

研究テーマ 「オートファジー制御を応用した尿路結石に対する新規治療薬の開発」

研究責任者 所属機関名 名古屋市立大学大学院医学研究 腎・泌尿器科学分野

役職 臨床研究員

氏名 海野 怜 メールアドレス unno@med.nagoya-cu.ac.jp@gmail.com

共同研究者 所属機関名 名古屋市立大学大学院医学研究 腎・泌尿器科学分野

官職又は役職 教授

氏名 安井 孝周

共同研究者 所属機関名 名古屋市立大学大学院医学研究 腎・泌尿器科学分野

官職又は役職 准教授

氏名 戸澤 啓一

共同研究者 所属機関名 名古屋市立大学大学院医学研究 腎・泌尿器科学分野

官職又は役職 講師

氏名 岡田 淳志

共同研究者 所属機関名 名古屋市立大学大学院医学研究 腎・泌尿器科学分野

官職又は役職 病院講師

氏名 安藤 亮介

共同研究者 所属機関名 名古屋市立大学大学院医学研究 腎・泌尿器科学分野

官職又は役職 助教

氏名 濱本 周造

私たちは、シュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸の投与により尿路結石モデルマウスを確立した。その過程で、尿細管細胞傷害が結晶の付着・凝集を亢進することを報告した。また、ヒト検体を用いた解析で、炎症や酸化ストレスが結石形成を促進することを報告した。以上のことから、“腎尿細管上皮細胞の傷害が結石形成を促進する”という全く新しい概念を提唱した。傷害を受けた細胞はオートファジーを誘導する。2重膜構造を持つオートファゴソームが、傷害ミトコンドリアやリソソームなどのオルガネラを囲いこみ、それらがリソソームと融合することでオートリソソームとなり、内容物が処理される。オートファジーと結石形成との関係に関する報告はなく、メカニズムの解明と予防法に応用可能であると考えた。本課題では、以下の3つの観点からオートファジー機構の解明と、尿路結石のバイオマーカーの開発、さらにその制御による尿路結石の新規治療薬の開発を試みた。

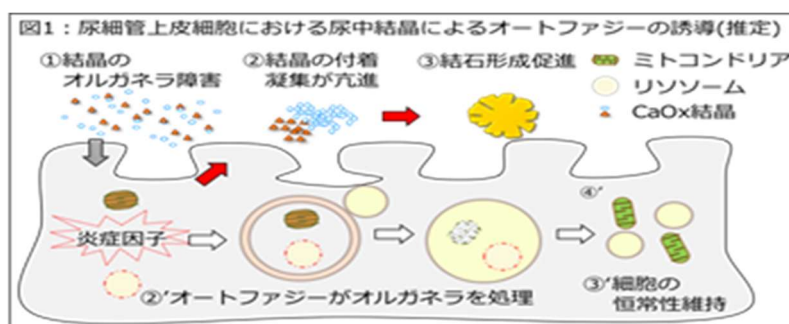
[1] シュウ酸Ca結晶によるマウス腎尿細管細胞でのオートファジーとオルガネラの解析

[2] 遺伝子改変マウスを用いたオートファジーの検討

[3] オートファジー制御薬による尿路結石予防効果の検討

In vitro 研究では、マウス由来腎尿細管細胞に対してシュウ酸カルシウム 1水和物結晶  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  を2、4、6、8時間暴露させたのち、オートファジー関連蛋白の Western-blot でオートファジーフラックスを、オルガネラの蛍光免疫染色で細胞内障害を、偏光顕微鏡で細胞

