障害時の糸球体硬化を抑制することが明らかとなった。また、ポドサイト特異的カテプシンDノックアウトマウスを作製し、カテプシンD欠損が加齢と共に糸球体硬化に至るポドサイト障害をもたらすことを示した。

研究成果の概要(英文)：Injury and loss of podocytes are major risk factors for renal failure. In this study, we aim to investigate the role of lysosomal proteases, cathepsin L (CL) and D (CD) in podocytes. Previous studies showed that up-regulated CL in podocytes is required for the development of proteinuria in mice. We examined the doxorubicin induced nephrosis and glomerulosclerosis model on CL knockout mice. Our findings suggested that CL-mediated proteolysis plays a role in the development of glomerulosclerosis. The role of CD in podocytes has not been previously explored. We generated podocyte-specific CD knockout mice. These mice developed proteinuria and glomerulosclerosis because of the presence of lysosomal storage disease that progressively worsens with aging. We also discovered that CD deficiency in podocytes leads to apoptotic cell death. This strongly indicates that CL and CD enzymatic activity in podocytes is generally essential for protein turnover and autophagy homeostasis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ポドサイト オートファジー カテプシンL カテプシンD

## 1. 研究開始当初の背景

腎糸球体足細胞(ポドサイト)は、血清タンパクの最終濾過障壁であり、ポドサイトが障害されると、濾過障壁崩壊によりタンパク尿が生じる。しかし、タンパク尿発症から末期腎不全に至るメカニズムは、明らかとなっていない部分が多い。

### (1) ポドサイトとオートファジー

オートファジーは細胞内の大規模分解系であり、不要な物質を除去し、その分解産物を再利用し栄養素として細胞に供給することで、細胞の恒常性を維持している。ポドサイトは恒常的にオートファジー活性が高く、栄養飢餓によりオートファジーが亢進することが分かっている<sup>1)</sup>。これは、ポドサイトが終末分化細胞であり、様々なストレスに対抗し、長い細胞寿命を保つためにオートファジーが重要な役割を果たしているからである。

オートファジーで取り込まれた物質はリソソームと融合し、リソソーム内加水分解酵素により分解される。カテプシンファミリーはリソソーム内の主要なタンパク分解酵素である。20種類以上が知られており、各々の基質や組織特異的な分布により、神経・骨・消化器など様々な疾患との関連が報告されている。本研究では、以下の背景から、特にカテプシン L (CL) とカテプシン D (CD) に着目して研究を行った。

### (2) CL とポドサイト障害

CL は腎障害時に発現が亢進し、細胞骨格関連タンパクや濾過障壁を構成するスリット膜関連タンパクを過剰に分解することで、足突起消失とタンパク尿をもたらすことが分かっている<sup>2)-4)</sup>。実際にヒトの微小変化群・膜性腎症・巣状糸球体硬化症においてポドサイトの CL の発現が亢進している<sup>2)</sup>。これらの知見から CL 阻害による、タンパク尿抑制効果が期待される<sup>5)</sup>。

### (3) CD とポドサイト障害

カテプシンのノックアウトマウスは、ほとんどが長期に生存するのに対し、CD ノックアウトマウスは痙攣や視覚障害などの神経症状を呈し生後約 28 日で死亡する。神経細胞はオートファジー不全によりリソソーム酵素を含んだ特徴的な封入体が蓄積し、この封入体の主成分はミトコンドリア ATP 合成酵素のサブユニット C であることから、神経性セロイドリポフスチン蓄積症のモデルマウスであることが報告されている<sup>6)</sup>。

このため CD には、他のカテプシンには無い独自の働きがあると考えられてきたが、ポドサイトでの役割についてはこれまで検討されていなかった。我々は、ポドサイトが神経細胞と同様に終末分化細胞であり、恒常的にオートファジー活性が高いこと、神経特異的タンパクを多く発現していることより、CD

が神経細胞と同様にポドサイトにおいても重要な役割を果たしていると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ポドサイトにおけるオートファジーの役割、および CL・CD の生理的・病的条件下での役割やタンパク尿発現との関連について明らかにすることである。さらに、これらの結果からタンパク尿発症機序を解明し、慢性腎臓病の新規治療薬を開発することを最終目的とした。

