

令和 3 年 10 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19653

研究課題名(和文) 腎老化による慢性腎臓病進行メカニズムとポドサイトにおける細胞内蛋白分解機構の関係

研究課題名(英文) The role of proteolysis in podocyte and mechanisms of CKD along with aging

研究代表者

浅沼 克彦 (ASANUMA, KATSUHIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：60449064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓では糸球体で血液濾過が行われるが、ポドサイトは糸球体での血液濾過に重要な役割を担っており、ポドサイト障害は慢性腎不全(CKD)進行の要因となる。加齢で進行するCKDはポドサイトの蛋白分解機能の低下が原因ではないかと考え、蛋白分解系の一つであるユビキチン-プロテアソーム(UPS)系のポドサイト特異的な機能不全マウスを作成したところ、若齢でポドサイト障害を引き起こし腎不全が進行した。ポドサイト老化促進とアポトーシスが見られた。細胞実験では抗酸化剤やオートファジー活性化によりこのアポトーシスが抑制され、これらがUPSの機能低下によるポドサイトの老化を抑制しCKD進行を遅らせることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎不全(CKD)の患者数は、高齢化が進むにつれて増加し、CKDの進行抑制薬の開発が望まれる。加齢により機能が低下するポドサイトの蛋白分解機能が、ポドサイト障害を引き起こしてCKDの原因となりうることを示し、またCKDの進行を抑制する可能性のある薬剤候補を示すことができた。これは、UPSを治療ターゲットとした、CKDの進行抑制薬の開発にエビデンスを与える。学術的には、ポドサイト特異的なUPSの機能不全マウスの解析を初めて行うことで、ポドサイトにおけるUPSの重要性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)： Podocyte plays an important role in glomerular filtration in kidney. Podocyte injury causes the progression of chronic kidney disease (CKD).

We considered dysfunction of proteolysis in podocyte causes the progression of CKD with aging. We generated podocyte-specific dysfunctional mice of the ubiquitin-proteasome system (UPS), which is one of the intracellular protein degradation systems. The mice showed podocyte injury and progression of CKD in young age. Senescence promotion and apoptosis were observed in podocyte of the mice. In vitro study, anti-oxidant and autophagy activation suppressed the apoptosis of podocyte. This suggested that these reagents could suppress the aging of podocytes and the progression of CKD due to UPS dysfunction.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ポドサイト 蛋白分解 老化 ユビキチン プロテアソーム

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

1. 研究開始当初の背景

腎臓は加齢に伴う老化により機能が低下する臓器であり、慢性腎臓病 (CKD) 患者は高齢化とともに増加の一途をたどっている。老化に伴う腎臓の変化の一つに糸球体硬化の増加がある。糸球体は毛細血管の塊でありここで血液が濾過されて尿を生成する。毛細血管の周囲には糸球体足細胞 (ポドサイト) が存在しており、これが血清蛋白の最終濾過関門の役割を果たす。ポドサイトが障害を受けると、その特殊な構造が劇的に変化して血清蛋白が尿に漏出し蛋白尿となる。障害が持続すると、やがてポドサイトは糸球体から脱落し、糸球体は硬化して血液濾過ができなくなり CKD が進行する。

細胞を構成する蛋白は常に分解と合成が繰り返されており、細胞内の蛋白分解機構は細胞の恒常性維持に不可欠である。しかしこの蛋白分解機構の能力は加齢とともに低下する。主要な細胞内蛋白分解系として、オートファジーとユビキチン・プロテアソームが知られている。申請者はポドサイトの恒常性維持にこれらの蛋白分解系が重要な役割を担っていると考え、ポドサイト特異的にオートファジーを欠損させたマウス (pAtg7 KO マウス) を作成した。しかしこのマウスは自然経過では加齢による CKD の進行はほとんど認められなかった [1]。