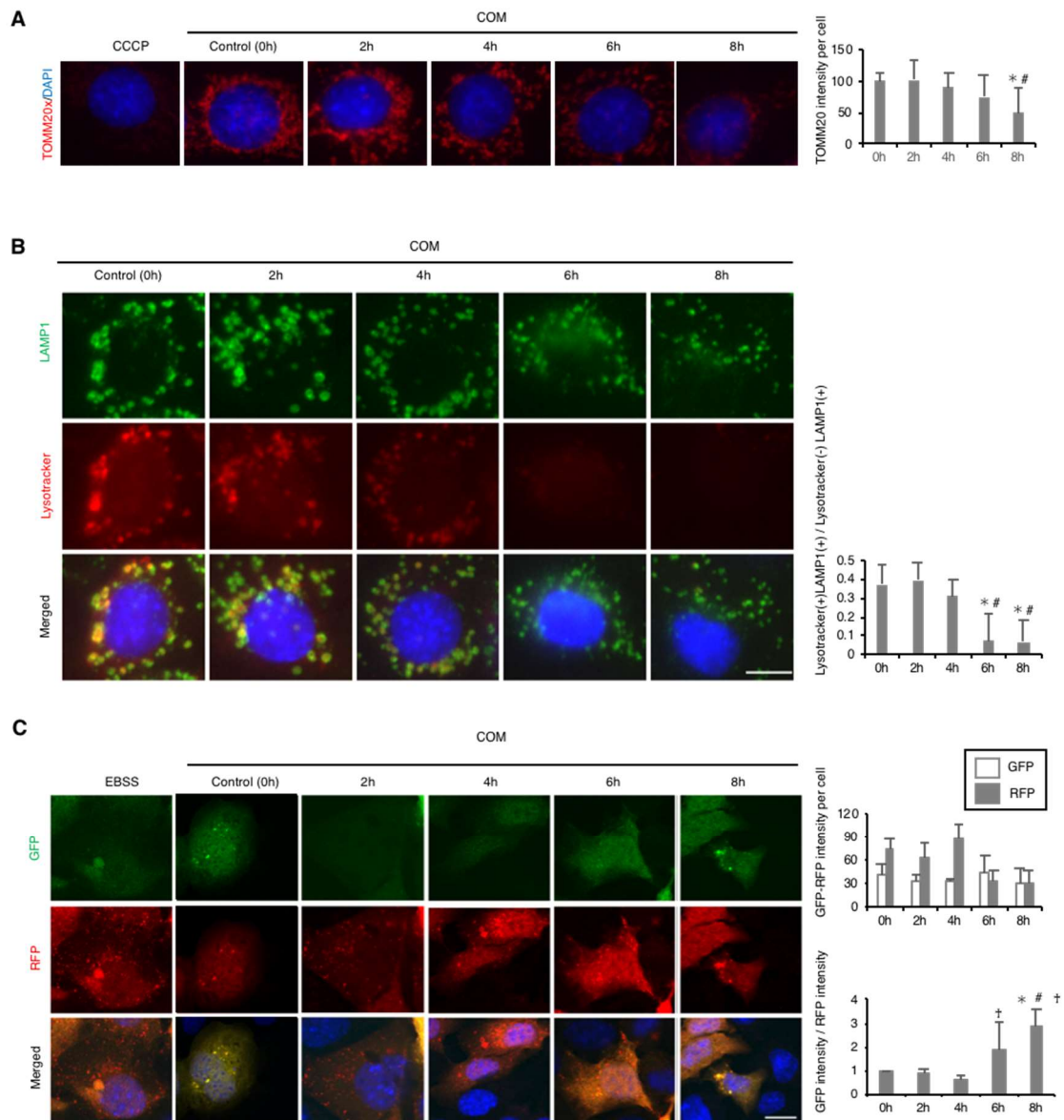
への結晶付着量を検討した。また、tandem fluorescent-tagged LC3 を細胞に transfection し、オートファジーの活性を評価した。In vivo 研究ではオートファゴソーム可視化マウス (GFP-LC3 transgenic mice) を作成し、シュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸 (GOX) 80mg/kg を連日腹腔内投与し 6、12、24 時間後、2、4 日後に腎を摘出し、偏光顕微鏡で結石形成量を、透過型電子顕微鏡で細胞内の変化を観察した。オートファジー制御の実験では、促進薬であるラパマイシン 2mg/kg/day を連日投与し結石の予防効果を検討した。In vitro では、結晶暴露でオルガネラの障害が起こり、それら进行处理するためにオートファジーの発現が上昇した。細胞への結晶付着量は暴露 8 時間後でオートファジーを抑制することにより上昇した。In vivo では、腎結石は GOX 投与 1 日目以降で上昇した。電子顕微鏡像では、GOX 投与 12 時間後以降でオートファジーの産物を認めたが、投与 2 日目以降では傷害を受けたオルガネラや空砲が目立った。Western-blot では、結石が増加するとともにオートファジーの発現は低下し、GFP-LC3 マウスでも LC3 の発現は低下した。さらにオートファジー促進薬であるラパマイシンを投与したマウスでは、結石が優位に抑制された。本研究から、シュウ酸カルシウム結晶負荷により、細胞内のオルガネラ傷害や活性酸素が発生し、それら进行处理するためにオートファジーが引き起こされることがわかった。オートファジーは腎結石形成過程において、細胞の恒常性を維持し、結石を抑制する働きをすることから、オートファジーの制御による新たな結石治療の開発が期待される。