### (1) ポドサイトとオートファジー

ポドサイトのオートファジーは栄養飢餓によって亢進する。ポドサイト特異的にオートファジーを欠損したマウスの腎組織は、加齢と共に糸球体硬化に至り、若年例でも薬剤性の腎障害モデルを作製すると障害が増悪する<sup>7)</sup>。本研究では、これまで検討されていなかった片腎摘を行った際の、残存腎のポドサイトのオートファジーの働きを解明することを目的とした。

### (2) CL とポドサイト障害

CL の阻害がタンパク尿抑制のみならず、不可逆性の変化である糸球体硬化も抑制するかどうかについて検討する。その上で、CL 阻害薬の新規治療薬としての可能性を検討することを目的とした。

### (3) CD とポドサイト障害

ポドサイトにおける CD の役割を明らかにし、タンパク尿発症との関連を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ポドサイトとオートファジー

LC3 はオートファゴソーム膜結合タンパク質であり、GFP-LC3 マウスはオートファゴソーム形成を GFP 標識した LC3 のドット形成として蛍光顕微鏡で可視化することができる。また、オートファゴソーム形成に必須な Atg タンパクである Atg7 のポドサイト特異的ノックアウトマウスは、ポドサイトでのオートファジーが欠損する。我々はこれらのマウスに片腎摘を行い、ポドサイトに負荷が加わった際のオートファジーの変化について評価した。

### (2) CL とポドサイト障害

野生型マウスに腎症モデルを作製し CL の発現変化を確認した。さらに、CL ノックアウトマウスに糸球体硬化モデルであるアドリアマイシン腎症を作製し、評価を行った。

### (3) CD とポドサイト障害

CD ノックアウトマウスは生後早期に死亡するため、ポドサイト特異的 CD ノックアウ

トマウスを作製し、自然経過の観察を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ポドサイトとオートファジー

###### GFP-LC3 マウスでの検討

まず、GFP-LC3 マウスに片腎摘を行い、残存腎のポドサイトの観察を行った。GFP-LC3 マウスでは図1に示したようにオートファゴソームをLC3の緑色のドットとして共焦点顕微鏡下で観察することができる。この結果、片腎摘後1日目に一時的にオートファジー活性が低下し、3日目には片腎摘前と同レベル

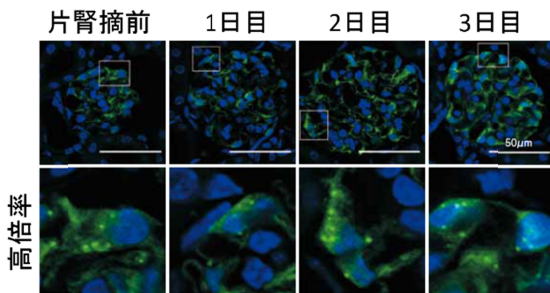


図1: 共焦点顕微鏡観察による片腎摘後のGFP-LC3ドット数の変化(緑:GFP 青:DAPI(核))

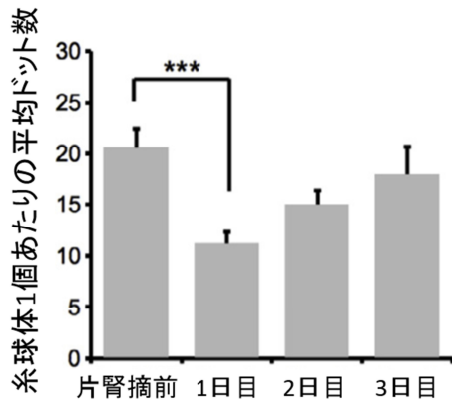


図2: 片腎摘後のGFP-LC3ドット数の変化

まで回復することが明らかとなった(図1・2)。

###### ポドサイト特異的 Atg7 ノックアウトマウスでの検討

次に、オートファジー欠損マウスであるポドサイト特異的 Atg7 ノックアウトマウスに対し片腎摘を行った。対象とした生後3カ月のポドサイト特異的 Atg7 ノックアウトマウスは野生型マウスと同様、蛋白尿を認めず腎組織も正常であった。しかし、片腎摘後1日目に、野生型マウスと比し有意にタンパク尿の増加を認め(図3)、電子顕微鏡観察では濾過障壁の崩壊を示唆する足突起消失を認めた。また、3日目にはポドサイト数の減少を認めた(図4)。

