

令和 3 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08208

研究課題名（和文）リソソームストレスとしての腎疾患の病態解明とそれに基づく治療薬の探索

研究課題名（英文）Lysosomal stress as an emerging target in kidney disease

研究代表者

高畠 義嗣 (Takabatake, Yoshitsugu)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30403075

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）：腎虚血再灌流（IRI）負荷では、オートファジーが活性化され、腎保護的に機能する。しかし急性期を過ぎた48時間後には、リソソームの形態・機能異常を認め、オートファジーが十分に活性化できていなかった。このリソソームストレスには脂質代謝異常が関与しており、PPAR アゴニスト投与により、リソソームの形態・機能異常が軽減し、腎障害も緩和された。リソソームストレスに関与する因子として転写因子TFEBに注目し、尿管特異的TFEBノックアウトマウス（以下KOマウス）を作成し、種々の腎疾患モデルにおけるTFEBの役割を検証した。IRIでは差異はなかったが、シュウ酸腎症ではKOマウスで腎症が悪化していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、IRIやシュウ酸腎症マウスモデルでは、リソソーム障害（傷害）がオートファジー活性化の阻害などを介して、病態を悪化させている、「リソソームストレス」とも呼ぶべき状態が存在することが判明した。リソソームストレスの特徴の一部は、ヒト腎移植後の腎臓でも認められ、臨床的にも意義を持つものと思われる。IRIの場合、脂質代謝異常がリソソームの機能異常の原因になっており、またノックアウトマウスを用いた実験からは、転写因子TFEBの活性調節がリソソームストレスの解除を介して腎保護につながるものと推測された。今後薬剤による脂質代謝異常の改善やTFEBの活性化が治療の選択肢になり得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Autophagy plays an important role in protecting kidney from ischemia-reperfusion injury (IRI); however, in a later phase (48 hours after IRI), enlarged and dysfunctional (as suggested by a decrease in enzymatic activity) lysosomes were observed, which inhibited full activation of autophagy (referred to as "lysosomal stress"). We found that dysregulated lipid metabolism (especially lipid peroxidation) leads to lysosomal stress. PPAR administration alleviated lysosomal stress and IRI. Based on a hypothesis that modulating lysosomal activity alleviates lysosomal stress, we investigated the role of TFEB in various kidney disease models by analyzing TFEB knockout mice (KO mice). We found no difference between wildtype and KO mice subjected to IRI, but in oxalate nephropathy, kidney injury was more exaggerated in KO mice, suggesting that TFEB protects kidney from lysosomal stress during crystal nephropathy. Modulating TFEB activity may be a therapeutic option targeting kidney diseases.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：リソソーム オートファジー 近位尿管 虚血再灌流 シュウ酸腎症 TFEB

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、ユビキチン-プロテアソーム系と並ぶ主要な細胞内分解システムであり、リソソームにおける細胞質成分(タンパク質や細胞内器官)分解の総称である。その成果を簡潔にまとめると以下の3点に集約される。

- ・尿細管オートファジーは尿細管細胞のホメオスタシスに必須である。
- ・腎疾患時には、各状況に応じて傷害された小器官を選択的に除去し、疾患に対抗する。
- ・糖尿病や脂質負荷時には、尿細管オートファジーが発動するが、基質の量や質が原因で消化不良が生じ、オートファジーは停滞する。

尿細管に豊富に存在するリソソームは、管腔からエンドサイトーシスにて再吸収された低分子タンパクの分解に寄与する。しかし近年、リソソームは転写因子 transcription factor EB (TFEB) のもとで能動的に生成が制御され、膜上にある mTOR を介して細胞内の栄養状態を感知し、アミノ酸などの代謝物のリザーバーとして機能するなど、単なる「ゴミ箱」ではなく、細胞内の代謝を制御するハブとして機能することが明らかになっている。研究代表者らは、(オートファジーが発動する)1型糖尿病性腎症マウス(尿タンパクは検出されない)の尿細管では不整形に拡張したリソソームを多数認めるとともにオートファジーが停滞する、脂質負荷下ではオートファジーの亢進に伴ってリソソームにリン脂質が蓄積し、その機能が障害される、といった知見を得たことから、「種々の腎疾患ではオートファジーの円滑な遂行が障害されていることに加え、経路の最終段階であるリソソーム機能が障害されていることで代謝を制御するハブとしての役割が果たせず、それが病態の進行に寄与する」という仮説を立てるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、腎疾患をリソソームストレスとして捉えなおし、定常時や各種腎疾患時の尿細管でのリソソームストレスの実態を形態的・生化学的に探究すること、その役割を検証すること、リソソームストレスを規定している因子を同定し、最終的に薬剤でリソソームストレスを軽減することで腎疾患を治療することである。

## 3. 研究の方法

### IRI 後の脂質代謝異常とリソソームストレスの関連

GFP-LC3 トランスジェニックマウス(オートファゴソームが GFP でマーキングされる)の片側腎動脈を 35 分間クランプし、経時的に腎臓を摘出し、近位尿細管の GFP ドット数を計測した。それぞれのマウスにおいて 6 時間前にクロロキンを投与した場合と投与しなかった場合の GFP 陽性ドット数の差をオートファジーフラックスとして評価した。48 時間後の腎臓を p62 で染色した。IRI の細胞モデルとして、不死化近位尿細管細胞を低酸素下(1%)で培養したのち再酸素化し、LC3 抗体でウエスタンブロットを行ってオートファジーフラックスを評価した。

IRI 後の腎臓において、経時的に、リソソームの形態および機能を、LAMP1 染色、電子顕微鏡による観察、カテプシン D のウエスタンブロット、ASM 活性で評価した。また低酸素下で培養した尿細管細胞でも同様にリソソームの形態および機能の評価を行った。

