

奨励金No.1599

オートファジー創薬の実現に向けた、ヒト糖尿病性腎臓病の病態解明

南 聡

大阪大学大学院医学系研究科遺伝学 特任助教（常勤）

Elucidation of the pathophysiology underlying human diabetic kidney disease for the realization of autophagy drug discovery

Satoshi Minami

Department of Genetics, Graduate School of Medicine, Osaka University,
Specially Appointed Assistant Professor (Full time)



本研究では、糖尿病関連腎臓病の進行機構を解明し、新たな治療の可能性を探った。特に、細胞内の不要な物質を分解するオートファジーに関わる転写因子 TFEB に注目した。脂質が蓄積すると TFEB が活性化し、細胞が余分な脂質を排出することで腎臓病の進行を防ぐことが明らかとなった。一方、TFEB が機能しない場合、腎障害が悪化することが示された。これらの知見は、糖尿病関連腎臓病の新たな治療法の開発につながる可能性がある。

In this study, we sought to elucidate the mechanism of progression of diabetic kidney disease and explore new therapeutic possibilities. In particular, we focused on TFEB, a transcription factor involved in autophagy, which degrades unwanted substances in cells. It was found that TFEB is activated when lipids accumulate, and the cells expel excess lipids, thereby preventing the progression of kidney disease. On the other hand, when TFEB failed to function, kidney damage was shown to worsen. These findings may lead to the development of new treatments for diabetic kidney disease.

1. 研究内容

①飽和脂肪酸負荷はリソソームの主要制御転写因子 TFEB を活性化する：肥満関連尿細管症の病態を明らかとするためにまず培養尿細管細胞に飽和脂肪酸であるパルミチン酸（PA）を負荷し RNAseq データによるエンリッチメント解析を行ったところリソソーム関連遺伝子が PA 負荷により著明に発現亢進していた（図1）。次に PA 負荷により発現の亢進する転写因子を解析したところ PA は TFEB を著明に活性化することが示唆された。実際培養尿細管細胞に PA を負荷すると TFEB の核内移行を認め TFEB 活性が亢進していた（図2）。

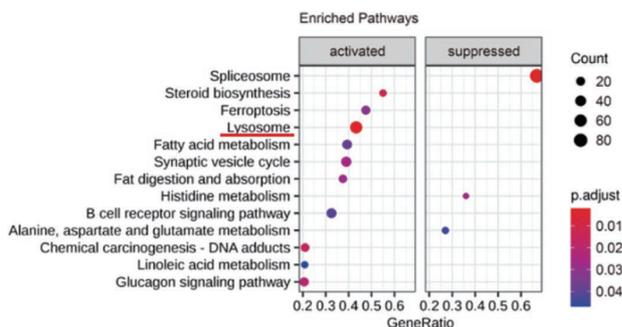


図1. 培養尿細管細胞にパルミチン酸を負荷した RNAseq 解析。エンリッチメント解析によりパルミチン酸はリソソーム関連遺伝子群の発現を著明に亢進させることが明らかとなった。

②高脂肪食負荷下での腎尿細管における転写因子

TFEBの活性調節：次に高脂肪食2ヵ月負荷下でのマウス腎尿細管におけるTFEBの発現を検証したところ、高脂肪食群ではTFEBの核内移行が亢進し、TFEBの活性化が示唆された（図3）。従来TFEBの活性は主にmTORC1により制御されることが知られている [PMID: 22343943] ためmTORC1の活性を検証したところPA負荷はTFEBの脱リン酸化が促進される一方で、mTORC1の古典的な下流因子（S6RP、4E-BP1）のリン酸化には影響を与えず、PA負荷によるTFEBの活性化はmTORの古典的経路を介さないことが明らかとなった（図4）。近年TFEBのmTORC1によるリン酸化・活性抑制にはRHEB非依存性Rag GTPase依存性の非古典的経路を介することが明らかになっている（図5、[PMID: 35654731]）。そこでPAによるTFEB活性化がRag GTPase依存性の非古典的経

路の活性化により抑制されるか検証した。PAによるTFEBの核移行は非古典的経路が持続的に活性化しているRagC過剰発現細胞においては認めなかった（図6）。このことからPAによるTFEB活性化がRag GTPase依存性の非古典的経路の抑制を介することが明らかとなった。

