

■受領No.1466

## シングルセル解析とリピドーム解析を用いた、急性腎障害が慢性腎臓病へ移行する機序の解明

代表研究者

山本 毅士

大阪大学医学系研究科 医員



## Unraveling the pathophysiology of AKI to CKD transition by integrating single-cell RNA sequencing and lipidomic analyses

Principal Researcher

Takeshi YAMAMOTO,

Department of Nephrology, Osaka University Graduate School of Medicine Clinical Fellow

2016 年大隅良典氏がオートファジー研究によりノーベル医学生理学賞を受賞された。我々はこれまで腎疾患におけるオートファジー研究に取り組んできた。今回、急性腎障害の回復期において、オートファジー関連遺伝子 Atg5 は、傷害ミトコンドリアを選択的に除去するマイトファジーと、ミトコンドリア再生を促進することによって、慢性腎臓病への進展を抑制することがわかった。今後シングルセルとリピドームの統合解析を用い、細胞運命決定因子と病態関連脂質を同定し、創薬・バイオマーカー確立につなげたい。

Acute kidney injury (AKI) elevates the risk of chronic kidney disease (CKD) progression, but the molecular mechanism underlying the AKI to CKD transition remains elusive. Here, the authors show that autophagy is reactivated during both the recovery phase and immediately after AKI, and that induced deletion of autophagy gene Atg5 in proximal tubular epithelial cells (PTECs) after AKI exacerbates CKD progression. Mechanistically, the ATG-conjugation system promotes mitochondrial biogenesis via the autophagy-independent transcription factor EB (TFEB)-peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) axis as well as autophagy-dependent removal of damaged mitochondria. This novel mechanism may have potential therapeutic implications for preventing the AKI to CKD transition.

### 1. 研究内容

#### はじめに

従来、急性腎障害 (Acute Kidney Injury: AKI) は自然治癒する病態と考えられていたが、近年の臨床研究により、高い致死率に加え、慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD)・末期腎不全 (End Stage Renal Disease: ESRD) に至る予後不良な致命的な病態であることがわかってきた

(AKI to CKD transition と呼ばれる: Clin J Am Soc Nephrol. 2008, Kidney Int. 2013). AKI では近位尿細管細胞(PTECs)の障害が中心的な役割を果たすと考えられている一方で、CKD では糸球体硬化・近位尿細管障害・遠位尿細管障害などの広範なネフロン障害と間質の線維化を特徴とする。AKI 後、障害を受けた尿細管を含め、腎のどの構成細胞がどのように回復あるいは不全に至るか、

CKD の特徴に至るのかの詳細な分子機序は解明されていない。オートファジーは主要な細胞内分解システムであり、細胞成分の代謝回転を担うことで細胞内恒常性を維持し、また細胞が負荷を受けると傷害性物質を排除するために亢進する。我々はこれまで「腎疾患における尿細管オートファジーの役割」を研究し、加齢・老化 [引用文献 1]・肥満・脂肪毒性 [2,3]・糖尿病 [4] は「オートファジー不全 (脂質代謝異常・オートファジー停滞状態)」を引き起こし、「AKI への脆弱性」につながることを報告してきた [5]。一方、近年、急速なシングルセル RNA-sequence 技術の進歩により、個々の細胞の個性を維持したまま細胞の性質を解析すること、さらに機械学習アルゴリズムを用いて軌道解析 (Trajectory analysis) により分化経路を推定することが可能となった。以上の背景から、本研究では、「AKI 後オートファジー不全・脂質代謝異常を伴い致命的な障害を受けた不全近位尿細管が、糸球体や他の尿細管にもダメージを波及させ、さらに周囲に強く炎症や線維化を惹起し、CKD に至る」との仮説をたて、① AKI to CKD 過程におけるオートファジーの挙動と役割を詳細に検討し、同時に② シングルセル解析で AKI to CKD 過程 (障害尿細管の分化経路および制御シグナルの同定) を網羅的に解析し、さらにリポドーム解析の統合により AKI to CKD 過程の全容を解明することを目的とした。

## 実験方法

① 遺伝子改変マウス・虚血再灌流傷害-腎線維化モデルを用いた AKI to CKD transition の病態解明  
当研究室にて樹立した C57BL/6 系統の近位尿細管特異的 Atg5 ノックアウトマウス (KAP-Cre Atg5 flox マウス)、薬剤 (タモキシフェン) 誘導性近位尿細管特異的 Atg5 ノックアウトマウス (NDRG1-CreERT2 Atg5 flox マウス) とそれぞれの対照となる野生型マウスを使用した [1-4]。マウス腎のオートファジー活性の評価には、オー

