

# 腎老化における糸球体足細胞の細胞内分解系の役割

千葉大学大学院医学研究院 腎臓内科学

浅沼 克彦

## 【背景】

血液は腎臓の糸球体で濾過されるが、糸球体足細胞(ポドサイト)が血液蛋白の最終濾過障壁として重要な役割を担っている。そのためポドサイトが障害されると、血液蛋白が漏れ出して蛋白尿が生じる。さらに障害が長引くと、ポドサイトが糸球体から脱落して糸球体の構造・機能維持ができなくなり、最終的に糸球体が硬化する。近年、ポドサイト障害が腎老化に関わっているとされており、加齢でポドサイトが減損するメカニズムを解明することは、慢性腎臓病(CKD)予防法の開発のために重要であると考えられる。細胞を構成する蛋白は常に分解と合成が繰り返されているが、特にポドサイトのような終末分化細胞では、不要な蛋白を分解除去する機構が必要不可欠と考えられる。主な蛋白分解機構としては①オートファジー(autophagy)と②ユビキチン・プロテアソーム(UPS)の存在がすでに知られている。これらは細胞の恒常性維持において不可欠であるが、加齢とともに機能が低下することが知られている。そこで申請者はこれらポドサイトの細胞内蛋白分解機構の機能低下が老化による腎機能低下と関連していると考えている。ポドサイトに行けるautophagyの役割についての研究報告は多数されてきたが、UPSについてはほとんど知られていない。

## 【目的】

本研究ではポドサイト特異的にプロテアソームを欠損したマウスを用いて、ポドサイトにおけるプロテアソームの役割を明らかにすることを目的としている。

## 【研究方法】

プロテアソームの構築に必須のサブユニットであるRpt3をコードする遺伝子をflox配列で挟むようにデザインされたRpt3<sup>flox/flox</sup>マウスと、flox配列を認識して特異的に切断するCre遺伝子をpodocin遺伝子の制御下に配列したマウスPodocinCreマウスを掛け合わせると、ポドサイト特異的にプロテアソーム機能を欠損させたマウスが得られる。

ユビキチン化蛋白の分解を担うプロテアソームの構成要素の一つであるRpt3の遺伝子を、Cre-loxPシステムを使用してノックアウト(KO)することで、ポドサイト特異的にUPS機能を欠損したマウス(pRpt3 KOマウス)を作成した。またIn vitroにおいては培養ポドサイトにおいて、プロテアソーム阻害剤であるbortezomibを投与して経時的な変化を記録した。

## 【研究当初の結果】

ポドサイト特異的にプロテアソームを欠損すると、4週齢と早期から蛋白尿を認め、8週齢には硬化糸球体が増加し、重篤な腎不全をきたしてマウスは平均4ヶ月齢で死亡した。ポドサイトの足突起消失とポドサイト数の減少を認めポドサイト障害を来していることがわかった。ポドサイトにおいてユビキチン化蛋白の蓄積、酸化ストレスの上昇を認め、これがポドサイトにおいてアポトーシスを引き起こしていると考えられた。これら結果からポドサイトの恒常性の維持においてUPSが重要な役割をしていることがわかった。またこのマウスの腎不全に至る過程は、ポドサイト数の減少と糸球体硬化という腎老化による変化に類似しており、加齢に伴う蛋白分解機構の低下による腎老化のモデルとなることが考えられた。

## 【研究成果】

pRpt3 KOマウスやbortezomibを投与した培養ポドサイトにおいて老化マーカーとして知られるp19やp21が増加しており、ポドサイトにおけるプロテアソーム機能の低下が細胞老化を促進していることが示唆された。ポドサイト障害がCKDの原因として重要であることを考えると、加齢によるCKDの進行にポドサイトのプロテアソーム機能の低下が関わっていることが示唆される。

プロテアソームを欠損させたポドサイトにおいて酸化ストレスが増強していたことより、抗酸化剤がプロテアソーム欠損によるポドサイト障害を軽減できるのではないかと考えた。in vitroでの検討では、培養ポドサイトにプロテアソーム阻害剤であるbortezomibを投与すると、in vivoと同様にアポトーシス調節因子であるp53や、アポトーシスのマーカーとなるcleaved caspase3の上昇が認められたが、抗酸化剤であるアポシニンを前投与することにより、p53やcleaved caspase3の発現が抑制された。この結果からpRpt3 KOマウスにおいて、抗酸化剤の投与がpRpt3 KOマウスの腎予後を改善させる可能性がある。また、細胞内の蛋白分解を担うシステムにはユビキチン・プロテアソーム以外にオートファジーが知られている。ポドサイトにおけるオートファジーの活性を可視化したマウス(GFP-LC3マウス)と掛け合わせることで、ポドサイトにおけるプロテアソーム機能の欠損により、オートファジー活性がどのように変化するか調べた。当初の予想では、プロテアソーム機能の欠損を代償してオートファジー活性が上昇すると予想していたが、予想に反してポドサイトにおけるオートファジー活性は抑制されていた。In vitroによる検

討では、bortezomibの投与により、オートファジーの活性を負に調整するmTORシグナルが活性化されていた。mTORシグナルの抑制薬である、rapamycinをbortezomibに加えて投与すると、抑制されていたオートファジーが活性化された。さらにbortezomibにより誘導されていたp53やcleaved caspase3の発現も、rapamycinの投与により抑制することができた(図3)。この結果からはpRpt3 KOマウスにおいてオートファジーを活性化させることが、腎予後を改善させる可能性がある。

以上の結果は抗酸化剤やオートファジーの活性化剤が、老化にともなうCKDの進行を抑制できる可能性を示している。さらに今後は蓄積蛋白を質量分析で解析することで、ポドサイト障害の原因となりうる蛋白を特定したい。