

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、肥満関連腎症において脂肪毒性がリソソーム機能障害を引き起こす機構を解明した。転写因子 TFEB はリソソームエクソサイトシスを介してリソソーム恒常性を維持し腎障害を抑制する一方、その機能低下は病態を悪化させることを明らかにした。さらに、飽和脂肪酸によるリソソーム障害に脂肪酸代謝経路および mTOR–Rubicon 経路が関与することを示すと同時に、その責任因子を網羅的に同定する CRISPR スクリーニング系を構築した。

This study elucidated the molecular mechanisms by which lipotoxicity induces lysosomal dysfunction in obesity-related nephropathy. We demonstrated that the transcription factor TFEB plays a protective role by maintaining lysosomal homeostasis through lysosomal exocytosis, thereby limiting renal injury, whereas impairment of TFEB function exacerbates disease progression and promotes pathological changes. Furthermore, we showed that saturated fatty acid-induced lysosomal damage is mediated, at least in part, by fatty acid metabolic pathways and the mTOR–Rubicon signaling axis, highlighting a previously unrecognized regulatory mechanism. In addition, we established a CRISPR-based screening platform to comprehensively identify the key molecular determinants responsible for lipotoxicity-induced lysosomal dysfunction. These findings provide an integrated understanding of lipotoxic kidney injury and offer a foundation for the development of therapeutic strategies targeting the autophagy–lysosome pathway.

1. 研究内容

A. 脂肪毒性によるリソソーム機能障害に対する TFEB の保護機構の解明

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にするため、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、RNA-seq データによるエンリッチメント解析を行った。そ

の結果、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）。さらに、PA 負荷により発現が亢進する転写因子を解析したところ、TFEB の活性化が示唆された。実際に、PA 負荷により TFEB の核内移行を認め、TFEB 活性の上昇が確認された（図 2）。

②高脂肪食負荷下での腎尿細管における TFEB の活性調節：高脂肪食を 2 ヶ月負荷したマウス腎尿

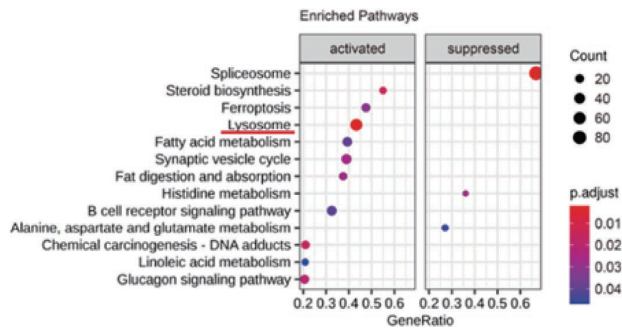


図 1. 培養尿細管細胞にパルミチン酸を负荷した RNAseq 解析。エンリッチメント解析によりパルミチン酸はリソソーム関連遺伝子群の発現を著明に亢進させることが明らかとなった。

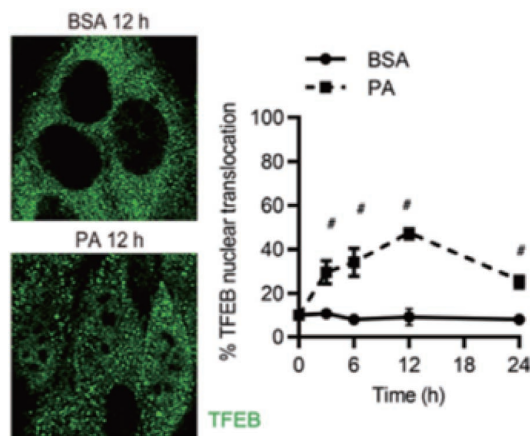


図 2. 培養尿細管細胞にパルミチン酸を负荷すると TFEB が核内移行する。

細管においても、TFEB の核内移行が亢進しており、TFEB 活性の上昇が示唆された。TFEB は主に mTORC1 により制御されることが知られているため、mTORC1 活性を検証したところ、PA 负荷は TFEB の脱リン酸化を促進する一方で、S6RP や 4E-BP1 といった mTORC1 の古典的下流因子には影響を与えなかった。このことから、PA による TFEB 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。さらに、Rag GTPase 依存性の非古典的経路に着目した解析から、PA による TFEB 活性化はこの経路の抑制を介して生じることを明らかにした。