トファゴソーム可視化マウス (GFP-LC3 マウス) にリソソーム阻害薬クロロキン注射の有無による増加分をオートファジーフラックスとして測定した [1-4]。いずれも雄マウスのみを使用した。マウス虚血再灌流傷害 (Ischemia-Reperfusion injury: IRI) は、8 週齢に対して片腎虚血 35 分を行い再灌流後、経時的な解剖・観察を行った。さらに当研究室にて樹立した Atg5 欠損近位尿細管細胞 (Atg5 (-) PTEC) と、Atg5 (-) PTEC に Atg5 を reconstitution した Atg5 (+) PTEC を使用し培養細胞による機序追究を行った。培養液として 5% FBS を含んだ low glucose (LG) DMEM を使用した。

② シングルセル解析とリポドーム解析を用いた AKI to CKD transition の病態解明  
シングルセル解析として、コントロール、マウス IRI 2 日後、5 日後、2 週間後の腎臓のシングルセル RNA-sequence を 1 万細胞/sample、5 万リード/細胞で実施し (大阪大学免疫学フロンティア研究センター: IFRcC にて実施)、腎構成細胞のクラスタリングを行い、RNA velocity 解析を行った。同じ IRI 処置・解剖を行った腎臓のサンプルをリポドーム解析に供し、九州大学生体防御医学研究所トランスオミクス医学研究センターメタボロミクス分野馬場健史教授、和泉自泰准教授との共同研究継続中である [3, 6]。

## 結果及び考察

① 遺伝子改変マウス・虚血再灌流傷害-腎線維化モデルを用いた AKI to CKD transition の病態解明  
片側 35 分の IRI 処置を行った後、経時的な観察を行った。近位尿細管特異的オートファジー不全マウスでは IRI 3 週間後には野生型マウスに比して炎症反応遷延、腎線維化の増悪を認めた。オートファゴソーム可視化マウスを用いて IRI 後のオートファジーフラックスを検討したところ、IRI 6 時間後 (急性期) と 1 週間後 (回復期) とに 2 峰性のピークを認めた (図 1A)。タモキシフェン誘導性

近位尿細管特異的オートファジー不全マウスに IRI 後タモキシフェンを投与することにより回復期におけるオートファジーのみを不全にしたところ同様に野生型マウスに比して腎線維化が増悪した。IRI 後の経時的な検討により IRI 1 週間後において野生型マウスではマイトファジーが活性化すると同時に PGC1 $\alpha$  依存性にミトコンドリア再生が亢進していた。一方オートファジー不全マウスではマイトファジーを認めずミトコンドリア再生も低下していた。不死化 PTECs を用いた検討により、Atg5 は TFEB の核移行を介して PGC1 $\alpha$  を活性化することが示された (図 1B)。AKI の回復期において Atg5 はマイトファジーと同時にミトコンドリア再生を促進することにより、AKI から CKD への進展を抑制することがわかった (図 1C)。

#### ②シングルセル解析とリポドーム解析を用いた AKI to CKD transition の病態解明

上記の検討を進めていく中、1)病態に中心的な役割を果たす近位尿細管細胞は同一個体内であっても AKI 後に完全に修復される細胞と、修復がうまく働かず萎縮に至る細胞に二分され、萎縮に至った細胞が CKD への進展に中心的な役割を果たす

こと、2)AKI 後には多様な腎構成細胞が相互に作用しあうことにより、AKI 後の修復や CKD への進展に関わるという興味深い点に気づき、1)AKI 後の尿細管細胞の修復や萎縮に至る分子機構ならびに 2)腎構成細胞間のシグナル伝達機構を解明することが AKI to CKD transition の病態の理解・治療法の開発に重要であるという結論に至った。その目的を達成すべく、IRI 2 日後、5 日後、2 週間後におけるサンプルをシングルセル RNA-sequence に供した。まず、腎構成細胞のクラスタリングを行い、腎臓が 13 種類の細胞から構成されることを明らかとした (図 2A)。現在までに、RNA velocity 解析を用いて AKI 後近位尿細管の分化過程を推定したところ、近位尿細管は AKI 後、定常状態に戻る修復尿細管と炎症性サイトカインなど CKD の進展に関わる遺伝子を高発現する修復不全尿細管の 2 つのクラスターに分岐していくことを明らかにした (図 2B)。引き続き、RNA velocity 解析のみならず、SCENIC を用いた転写因子活性をはじめ、更なる検証を行うことにより AKI to CKD の進展に重要な転写因子を同定していく予定である。

