

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17241

研究課題名(和文)ポドサイトにおけるユビキチン・プロテアソームで発現調整を受ける分子の網羅的解析

研究課題名(英文)The global analysis of molecules regulated by ubiquitin-proteasome in podocytes

研究代表者

牧野 慎市 (Makino, Shin-ichi)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40713649

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)：ポドサイトのユビキチン・プロテアソームの役割を調べるためポドサイト特異的プロテアソーム不全マウス(pRpt3マウス)を作成した。pRpt3マウスは若齢で尿蛋白が出現し腎不全で死亡した。pRpt3マウスのポドサイトでは酸化ストレスによりp53を介したアポトーシスが誘導された。またpRpt3マウスのポドサイトではmTORの活性化によりオートファジーが抑制された。mTOR阻害剤であるrapamycinはpRpt3マウスの糸球体障害を改善した。ポドサイトに蓄積するユビキチン蛋白を質量分析で解析し、熱ショック蛋白、DNA修復蛋白、UPSとオートファジーのアダプター蛋白、細胞骨格関連蛋白などを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ポドサイトのプロテアソーム機能不全がポドサイト障害を来して慢性腎不全を進行させることが分かった。またポドサイトでは、プロテアソーム機能不全がmTORの活性化を介してオートファジー不全を引き起こすこと、mTORの活性化が糸球体障害を改善することを示した。プロテアソーム機能は老化に伴ってその機能が低下することが知られている。高齢者におけるCKDの病態として、加齢とともにポドサイトのプロテアソーム機能が低下し、これがポドサイトの老化と糸球体障害を来してCKDを進行させる機序が予想される。本研究により抗酸化剤やオートファジーの活性化剤は老化に関連したCKDの進行抑制の治療戦略となり得る。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of ubiquitin-proteasome(UPS) in podocytes, we generated podocyte-specific proteasome-impaired mice(pRpt3). The mice showed proteinuria at a young age and died due to renal failure. In the podocytes of the mice, apoptosis was induced via p53 due to oxidative stress, and autophagy was suppressed by mTOR activation. Rapamycin, an mTOR inhibitor, improved glomerular injury of the pRpt3 mice. We analyzed the ubiquitinated proteins accumulated in podocytes by mass spectrometry and identified heat shock proteins, DNA-repair proteins, adaptor protein between UPS and autophagy, and cytoskeletal protein.

研究分野：慢性腎不全

キーワード：ユビキチン・プロテアソーム オートファジー アポトーシス 酸化ストレス ポドサイト

1. 研究開始当初の背景

高齢者における慢性腎臓病(CKD)患者の増加が問題となっている。糸球体足細胞(ポドサイト)は糸球体における血液蛋白の最終濾過機能を担う細胞であり、ポドサイト障害はCKD進行の要因となる。ポドサイト障害が起こるメカニズムを解明して障害を抑制することはCKDの進行抑制につながると考えられる。

ユビキチン・プロテアソーム(UPS)とオートファジーは細胞内の主要な蛋白分解機構であり細胞内の蛋白の発現調節において重要である。糖尿病性腎症などのポドサイト障害時には、ポドサイトのオートファジー機能が重要であることが知られているが、ポドサイト特異的なオートファジー不全マウスは自然経過では腎不全の表現型はみられない。そこでポドサイトにおけるUPSの役割を明らかにするため、ポドサイト特異的にプロテアソームを欠損させたマウス(pRpt3 KO)を新たに作成したところ、pRpt3 KOは若齢よりCKDの進行を認め、腎不全で死亡した。プロテアソーム機能は老化などでその機能が低下することから、このマウスは蛋白分解機構の低下による腎老化モデルになると考えられ、このマウスを用いて、CKD進行におけるポドサイトのプロテアソーム機能の役割を検討することとした。

2. 研究の目的

本研究ではポドサイトにおける蛋白分解機構に着目し、ポドサイトの蛋白分解機能の低下が引き起こす腎不全のメカニズムを明らかにすること、またUPSとオートファジーがポドサイトにおいてどのように相互作用しているのか明らかにすることを目的とした。さらにポドサイトにおいてUPSで発現調節される蛋白の網羅的解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、ポドサイト特異的にRpt3を欠損させて、ポドサイト特異的なプロテアソーム機能不全マウス(pRpt3 KOマウス)を作成し、ポドサイトにおけるプロテアソーム機能の役割を解析した。また細胞実験では、不死化培養ポドサイトに、プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブを投与して、プロテアソーム機能不全によるポドサイト障害のメカニズムをより詳細に検討した。さらにポドサイトに蓄積するユビキチン化蛋白を質量分析により解析し、プロテアソームで発現調整を受ける蛋白を網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) pRpt3 KOマウスはポドサイト障害により慢性腎不全が進行して死亡した