③高脂肪食负荷下での腎尿細管における TFEB の働き：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 カ月负荷したところ、

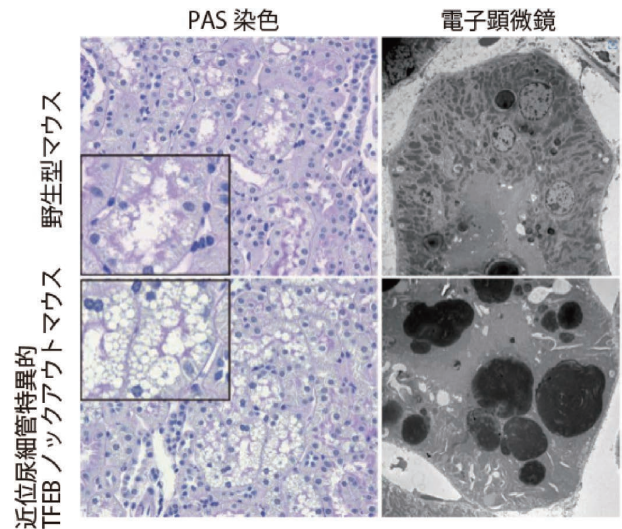


図 3. 近位尿細管特異的 TFEB ノックアウトマウスに、高脂肪食を 2 カ月负荷すると、野生型マウスに比して近位尿細管のリソソーム拡張（左）・リソソーム内リン脂質蓄積（右）が著しく増悪した。

野生型マウスと比較してリソソームの拡張およびリン脂質の蓄積が著明に増加した（図 3）。一方で、TFEB 活性化作用を有するトレハロースやレスベラトロールの投与により、これらの異常は改善した。

④転写因子 TFEB はリソソー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する：TFEB の作用機構を検討した結果、リソソームバイオジェネシスには明らかな変化は認められなかった。一方で、高脂肪食负荷マウスの腎組織および尿の電子顕微鏡解析により、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る像を認め、尿中へのリン脂質排泄も確認された。TFEB 欠損マウスではこれらの排泄が低下し、細胞内の脂質蓄積が増悪していた。さらに培養尿細管細胞においても、PA 负荷によりリソソーム内容物の細胞外放出が亢進し、TFEB 欠損によりこの機構が低下した。これらの結果から、TFEB はリソソー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することが示された。

