

令和元年6月17日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19466

研究課題名(和文)新規治療法を目指したオートファジー・カテプシンの糸球体硬化進展への関与の解明

研究課題名(英文) Research into the relationship between autophagy lysosome degradation factors and glomerulosclerosis leading to development of new medical treatment options.

研究代表者

高木 美幸 (TAKAGI, Miyuki)

順天堂大学・医学部・特任助教

研究者番号：80599895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジー・リソソーム分解系は細胞の恒常維持に重要な役割を果たす。本研究では特にカテプシンD(CD)、L(CL)とポドサイト関連蛋白との関連、役割に注目した。ポドサイト特異的CDノックアウトマウスの観察により、CDの欠損がメンテナンス不全を来すこと、腎炎モデルの観察によりCLとそのinhibitorの発現バランスがポドサイト障害抑制に関連することが明らかとなり、ポドサイトの品質管理にはリソソームオートファジー分解系の重要性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジー・リソソーム経路による分解系関連蛋白と糸球体硬化進展メカニズムの病態の解明は、特に蛋白分解系に着目した創薬研究にも密接に関連すると考える。また、糸球体硬化進展メカニズムの関係解明により、ポドサイト障害のバイオマーカーの検出にもつながり、さらには糸球体硬化・慢性腎臓病を減らすことが出来るような治療薬の開発への糸口となりうる。

研究成果の概要(英文)：The autophagy lysosome degradation system is essential for keeping cell homeostasis. In this study, we investigated the relationship between lysosomal proteases and glomerulosclerosis by focusing especially on cathepsins D (CD) and L (CL) in podocytes. We analyzed podocyte specific CD knockout mice and found that CD deficiency results in dysregulation of podocyte function. Moreover, we examined the role of CL in rat podocytes using a Puromycin Aminonucleoside (PAN) nephrosis model. We discovered that CL levels and the absence of its inhibitors in podocytes affected by PAN nephrosis, are important factors contributing to podocyte damage and the development of proteinuria. Together, our results indicate that CD and CL activity are essential for quality control in podocytes.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ポドサイト カテプシンD カテプシンL オートファジーリソソーム分解系 糸球体硬化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) **ポドサイト**は、糸球体基底膜を外側から覆う高度に分化した上皮細胞であり、この障害は尿中への蛋白質漏出を来す。その障害が激しい場合には不可逆的な構造変化を引き起こし、基底膜からの剥離、ポドサイト数の減少を経て最終的には糸球体硬化に至る。電子顕微鏡の観察では、ポドサイト障害時には足突起の消失が共通して確認でき、障害が不可逆的で重度な場合には、多くの**リソソーム**が細胞内に出現し、基底膜からの剥離を予見する所見が出現する。このように、**糸球体硬化を考えるうえでリソソーム機能・タンパク分解系の破綻はカギになる因子である。**

(2) **リソソーム**は、多くの加水分解酵素を含む細胞内小器官であり、ヘテロファゴサイトーシス(貪食作用)、エンドサイトーシス後の後期エンドソーム、**オートファジー**などによる細胞内外の代謝産物や古くなった構造物を分解・再利用することで細胞の恒常性を維持する重要な役割を担っている。

(3) **カテプシン D (CD)**は、リソソーム内に存在する代表的なプロテアーゼの一つであり、腎臓においてはポドサイトにも存在する。神経特異的 CD ノックアウト(KO)マウスが特徴的な神経症状を呈することから、神経と共通点の多いポドサイトにおいて、CD は重要な役割を果たしているのではないかと推測される。また**カテプシン L (CL)**は、腎障害時に発現が亢進し、細胞骨格蛋白や濾過障壁を構成するスリット膜蛋白を過剰に分解することで、足突起消失と蛋白尿をもたらすことが解っている。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(*J Biol Chem.* 279: 34827-34832, 2004)