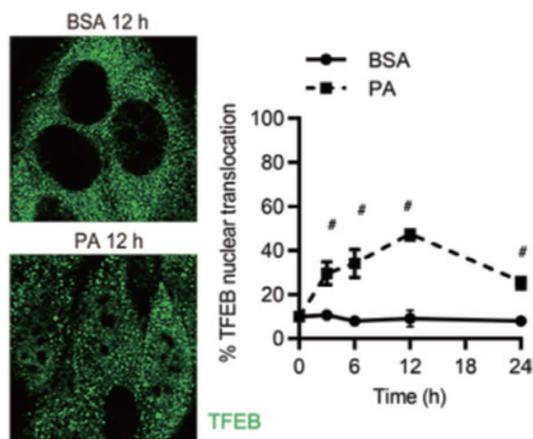


図2. 培養尿細管細胞にパルミチン酸を負荷するとTFEBが核内移行する。

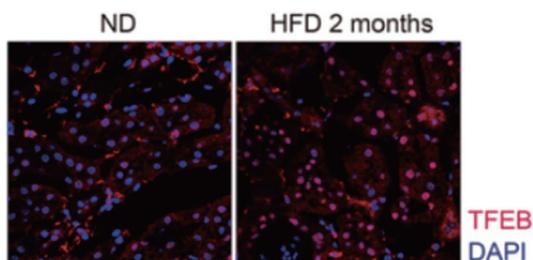


図3. 高脂肪食（HFD）を2ヵ月負荷するとマウス腎尿細管におけるTFEBの核内移行が亢進する。

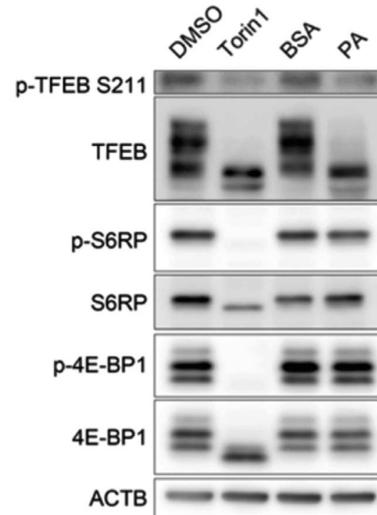


図4. パルミチン酸負荷はTFEBを脱リン酸化するがmTORC1の古典的な下流因子（S6RP、4E-BP1）のリン酸化には影響を与えない。

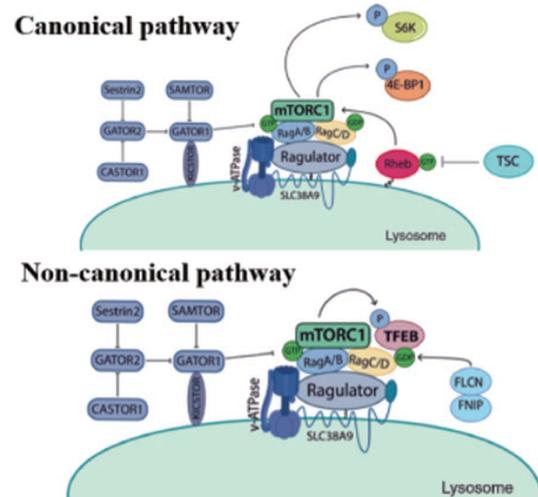


図5. 近年mTORC1によるTFEBのリン酸化・活性化には、Rheb依存性の古典的経路（canonical pathway；上段）ではなく、Rag GTPase依存性の非古典的経路（non-canonical pathway；下段）を介することが明らかとなっている。

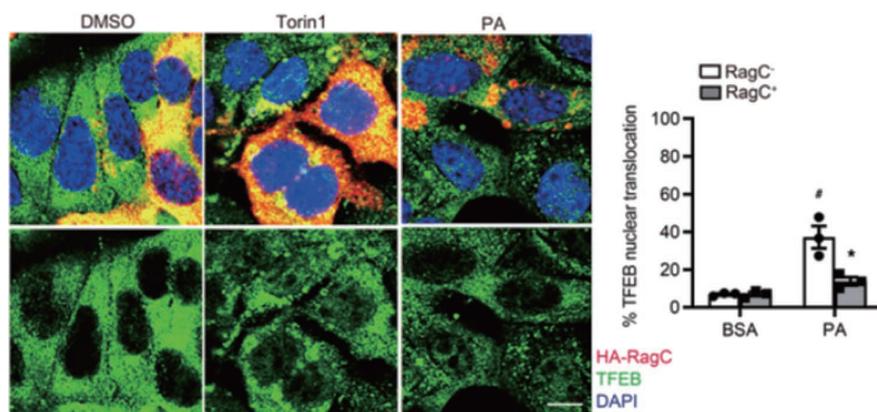


図6. パルミチン酸によるTFEBの核移行は非古典的経路が持続的に活性化しているRagC過剰発現細胞では認めない。このことからパルミチン酸によるTFEB活性化はRag GTPase依存性の非古典的経路の抑制を介することが明らかとなった。