この pAtg7KO マウスに片腎摘を行うと、一過性に蛋白尿が上昇し、ポドサイトにユビキチン化蛋白が一時的に著増することがわかった。この現象は、片腎的によるストレスに応答して、野生型では一過性にオートファジーが亢進して障害に対応するが、pAtg7KO マウスではオートファジーが働かないため、UPS が亢進することで代償していると考えられた。またオートファジーの過程で蛋白分解酵素として働くカテプシン D を、ポドサイト特異的にノックアウトしたマウスを作成して自然経過を観察したところ、カテプシン D により分解されないオートファゴソームが蓄積するだけでなく、ユビキチン化蛋白の蓄積が認められ、このマウスにおいてもユビキチン・プロテアソームとオートファジーの関連が予想された [2]。以上から、オートファジーとユビキチン・プロテアソームの蛋白分解は相互に関係していると考えられる。我々はポドサイトの恒常的な蛋白分解にユビキチン・プロテアソームが主要な役割を果たしており、この機能の低下が加齢による腎機能低下を引き起こすのではないかと考え、今回ポドサイト特異的なプロテアソームの機能不全マウスを作成した。

2. 研究の目的

ユビキチン・プロテアソームやオートファジーなどの蛋白分解機能が老化により機能低下することや [3]、腎では老化によりプロテアソーム活性が低下することが報告されている [4]。

これらのことからプロテアソーム機能の低下が、老化にともなう CKD に関連していると我々は考え、ポドサイトにおける、プロテアソーム機能の役割を明らかにし、また老化にともなう CKD とこれら蛋白分解機構との関連を調べ、最終的にはポドサイトにおける細胞内蛋白分解の観点で CKD の治療へ結びつけることを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、ポドサイトにおいて、ユビキチン化蛋白の分解を担うプロテアソーム機能を欠損させるために、ユビキチン化蛋白の分解を担うプロテアソームの構成要素の一つである Rpt3 の遺伝子を、Cre-loxP システムを使用してノックアウトすることで、ポドサイト特異的にプロテアソーム機能を欠損したマウス (pRpt3KO マウス) を作成し自然経過を観察した。

マウスの血流に鉄粉 (dynabeads) を還流させた後に、腎臓組織を回収して酵素で消化し、マグネットにより糸球体のみ単離した。この単離糸球体を可溶化したサンプルを蛋白の解析に用いた。また培養実験においては、培養ポドサイトにプロテアソームの阻害剤であるボルテゾミブ

を投与することで、プロテアソーム機能を阻害した。細胞回収後、糸球体と同様の方法で可溶化したサンプルを蛋白の解析に用いた。オートファジーの活性の評価にはオートファゴソームを可視化したマウスである GFP-LC3 マウス [5]をさらに掛け合わせることで評価した。また可溶化したサンプルを、ウェスタンブロットにより定量し、LC3-II/LC3-I の比変化を比較することでも評価した。

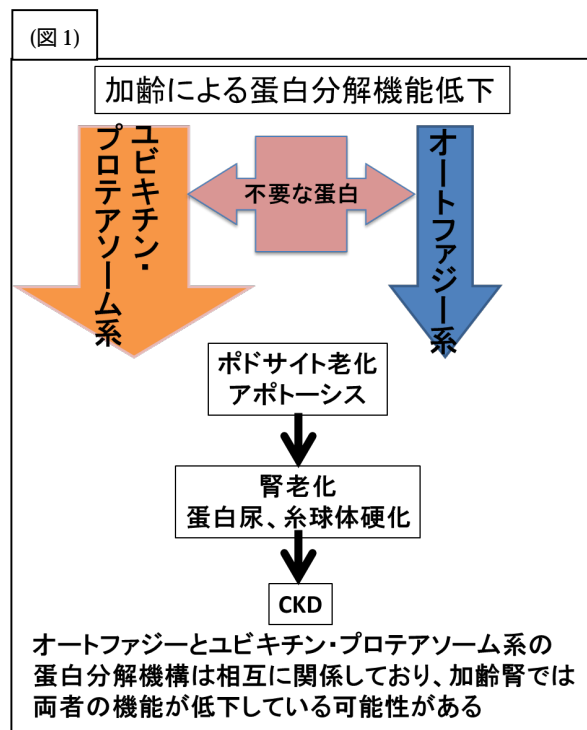
4. 研究成果

プロテアソーム機能はポドサイトの恒常性維持のために重要である

ポドサイト特異的なオートファジー機能不全マウスが自然経過でほとんど表現型を示さなかったのに対し、ポドサイト特異的にプロテアソーム機能を欠損したマウス(pRpt3KO マウス)は生後約 4 週齢より蛋白尿を認め、約 8 週齢には、野生型に対して有意に尿蛋白量が増加した。また、血清クレアチニンが約 8 週齢において pRpt3KO マウスは野生型に比して有意に増加し pRpt3KO マウスは腎不全を発症したと考えられた。

