

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15998

研究課題名（和文）リソソーム障害に着目した慢性腎臓病における糸球体上皮細胞障害機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of podocyte damage in chronic kidney disease by focusing on lysosomal damage

研究代表者

山原 真子（Yasuda-Yamahara, Mako）

滋賀医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：70731941

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：わが国における慢性腎臓病（CKD）の患者数は増加しており、その発症機構の解明は重要な研究課題である。CKDの診断基準でもある蛋白尿の原因となるのは、主にポドサイトの障害であるが、分裂・再生能のないポドサイトにとって、細胞内恒常性維持は重要である。今回、CKDのポドサイト障害に対し、細胞内の蛋白分解を担うリソソームの機能強化が細胞保護的に働くと仮説をたて、検証を行った。リソソームは転写因子TFEBにより発現調節される。TFEBの活性化によりポドサイト障害が抑制されることが明らかとなり、TFEBによるリソソームの活性化を介したCKDポドサイト障害の抑制が新たな治療戦略になり得る可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国の慢性腎臓病（CKD）患者数は増加の一途を辿っている。CKDとは糸球体濾過量の低下、蛋白尿の持続により定義される疾患群で、その病態は多種多様である。しかし、蛋白尿の主な原因となるのは糸球体スリット膜を形成するポドサイトの障害であり、この障害を抑制する機構を解明すれば、すなわち多くのCKD患者にとっての新たな治療法の開発につながると考えられる。今回、分裂能を有さないポドサイトにおいて、細胞内の蛋白分解を担うリソソームの転写因子TFEB活性化による細胞保護効果が明らかとなった。TFEBによるリソソームの活性化を介したポドサイト障害の抑制がCKDの新たな治療戦略になり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The number of patients with chronic kidney disease (CKD) in Japan is increasing, and elucidating the pathogenesis of CKD is an important research issue. Proteinuria, which is a diagnostic criterion for CKD, is mainly caused by podocyte injury, and maintaining intracellular homeostasis is important for podocytes, which do not have the ability to divide and regenerate. In this study, we hypothesized that the enhancement of lysosome function, which is responsible for intracellular proteolysis, would act cytoprotectively against podocyte injury in CKD. We found that activation of transcription factor EB (TFEB), a master regulator of lysosomal biogenesis, suppressed podocyte damage. This suggests that inhibition of podocyte damage through TFEB-mediated activation of lysosomal biogenesis may be a new therapeutic strategy for CKD.

研究分野：腎臓病

キーワード：慢性腎臓病 ポドサイト リソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (**CKD**) とは糸球体濾過量の低下、蛋白尿の持続により定義づけられる疾患群であり、進行すると末期腎不全へと至る。尿蛋白の増加は、尿細管障害、間質障害を惹起し腎機能低下を引き起こすため、蛋白尿に対して早期の治療を必要とする。臨床の場において、原疾患に応じた各種免疫抑制剤や **RAS** 阻害薬を用いた適切な加療により、尿蛋白の減少や腎予後の改善がみられる一方で、これら既存の治療によっても治療抵抗性蛋白尿を呈し末期腎不全に至る症例が未だ多く存在する。よって、これら治療抵抗性症例に対する新規治療戦略の確立が腎疾患領域における重要な研究課題の一つと考えられる。