生化学的な解析により、この時、ポドサイトにユビキチンの蓄積(図5)や小胞体ストレスマーカーの増加を認め、ポドサイト障害の原因であると考えられた。しかし、片腎摘後150日目の長期の経過観察では腎機能低下や糸球体硬化は認めなかった。

これらの結果より、片腎摘後の残存腎のごく初期のポドサイトの代償性肥大にオートファジーが重要な役割を果たしていることが明らかとなった<sup>8)</sup>。

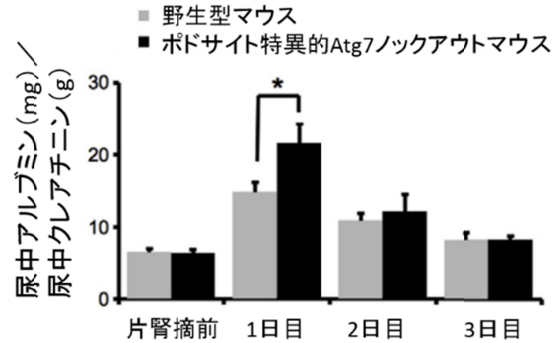


図3: 片腎摘後の蛋白尿の変化

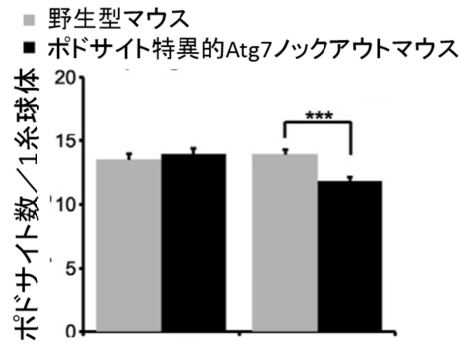


図4: 1糸球体あたりの平均ポドサイト数

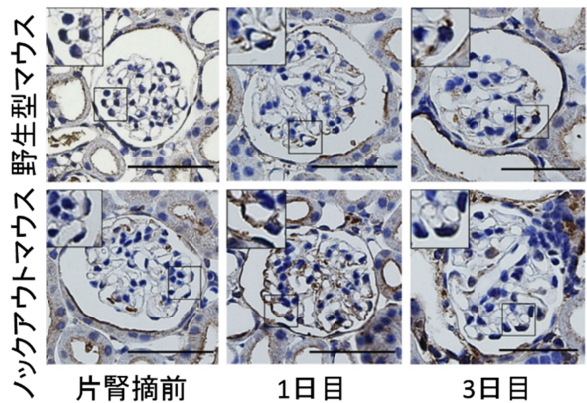


図5: ポドサイトにおけるユビキチンの蓄積(酵素抗体法)

##### (2) CLとポドサイト障害

###### 野生型マウスでの検討

野生型マウスにアドリマイシン・リポポリサッカリドを投与し腎症モデルを作製した。この結果、タンパク尿出現時にポドサイトにおけるCLの発現が亢進することが明らかとなった。

#### CL ノックアウトマウスでの検討

CL ノックアウトマウスの自然経過を長期観察したが、特に腎障害は認めなかった。

次に、CL ノックアウトマウスにアドリアマイシンを投与すると、野生型と比し、タンパク尿・糸球体硬化共に有意に抑制されることが明らかとなった。

この結果より、腎障害時に、CL の発現が亢進すること、亢進した CL による基質の過剰分解が糸球体硬化につながる可能性が示された。さらにノックアウトマウスの解析から、CL 欠損により、基質の過剰分解が行われないことで、濾過障壁が保たれ、糸球体硬化が抑制されることが示された。

