

令和 4 年 4 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09173

研究課題名(和文) 選択的オートファジーを介した新規尿路結石治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of medication for urolithiasis via selective autophagy

研究代表者

坂倉 毅 (Sakakura, Takeshi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：00275132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスや炎症の亢進による尿細管細胞傷害が結石形成を促進する。近年、傷害を受けた細胞がオートファジーを誘導することが報告されている。本研究では、腎結石形成過程におけるオートファジーの関与を腎尿細管細胞、結石モデルマウスで検討し、結石形成メカニズムを明らかにすることを目的とした。結果として、mTOR/TFEB経路の障害によるオートファジーの低下が、腎結石形成の誘因になることを見出した。活性化したmTORシグナルは腎結石形成を促進すると考えられた。mTORをターゲットとした新規結石治療薬の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路結石症は、全世界で有病率10%に達し、末期腎臓病へと進行する難治性疾患のため、予防法を含めた内科的根治治療の確立が望まれているが、未だ達成されていない。尿路結石が、“酸化ストレスや炎症による腎尿細管上皮細胞の傷害が結石形成を促進する”という概念のもと、細胞保護作用を有するオートファジーに着目したところ、オートファジーが尿中の結晶により傷害を受けた尿細管細胞内のオルガネラを処理することにより、結石形成を抑制していることを見出した。細胞保護作用に着目した、メカニズムの理解は、これまでの尿路結石学にはなかった概念であり、これからの研究・治療法を根本から変える可能性がある研究課題である。

研究成果の概要(英文)：Tubular cell damage due to oxidative stress and increased inflammation promotes stone formation. Recently, it has been reported that injured cells induce autophagy. The purpose of this study was to investigate the involvement of autophagy in the process of renal calculus formation in renal tubular cells and calculus model mice, and to clarify the calculus formation mechanism. As a result, we figure out that a decrease in autophagy due to a disorder of the mTOR / TFEB pathway triggers renal stone formation. Activated mTOR signals were thought to promote renal stone formation. The development of a new stone treatment drug targeting mTOR is expected.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路結石 オートファジー 酸化ストレス 細胞傷害

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

尿路結石症は、全世界で有病率 10%に達し、末期腎臓病へと進行する難治性疾患のため、予防法を含めた内科的根治治療の確立が望まれているが、未だ達成されていない。

私たちは、シュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸の投与による尿路結石モデルマウスを確立し、その過程で、酸化ストレス障害・尿細管細胞傷害により結晶の凝集・沈着が亢進することを明らかにした。さらに、尿路結石の 90%を占めるシュウ酸カルシウム結石の原基であると考えられる腎盂乳頭の石灰化 (Randall's Plaque) において、結石形成が腎盂粘膜の傷害と炎症の活性化に関係していることを新たに見出した。以上のことから尿路結石は、単に尿中の無機物質の増加によってできるのではなく、“酸化ストレスや炎症による腎尿細管上皮細胞の傷害が結石形成を促進する” という全く新しい概念を提唱した。近年、傷害を受けた細胞は自己を防御するためオートファジーを誘導することが報告されている。オートファジーは多分野で研究が行われているが、尿路結石形成との関係に関する報告はなく、メカニズムの解明と予防法に応用可能であると考えた。

## 2. 研究の目的

オートファジーと尿路結石形成の関係を明らかにし、結石形成メカニズムを詳細に理解し、新規分子標的薬におけるターゲットとなる因子を見出すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