pRpt3 KOマウスは4週齢からアルブミン尿を認め、8週齢ではコントロールマウスに比べて有意に増加した。またpRpt3 KOマウスでは8週齢で血清クレアチニンがコントロールマウスに比べて有意に上昇していた。これらの結果からpRpt3 KOマウスは若齢で腎不全となり死亡したと考えられた。組織学的な検討ではpRpt3 KOマウスは8週齢で有意に硬化糸球体の数が増加していた。またpRpt3 KOマウスの糸球体におけるポドサイトの数を、ポドサイトマーカーであるWT1で評価したところ、pRpt3 KOマウスではコントロールマウスに比べて、糸球体当たりのWT1陽性細胞数が4週齢で有意に減少していた。またpRpt3 KOマウスではポドサイトのスリット膜に発現しているポドシンとネフリンの局在変化と発現の低下が見られた。これらの結果からpRpt3 KOマウスではポドサイト障害を起こして糸球体硬化と腎不全が進行し

たとえられた。また電子顕微鏡による観察では、pRpt3 KO マウスのポドサイトにおいて足突起の消失が見られ、細胞質に均一な電子密度を持った蓄積物が見られた。

(2) 抗酸化剤によりプロテアソーム機能不全ポドサイトのアポトーシスが抑制された

ポドサイト障害の要因として酸化ストレスを調べたところ酸化ストレスのマーカーである 8-OHdG が pRpt3 KO マウスのポドサイトにおいて発現増強していた。また pRpt3 KO マウスの腎臓をアポトーシスのマーカーである Cleaved caspase 3 で評価したところ、Cleaved caspase 3 陽性ポドサイトが pRpt3 KO マウスで有意に増加していた。

細胞実験では培養ポドサイトにプロテアソーム阻害剤である bortezomib を投与する実験を行った。培養ポドサイトに bortezomib を投与すると、酸化ストレスのマーカーである 8-OHdG が有意に上昇した。また、bortezomib の投与により、ユビキチン化蛋白の蓄積が見られ、アポトーシス制御分子である p53 やアポトーシスマーカーである Cleaved caspase 3 の発現上昇が見られた。このポドサイトのアポトーシスは、Crispr cas9 によりポドサイトの p53 の発現を低下させると抑制された。このことから酸化ストレスにより p53 を介してポドサイトがアポトーシスしていると考えられた。抗酸化剤である apocynin を前投与したところ、bortezomib で誘導される p53 やポドサイトのアポトーシスが抑制された。

(3) pRpt3 KO マウスのポドサイトでは mTOR の活性化を介してオートファジーが抑制された

本研究ではオートファジーのマーカーである LC3 陽性顆粒の数を蛍光免疫染色で評価した。ポドサイトマーカーであるシナプトポディンと共染色される LC3 陽性顆粒の数は、コントロールマウスに比べて pRpt3 KO マウスで有意に少なかった。この結果から pRpt3 KO マウスのポドサイトではオートファジー活性が抑制されていると考えられた。また、オートファジー特異的に分解される p62 の発現を調べたところ、コントロールマウスに比べて pRpt3 KO マウスのポドサイトにおいて p62 の蓄積が有意に増加していた。これらの結果から、ポドサイトにおいてはプロテアソーム機能不全によりオートファジーも抑制されることが分かった。

培養ポドサイトにおいてプロテアーゼ阻害によるオートファジー活性の変化を調べた。bortezomib を培養ポドサイトに投与すると細胞質に p62 の蓄積が見られた。さらにオートファジー活性を調べるために、LC3⁻ /LC3⁺ 比を評価した。オートファゴソーム膜上で LC3⁻ が LC3⁺ に変化されるため、LC3⁻ /LC3⁺ 比はオートファゴソームの数と相関し、オートファジー活性の指標となる。プロテアーゼ阻害剤 (E64d, pepstatinA) の存在下でオートファゴソームの分解を阻害した条件にて LC3⁻ /LC3⁺ 比を評価したところ、bortezomib の投与により有意に LC3⁻ /LC3⁺ 比は低下していた。このことから、bortezomib の投与によりオートファジーが抑制されたことが確認された。これらの結果から、マウスと同様に培養ポドサイトにおいても、プロテアソーム機能の阻害により、オートファジーが抑制されることが示された。

ポドサイトにおいて、プロテアソームの機能不全がオートファジーを抑制したメカニズムを調べるため、オートファジーを負に制御している mTOR シグナルについて調べた。mTOR の下流分子である ULK1 のセリン 757 のリン酸化を評価したところ、pRpt3 KO マウスの糸球体ではセリン 757 リン酸化 ULK1 が増加しており、mTOR の活性化が示唆された。同様に培養ポドサイトに bortezomib を投与すると、セリン 757 リン酸化 ULK1 の増加が見られた。これらの結果から mTOR の活性化によりオートファジーが抑制されていると考えられた。