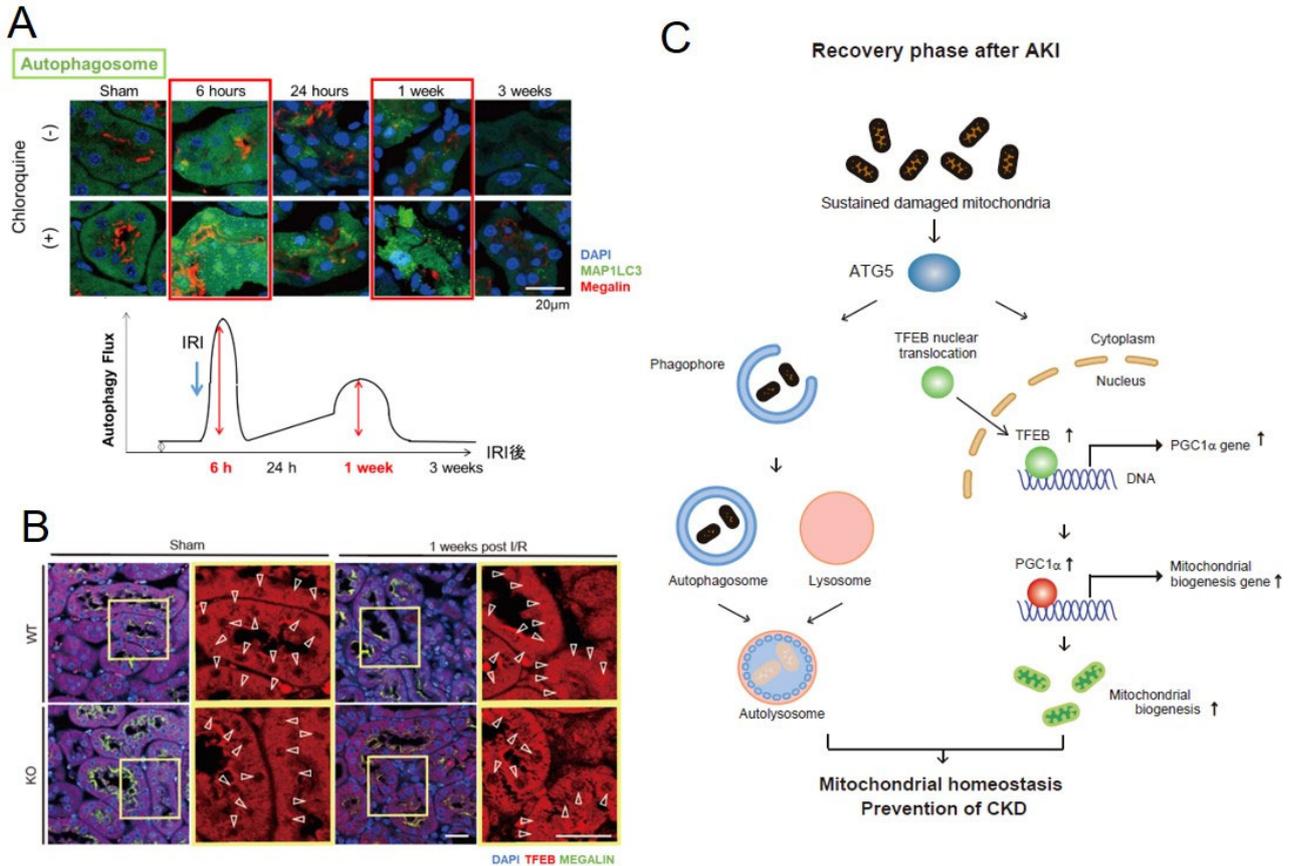


図1. 遺伝子改変マウス・虚血再灌流傷害-腎線維化モデルを用いた AKI to CKD transition の病態解明  
 A: AKI to CKD transition におけるオートファジーフラックスの変化, B: AKI to CKD transition における TFEB の核移行, C: 本研究で解明した AKI to CKD 移行機序の概要図