組織学的な検討によりポドサイト特異的に発現するネフリン、ポドシンを評価したところ、野生型ではポドサイトの足突起に一致して発現しているのに対し、ノックアウトマウスではポドサイトの細胞質への局在変化と発現量の低下が見られた。これはポドサイト障害が起こっていることを示す。実際、4 週齢のノックアウトマウスのポドサイト数は、野生型に比して有意に減少し、8 週齢で糸球体硬化の著明な増加が認められた。

これらの結果より、pRpt3KO マウスはポドサイト障害から糸球体硬化を来して慢性腎不全に至って死亡したと考えられた。これはポドサイトにおけるユビキチン・プロテアソームが生理的条件下で腎機能維持に重要な役割を果たしていることを示している。オートファジーやユビキチン・プロテアソームなどの蛋白分解機能が老化により機能低下することや[3]、腎では老化によりプロテアソーム活性が低下することが報告されており[4]、ポドサイトのユビキチン・プロテアソーム機能不全により CKD に至ったこの pRpt3KO マウスは、腎老化のモデルとなると考えられた(図 1)。



プロテアソーム機能不全はポドサイトのアポトーシスを引き起こす

ポドサイト障害の詳細なメカニズムを解明するため、さらに詳細な検討を行ったところ pRpt3KO マウスでは、ポドサイトの細胞質にユビキチン化蛋白の蓄積を認めた。また細胞のアポトーシスの指標である Cleaved Caspase3 陽性ポドサイトの増加を認めた。ポドサイト障害の原因を解析したところ、ポドサイトにおいて酸化ストレスの増加がみられた。

細胞実験において、培養ポドサイトにプロテアソーム阻害剤を投与したところ、マウスの結果と同様にユビキチン化蛋白の蓄積、酸化ストレスの上昇がみられ、アポトーシスの上昇が見られた(図 2)。そこで細胞実験において抗酸化剤の投与を試みたところ、ポドサイトのアポトーシスが抑制されることが分かった。

プロテアソーム機能不全はポドサイトのオートファジーの活性を低下させる

またオートファジーに対する影響を GFP-LC3 マウスを掛け合わせることで評価したところ、pRpt3KO マウスの糸球体では GFP のドットが減少しておりオートファジーの活性が低下していることが示唆された。細胞実験においても、プロテアソーム阻害剤の投与により、LC3-II/LC3-I 比の低下が見られ、プロテアソーム阻害によりポドサイトにおけるオートファジー活性が低下したと考えられた。そこで、細胞実験においてオートファジーの活性化を試したところ、プロテアソーム阻害剤により引き起こされるポドサイトのアポトーシスが抑制された。

これらの結果からは抗酸化剤やオートファジーの活性化が、ユビキチン・プロテアソームの機能低下によるポドサイトの老化進行を抑制し CKD の進行を遅らせる可能性があると考えられる。

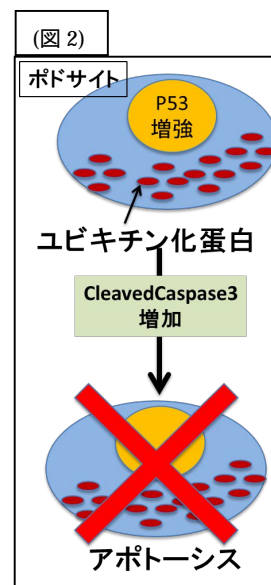
<引用文献>

- [1] J. A. Oliva Trejo *et al.*, “Transient increase in proteinuria, poly-ubiquitylated proteins and ER stress markers in podocyte-specific autophagy-deficient mice following unilateral nephrectomy,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 446, no. 4, pp. 1190–1196, 2014.
- [2] K. Yamamoto-Nonaka *et al.*, “Cathepsin D in Podocytes Is Important in the Pathogenesis of Proteinuria and CKD,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, pp. 2685–2700, 2016.
- [3] I. Saez and D. Vilchez, “The Mechanistic Links Between Proteasome Activity, Aging and Age-related Diseases,” *Curr. Genomics*, vol. 15, no. 1, pp. 38–51, 2014.
- [4] J. N. Keller, K. B. Hanni, and W. R. Markesbery, “Possible involvement of proteasome inhibition in aging: Implications for oxidative stress,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 113, no. 1, pp. 61–70, 2000.
- [5] N. Mizushima, M. M. Akitsugu Yamamoto, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, “In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 15, no. March, pp. 1101–1111, 2004.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- (1) Makino S, Shirata N, Trejo JAO, Yamamoto-Nonaka K, Yamada H, Miyake T, Mori K, Nakagawa T, Tashiro Y, Yamashita H, Yanagita M, Takahashi R, **Asanuma K**. Dysfunction of proteasome in podocytes results in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 32. 597-61