糸球体硬化は、濾過障壁の完全な崩壊、つまり不可逆性の腎障害を示す慢性腎臓病の最終形態であり、現在、有効な治療法はない。本研究結果は、CL 阻害が新規糸球体硬化抑制薬のターゲットとなる可能性を示している。今後、CL 阻害の糸球体硬化抑制メカニズムを明らかにしていく必要があると考える。

#### (3) CD とポドサイト障害

ポドサイト特異的 CD ノックアウトマウスの自然経過

ポドサイト特異的 CD KO マウスは、生後 5 ヶ月頃よりタンパク尿が出現し、加齢と共に漸増傾向となった。

腎組織では生後 12 ヶ月頃より糸球体硬化への進行を認めた。電子顕微鏡観察では、濾過障壁崩壊を示す足突起消失を認めた。

#### CD 欠損ポドサイトとアポトーシス

ポドサイト特異的 CD ノックアウトマウスは野生型と比し、有意に糸球体内のポドサイト数が少なかった。つまり、ポドサイトが細胞死に至り、濾過障壁から脱落することで糸球体硬化が進行することが分かった。

さらに細胞死に至る機構として、ポドサイトのオートファジー・リソソーム経路が停滞していること、この結果、多くのポドサイトがアポトーシスに至ることが示された。

電子顕微鏡観察では CD ノックアウトマウスの神経細胞で認めた特徴的な封入体（オスミウム好性顆粒・指紋様構造）と類似した蓄積物が観察された。

本研究によりポドサイトは神経細胞と同様に、CD の欠損がオートファジーの停滞をもたらす、アポトーシスに至ることが初めて示された。

細胞死に至るまでのメカニズムを明らかにしていくことは、不可逆性の変化である糸球体硬化発症メカニズムを解明していくことにつながると考えられる。

#### <引用文献>

- 1) Mizushima N, et al. *Mol Biol Cell* 15: 1101-1111, 2004
- 2) Reiser J, et al. *J Biol Chem* 279: 34827-34832, 2004
- 3) Sever S, et al. *J Clin Invest* 117: 2095-2104, 2007
- 4) Yaddanapudi S, et al. *J Clin Invest* 121: 3965-3980, 2011
- 5) Faul C, et al. *Nat Med* 14: 931-938, 2008
- 6) Koike M, et al. *J Neurosci*. 20: 6898-906, 2000
- 7) Hartleben B, et al. *J Clin Invest* 120: 1084-1096, 2010
- 8) Oliva Trejo JA, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 446(4), 1190-1196, 2014

#### 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7件)

Fukuda H, Hidaka T, Takagi-Akiba M, Ichimura K, Oliva Trejo JA, Sasaki Y, Wang J, Sakai T, Asanuma K, Tomino Y. Podocin is translocated to cytoplasm in puromycin aminonucleoside nephrosis rats and in poor-prognosis patients with IgA nephropathy. *Cell Tissue Res*. 360(2): 391-400, 2015. (査読有)

DOI: 10.1007/s00441-014-2100-9.

Combination therapy with telmisartan and oxalacitriol suppresses the progression of murine adriamycin nephropathy. Jeong KH, Asanuma K, Lydia A, Takagi M, Asao R, Kodama F, Asanuma E, Tomino Y. *Nephron*. 129(2):143-54, 2015. (査読有)

DOI: 10.1159/000369346.

Oliva Trejo JA, Asanuma K, Kim EH, Takagi-Akiba M, Nonaka K, Hidaka T, Komatsu M, Tada N, Ueno T, Tomino Y. Transient increase in proteinuria, poly-ubiquitylated proteins and ER stress markers in podocyte-specific autophagy-deficient mice following unilateral nephrectomy. *Biochem Biophys Res Commun*. 446(4), 1190-1196, 2014 (査読有)

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.03.088.