⑤肥満関連腎症患者での TFEB の発現：肥満関連腎症患者において、尿細管細胞のリソソーム機能

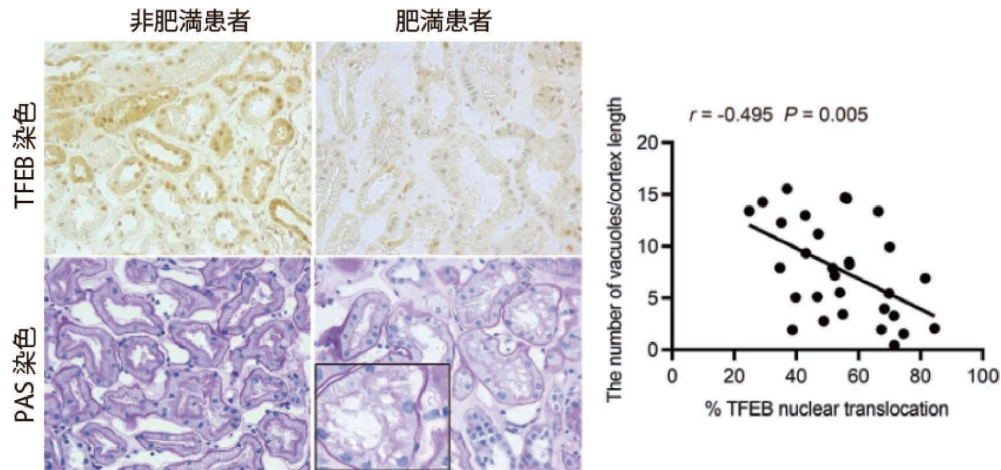


図 4. 肥満関連腎症の患者では尿細管細胞のリソソーム機能異常を示す空胞病変の程度と相関して TFEB の発現低下を認める。

異常を示す空胞病変の程度と相関して TFEB 発現の低下を認めた。このことから、TFEB 活性の低下が肥満関連尿細管症の進展に与与する可能性が示唆された（図 4）。

以上より TFEB は高脂肪食により活性化されリソソー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にした。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。

B. 脂肪毒性誘導リソソーム障害の責任因子同定に向けた CRISPR スクリーニング系の構築

脂肪毒性によるリソソーム機能障害およびオートファジー調節不全の分子基盤を解明するため、オートファジー可視化プローブと CRISPR-Cas9

遺伝子編集技術を組み合わせた全ゲノム規模の網羅的スクリーニング系を構築した。本系では、飽和脂肪酸負荷下におけるオートファジーフラックスの変化を定量的指標とし、脂肪毒性にตอบสนองしてリソソーム機能およびオートファジー制御に与与する遺伝子群を機能的に同定することが可能である。

予備解析として複数の細胞種を用いて検討した結果、パルミチン酸によるオートファジー障害の程度は細胞種により大きく異なり、脂肪毒性に対する感受性に顕著な細胞特異性が存在することを明らかにした。さらに、脂肪酸代謝に与与する ACS 阻害薬や mTORC1 阻害薬、ならびにオートファジー制御因子 Rubicon の抑制により、脂肪毒性によるオートファジー低下が回復することを確認し、脂質代謝経路および mTOR-Rubicon 経路が本現象に深く与与することを示した。

現在、CRISPR ライブラリー導入細胞を用いた初回 FACS ソーティングを完了しており、オートファジー活性の変化に基づく細胞集団の分離を経て、脂肪毒性によるリソソーム機能障害およびオートファジー異常を制御する新規遺伝子の同定を進めている（図 5）。今後は、同定された候補遺伝子の機能解析を通じて、脂肪毒性による細胞障害の因果的分子機構を解明する予定である。

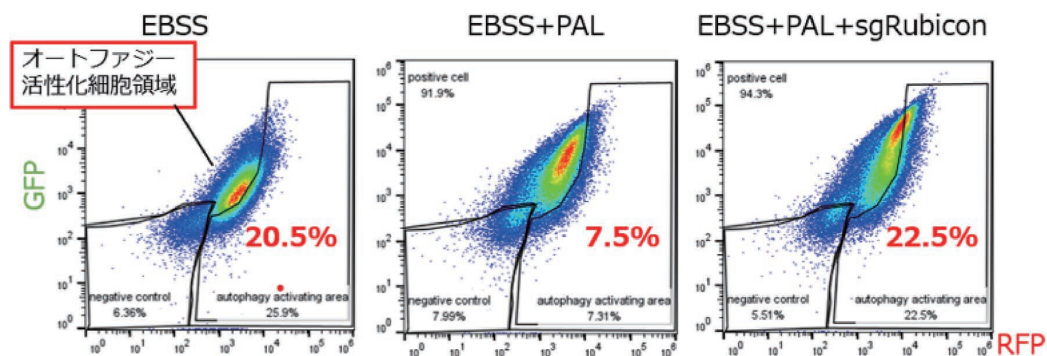


図 5. Rubicon は飽和脂肪酸によるオートファジー調節不全に関わる

本研究により、脂肪毒性に基づくリソソーム・オートファジー異常の統合的理解が進むとともに、これらの経路を標的とした新規治療戦略の創出に資する創薬基盤の確立が期待される。

2. 発表（研究成果の発表）

該当なし