(4) **オートファジー(自食作用)**は、哺乳類の全ての細胞に存在する細胞内小器官等の蛋白処理装置である。オートファジーには、自己消化のため消化物を隔離する隔離膜(オートファゴソーム)の形成が不可欠であるが、これに必要な機能グループの一つとしてユビキチン様因子 Atg8 の結合反応系がある。この Atg8 のホモログには **LC3(microtubule-associated protein 1 light chain 3)**、**GABARAP (GABAA-receptor-associated protein)**がある。**LC3(Atg8)**は Atg4、**Atg7**、**Atg3**、**Atg12・Atg5-Atg16L** 複合体の触媒を経て基質であるリン脂質(PE)と結合し、これはオートファゴソームの膜成分の一部として機能する。オートファゴソームは、その後**リソソーム**と融合し**オートリソソーム**となり、リソソーム内の多種の酵素により内容物が加水分解され、分解産物を再供給するという役割をもつ。

(5) **オートファジー**は、飢餓応答をはじめ抗老化、発生、感染防御など多くの生命現象にかかわり、その破綻は悪性腫瘍や神経変性疾患へ関与することが明らかになってきた。Atg7 の脳特異的な欠損マウスが神経疾患を引き起こすことが報告され(*Nature* 441(7095), 2006)、腎臓においては最近、腎特異的 Atg5KO マウスが糸球体硬化を来し、さらには糸球体障害モデルにおいて有意に障害を増悪させることが報告された(*J Clin Invest* 120(4), 2010)。近年神経変性疾患については、動物モデルにおけるオートファジーの活性化による治療効果が報告されており(*Nat Chem Biol* 3, 331, 2007, *Hum Mol Genet* 19, 2144, 2010)、オートファジーを治療のターゲットにするという試みが進んできている。

(6) ポドサイトにおけるオートファジーの役割に関して、当教室ではポドサイト障害からの回復時に LC3 の著明な増加を認め、オートファジーが活性化している可能性を報告した(*FASEB J* 17, 2003)。LC3 のホモログである GABARAP についても、GABARAP トランスジェニックマウスの解析により、腎臓においては GABARAP がポドサイト障害に関与している可能性を報告した(*Am J Physiol Renal Physiol.* 302. F380-389, 2012)。**ポドサイト特異的 Atg7KO マウス**を作製し、このマウスについての観察・解析を行っている。Atg7KO マウスは生理的条件下では野生型と比較して表現型に明らかな違いは認めず、そこで Atg7KO マウスに急性の過剰濾過負荷を来す片腎摘出を施行したところ、ごく急性期に KO マウスに有意な蛋白尿を来したことから、ポドサイトの形状・機能保持にオートファジーが関与している可能性が考えられた(*Biochem Biophys Res Commun.* 18, 1190-6, 2014)。

**神経細胞とポドサイトの形態学的・機能的な共通点と先の Atg5、Atg7 の報告により、ポドサイトにおける Atg7 欠損がポドサイト障害・糸球体硬化とオートファジーの関連性の検討に重要な因子となりうると思われる。**

### 2. 研究の目的

(1) 本研究は、ポドサイト特異的な Atg7 欠損マウス、カテプシン欠損マウスを利用することで、オートファジー・リソソーム経路による分解系関連蛋白と糸球体硬化進展メカニズムの関係解明を目的とした。病態の解明は分解系に着目した創薬研究にも密接に関連すると考える。  
(2) 糸球体硬化進展メカニズムの関係解明により糸球体硬化を少しでも減らすことが出来るような治療薬の開発へ糸口につなげたいと考えている。

### 3. 研究の方法

オートファジー・リソソーム経路によるタンパク分解系関連蛋白の機能解析と糸球体硬化進展メカニズムを解明するため、ポドサイト特異的な Atg7 欠損マウス、カテプシン欠損マウスを用いた実験糸球体硬化モデルの観察・解析を中心に組織学的・生化学的な評価を行う。