Tanaka E, Asanuma K, Kim E, Sasaki Y, Oliva Trejo JA, Seki T, Nonaka K, Asao R, Nagai-Hosoe Y, Akiba-Takagi M, Hidaka T, Takagi M, Koyanagi A, Mizutani S, Yagita H, Tomino Y. Notch2

activation ameliorates nephrosis.  
*Nat Commun* 5,3296, 2014 (査読有)  
DOI: 10.1038/ncomms4296.  
Kodama F, Asanuma K, Takagi M, Hidaka T, Asanuma E, Fukuda H, Seki T, Takeda Y, Hosoe-Nagai Y, Asao R, Horikoshi S, Tomino Y.  
Translocation of dendrin to the podocyte nucleus in acute glomerular injury in patients with IgA nephropathy.  
*Nephrol Dial Transplant*. 28(7):1762-72, 2013. (査読有)  
DOI: 10.1093/ndt/gfs500.  
Asao R, Asanuma K, Kodama F, Akiba-Takagi M, Nagai-Hosoe Y, Seki T, Takeda Y, Ohsawa I, Mano S, Matsuoka K, Kurosawa H, Ogasawara S, Hirayama Y, Sekine S, Horikoshi S, Hara M, Tomino Y.  
Relationships between levels of urinary podocalyxin, number of urinary podocytes, and histologic injury in adult patients with IgA nephropathy.  
*Clin J Am Soc Nephrol*. 7(9):1385-93, 2012. (査読有)  
DOI: 10.2215/CJN.08110811.  
浅沼克彦, 日高輝夫, 高木美幸, 富野康日己.  
Clinical nephrology 系球体障害 足細胞障害とオートファジー  
Annual Review 腎臓 2013:165-171, 2013. (査読無)

[学会発表](計6件)

田中絵里子, 浅沼克彦, 児玉史子, 高木美幸, 日高輝夫, Peter Mundel, 水谷修紀, 富野康日己.  
RIL(Reversion-induced LIM protein)のポドサイトにおける機能の検討. 日本腎臓学会学術総会, 2014年7月4日~2014年7月6日, パシフィコ横浜(神奈川県).  
田中絵里子, 浅沼克彦, 佐々木有, 関卓人, Alejandro Oliva Trejo Juan, 野中香苗, 浅尾りん, 細江佳子, 日高輝夫, 水谷修紀, 八木田秀雄, 富野康日己.  
Notch2 アゴニスト抗体による系球体硬化改善効果の検討. 日本腎臓学会学術総会, 2013年5月10日~2013年5月12日, 東京国際フォーラム(東京都).  
Lida Aida, 浅沼克彦, 野中香苗, 高木美幸, 富野康日己. Effects of 22-oxa-calcitriol on podocyte injury in adriamycin-induced nephrosis. 日本腎臓学会学術総会, 2012年6月1日~6月3日, パシフィコ横浜(神奈川県).  
田中絵里子, 浅沼克彦, 関卓人, 野中香苗, 浅尾りん, 細江佳子, 高木美幸, 水

谷修紀, 八木田秀雄, 富野康日己. ポドサイト障害における Notch 再活性化と receptor 特異的系球体硬化抑制機能の検討. 日本腎臓学会学術総会, 2012年6月1日~6月3日, パシフィコ横浜(神奈川県).

Asao R, Asanuma K, Kodama F, Takagi M, Hosoe NY, Seki T, Takeda Y, Ohsawa I, Mano S, Matsuoka K, Kurosawa H, Ogasawara S, Hirayama Y, Sekine S, Horikoshi S, Hara M, Tomino Y.  
Relationship between Urinary Podocalyxin Level and Histological Activity in Patients with IgA Nephropathy. The 9<sup>th</sup> international podocyte conference, 2012年4月23日, マイアミ.

Tanaka E, Asanuma K, Nonaka K, Seki T, Asao R, Hosoe Y, Takagi M, Oliva A, Mizutani S, Yagita H, Tomino Y.  
Notch2 pathway reactivation ameliorates urinary protein and glomerular sclerosis in adriamycin nephropathy mice. The 9<sup>th</sup> international podocyte conference, 2012年4月23日, マイアミ.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高木 美幸 (TAKAGI, Miyuki)  
順天堂大学大学・医学部・非常勤助教  
研究者番号: 80599895