蛋白尿を呈する病態において、糸球体上皮細胞の障害が尿蛋白の主な原因となることが明らかとなっている。糸球体上皮細胞は分裂能を有さない高分化細胞であり、互いの足構造により糸球体濾過バリアを形成している。このため、糸球体上皮細胞の機能障害や細胞死は、糸球体濾過バリア機能の破綻をきたし尿蛋白の出現を引き起こす。つまり、糸球体上皮細胞における恒常性の維持は蛋白尿の発症抑制に不可欠である。これまでの研究により、細胞内恒常性維持のためには細胞内の主な分解機構であるリソソームの働きが重要であることが明らかとなっている。先天的にリソソーム酵素のひとつである  $\alpha$  ガラクトシダーゼ活性低下を認める **Fabry** 病において、酵素基質の蓄積から糸球体上皮細胞障害を来し蛋白尿を呈することが明らかになっている。また、後天的なリソソーム機能の障害によっても、糸球体上皮細胞障害が引き起こされることが明らかとなってきている。我々も糸球体上皮細胞におけるオートファジー・リソソーム機能低下が糖尿病性腎症の病態進展に関わることを明らかにしてきた (**Tagawa, Yasuda 他. Diabetes. 2015**)。このようにとりわけ分裂能を有さない糸球体上皮細胞において、リソソームの機能は細胞内恒常性維持に非常に重要と考えられ、その異常が糸球体上皮細胞障害に関わることを示唆される。しかしながら、これまで糸球体上皮細胞におけるリソソーム合成・分解調節と細胞障害機構との関連は明らかではない。そこで本研究では糸球体上皮細胞障害についてリソソーム機能障害に着目し、糸球体上皮細胞のリソソーム生合成活性化が糸球体上皮細胞障害を抑制するかを検討する。

## 2. 研究の目的

本研究では、各種病態における細胞ストレス下において、リソソームへの過剰な負荷により、糸球体上皮細胞障害が惹起・増悪すると仮説を立て、リソソーム生合成の活性化によるリソソーム機能の改善が、糸球体上皮細胞障害に効果的であるかを検討する。

## 3. 研究の方法

リソソーム生合成の亢進ならびに低下が、病態モデルにおける糸球体上皮細胞障害に及ぼす影響を明らかにするために、**TFEB** に着目して下記の 3 点を検討する。

課題 細胞ストレス下におけるリソソーム障害の程度、およびリソソーム活性化が細胞障害に与える影響

課題 **TFEB** の活性化経路、ならびに **TFEB** の作用経路

課題 **TFEB** 活性化・抑制化環境下での病態モデルにおける糸球体上皮細胞障害

課題 リソソーム障害の評価とリソソーム活性化の効果の検討

-1 先天的リソソーム障害モデルを用いた検討

先天的リソソーム障害を持つ疾患として **Fabry** 病が知られる。**Fabry** 病の病態責任遺伝子変異はすでに明らかになっており、申請者らは、**CRISPR/Cas9** 技術を用いてこの責任遺伝子を欠損させ、**Fabry** 病モデル (リソソーム障害モデル) 糸球体上皮細胞を作成した。この細胞に対し **TFEB** を過剰発現し、**Fabry** 病の病態が改善するかを検討する。

-2 培養糸球体上皮細胞を用いた検討

培養糸球体上皮細胞を用いて、各種病態モデルを想定した細胞刺激 (高血糖や高脂肪酸、**LPS** や **TNF $\alpha$**  など) を行い、リソソーム機能の評価、**TFEB** の発現および核内移行によるリソソーム生合成の活性化の検討を行う予定としている。さらに、これらの細胞障害モデルに対し、**TFEB** の恒常的亢進モデルならびに恒常的不活化モデルを導入し、細胞内ストレスや細胞死について評価を行う。

課題 **TFEB** の活性化経路および作用経路の検討

-1 **TFEB** の核内移行を調節する分子機構の検討 (上流経路の検討)

糸球体上皮細胞における **TFEB** 発現の上昇および核内移行に重要な分子機構を明らかにする。これまでの報告から、**mTORC1** (**mammalian target of rapamycin complex 1**) の活性化による **TFEB** のリン酸化により、**TFEB** の核内移行が抑制されることや、小胞体ストレスおよび飢餓状態により **TFEB** の核内移行が亢進することが明らかとなっている。**mTORC1** の抑制を介して **TFEB** の核内移行を促進する、という戦略が考えられるが、**mTORC1** の活性抑制は生体に広