ポドサイトにおけるカテプシンの役割や蛋白尿発現との関連性の解明を目的として、**ポドサイト特異的なカテプシン K0 マウス**の解析を行った。

ポドサイト障害における **CL と関連分子の役割の解明**を目的として、一時的な蛋白尿ながら糸球体硬化も来し得るモデルであるラットピューロマイシン腎症を用いて関連因子の動向を観察した。

ポドサイト関連蛋白と糸球体硬化の関連性について、マウス糸球体硬化モデルを用いて関連因子の動向を観察した。

#### 4. 研究成果

(1) ポドサイトにおけるカテプシンの役割や蛋白尿発現との関連について明らかにすることを目的として**ポドサイト特異的なカテプシン K0 マウス**の解析を行った。

ポドサイト特異的な CD K0 マウスは、WT マウスと比較して、生後 3 か月齢の K0 マウスには蛋白尿を検出しはじめ 5 か月齢で有意な差となった。さらには 12 か月齢の K0 マウスにおいて、糸球体硬化の有意な増加を認め、また 39 か月齢での生存率は有意に K0 マウスで低下を認めた(図 1)。

電子顕微鏡におけるポドサイトの観察では、WT マウスに明らかな変化は認めなかったものの、3 か月齢 K0 マウス(蛋白尿検出前の時期)においてオスミウム好性顆粒状沈着物(GRODs: granularosmiophilic deposits)の貯留を認め、月齢が進む毎に増加を認め、ポドサイト障害を示す足突起消失や微絨毛変性所見も K0 マウスにおいて広範に認められた(図 2)。

ポドサイトマーカーである WT1 の蛍光免疫染色(IF)と糸球体あたりの WT1 のカウントにより、K0 マウスにおいて有意なポドサイト数の減少を認めた。アポトーシスの指標である cleaved caspase3 の IF 染色、および TUNEL 染色では、K0 マウスにおいて糸球体内アポトーシス細胞の有意な増加を認めた。

リソソームのマーカーである Lamp1 の IF 染色により、K0 マウスにおいて Lamp1 の貯留を認め、またオートファジー関連蛋白の IF 染色では、K0 マウスにおいて LC3 のポドサイトへの蓄積を認め、さらには P62、ubiquitin の蓄積も認めたことから、K0 マウスにおいてオートファジー不全を来していることが考えられた。

ポドサイトスリット膜関連蛋白である nephrin, podocin の IF 染色を行ったところ、WT マウスでは糸球体係蹄に沿って線状に染色されるところが、K0 マウスにおいては細胞質内に顆粒状に蓄積し、podocin においては免疫電顕により GERD s 顆粒内に貯留していることが確認できた。

これらの結果より、カテプシン D のポドサイトにおける欠損が、オートファジー不全、リソソーム蓄積などポドサイトのメンテナンス不全を惹起し、アポトーシスの増加からポドサイト剥離を来し糸球体硬化に至ることが考えられ、カテプシン D がオートファジー分解系に必須であり、ポドサイトの品質管理にはリソソームオートファジー分解系が重要な役割を担っていると考えられた。

(2) また**カテプシン L (CL)** は、腎障害時に発現が亢進し、細胞骨格蛋白や濾過障壁を構成するスリット膜蛋白を過剰に分解することで、足突起消失と蛋白尿をもたらすことが解っている。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(*J Biol Chem.* 279: 34827-34832. 2004)。蛋白分解酵素であるカテプシンの内因性阻害物質として cystatin が知られており、中でも cystatin B, C は多くの細胞に分布して、それぞれ細胞内、外でタンパク分解への阻害活性をもつことが知られている(*J Health Care Poor Underserved.* 21: 51-70. 2010, *Cell Mol Life Sci.* 62:653-69. 2005)。ポドサイト障害における CL とこれら cystatin B, C について、一時的な蛋白尿ながらポドサイト剥離も来し得るモデルであるラットピューロマイシン(PAN)腎症を用いて CL とその阻害物質である cystatin の動向を観察した。