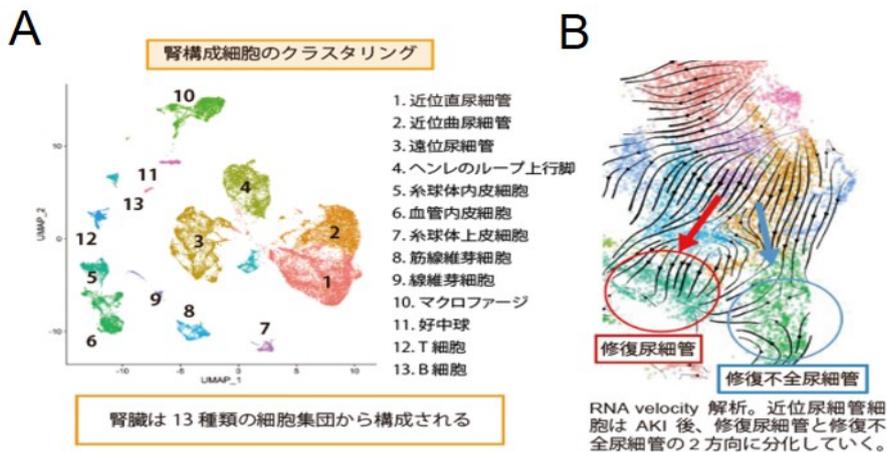


図2. シングルセル解析とリピドーム解析を用いた AKI to CKD transition の病態解明  
 A: シングルセル解析における腎構成細胞のクラスタリング, B: RNA velocity 解析

**おわりに**

AKIの回復期においてAtg5はマイトファジーと同時にミトコンドリア再生を促進することによりAKIからCKDへの進展を抑制することがわかった。今後さらにシングルセル解析追究とリポドーム解析との統合的解析を用い、尿細管細胞運命の決定にかかわる転写因子と病態関連脂質代謝物を同定し、創薬・バイオマーカー確立につなげたい。

**引用文献**

1. Yamamoto T, Takabatake Y, Kimura T, Takahashi A, Namba T, Matsuda J, Minami S, Kaimori JY, Matsui I, Kitamura H, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Isaka Y, Rakugi H: Time-dependent dysregulation of autophagy: Implications in aging and mitochondrial homeostasis in the kidney proximal tubule. *Autophagy*, 3; 12 (5): 801-13 (2016)
2. Yamamoto T, Takabatake Y, Takahashi A, Kimura T, Namba T, Matsuda J, Minami S, Kaimori JY, Matsui I, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Isaka Y: High-Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to Lipotoxicity in the Kidney. *J Am Soc Nephrol*, 28 (5): 1534-1551 (2017)
3. Yamamoto T, Takabatake Y, Minami S, Sakai S, Fujimura R, Takahashi A, Namba-Hamano T, Matsuda J, Kimura T, Matsui I, Kaimori JY, Takeda H, Takahashi M, Izumi Y, Bamba T, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Isaka Y: Eicosapentaenoic acid attenuates renal lipotoxicity by restoring autophagic flux. *Autophagy*, 17 (7): 1700-1713 (2021)
4. Sakai S, Yamamoto T, Takabatake Y, Takahashi A, Namba-Hamano T, Minami S, Fujimura R, Yonishi H, Matsuda J, Hesaka A, Matsui I, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Isaka Y:

Proximal Tubule Autophagy Differs in Type 1 and 2 Diabetes. *J Am Soc Nephrol*, 30 (6): 929-945 (2019)

5. Yamamoto T, Takabatake Y, Isaka Y: Obesity-related tubulopathy. *Nephrology*, 15 (1): 108-116 (2022)
6. Minami S, Yamamoto T, Takabatake Y, Takahashi A, Namba T, Matsuda J, Kimura T, Kaimori JY, Matsui I, Hamano T, Takeda H, Takahashi M, Izumi Y, Bamba T, Matsusaka T, Niimura F, Isaka Y: Lipophagy maintains energy homeostasis in the kidney proximal tubule during prolonged starvation. *Autophagy*, 13 (10): 1629-1647 (2017)

**2. 発表(研究成果の発表)**

国内外の学会誌、学会講演会等における発表があれば5件程度記載。

記載内容:氏名、題目、誌名、巻、号、頁(年次)、学会名(場所、年次)

本研究内容(一部)は、“ATG-Conjugation System Counteracts AKI to CKD Transition by Coordinating Mitophagy and Mitochondrial Biogenesis.”として論文投稿中である。

また、本研究内容(一部)は、2022年11月18日第52回日本腎臓学会西部学術大会 山本毅士

シンポジウム1「時間空間的ネットワークで考えるDKDの基礎研究」【演題】DKDにおけるオルガネラクロストーク-オートファジーにて発表予定である。