3. 2021

- (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* ,査読あり,2018 Nov 21; 8(1):17157. doi: 10.1038/s41598-018-35465-6. (K A is corresponding author)
- (3) Empitu MA, Kadariswantingsih IN, Aizawa M, **Asanuma K**. MAGI-2 and scaffold proteins in glomerulopathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* , 査読あり,2018 Nov 1;315(5): F1336-F1344. (Review) doi: 10.1152/ajprenal.00292.2018. Epub 2018 Aug 15. (K A is corresponding author), doi: 10.1152/ajprenal.00292.2018. Epub 2018 Aug 15.
- (4) 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.* , 査読あり, 2018 Dec;66(12):863-877, doi: 10.1369/0022155418791822. Epub 2018 Jul 27.
- (5) 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.*, 査読あり 2018 Mar 22;8(1):5061. (K A is corresponding author), doi: 10.1038/s41598-018-23278-6.
- (6) Taguchi K, Yamagishi SI, Yokoro M, Ito S, Kodama G, Nakayama Y, Ando R, Yamada-Obara N, **Asanuma K**, Matsui T, Higashimoto Y, Brooks CR, Ueda S, Okuda S, Fukami K. RAGE-aptamer attenuates deoxycorticosterone acetate/salt-induced renal injury in mice. *Sci Rep.*, 査読あり, 2018 Feb 8;8(1):2686. doi: 10.1038/s41598-018-23278-6.
- (7) 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 against Adriamycin induced nephrosis. *Lab Invest.* , 査読あり, 2017 Nov;97(11):1306-1320. (K A is corresponding author), doi: 10.1038/labinvest.2017.69. Epub 2017 Jul 31.
- (8) Shirata N, Ihara KI, Yamamoto-Nonaka K, Seki T, Makino SI, Trejo JAO, Miyake T, Yamada H, Campbell K, Nakagawa T, Mori K, Yanagita M, Mundel P, Nishimori K, **Asanuma K**. Glomerulosclerosis induced by MAGI-2 deficiency in kidney podocytes. *J Am Soc Nephrol.*, 査読あり,2017, Sep;28(9):2654-2669. (K A is corresponding author), doi: 10.1681/ASN.2016121356. Epub 2017 May 24.
- (9) Sasaki Y, Hidaka T, Ueno T, Akiba-Takagi M, Trejo JA, Seki T, Nagai-Hosoe Y, Tanaka E, Horikoshi S, Tomino Y, Suzuki Y, **Asanuma K**. Sorting Nexin 9 facilitates podocin endocytosis in the injured podocyte. *Sci Rep.*, 査読あり, 2017, Mar 7;7:43921. (K A is corresponding author), doi: 10.1038/srep43921.

[学会発表](計 3 件)

- (1) 発表者 Shinichi Makino, **Katsuhiko Asanuma**
発表標題 Dysfunction of Proteasome in Podocytes Results in CKD
学会等名 ISN Frontiers meetings
2018年2月23日 東京
- (2) 発表者 Shinichi Makino, **Katsuhiko Asanuma**

発表標題 Dysfunction of Proteasome in Podocytes Results in CKD

学会等名 日本腎臓学会

2018年6月8日 新潟

(3) 発表者 牧野慎市, 山田博之, Maulana A. Empitu, Ika N. kadariswantingsih, 柳田素子,

浅沼克彦

発表標題 ポドサイトにおけるプロテアソームとオートファジーの相互作用

学会等名 日本腎臓学会

2021年6月18日 横浜

〔図書〕(計 1 件)

著者名 牧野 慎市(Shinichi Makino)、**浅沼 克彦(Katsuhiko Asanuma)**

出版社 東京医学社

書名 ポドサイト障害と蛋白尿『腎と透析』第85巻6号

発行年 2018年12月

〔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。