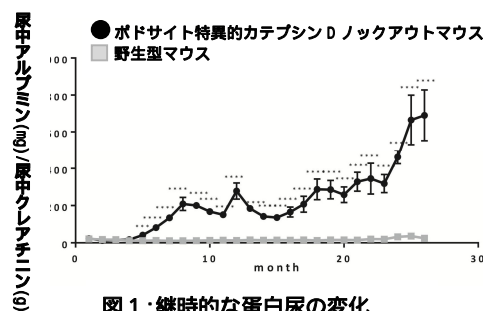


図 1: 継続的な蛋白尿の変化

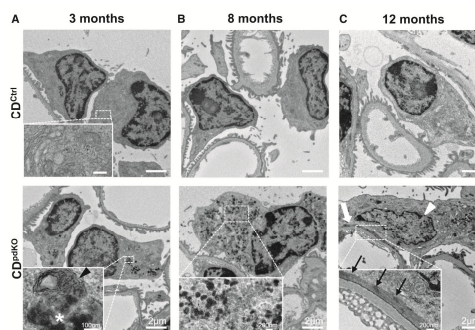


図 2: 電子顕微鏡によるポドサイトの観察

(上段: 野生型マウス、  
下段: ポドサイト特異的なカテプシン D ノックアウトマウス)

PAN 腎症の観察では、薬剤投与 4 日目より有意な蛋白尿の増加を認め、検出尿蛋白は 8 日目に最大量となった。その後は投与 28 日目、56 日目と徐々に減少するも尿蛋白は検出された。光顕上は、経過中メサンギウム増殖は認めなかったものの、投与 8 日目で糸球体癒着を確認し、28 日目 56 日目には部分硬化を確認した。電顕上は、蛋白尿が出始めた投与 4 日目にポドサイトの足突起消失、空胞変性、リソソームの蓄積を認め、8 日目には広範に認めポドサイトの一部剥離も認めた。その後の蛋白尿減少に合わせて、投与 28 日目、56 日目は、部分硬化部位以外の足突起消失は改善した。

薬剤投与前の糸球体に、CL、cystatin B,C はほとんど確認できなかったが、蛋白尿検出時期の PAN 投与 4 日目に CL がポドサイト内に顆粒状に増加するのを確認し、8 日目にはさらに増加した。Cystatin B は薬剤投与後も糸球体内ではほぼ検出されず、cystatin C は CL と同様に投与 4 日目、8 日目にポドサイト内に著明に増加した。また投与 28、56 日目においては、CL は糸球体癒着周辺部分のポドサイトに認められたが、cystatin C は同部位に検出されなかった (図 3)。

これらの結果より、ポドサイトにおけるカテプシン L と障害物質であるシスタチン C のバランスが崩れるとポドサイト障害を増悪させ、ポドサイトの糸球体基底膜からの癒着を来すことが考えられ、ポドサイト障害、糸球体癒着・硬化の進展にカテプシン L が重要な役割を担っていることが考えられた。

(3) 細胞内輸送はリソソーム分解にも連絡するが、この細胞内輸送を担う蛋白質ファミリーである sorting nexin (SNX) は、エンドサイトーシスや細胞内に取り込まれた物質の選別・分解・再利用を制御するエンドソームの輸送・シグナル伝達などに関与しており、中でも SNX9 はエンドサイトーシスに関与している。我々は過去に、平静時スリット膜の裏打ち蛋白として存在する podocin がポドサイト障害時に細胞質内に局在変化を来し、これがエンドサイトーシスによることを報告した (*Cell Tissue Res.* 360:391-400, 2015)。さらなる解析により、エンドサイトーシスに関与する Podocin と結合する蛋白として SNX9 が検出されたことから、SNX9 とポドサイト関連蛋白の動向について観察した。

マウス ADR 腎症組織を用いた SNX9 の IF 染色では、投与前はほとんど確認できなかったが、ADR 投与後 7 日目の蛋白尿増加時期にポドサイト内の SNX9 発現が増加し、podocin と発現の分布が一致することを確認した。