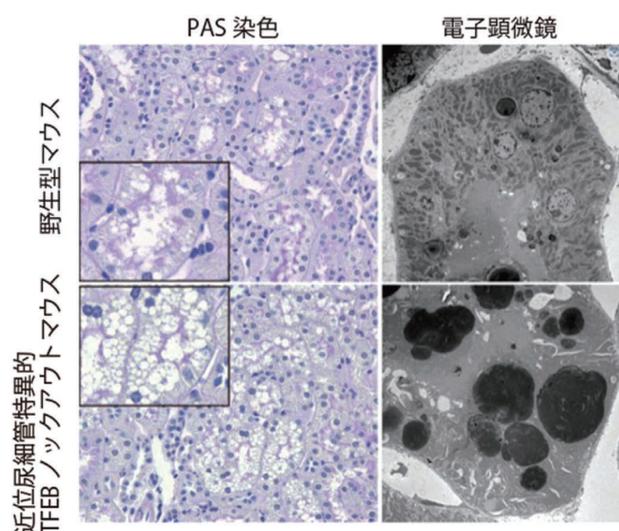


図7. 近位尿細管特異的TFEBノックアウトマウスに、高脂肪食を2カ月負荷すると、野生型マウスに比して近位尿細管のリソソーム拡張（左）・リソソーム内リン脂質蓄積（右）が著しく増悪した。

③高脂肪食負荷下での腎尿細管における転写因子TFEBの働き：次に近位尿細管特異的TFEBノックアウトマウスを樹立し、高脂肪食を2カ月負荷したところ、野生型マウスに比して近位尿細管のリソソーム拡張・リソソーム内リン脂質蓄積が著しく増加した（図7）。一方でTFEBを活性化することの知られているトレハロースやレスベラトロールを高脂肪食負荷マウスに投与すると尿細管のリソソーム拡張が改善した。

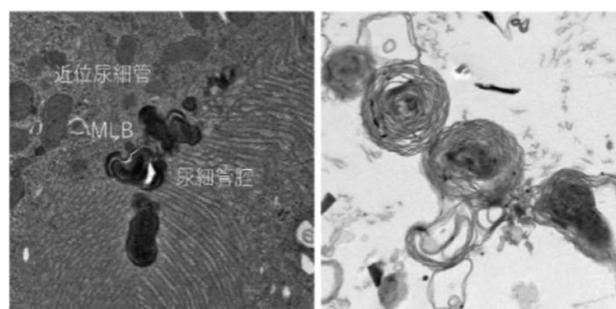


図8. 高脂肪食を負荷した肥満マウスの電子顕微鏡画像（左：腎臓、右：尿）。尿細管のリソソーム内に蓄積したリン脂質はリソソームエクソサイトーシスにより尿細管腔へ放出され、尿中に排泄される。

④転写因子TFEBはリソソームエクソサイトーシスを介して高脂肪食下での腎尿細管細胞のリソソーム恒常性を維持する：次にTFEBがリソソーム恒常性維持に働く機構を検討した。まずTFEBはリソソームバイオジェネシスを介して様々な病態を改善することが知られている [PMID: 29782848] ため、野生型マウスと近位尿細管特異的TFEBノックアウトマウスとでリソソームバイオジェネシスの程度を検証したところ変化は認めなかった。次にTFEBはリソソーム蓄積病においてリソソームエクソサイトーシスを介して病態を改善することが報告されている [PMID: 23606558] ことから、リソソームエクソサイ

トーシスに着目した。まず高脂肪食負荷マウスの腎組織および尿の電子顕微鏡解析にて尿細管のリソソーム内に蓄積したリン脂質が尿細管腔内へ放出されている像が認められ、また尿中にもリン脂質の排泄を認めた（図8）。一方で近位尿細管特異的TFEBノックアウトマウスにおいては尿細管細胞でのリソソーム内リン脂質蓄積が増悪する一方で、尿中リン脂質の排泄低下を認めていた。このことからTFEBはリソソーマルエクソサイトーシスを介して高脂肪食下での腎尿細管細胞のリソソーム恒常性を維持することが示唆された。次に培養尿細管細胞にパルミチン酸を負荷し電子顕微

鏡観察を行ったところリソソーム内容物が細胞外に放出されるリソソーマルエクソサイトーシスが盛んにおこなわれていることが明らかとなった。さらにリソソーム酵素が細胞培養液中に著明に放出されていたこと、リソソーム膜タンパクであるLAMP1が細胞膜上に著明に蓄積していたことからパルミチン酸によるリソソーマルエクソサイトーシスの活性化が示唆された。次にTFEBノックアウト培養尿細管細胞を樹立しパルミチン酸を負荷しリソソーマルエクソサイトーシスを評価したところ、TFEBノックアウト細胞ではリソソーム酵素の細胞上清中への放出やLAMP1の細