汎な影響を与えることが知られており、単純な導入は難しい。(mTORC1 阻害薬であるラパマイシンは免疫抑制薬として臨床応用されているが、しばしば mTORC1 シグナルの過抑制により、糸球体上皮細胞を傷害し、蛋白尿といった副作用を呈する。)そのため、mTORC1 に依存しない TFEB 核内移行活性化経路を発見すべく、ケミカルライブラリーを用いて TFEB の核内移行活性化物質を網羅的に検索する。

## -2 TFEB の活性化によって誘導される細胞保護に関わる分子機構の検討 (下流経路の検討)

リソソーム生合成の改善が直接的に細胞保護効果を誘導するのか、もしくはその他の経路蛋白質の転写を活性化させ、間接的に細胞保護効果を発揮するのかを明らかにする。TFEB 恒常的亢進モデル細胞と恒常的不活性化モデル細胞を用いて、RNA シークエンスを行い、どの経路の転写が活性化しているのかを明らかにする。また、プロテオミクスを用いて、実際の蛋白発現を検討する。候補蛋白を抽出した後は、その蛋白の欠損モデルや発現亢進モデルを作成し、細胞保護効果を示すのか検討する。

## 課題 TFEB 活性化・抑制化環境下での病態モデルにおける糸球体上皮細胞障害の検討

活性化ならびに不活化 TFEB を糸球体上皮細胞特異的に発現するマウスを作製し、それらのマウスに対し、糸球体上皮細胞に障害を起こす病態モデルを導入する。マウスモデルとして、LPS やアドリアマイシンによる FSGS モデルや、アンジオテンシン の持続投与による高血圧モデルマウス、ストレプトゾトシンや高脂肪食を用いた 1 型および 2 型糖尿病モデルマウス、加齢マウスを作成予定としている。これまでの検討から、それぞれのモデルが糸球体上皮細胞に及ぼす細胞障害機構は異なるため、前述 の実験で得られた TFEB の作用経路の予測結果に基づき、関連性の高い病態動物モデルから検討を開始する。評価項目として、尿蛋白および腎組織評価、糸球体上皮細胞の形態変化、リソソーム機能を予定している。

## 4. 研究成果

### 結果 -1 先天的リソソーム障害モデルを用いた検討

リソソーム障害モデルである α ガラクシダーゼ欠損糸球体上皮細胞を用いて、検討を行った。この細胞では、Fabry 病で特徴的に認められる細胞内のゼブラ体蓄積、α ガラクシダーゼの基質である GB3 の細胞内蓄積を確認した。また、リソソーム機能障害としてリソソーム pH の上昇、巨大リソソームの蓄積を確認した。

この細胞を用いて、TFEB 過剰発現によるリソソーム生合成亢進のリソソーム障害に対する効果を検討した。その結果、TFEB の過剰発現は、α ガラクシダーゼ欠損糸球体上皮細胞におけるリソソーム障害による α シヌクレイン発現を減少させなかった。この結果は、α ガラクシダーゼが欠損している細胞においてリソソームの生合成を亢進させても蓄積する α シヌクレインの減弱には至らないことを示唆しており、さらなる検討が必要ではあるが、リソソームの他経路の活性化による代償機能に効果は乏しいと推測された。

### 結果 -2 培養糸球体上皮細胞を用いた検討

TFEB の恒常的活性化(S211/142A)および不活化(S142D)変異をもつ培養糸球体上皮細胞を用いて TFEB の核内移行について検討した。簡便な細胞/核蛋白分離法を確立し、TFEB 過剰発現細胞では TFEB の核内移行が亢進することを確認した。さらに、恒常的活性化型 TFEB 過剰発現糸球体上皮細胞では、TFEB の核内移行が増加し、不活化型 TFEB 過剰発現細胞では、細胞質 TFEB 発現は増加するが、核内移行は低いことを確認した(図1)。

高脂血症や高血圧モデルの疑似試薬による検討においては、飽和脂肪酸であるパルミチン酸の附置により、TFEB の発現量は減弱するが、核内移行は増加すること明らかにした(図1)。さらに、恒常的活性化 TFEB 過剰発現細胞ではパルミチン酸附置によって誘導される細胞死を抑制すること、および恒常的不活性化 TFEB 過剰発現細胞では、細胞死の抑制を認めないことを明らかにした(図2)。

