

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16163

研究課題名（和文）腎臓の老化におけるp53とオートファジーの協調的なDNA損傷応答機構の解明

研究課題名（英文）Unraveling the cooperative action of p53 and autophagy against kidney aging

研究代表者

山本 毅士（Yamamoto, Takeshi）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：20756994

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：高齢癌患者における腎障害の頻度は高く、腎障害が起こると予後は悪化する。今回、p53の加齢腎への影響を検討した。2年齢の近位尿細管特異的p53欠損マウスは腎組織学的な異常は認めなかった一方、DNA修復異常による損傷DNA増加とともにオートファジー亢進を認めた。2年齢の近位尿細管特異的p53・Atg5欠損マウスでは尿細管細胞老化進行、SASP因子亢進、炎症細胞の著明な集簇を認めた。細胞老化やp53欠損により生じた細胞質への損傷DNA蓄積をオートファジーが処理することによりSASP因子を抑制していることが判明した。p53とオートファジーはSASP因子を協調的に抑制することによって腎老化を抑制する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢腎において、p53は損傷DNAの修復、一方で、オートファジーは細胞質に漏出した損傷DNA（CCFs）の除去を介して、協調的にcGAS-STING-SASP経路の抑制、腎炎症（3次リンパ組織TLT形成）の抑制に働くことが明らかとなった。p53が変異している高齢担癌患者において、腎障害の発症・進展を抑制するために、オートファジー活性を適切に維持する必要がある。

研究成果の概要（英文）：Recently the diverse and global functions of p53 in the kidney under disease pathogenesis has been studied; however, its pathophysiological role in kidney aging remains uncertain. Using proximal tubular epithelial cell (PTEC)-specific p53 and/or atg5-deficient (p53 or atg5-TSKO) mice, we investigated the role of p53 and a possible interplay in the aged kidney and assessed the phenotypes of TSDKO mice at 24 months. p53-TSKO at 24 months exhibited DNA damage, thereby upregulating autophagy. On the other hand, aged atg5-TSKO mice activated p53. Aged TSDKO mice deteriorated renal histology and function, accompanied by accelerated tubular senescence and the senescence-associated secretory phenotype (SASP), thus facilitating tertiary lymphoid tissues (TLTs) development. Autophagy suppressed the SASP by degrading cytoplasmic chromatin fragments (CCFs) in aged kidneys. In conclusion, p53 and autophagy cooperatively delay kidney aging by suppressing DNA damage and the SASP.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：p53 オートファジー DNA損傷 がん 腎障害

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い透析患者は増加し、今後さらなる高齢社会を迎える我が国においてその対策が急務である。高齢者は腎障害に罹患しやすく回復しにくい、その回復力低下の機序は不明である。がん抑制遺伝子 p53 は、細胞ストレスに応じて細胞周期停止、アポトーシス、細胞老化など多彩な細胞応答を起こすが、腎老化における p53 の病態生理学的役割はこれまで検討されていない。一方、オートファジーはリソソームにおける細胞質成分分解の総称であり、研究代表者はこれまで、加齢・肥満・糖尿病などの生活習慣病が関連する腎疾患におけるオートファジーの役割を研究してきた。

### 2. 研究の目的

本研究では p53 とオートファジーの関わりに着目し、「p53 とオートファジーは、DNA 損傷と SASP を抑制することにより、協調的に腎臓の老化を遅らせる」という仮説をたて、p53-オートファジーの相互作用、p53 の生理的意義と抗老化作用、DNA 損傷におけるオートファジーの選択的基質を解明し、さらにマウスでの病態解明をヒト高齢者腎でも検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子改変マウスを用いた p53 /オートファジーの相互作用の検討