(4) mTOR 阻害剤により pRpt3 KO マウスの糸球体障害が改善した

そこで、mTORの抑制薬である rapamycin を投与してオートファジーを活性化させ、ポドサイト障害が改善するかどうか検討した。培養ポドサイトに rapamycin を前投与したところ、bortezomib により誘導される p53 や Cleaved caspase 3 などのアポトーシスマーカーの発現上昇が抑制された。さらに生後3週齢の pRpt3 KO マウスに 4mg/kg の投与量で rapamycin を腹腔内に隔日投与を行い、8週齢で硬化系球体の数を評価したところ、rapamycin を投与した pRpt3 KO マウスは DMSO(vehicle)を投与した pRpt3 KO マウスと比べて有意に硬化系球体の数が少なかった。これらの結果から rapamycin によるオートファジーの活性化は pRpt3 KO マウスの系球体障害を改善することが示唆された。

(5) ポドサイトのプロテアソーム機能不全により老化が促進する

加齢に伴って臓器や細胞のプロテアソーム機能が低下し、ユビキチン化蛋白や酸化蛋白の蓄積が見られることが知られている。我々はポドサイトのプロテアソーム機能低下が老化に関与していると考え、老化マーカーである p19ARF を調べたところ、pRpt3 KO マウスのポドサイトで p19ARF の発現上昇が見られた。また培養ポドサイトに bortezomib を投与すると、同様に p19ARF の発現が上昇した。これらの結果から、ポドサイトのプロテアソーム機能低下が腎老化を促進していることが示唆された。

(6) プロテアソーム機能不全により蓄積する蛋白の網羅的解析

培養ポドサイトにプロテアソーム阻害剤である bortezomib を投与した後、ユビキチンと特異的に結合するアフィニティービーズを用いて、ユビキチン化蛋白のみを回収し、質量分析により解析した。熱ショック蛋白や DNA 修復蛋白、また UPS とオートファジーのアダプター蛋白として報告されている Toll-interacting protein、膜蛋白である Caveolin-1、細胞骨格と関連する Formin-like protein 3 などを同定した。

ポドサイトは生理的条件下ではオートファジー活性が高いが、ポドサイト特異的なオートファジー不全マウスは自然経過では高齢になるまで腎不全は見られない。一方今回の検討により、ポドサイト特異的なプロテアソーム機能不全は、若齢より尿蛋白とポドサイトのアポトーシスが見られ、腎不全の進行が見られた。これらの結果からポドサイトの恒常性維持においては、UPS が APLS より重要な役割を担っていると考えられた。

加齢に伴って臓器や細胞のプロテアソーム機能が低下し、ユビキチン化蛋白や酸化蛋白の蓄積が見られることが知られている。本研究では pRpt3 KO マウスのポドサイトにおいてユビキチン化蛋白や酸化蛋白の蓄積を認め、さらに老化マーカーである p19ARF の発現が上昇していた。これらの知見から、高齢者における CKD の病態として、加齢とともにポドサイトのプロテアソーム機能が低下し、これがポドサイトの老化と系球体障害を来して CKD を進行させる機序が予想される。本研究により、ポドサイトのプロテアソーム機能不全がポドサイト障害を来して CKD を進行させることが分かった。さらに抗酸化剤やオートファジーの活性化剤は、CKD の進行抑制の治療戦略となることが分かった。

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 0件）

1. 著者名 Makino Shin-ichi, Shirata Naritoshi, Oliva Trejo Juan Alejandro, Yamamoto-Nonaka Kanae, Yamada Hiroyuki, Miyake Takafumi, Mori Kiyoshi, Nakagawa Takahiko, Tashiro Yoshitaka, Yamashita Hirofumi, Yanagita Motoko, Takahashi Ryosuke, Asanuma Katsuhiko	4. 巻 32
2. 論文標題 Impairment of Proteasome Function in Podocytes Leads to CKD	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 597 ~ 613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2019101025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 1件）

1. 発表者名 牧野慎市、山田博之、Ika N. Kadariswantiningsih, Maulana A. Empitu, 柳田素子、浅沼克彦
2. 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
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧野慎市、山田博之、柳田素子、浅沼克彦
2. 発表標題 ポドサイトにおける、プロテアソーム機能と酸化ストレス
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shin-ishi Makino, Hiroyuki Yamada, Motoko Yanagita, Katsuhiko Asanuma
2. 発表標題 Impairment of proteasome function in podocytes leads to chronic kidney disease
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 1. Shinichi Makino, Hiroyuki Yamada, Ika N. Kadariswantiningsih, Maulana A. Empitu, Motoko Yanagita, Asanuma Katsuhiko.
2. 発表標題 Analysis of the Relationship Between Proteasome and Autophagy in Podocytes Using Podocyte-Specific Proteasome Impairment Mice.
3. 学会等名 ASN KIDNEY WEEK 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 牧野慎市、浅沼克彦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 糖尿病性腎臓病の病態と治療	

1. 著者名 牧野慎市	4. 発行年 2022年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 6
3. 書名 ネフローゼ症候群update ネフローゼ症候群におけるポドサイト障害の分子メカニズム.	

1. 著者名 牧野慎市、浅沼克彦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 8
3. 書名 腎臓病におけるオートファジー	

〔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
---------	---------