以上のことから、TFEB 活性化による細胞保護効果が明らかとなってきた。

### 結果 -1 TFEB の核内移行を調節する分子機構の検討

TFEB の核内移行を亢進させる物質を網羅的に解析するために、共同研究者によりケミカルライブラリーを用いたスクリーニングを施行した。その結果、mTORC1 の活性を変えることなく TFEB の核内移行を亢進させる物質を見出し、現在構造解析や投与法の検討を行っているところである。



図1. 薬剤誘導性恒常的核内移行型(S211/142A)/非移行型(S142D)TFEB過剰発現培養ヒト糸球体上皮細胞を用いた実験。S211/142A変異細胞株ではTFEBの有意な核内移行亢進を認める。さらにパルミチン酸(pal)刺激によりTFEBの発現量は減少するが、細胞内移行は亢進する。

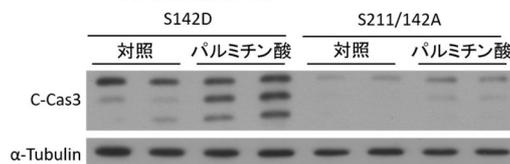


図2. 薬剤誘導性恒常的核内移行型(S211/142A)/非移行型(S142D)TFEB過剰発現培養ヒト糸球体上皮細胞を用いた実験。S142D変異TFEB発現細胞株で認めるパルミチン酸刺激によるアポトーシスの増加(c-cas3の上昇)は、S211/142A変異細胞株で有意に抑制される。

また、課題の結果からどういった条件で **TFEB** の核内移行が抑制されるかを検証した。その結果、糖尿病疑似刺激である高血糖かつ、炎症の疑似試薬としての  $\text{TNF}\alpha$  附置によって、**TFEB** の核内移行が抑制されることがわかった。このことから、糖尿病状態では糸球体上皮細胞の **TFEB** の核内移行が抑制されていることが示唆された。さらに、**mTORC1** の過剰亢進モデルである糸球体上皮細胞特異的 **TSC1** 欠損マウスを用いて、糸球体上皮細胞における **mTORC1** が過剰亢進した状態での **TFEB** や細胞障害について検討を行った。その結果、このマウスから単離した糸球体上皮細胞において、**TFEB** の核内移行が抑制されていること(図3)、 $\text{TNF}\alpha$  の附置によって細胞死が誘導されることを明らかにした。さらにこの細胞死は **mTORC1** 抑制薬であるラパマイシンの共附置により抑制された(図4)。以上より、**mTORC1** の過剰な活性化は **TFEB** の核内移行を抑制し、炎症などの刺激による細胞の脆弱性を高めることを明らかにした。これまでの **TFEB** の活性化による細胞保護効果の結果とあわせて、その機序が明らかとなってきた。

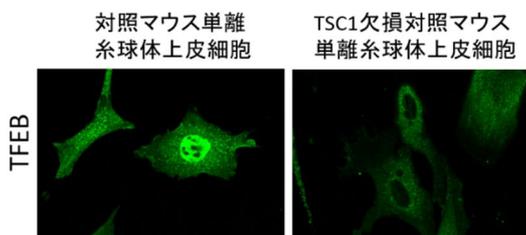


図3. 糸球体上皮細胞特異的TSC1欠損マウスおよび対照マウスより単離した単離糸球体上皮細胞を用いた実験。TSC1欠損によりmTORC1が過剰亢進した単離糸球体上皮細胞(右)にてTFEBの核内移行が有意に抑制されている。