## 2. 実施内容および成果の説明

(1) シュウ酸Ca結晶によるマウス腎尿細管細胞でのオートファジーとオルガネラの解析  
マウス尿細管細胞(M-1細胞)へ、シュウ酸Ca1水和物(COM)結晶(20ng/cm<sup>2</sup>)を添加し、結晶暴露0,2,4,6,8時間後に細胞を回収した。まず結晶による細胞内の変化をオルガネラの免疫染色で評価した。ミトコンドリアは外膜タンパクである TOMM20 抗体を使用した。リソソームの酸性化障害は、膜タンパク LAMP1 を用いて内部の酸性化は Lysotracker を使用した。オートファジーの活性は、関連蛋白である LC3 に、RFP(Red) と GFP(Green)を融合させた tandem fluorescent-tagged LC3(tfLC3)を細胞にトランスフェクションし、評価した。GFPシグナルはリソソーム内の環境下で蛍光が減弱するのに対し、RFPは同環境下でも安定であるため、RFPシグナルの増強はオートファジー亢進を意味する。

2



A : COM 結晶によりミトコンドリアが経時的に障害される

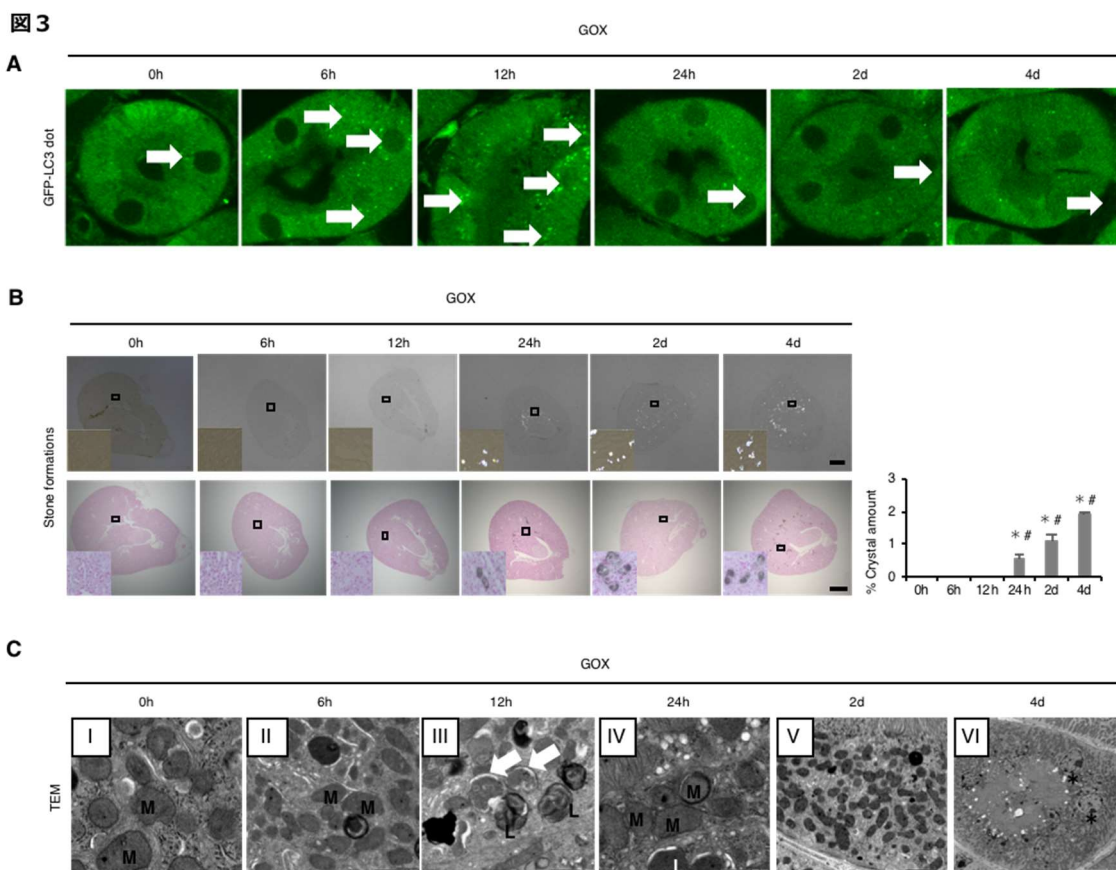
B : COM 結晶によりリソソームの酸性障害 (Lysotracker red の低下) を認める