In vitro: マウス腎尿細管細胞に対してシュウ酸カルシウム 1 水和物結晶  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  を添加後、0, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 時間後に細胞を回収し、オートファジーの活性を関連蛋白 (MAP1LC3B, SQSTM1/p62) の Western-blot で、オートファジーの進行を MAP1LC3B に RFP(Red)と GFP(Green)を融合させた tandem fluorescent-tagged LC3 を細胞にトランスフェクションし、Red/Green シグナルの比で検討した。さらにオルガネラ傷害を蛍光免疫染色 (Mitotracker/TOMM20, LAMP1/Lysotracker, LGALS3/galectin-3) で検討し、細胞への結晶付着量を偏光顕微鏡で観察した。次にオートファジーの上流因子である mTOR の活性を p-p70S6K/p70S6k の Western blot で、TFEB 活性を核内タンパク抽出による Western-blot、GFP-TFEB のトランスフェクションで検討した。さらに、それらの標的因子であり、オートファジー活性に関与する ULK1 のリン酸化を調べた。また、オートファジー制御薬の効果の検討のため、抑制薬である 3-Methyladenine (3-MA); 5mM、促進薬である Torin1;  $1 \mu\text{M}$  を使用した。

In vivo: オートファゴソームを可視化させた GFP-MAP1LC3B マウスに、シュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸 (GOX) 80mg/kg を連日腹腔内投与し、6, 12, 24 時間後、2, 4 日後に腎を摘出し、偏光顕微鏡で腎結石形成量を観察した。オートファジー活性は MAP1LC3B の発現、SQSTM1 の Western-blot、透過型電子顕微鏡での細胞内観察で検討した。次に、mTOR、TFEB の活性を Western-blot で調べ、ULK1 のリン酸化を検討した。さらに、オートファジー促進薬である Rapamycin; 1mg/kg を連日腹腔内投与し、結石予防効果を検討した。

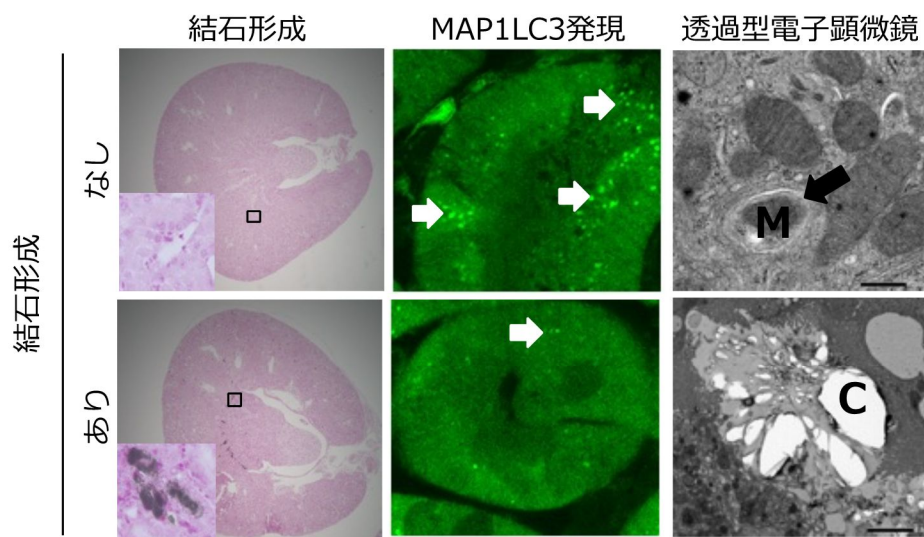
ヒト検体での検討: 結石患者において、腎結石の原基と考えられる腎乳頭の石灰化である

Randall's plaque を結石内視鏡治療の際に採取し、plaque 部と正常粘膜部でオートファジーの発現を SQSTM1 の免疫染色と、透過型電子顕微鏡による細胞内の観察で検討した。

#### 4 . 研究成果

In vitro: 結晶添加 6 時間以降では、細胞内のオルガネラ傷害が顕著となり、ミトコンドリア由来の活性酸素種や、リソソームの酸性化傷害と膜の傷害による LGALS3 の上昇を認めた。オートファジーも同様に、結晶添加 6 時間以降で活性が低下した。オートファジー活性の低下は、結晶による mTOR 活性の上昇と TFEB の核内発現の低下により、ULK1 のリン酸化が阻害されたことが原因と考えられた。Torin1 の投与は、mTOR 活性阻害により細胞内傷害や結晶の細胞への付着を有意に抑制した。