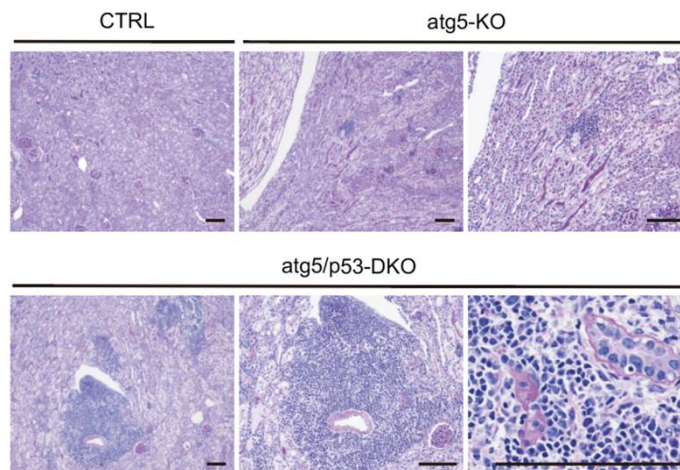
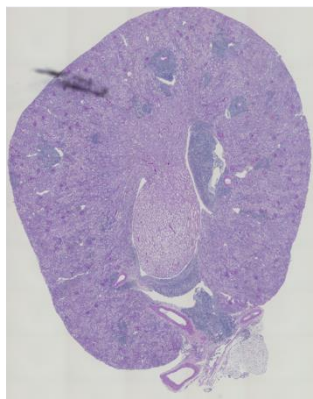
・今回新たに近位尿細管特異的 p53 KO (Kap-Cre;p53) マウスを作成し老化モデル (2 年齢) を観察したところ、野生型マウスと比し、DNA 損傷 ( $\gamma$ H2AX の核染色) の増加と DNA 修復因子 (Msh2, p48 DDB2, Xpc, Pms2) の mRNA 発現低下を認める一方、腎組織、腎障害 (Kim1, Ng2)・炎症線維化 (Ccl2, Col1)・細胞老化 (p16, p19) の mRNA 発現に有意な差は認めなかった。代償機構が働いていると考え、電顕でオートファゴソーム数を評価したところ、p53 KO 腎で有意な増加を認めた。そこで、研究代表者が確立したマウス腎オートファジーフラックスアッセイを応用し、p53 KO 腎でのオートファジー亢進とその制御機構を調べることにした。

・一方、研究代表者らは以前、近位尿細管特異的 Atg5 KO (Kap-Cre;Atg5) マウス 2 年齢を観察し、DNA 損傷・ミトコンドリア機能低下を介して腎老化が加速することを報告したが、この高齢オートファジー不全マウスでは、p53 リン酸化の増加、p53 シグナル (p21, Puma, Dram1, Tigar, Bax 等) の mRNA 発現増加を認め、p53 が機能亢進することを見出した。以上から、「p53 とオートファジーは、加齢により機能低下を起こすが、相互に補完する」という仮説をたて、さらなる検証のため追加実験群高齢マウスを飼育し検討することとした。

#### (2) 近位尿細管特異的 p53/Atg5 ダブルノックアウトマウスの解析による p53 の役割解明

・活性化した p53 が腎老化にいかに関与するかを検討するため、今回新たに近位尿細管特異的 Atg5・p53 DKO (Kap-Cre;Atg5/p53) マウスを作成し老化モデル (2 年齢) を観察したところ、興味深いことに、リンパ節のような組織が出現し腎実質を占拠していることを認めた。研究協力者の柳田素子教授は、高齢マウスの腎臓病では「3 次リンパ組織」ができ、炎症が遷延し腎臓が修復できなくなることを報告した (JCI Insight 2016)。実際、高齢 DKO マウスは、野生型および Kap-Cre;Atg5 マウスと比し、DNA 損傷と尿細管細胞老化・SASP が増悪し腎機能低下進行を認めた。以上より p53 の抗老化効果が示唆され、さらなる検証のため追加実験群高齢マウスを飼育し検討することとした。

高齢DKOマウスでは、tertiary lymphoid tissue; TLTを認める



Scale Bars; 50 $\mu$ m

(3)加齢に伴う DNA 損傷に対抗するオートファジーの選択的基質の探索・検討  
 ・近年、「細胞老化において核の損傷により細胞質クロマチンフラグメント (CCF) が放出され、オートファジーの標的となること (JCB 2013)」「CCF は自然免疫システムの一つである cGAS-STING 経路を活性化し、慢性炎症や SASP につながる (Nature2017, 2019 etc.)」が報告され注目を集めている。実際、高齢 DKO マウスでオートファジー選択的基質マーカー p62/SQSTM1 と損傷 DNA マーカー  $\gamma$ H2AX の共局在を認めた。そこで「オートファジーは高齢腎で CCF を分解することにより cGAS-STING 経路や SASP を抑制する」という仮説を検討することとした。