C : COM 結晶により 4 時間で RFP シグナルは増加するがその後は低下する

上記結果からシュウ酸 Ca 結晶はオルガネラの障害をもたらす。オートファジーは障害オルガネラ処理のため一時的に誘導されるが、結晶の暴露が長くなると活性が低下し、オルガネラ障害も顕著となる。

## (2) 遺伝子改変マウスを用いたオートファジーの検討

オートファジー可視化マウス(GFP-LC3#53 マウス)に、シュウ酸前駆物質であるGOX80mg/kgを腹腔内に連日投与し、尿路結石形成とオートファジーの関連を評価した。



A : オートファジー関連タンパク LC3 が結石形成前で増加するが、結石形成後低下する。

B : 腎結石は GOX 投与 24 時間以降で有意に増加した。

C : 透過型電子顕微鏡 (TEM) では結石形成前でオートファゴソームやリソソームが目立つが、結石形成後では障害オルガネラが顕著となる。

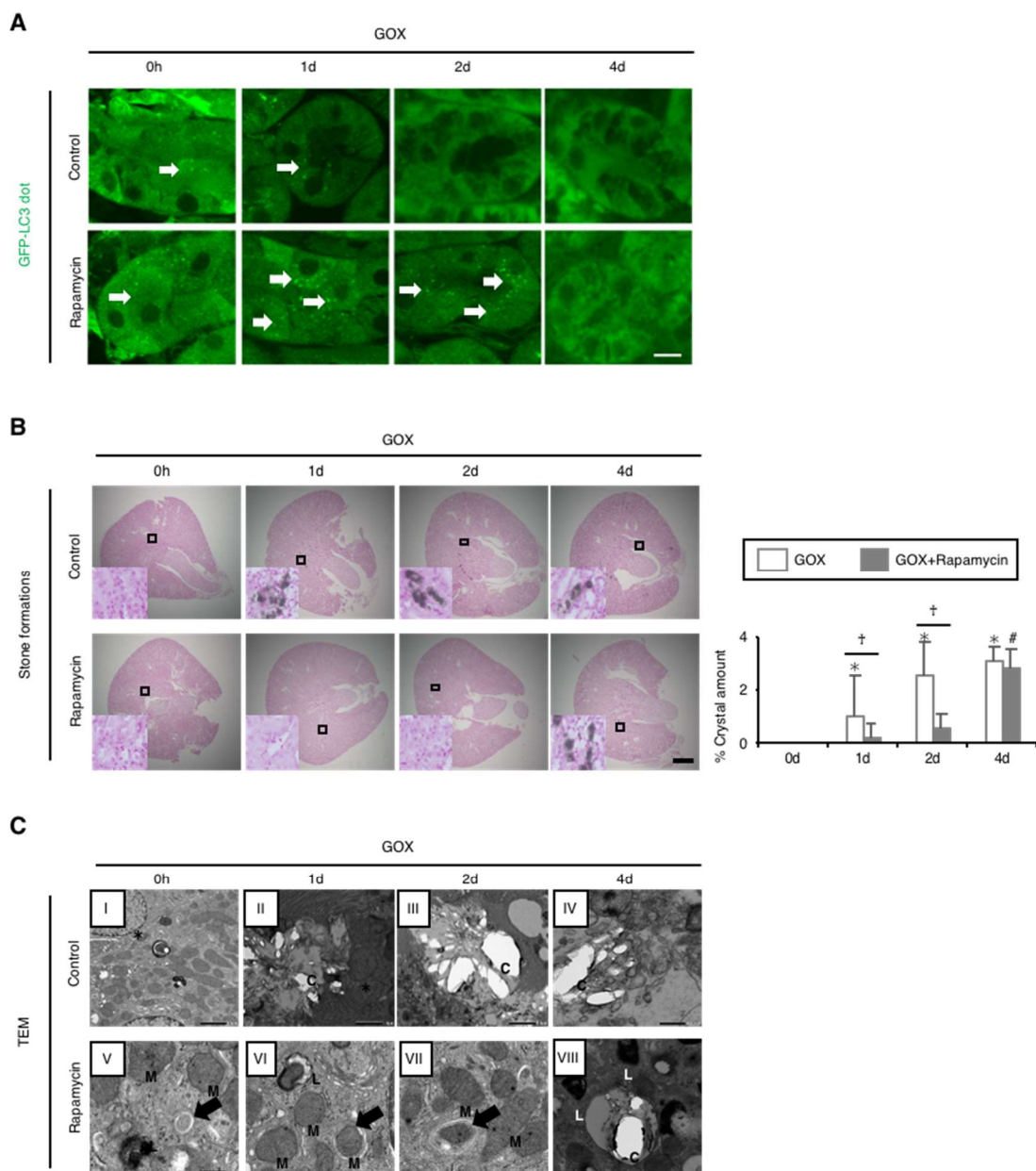
上記結果から、オートファジーは結石形成前誘導されるが、その低下によりオルガネラの障害が顕著となり、結石形成も有意に増加した。