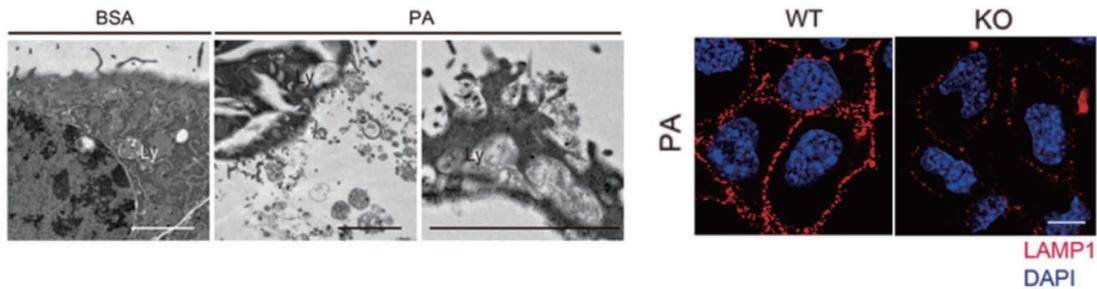


図9.（左）培養尿細管細胞にパルミチン酸を負荷した電子顕微鏡画像。パルミチン酸を負荷した尿細管細胞ではリソソーム内容物を細胞外に放出するリソソーマルエクソサイトーシスが盛んに行われている。（右）野生型尿細管細胞（WT）とTFEBノックアウト尿細管細胞（KO）の細胞膜上のLAMP1（リソソームマーカー）染色。細胞膜上のLAMP1の存在はリソソーマルエクソサイトーシスを示す。WTではパルミチン酸負荷後リソソーマルエクソサイトーシスが盛んに生じているが、KOではリソソーマルエクソサイトーシスはほとんど起こっていない。

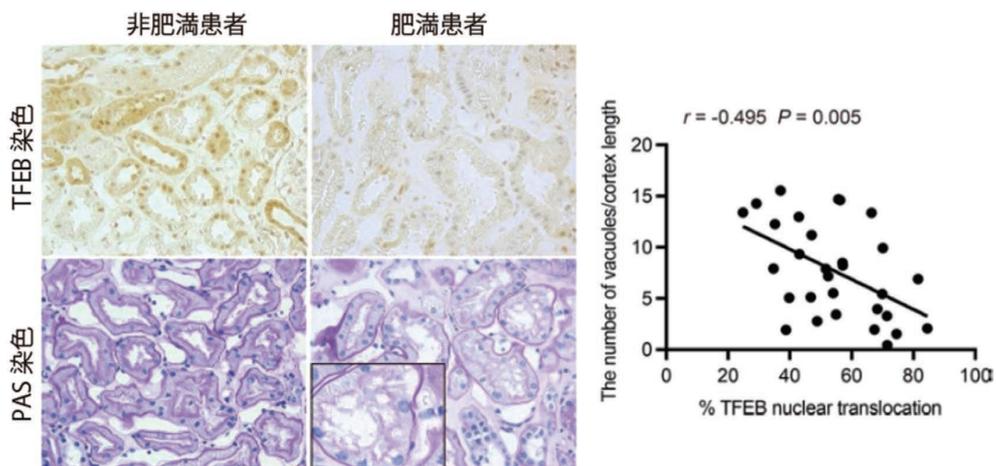


図10. 肥満関連腎症の患者では尿細管細胞のリソソーム機能異常を示す空胞病変の程度と相関してTFEBの発現低下を認める。

胞膜上への蓄積が抑制されていた（図9）。さらにTFEB ノックアウト細胞ではパルミチン酸負荷によるリソソームの拡張が増悪していた。このことからTFEBは培養尿細管細胞においてもリソソームマルエクソサイトーシスを介してリソソーム恒常性を維持していることが示された。

⑤肥満関連腎症患者でのTFEBの発現：最後に肥満関連腎症患者におけるTFEBの発現を検討した。その結果、肥満関連腎症患者においては尿細管細胞のリソソーム機能異常を示す空胞病変の程度と相関してTFEBの発現低下を認めた（図10）。このことから肥満関連腎症ではTFEB活性の低下により、肥満関連尿細管症が増悪する可能性が示唆された。

e. 研究から得た結論・考察、f. 今後の課題

以上よりTFEBは高脂肪食により活性化されリソソームマルエクソサイトーシスによりリソソーム恒常性を維持し肥満関連尿細管症に対抗することを明らかとした。本研究からTFEBを標的とすることにより、世界的に増加している肥満や生活習慣病に伴う腎臓病に対する新しい治療法の開発が期待される。一方でTFEBの過剰活性化は発癌とも関連していることが報告されており単純なTFEBの活性化は発癌の危険性が大きい。そのため今後TFEBがリソソームマルエクソサイトーシスを制御する特異的な分子機構の解明を進めていくことにより、リソソームマルエクソサイトーシスの特異的な活性化を介した、肥満や生活習慣病に伴う腎臓病に対する副作用の少ない新規治療法の開発を目指していく。

2. 発表（研究成果の発表）

該当なし