

オートファジー不全による糖尿病性腎症進展の機序解明

大阪大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学講座 遺伝学

南 聡

【研究目的】

肥満関連腎症は、従来糸球体内圧の増加等の要因により生じる糸球体病変が本態であると考えられてきた。一方我々は肥満患者の腎尿細管では、リソソームにリン脂質が蓄積しリソソーム機能異常が生じることを見出し、肥満関連尿管症と名づけた[PMID: 27932476]。リソソーム機能異常はオートファジー活性の低下を引き起こし、尿管細胞が本来オートファジーにより処理すべき傷害オルガネラの蓄積を助長することにより尿管を傷害する。本研究は肥満関連尿管症の病態を明らかとし治療への道筋をつけることを目的とする。

【方法・結果】

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

肥満関連尿管症の病態を明らかとするためにまず培養尿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)。

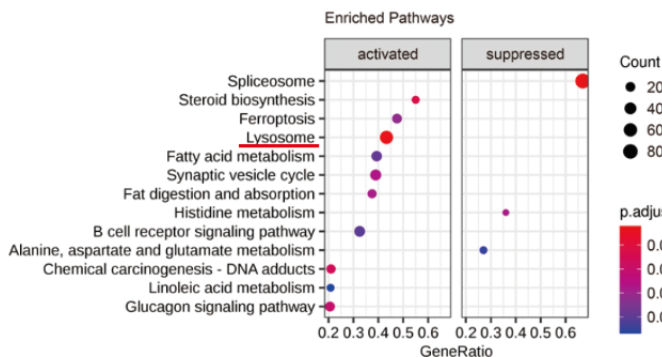


図 1. 培養尿管細胞にパルミチン酸を負荷した RNAseq 解析。エンリッチメント解析によりパルミチン酸はリソソーム関連遺伝子の発現を著明に亢進させることが明らかとなった。

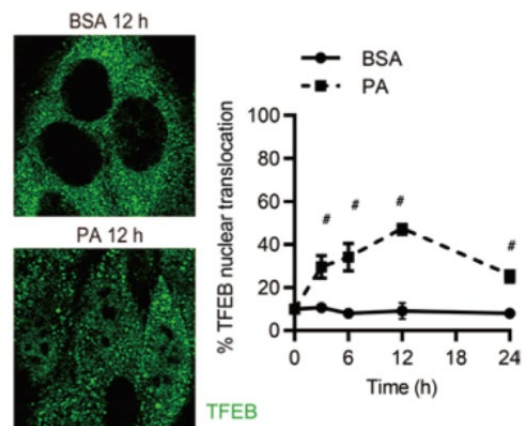


図 2. 培養尿管細胞にパルミチン酸を負荷するとTFEBが核内移行する。

②高脂肪食負荷下での尿管細胞における転写因子TFEBの活性調節

次に高脂肪食2ヵ月負荷下でのマウス尿管細胞における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。

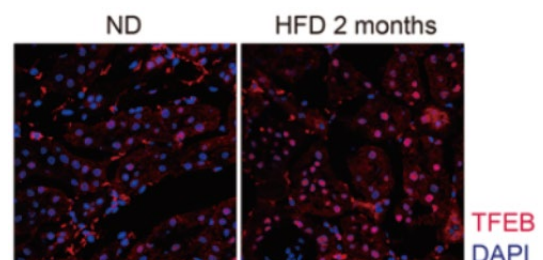


図 3. 高脂肪食 (HFD) を2ヵ月負荷するとマウス尿管細胞におけるTFEBの核内移行が亢進する。

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。

③高脂肪食負荷下での腎尿管における転写因子TFEBの働き

次に近位尿管特異的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管のリソソーム拡張が改善した。

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管のリソソーム内に蓄積したリン脂質が尿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)。一方で近位尿管特異的TFEBノックアウトマウスにおいては尿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はリソソームエクソサイトーシスを介して高脂肪食下での腎尿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ム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ム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管細胞を樹立しパルミチン酸を負荷しリソソーム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