実験(1), (2)からオートファジーの低下がオルガネラの障害を増加させ、結石形成を側隠している可能性が示唆された。

## (3) オートファジー制御薬による尿路結石予防効果の検討

GFP-LC3#53 マウスにオートファジー促進薬であるラパマイシンを投与し結石の予防効果を検討した。

図4



A : ラパマイシンを投与した群では LC 3 が増加しておりオートファジーが亢進した。

B : ラパマイシン投与群ではコントロールに比較し結石形成を抑制した。

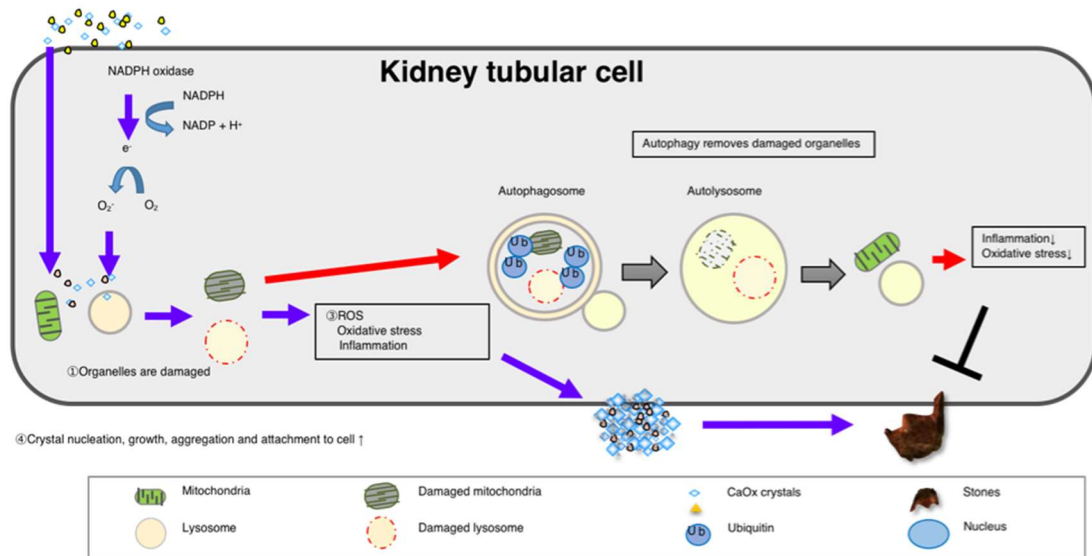
C : TEM でもラパマイシンはオートファジーを亢進し、結石を抑制することがわかる

上記結果から mTOR インヒビターであるラパマイシンは、結石モデルマウスにおいてオートファジーを亢進し、結石の形成を有意に抑制することがわかった。しかしながら GOX を 4 日間投与すると、その細胞毒性がオートファジーの保護作用を上回り、結石形成予防効果を示さなかった。

### 3. まとめ

本研究から、オートファジーの低下が腎結石形成の原因となっていることが示唆された。より特異的なオートファジー促進による結石予防薬の開発を今後目指していきたい。

図5



シュウ酸 Ca 結晶が細胞内のオルガネラを障害。通常オートファジーにより処理されるオルガネラは、オートファジーの低下により残存し、活性酸素種や酸化ストレス、炎症を引き起こす。それら細胞に有害な物質は、結晶の凝集、成長、接着を促進し、腎結石形成を促進する。(図5)