(4) 高齢ヒト腎検体を用いた、「DNA 損傷/SASP-オートファジー不全-3 次リンパ組織」の検証  
 ・「DNA 損傷/SASP-オートファジー不全-3 次リンパ組織」の関連がヒト高齢者の腎臓に共通する病態生理であることを免疫染色によって確かめることとした。

#### 4. 研究成果

##### (1) p53 /オートファジーの相互作用の検討

高齢近位尿細管特異的 p53 KO マウスでは DNA 損傷増加と DNA 修復因子低下を認めた。電顕で p53 KO マウスでオートファジーの有意な増加を認めたため、その制御機構を調べた。一方、高齢近位尿細管特異的 Atg5 KO マウスは p53 が機能亢進していることから、p53 とオートファジーは加齢により機能低下を起こすが、相互に補完するという仮説の検証を行った。2 年齢の近位尿細管特異的 p53 欠損マウスは腎組織学的な異常は認めなかった一方で、DNA 修復異常による損傷 DNA の増加とともにオートファジー活性の亢進を認めた。

##### (2) p53 の役割解明

近位尿細管特異的 Atg5・p53 DKO マウス 2 年齢を観察したところ「3 次リンパ組織」ができ DNA 損傷と細胞老化・SASP が増悪し腎機能低下進行を認めた。さらなる検証を行ったところ、2 年齢の近位尿細管特異的 p53・Atg5 欠損マウスでは尿細管細胞老化の進行、SASP 因子の亢進、炎症細胞の著明な集簇を認めた。

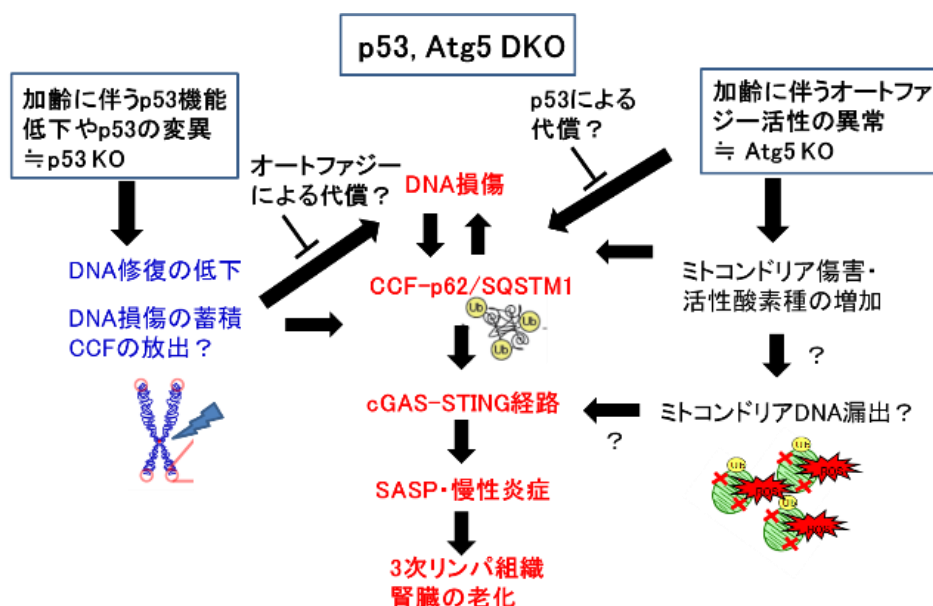
##### (3) DNA 損傷に対抗するオートファジー基質の探索

オートファジーは、高齢の腎臓で CCF を選択的に分解することにより cGAS-STING 経路や SASP を抑制するという仮説を検討した。細胞老化や p53 欠損により生じた細胞質への損傷 DNA 蓄積をオートファジーが処理することにより SASP 因子を抑制していることが判明した。