IRI におけるリソソーム膜の透過性亢進(LMP)とその意義を検証するため、IRI 後の腎臓のライゼートの超遠心後の上清分画でカテプシン D のウエスタンブロットを行った。その意義を解明するため、LMP に関与するとされるカルパイン阻害薬を IRI30 分前に投与し、非投与群と比較した。

IRI 後の脂質代謝異常とリソソームストレスの関連を調べるため、IRI 後の腎臓における脂質代謝を調べた。具体的には IRI 後の腎臓および低酸素負荷後の培養尿細管細胞の Oil red O 染色、脂質代謝に関わる分子群の発現(mRNA)を調べた。また IRI 後の腎臓において脂肪滴とリソソームの局在を探索した。

IRI 後の脂質代謝異常とリソソーム形態および機能異常の関連を調べるため、低酸素負荷培養尿細管細胞に PPAR アゴニスト K877 を添加し、リソソームの形態や機能を調べた。同様に IRI 後にフェノフィブラートを投与し、リソソーム機能や腎障害の程度を調べた。また PPAR ノックアウトマウスと野生型マウスに IRI を施し、リソソーム機能や腎障害の程度を調べた。

IRI 後の脂質代謝異常の本態を探索する過程で脂質過酸化に注目した。IRI 後の腎臓で過酸化脂質の一つ 4HNE の蓄積を調べた。また尿細管培養細胞に 4HNE を添加し、リソソーム酵素の活性やオートファジーフラックスを調べた。さらに過酸化脂質酸性阻害薬であるフェロスタチンをマウスに投与し、IRI 後のリソソーム機能、オートファジーフラックスを調べた。

上記の所見がヒトでも認められるか検証するために、腎移植後 delayed graft function の患者を対象にリソソームの形態、オートファジー停滞状況(p62 染色)、過酸化脂質の蓄積(4HNE)を調べた。

#### 腎リソソームストレスにおける TFEB の役割

KAP-Cre マウス (KAP [kidney androgen-related peptide] は近位尿細管に特異的に発現する) と TFEB flox マウスを交配し、尿細管特異的 TFEB ノックアウトマウスを樹立した (以下 KO マウス)。KO マウスおよびコントロールマウスを用い、リソソームストレスが惹起されると思われる IRI、糖尿病、結晶性腎症における TFEB の役割を検証した。具体的には尿細管リソソームの機能を主に細胞内代謝不全の観点から検討した。

#### 4. 研究成果

##### IRI 後の脂質代謝異常とリソソームストレスの関連

IRI 後のオートファジー活性は、6 時間、1 週間をピークとする 2 峰性を呈した。オートファジー活性が低下していた 48 時間後の腎臓では p62 陽性の蛋白凝集塊を認めた (オートファジーの停滞)。同様のオートファジーの停滞は低酸素後再酸素化した培養尿細管細胞でも認めた。

IRI 24-48 時間後の腎臓では LAMP1 陽性リソソームが増加していた。電子顕微鏡による観察では内部に層状の構造物が散見され、カテプシン D および ASM 活性の低下を認めた。3 週間後の近位尿細管では内部に小空胞を蓄えたリソソームを認め、一部はシュモール反応陽性のリポフスチンと判定された。リソソームの数や大きさの増加、機能低下は培養尿細管細胞でも確認された。

IRI 後のライゼートの超遠心後の上清分画 (リソソームを含まない) にはカテプシン D が検出された。またカルパイン阻害薬投与により LMP が抑制され、腎障害も改善していた。

IRI 後 24 時間、3 週間の腎臓および低酸素負荷後の培養尿細管細胞内には脂肪滴が散見された。またどちらの場合でも、脂質代謝に関わる分子群の発現低下を認めた。IRI 後の近位尿細管細胞内には脂肪滴とリソソームが近接して局在していた。

低酸素負荷培養尿細管細胞に K877 を投与したところ、ASM やカテプシン D 活性の上昇を認め、リソソームのサイズも小さくなった。IRI 後の腎臓にフェノフィブラートを投与すると腎障害が軽減した。また PPAR KO マウスでは IRI によりリソソーム機能および腎障害も増悪していた。

IRI 後の腎臓では 4HNE が蓄積していた。培養尿細管細胞に 4HNE を添加するとリソソーム機能活性の低下を伴ってオートファジーが停滞した。フェロスタチン投与により IRI 後のリソソーム機能不全およびオートファジーフラックスが改善した。

ヒト腎移植後 delayed graft function の患者の腎臓では、リソソームの大きさ・数の増加、p62 の蓄積に表されるオートファジーフラックスの低下、4HNE の蓄積といった、マウス IRI 後に認められた所見の一部が確認できた。

#### 腎リソソームストレスにおける TFEB の役割

片側腎 35 分虚血後 2、7、21 日に腎を解析したが、野生型および KO マウスで差異を認めなかった。また 1 型糖尿病モデルであるストレプトゾトシン投与マウスでも同様の検討を行ったが、差異はなかった。さらに結晶腎症の一つであるシュウ酸腎症を作成し、両者を比較すると (PAS 傷害スコア、腎機能、尿中 NAG 濃度など) KO マウスで腎症が悪化していた (大阪大学遺伝学吉森保らとの共同研究)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	猪阪 善隆  (Isaka Yoshitaka)  (00379166)	大阪大学・医学系研究科・教授   (14401)	
研究分担者	高橋 篤史  (Takahashi Atsushi)  (10704786)	大阪大学・医学部附属病院・助教   (14401)	

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