ヒト腎生検組織を用いた SNX9 の IF 染色では、糸球体硬化を来す腎障害 (巣状糸球体硬化症や IgA 腎症予後不良群) と来さない腎障害 (微小変化型ネフローゼ症候群や IgA 腎症予後良好群) で比較すると、後者でポドサイト内の SNX9 発現量が増強することを確認した。

培養ポドサイトを用いて SNX9 をノックダウンすると、ポドサイト障害時に起きていた podocin の局在変化が起こらないことが確認された。

これらの結果より、エンドサイトーシス関連蛋白である SNX9 がポドサイト障害のバイオマーカーとなりうること、また SNX9 が podocin の局在変化の鍵であることから、慢性腎臓病の進展予防への治療ターゲットとなる可能性が考えられた。

(4) ポドサイト関連蛋白と糸球体硬化の関連性について、マウス糸球体硬化モデルを用いて関連因子の動向を観察した。

腎臓の発達に関連した蛋白である Sal1 について、腎分化後の Sal1 蛋白の役割を解明するため、ポドサイト特異的 Sal1KO マウスを作成して表現型を観察した。平常時は KO マウスに明らかな尿所見異常を認めず、ADR 腎症を惹起したところ、KO マウスにおける蛋白尿の有意な増加、糸球体硬化の有意な増悪を確認した。WT マウスにおける ADR 投与後の Sal1 の変化については、投与 14 日目に最も発現が増加することが解った (KO マウスにおいてはポドサイトへ

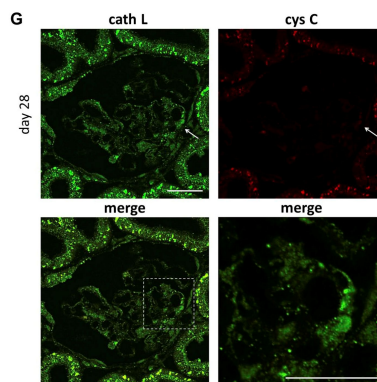


図 3: 共焦点顕微鏡によるラット PAN 腎症糸球体の観察 (緑: カテプシン L, 赤: シスタチン C)

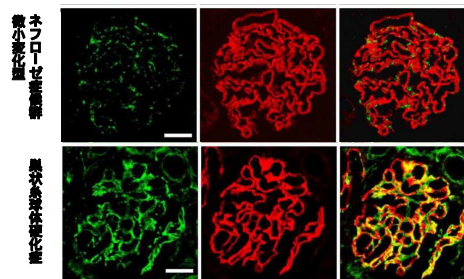


図 4: 共焦点顕微鏡によるヒト腎生検糸球体の観察 (緑: SNX9, 赤: podocin)

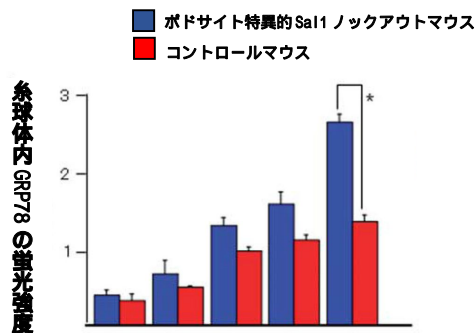


図 5: 糸球体内 GRP78 蛍光強度の比較

の発現はなし)。また KO マウスにおいて、ADR 投与 14 日目に TUNEL 陽性細胞の有意な増加を認め、ポドサイトアポトーシスの増加を確認し、ADR 投与 28 日目には ER ストレスマーカーである GRP78 の糸球体内での有意な増加を認め (図 5)、ER ストレスの関与も示唆された。培養ポドサイトを用いて Sal1 をノックダウンすると、アクチン関連蛋白である synaptopodin の減少とストレスファイバーの減少、また細胞運動能の低下を認めた。以上から、Sal1 が糸球体障害時にアクチン骨格の再構成やアポトーシスの制御を行うことでポドサイトに保護的な役割を担うことが考えられた。