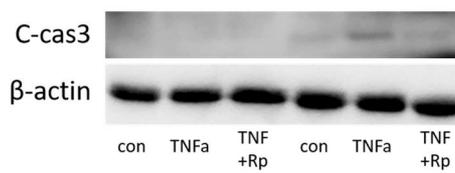


図4. 糸球体上皮細胞特異的TSC1欠損マウスおよび対照マウスより単離した単離糸球体上皮細胞を用いた実験。TSC1欠損細胞への $\text{TNF}\alpha$ 附置により細胞死が誘導される。この細胞死はラパマイシン(Rp)の共附置により抑制される。

## 結果 -2 **TFEB** の活性化によって誘導される細胞保護に関わる分子機構の検討

現在、**TFEB** 恒常的亢進モデル細胞と恒常的不活化モデル細胞を用いて、**RNA** シークエンスを行うにあたり準備をすすめている。さらに、結果 -1 で得られた候補物質を用いて、腎保護効果を検証するために、臓器特異的 **TFEB** 欠損マウスを作成中である。今後、結果 -1 で得られた候補物質をオートファジー欠損マウスや恒常的 **mTORC1** 過剰亢進マウスに投与を行い、腎保護効果が消失するのかを検証し、**TFEB** 活性化による細胞保護効果の作用機序を検証予定である。

## 結果 **TFEB** 活性化・抑制化環境下での病態モデルにおける糸球体上皮細胞障害の検討

活性化ならびに不活化 **TFEB** を糸球体上皮細胞特異的に発現するマウスを作製中である。これらマウスに作成に難渋したため、今後実験を行う予定としている。

またこの間、既報の **TFEB** 活性化薬のマウスへの投与を行った。1種類目の薬剤については、培養細胞において **TFEB** の核内移行を有意に亢進させたが、マウスへの投与において血中濃度の有意な上昇を認める時間が短かった。このためか、糸球体上皮細胞特異的 **TSC1** 欠損マウスを用いた検討において、蛋白尿を軽度減少させたが、その効果は有意ではなかった。現在2種類目の薬剤について投与および検証を行っている。また十分な結果は得られていないが、蛋白尿を呈する糸球体上皮細胞特異的オートファジー欠損モデルマウスにおいて、蛋白尿の減少させる結果を得ており、引き続き検討が必要ではあるが、**TFEB** の活性化は、**CKD** の糸球体上皮細胞障害に対する有効な治療標的となり得る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshiabayashi M, Kume S, Yasuda-Yamahara M, Yamahara K, Takeda N, Osawa N, Chin-Kanasaki M, Nakae Y, Yokoi H, Mukoyama M, Asanuma K, Maegawa H, Araki SI.	4. 巻 525
2. 論文標題 Pivotal role of podocyte autophagy against glomerular endothelial dysfunction in diabetes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 319-325
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.088.	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 -

1. 著者名 Yasuda-Yamahara M, Shinji Kume, Hiroshi Maegawa.	4. 巻 22
2. 論文標題 Roles of mTOR in Diabetic Kidney Disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants (Basel).	6. 最初と最後の頁 321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox10020321	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 -

1. 著者名 Tomita I, Kume S, Sugahara S, Osawa N, Yamahara K, Yasuda-Yamahara M, Takeda N, Chin-Kanasaki M, Kaneko T, Mayoux E, Mark M, Yanagita M, Ogita H, Araki SI, Maegawa H.	4. 巻 32
2. 論文標題 SGLT2 inhibition mediates protection from diabetic kidney disease by promoting ketone body-induced mTORC1 inhibition.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Metab.	6. 最初と最後の頁 404-419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cmet.2020.06.020.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasuada-Yamahara M, Yoshiabayashi M, Kume S, Araki SI, Maegawa H.
2. 発表標題 Autophagy protects podocytes from diabetes-related glomerular endothelial damage.
3. 学会等名 International Diabetes Federation 2019 (IDF 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山原 真子, 久米真司, 荒木信一, 前川聡.
2. 発表標題 Whole-body energy metabolism and podocytopathy.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山原 真子, 久米真司, 荒木信一, 前川聡.
2. 発表標題 Intracellular nutrient signals and diabetic kidney disease.
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------