### 謝辞

研究遂行にあたり、一般財団法人東海産業技術振興財団の研究助成に感謝致します。

### 参考文献

1. Neisius, A. & Preminger, G. M. Stones in 2012: epidemiology, prevention and redefining therapeutic standards. *Nat Rev Urol* **10**, 75–77 (2013).
2. Heers, H. & Turney, B. W. Trends in urological stone disease: a 5-year update of hospital episode statistics. *BJU Int* **118**, 785–789 (2016).
3. Rule, A. D., Bergstralh, E. J., Melton, L. J. 3rd, Li, X., Weaver, A. L., & Lieske, J. C. Kidney stones and the risk for chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **4**, 804–811 (2009).
4. Alexander, R. T., Hemmelgarn, B. R., Wiebe, N., Bello, A., Morgan, C., Samuel, S.,

- Klarenbach, S. W., Curhan, G. C., & Tonelli, M.; Alberta Kidney Disease Network: Kidney stones and kidney function loss: a cohort study. *BMJ* **345**, e5287 (2009).
5. Kum, F., Mahmalji, W., Hale, J., Thomas, K., Bultitude, M., & Glass, J. Do stones still kill? An analysis of death from stone disease 1999–2013 in England and Wales. *BJU Int.* **118**, 140–144 (2016).
  6. Mulay, S. R., Desai, J., Kumar, S. V., Eberhard, J. N., Thomasova, D., Romoli, S., Grigorescu, M., Kulkarni, O. P., Popper, B., Vielhauer, V., Zuchtriegel, G., Reichel, C., Bräsen, J. H., Romagnani, P., Bilyy, R., Munoz, L. E., Herrmann, M., Liapis, H., Krautwald, S., Linkermann, A., & Anders, H. J. Cytotoxicity of crystals involves RIPK3-MLKL-mediated necroptosis. *Nat Commun* **28**, 10274 (2016).
  7. Okada, A., Yasui, T., Fujii, Y., Niimi, K., Hamamoto, S., Hirose, M., Kojima, Y., Itoh, Y., Tozawa, K., Hayashi, Y., & Kohri, K. Renal macrophage migration and crystal phagocytosis via inflammatory-related gene expression during kidney stone formation and elimination in mice: detection by association analysis of stone-related gene expression and microstructural observation. *J Bone Miner Res* **25**, 2701–2711 (2010).
  8. Taguchi, K., Hamamoto, S., Okada, A., Unno, R., Kamisawa, H., Naiki, T., Ando, R., Mizuno, K., Kawai, N., Tozawa, K., Kohri, K., & Yasui, T. Genome-wide gene expression profiling of Randall's plaques in calcium oxalate stone formers. *J Am Soc Nephrol* **28**, 333–347 (2017).
  9. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27–42 (2008).
  10. Choi, A. M. K., Ryter, S. W., & Levine, B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* **368**, 651–662 (2013).
  11. Mizushima, N., & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728–741 (2011).
  12. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451** 1069–1075 (2008).

13. Kimura, T., Takahashi, A., Takabatake, Y., Namba, T., Yamamoto, T., Kaimori, J. Y., Matsui, I., Kitamura, H., Niimura, F., Matsusaka, T., Soga, T., Rakugi, H., & Isaka, Y. Autophagy protects kidney proximal tubule epithelial cells from mitochondrial metabolic stress. *Autophagy* **9**,1876–1886 (2013).
14. Namba, T., Takabatake, Y., Kimura, T., Takahashi, A., Yamamoto, T., Matsuda, J., Kitamura, H., Niimura, F., Matsusaka, T., Iwatani, H., Matsui, I., Kaimori, J., Kioka, H., Isaka, Y., & Rakugi, H. Autophagic clearance of mitochondria in the kidney copes with metabolic acidosis. *J Am Soc Nephrol* **25**, 2254– 2266 (2014).
15. Isaka, Y., Takabatake, Y., Takahashi, A., Saitoh, T., & Yoshimori, T. Hyperuricemia-induced inflammasome and kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant* **31**, 890–896 (2016).
16. Komatsu, M. & Ichimura, Y. Selective autophagy regulates various cellular functions. *Genes Cells* **15**, 923–933 (2010).