##### (4) ヒトでの検証

現在、「DNA 損傷/SASP-オートファジー不全-3 次リンパ組織」の関連がヒト高齢者の腎臓に共通する病態生理であることを免疫染色によって確かめている。

以上より、高齢腎において、p53 は損傷 DNA の修復、一方で、オートファジーは細胞質に漏出した損傷 DNA (CCFs) の除去を介して、協調的に cGAS-STING-SASP 経路の抑制、腎炎症 (3 次リンパ組織 TLT 形成) の抑制に働くことが明らかとなった。p53 が変異している高齢がん患者において、腎障害の発症・進展を抑制するために、オートファジー活性を適切に維持する必要がある。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 2件）

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Yamamoto Takeshi (corresponding author)、Nakamura Jun、Takabatake Yoshitsugu、Isaka Yoshitaka                                | 4. 巻<br>2                   |
| 2. 論文標題<br>Obesity-related proximal tubulopathy: an emerging threat to kidney health  | 5. 発行年<br>2023年             |
| 3. 雑誌名<br>Autophagy Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>1-6           |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1080/27694127.2023.2200341  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |
| 1. 著者名<br>Minami Satoshi、Yamamoto Takeshi (equally contributed)、Yamamoto-Imoto Hitomi、Isaka Yoshitaka、Hamasaki Maho                 | 4. 巻<br>179                 |
| 2. 論文標題<br>Autophagy and kidney aging   | 5. 発行年<br>2023年             |
| 3. 雑誌名<br>Progress in Biophysics and Molecular Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>10～15         |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.pbiomolbio.2023.02.005   | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |
| 1. 著者名<br>Nakamura Jun、Yamamoto Takeshi (corresponding author)、Takabatake Yoshitsugu、et al.   | 4. 巻<br>8                   |
| 2. 論文標題<br>TFEB-mediated lysosomal exocytosis alleviates high-fat diet-induced lipotoxicity in the kidney                           | 5. 発行年<br>2023年             |
| 3. 雑誌名<br>JCI Insight   | 6. 最初と最後の頁<br>-             |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1172/jci.insight.162498   | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |
| 1. 著者名<br>Yamamoto-Imoto Hitomi、Minami Satoshi、Shioda Tatsuya、Yamashita Yurina、Sakai Shinsuke、Maeda Shihomi、Yamamoto Takeshi、et al. | 4. 巻<br>38                  |
| 2. 論文標題<br>Age-associated decline of MondoA drives cellular senescence through impaired autophagy and mitochondrial homeostasis     | 5. 発行年<br>2022年             |
| 3. 雑誌名<br>Cell Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>110444～110444 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.celrep.2022.110444   | 査読の有無<br>無                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |

〔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<br>山本 毅士, 南 聡, 高島 義嗣, 猪阪 善隆  |
| 2. 発表標題<br>Cooperative action of p53 and autophagy delays kidney aging by suppressing DNA damage and the senescence-associated secretory phenotype |
| 3. 学会等名<br>第22回日本抗加齢医学会総会（優秀演題賞）   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Satoshi Minami, Takeshi Yamamoto, Yoshitaka Isaka, Tamotsu Yoshimori  |
| 2. 発表標題<br>Cooperative action of p53 and autophagy delays kidney aging by suppressing DNA damage and the senescence-associated secretory phenotype |
| 3. 学会等名<br>The 6th International Cell Senescence Association (ICSA) Conference (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山本 毅士, 南 聡, 酒井 晋介, 高島 義嗣, 猪阪 善隆   |
| 2. 発表標題<br>Fibroblast Growth Factor 21 is Robustly Induced by Autophagy Deficiency to Protect Against Age-related Kidney Disease |
| 3. 学会等名<br>第21回日本抗加齢医学会総会（優秀演題賞）   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|  |
|--|
| ・山本毅士「腎臓の老化とオートファジー」第53回日本腎臓学会東部学術大会シンポジウム2「老化を司る腎臓の秘密」（2023年 9月16日講演予定）<br>・山本毅士「オートファジーと腎臓の老化」第3回日本オートファジーコンソーシアムシンポジウム（2023年11月22日講演予定） |
|--|

6. 研究組織

|  |                           |                       |    |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|