In vivo: 腎結石は GOX 投与 2 日目以降で上昇した。結石形成前において、尿管細胞内では MAP1LC3B の発現上昇、オートファジーファゴソームが観察されたが、結石形成後では、MAP1LC3B の発現低下と、SQSTM1 の発現上昇が認められ、細胞内もオートファジー低下により傷害オルガネラや空胞が多数認められた ( 図 1 )。GOX 投与による mTOR 活



↑:MAP1LC3 C: 結晶 M:ミトコンドリア ↑:オートファゴソーム

図1: 結石を認めるマウスではオートファジーで発現が上昇するMAP1LC3が低下し細胞内のオートファゴソームが殆ど見られなかった。

性の上昇と TFEB の核内発現の低下により、ULK1 のリン酸化の阻害されたことが、オートファジー低下の原因と考えられた。Rapamycin の投与は、mTOR 阻害による細胞内のオートファジー亢進により、結石形成を有意に抑制した。

ヒト検体での検討: 正常粘膜部では、細胞内にオートファゴソームを多数認めた。一方で、plaque 形成部位では、傷害オルガネラが多数認められ SQSTM1 の発現が亢進していたことから、オートファジーが低下していることが示唆された。

以上のことから、mTOR/TFEB 経路の障害によるオートファジーの低下が、腎結石形成の誘因になることを見出した。本研究から、mTOR 阻害剤によるオートファジーの活性化が、新規結石治療薬になる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Unno Rei, Kawabata Tsuyoshi, Taguchi Kazumi, Sugino Teruaki, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Kohri Kenjiro, Yoshimori Tamotsu, Yasui Takahiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Deregulated MTOR (mechanistic target of rapamycin kinase) is responsible for autophagy defects exacerbating kidney stone development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 709 ~ 723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2019.1635382	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 海野 怜、河瀬 健吾、海野 奈央子、田中勇太郎、杉野 輝明、田口 和己、浜本 周造、安藤 亮介、中根 明宏、岡田 淳志、坂倉 毅、安井 孝周
2. 発表標題 mTOR 活性異常が腎結石形成の誘因となる
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田 朋記、田口 和己、濱本 周造、岡田 淳志、阪野 里花、山田 健司、坂倉 毅、安井 孝周
2. 発表標題 腎盂腎炎治療後に実施したTULの検討
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 海野 怜、川端 剛、海野 奈央子、田中 勇太郎、杉野 輝明、田口 和己、濱本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、坂倉 毅、吉森 保、安井 孝周
2. 発表標題 mTOR/TFEBシグナル障害によるオートファジーの低下が腎尿路結石形成の誘因となる
3. 学会等名 日本尿路結石症学会第29回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉野 輝明、田中 勇太郎、海野 怜、藤井 泰普、田口 和己、濱本 周造、宇佐美 雅之、安藤 亮介、岡田 淳志、戸澤 啓一、坂倉 毅、最上 徹、郡 健二郎、安井 孝周
2. 発表標題 褐色脂肪組織による尿路結石形成の制御
3. 学会等名 日本尿路結石学会第28回学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	郡 健二郎  (Kohri Kenjiro)  (30122047)	名古屋市立大学・その他部局等・学長   (23903)	
研究分担者	安井 孝周  (Yasui Takahiro)  (40326153)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	
研究分担者	岡田 淳志  (Okada Atsushi)  (70444966)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授   (23903)	
研究分担者	安藤 亮介  (Ando Ryosuke)  (30381867)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	
研究分担者	濱本 周造  (Hamamoto Shuzo)  (80551267)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師   (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田口 和己  (Taguchi Kazumi)  (00595184)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師    (23903)	
研究分担者	海野 怜  (Unno Rei)  (40755683)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員    (23903)	

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