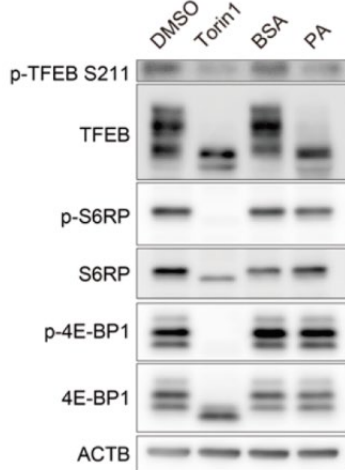


図4. パルミチン酸負荷はTFEBを脱リン酸化するがmTORC1の古典的な下流因子(S6RP, 4E-BP1)のリン酸化には影響を与えない。

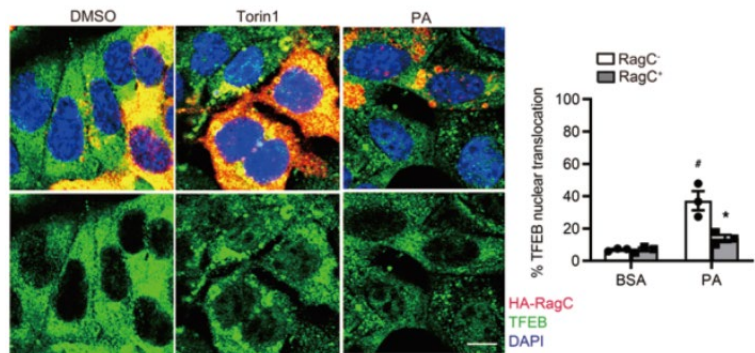


図6. パルミチン酸によるTFEBの核移行は非古典的経路が持続的に活性化しているRagC過剰発現細胞では認めない。このことからパルミチン酸によるTFEB活性化はRag GTPase依存性の非古典的経路の抑制を介することが明らかとなった。

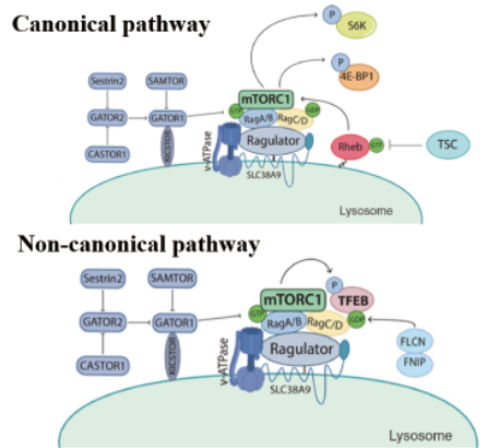


図5. 近年mTORC1によるTFEBのリン酸化・活性化には、Rheb依存性の古典的経路(canonical pathway; 上段)ではなく、Rag GTPase依存性の非古典的経路(non-canonical pathway; 下段)を介することが明らかとなっている。

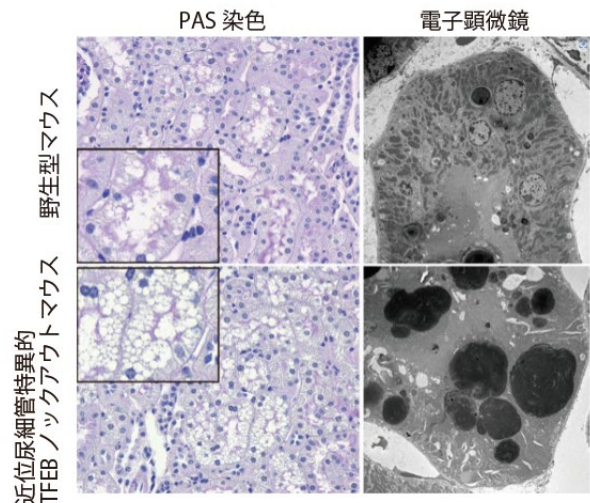


図7. 近位尿管特異的TFEBノックアウトマウスに、高脂肪食を2カ月負荷すると、野生型マウスに比して近位尿管のリソソーム拡張(左)・リソソーム内リン脂質蓄積(右)が著しく増悪した。