細胞骨格関連蛋白である Rac1 について、糸球体硬化における Rac1 の役割を解明するため、ポドサイト特異的 Rac1KO マウスを作成し、表現型を観察した。平常時は KO マウスに明らかな尿所見異常を認めず、ADR 腎症を惹起させたところ、KO マウスにおいて硬化糸球体の有意な増加を認めた。糸球体硬化の原因となりうるポドサイトの剥離 (ポドサイトの減少数) は WT と差がなかったが、KO においてポドサイトが小さいことを確認し (図 6)、糸球体障害時にポドサイトが代償的に肥大できないことを確認した。そのメカニズムの検証によりポドサイト形態の維持に、Rac1 と mTOR が必要であることが確認できた。これらの結果から、Rac1 は mTOR とともにポドサイトの形態維持に関与しており、糸球体硬化への抑制に関与していることが考えられた。

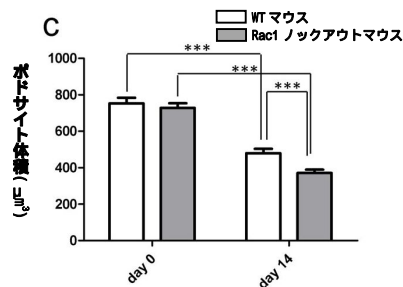


図 6: アドリアマイシン投与後のポドサイト体積の観察

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- 1). Kubo A, Shirato I, Hidaka T, **Takagi M**, Sasaki Y, Asanuma K, Ishidoh K, Suzuki Y. Expression of Cathepsin L and Its Intrinsic Inhibitors in Glomeruli of Rats With Puromycin Aminonucleoside Nephrosis. *J Histochem Cytochem.* 査読有.66(12):863-877,2018.  
doi: 10.1369/0022155418791822.
- 2). Wang J, Hidaka T, Sasaki Y, Tanaka E, **Takagi M**, Shibata T, Kubo A, Trejo JAO, Wang L, Asanuma K, Tomino Y. Neurofilament heavy polypeptide protects against reduction in synaptopodin expression and prevents podocyte detachment. *Sci Rep.* 査読有.21;8(1):17157,2018.  
doi: 10.1038/s41598-018-35465-6.
- 3). Asao R, Seki T, **Takagi M**, Yamada H, Kodama F, Hosoe-Nagai Y, Tanaka E, Trejo JAO, Yamamoto-Nonaka K, Sasaki Y, Hidaka T, Ueno T, Yanagita M, Suzuki Y, Tomino Y, Asanuma K. Rac1 in podocytes promotes glomerular repair and limits the formation of sclerosis. *Sci Rep.* 査読有.22;8(1):5061, 2018.  
doi: 10.1038/s41598-018-23278-6.
- 4). Hosoe-Nagai Y, Hidaka T, Sonoda A, Sasaki Y, Yamamoto-Nonaka K, Seki T, Asao R, Tanaka E, Trejo JAO, Kodama F, **Takagi M**, Tada N, Ueno T, Nishinakamura R, Tomino Y, Asanuma K. Re-expression of Sall1 in podocytes protects against adriamycin-induced nephrosis. *Lab Invest.* 査読有.97(11):1306-1320, 2017.  
doi: 10.1038/labinvest.2017.69.
- 5). Yamamoto-Nonaka K, Koike M, Asanuma K, **Takagi M**, Oliva Trejo JA, Seki T, Hidaka T, Ichimura K, Sakai T, Tada N, Ueno T, Uchiyama Y, Tomino Y. Cathepsin D in Podocytes Is Important in the Pathogenesis of Proteinuria and CKD. *J Am Soc Nephrol.* 査読有.27(9):2685-700, 2016.  
doi: 10.1681/ASN.2015040366

〔学会発表〕(計 1 件)

Eriko Tanaka and **Miyuki Takagi**, Toll-like receptor 8 and 10 are possibly associated with pathogenic mechanism of idiopathic nephrotic syndrome, American Society of Nephrology Kidney Week 2017, 2017 年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。