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ム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管細胞を樹立しパルミチン酸を負荷しリソソーム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。

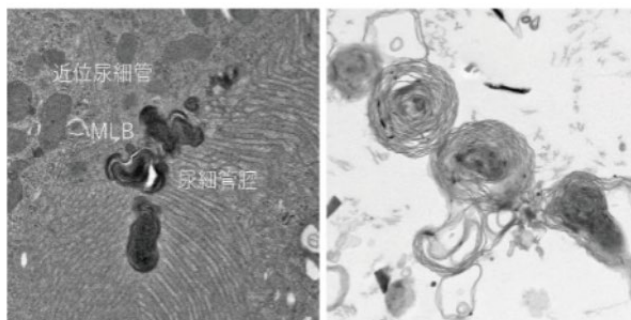


図8. 高脂肪食を荷した肥満マウスの電子顕微鏡画像(左:腎臓、右:尿)。尿細管のリソソーム内に蓄積したリン脂質はリソソームエクソサイトーシスにより尿細管腔へ放出され、尿中に排泄される。

【考察・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高い。そのため今後TFEBがリソソーム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。

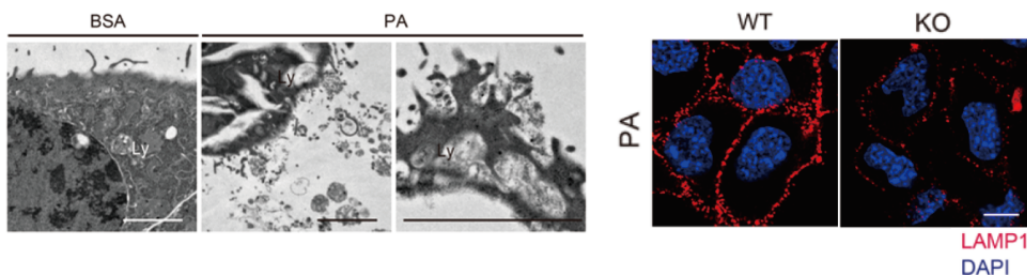


図9. (左) 培養尿細管細胞にパルミチン酸を荷した電子顕微鏡画像。パルミチン酸を荷した尿細管細胞ではリソソーム内容を細胞外に放出するリソソームエクソサイトーシスが盛んに行われている。(右) 野生型尿細管細胞 (WT) と TFEB ノックアウト尿細管細胞 (KO) の細胞膜上の LAMP1(リソソームマーカー) 染色。細胞膜上の LAMP1 の存在はリソソームエクソサイトーシスを示す。WT ではパルミチン酸荷後リソソームエクソサイトーシスが盛んに生じているが、KO ではリソソームエクソサイトーシスはほとんど起こっていない。

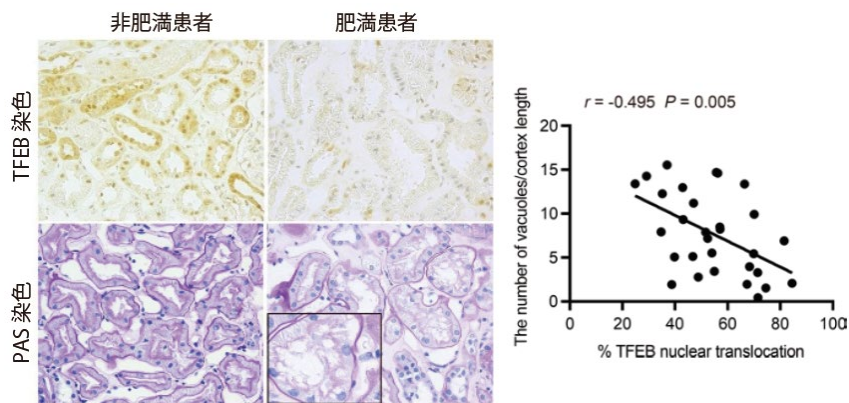


図10. 肥満関連腎症の患者では尿細管細胞のリソソーム機能異常を示す空胞病変の程度と相関してTFEBの発現低下を認める。