

第4回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

大島賞受賞講演

腎臓病の創薬を目指したオートファジーと代謝のリバーストランスレショナルリサーチ

Reverse translational research of autophagy and metabolism in kidney disease

木村友則

Tomonori KIMURA

はじめに

慢性腎臓病(chronic kidney disease : CKD)の制御は重要な課題であり、演者らは一貫してこれを検討してきた。CKDの予後予測が困難である現状を踏まえ、一連の観察研究によって心合併症、糖尿病、加齢といったCKDの臨床的背景が予後に及ぼす影響を検討した^{1~3)}。これにより、CKDの進展における臨床的背景、eGFR、尿蛋白、心機能などがどれだけの影響を持っているのか、評価することができた。一連の臨床研究により、CKDの進展を抑制するためには、腎臓病で普遍的に見られる尿管炎症性病変が重要であると認識し、オートファジーの腎臓病における治療応用性を検討した。

オートファジーと近位尿管

オートファジーは自己成分を分解することで細胞内恒常性維持を果たす機構である⁴⁾。細胞内の障害を受けたミトコンドリアや不良成分は、オートファゴソームと呼ばれる二重膜により認識され、隔離される。するとオートファゴソームは、ライソゾームと融合することで、内部成分を分解し、栄養源として再利用可能とする。オートファジーの分子機構の解明により、大隅良典先生が2016年にノーベル賞を受賞されたことは記憶に新しい。オートファジーの臨床応用が期待されている理由の一つが、多くの臓器におい

てオートファジーが疾患に対して防御的に働くことが示されてきたことによる。

われわれは、オートファジーが近位尿管でどのような役割を担っているか検討した(図1)⁵⁾。まず、オートファゴソームのマーカであるLC3にGFPタグのついたGFP-LC3トランスジェニックマウスでの検討から、虚血再灌流障害によってオートファジーが誘導されることが判明した。次に、虚血再灌流障害で誘導されるオートファジーの役割が何かを検討するため、オートファジーに必須の遺伝子Atg5を近位尿管特異的にノックアウトした近位尿管特異的オートファジー不全マウス(KAP-Cre ; Atg5^{Fl/F}マウス)を作製し検討した。この結果、虚血再灌流障害によりオートファジー不全マウスは強い障害を受けた。さらには、虚血再灌流障害により、オートファジー不全マウスの細胞内に、ユビキチン陽性の細胞内封入体が蓄積することが判明した。これらの事実から、虚血再灌流障害によってできるユビキチン陽性の異常な蛋白質を分解するためにオートファジーが誘導されること、そしてオートファジーが機能しない場合には、これらを分解することができずに腎障害が起きることが判明した⁶⁾。

その後の検討により、オートファジーはさまざまな腎障害性ストレス、シスプラチン⁷⁾、シクロスポリン⁸⁾、アシドーシス⁹⁾、尿酸腎症¹⁰⁾、糖尿病¹¹⁾、さらには加齢ストレス^{5,12)}などに対しても防御的に働くことが判明した。その機序として多様な防御機構も判明してきた。オートファジーは、ミトコンドリア由来の酸化ストレスやDNA損傷を防いだり⁷⁾、さらには細胞内代謝も制御したりする⁸⁾。このように、オー

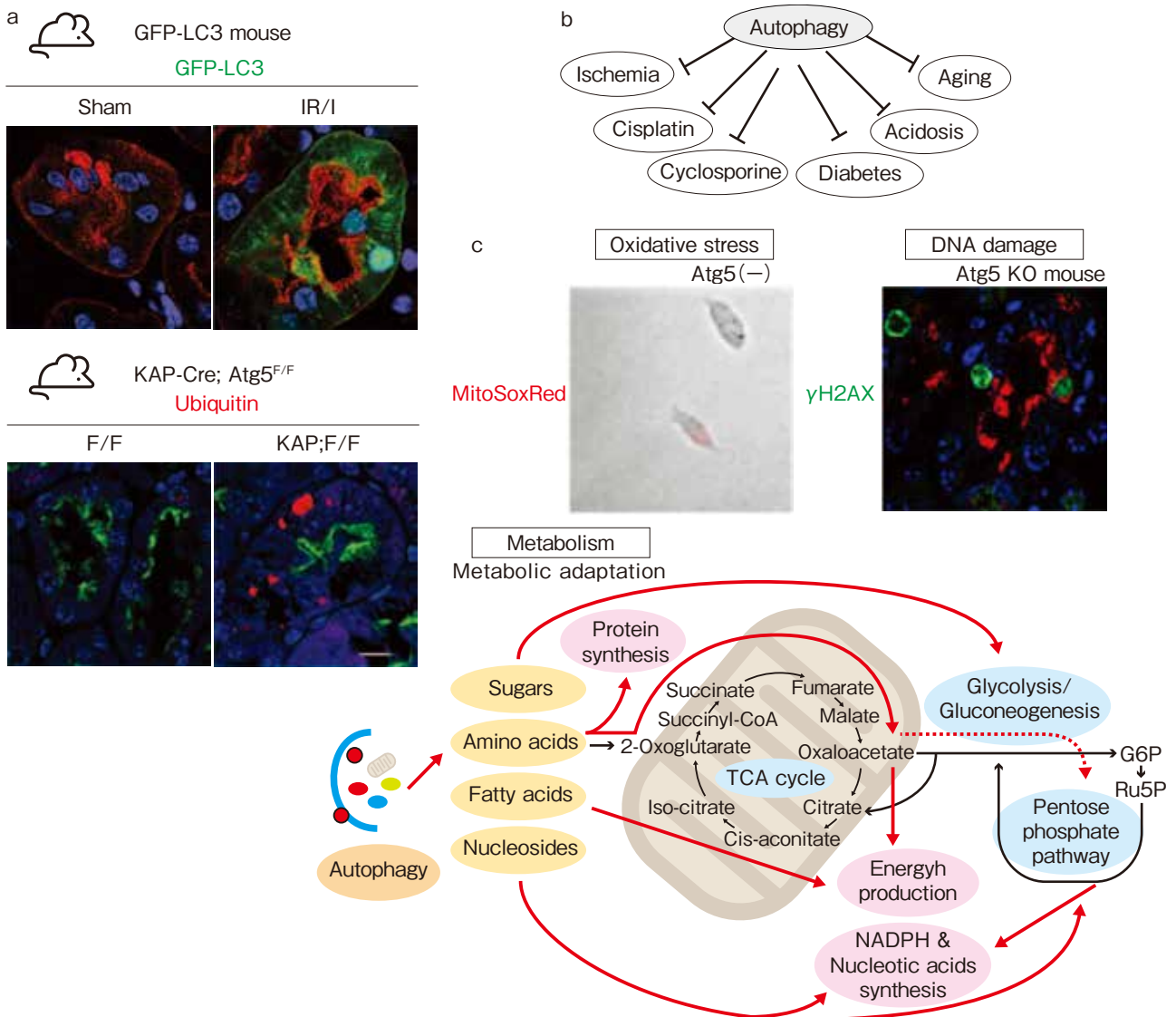


図1 オートファジーは近位尿管を保護する

- a: 虚血再灌流障害 (ischemia reperfusion injury: IR/I) により, GFP-LC3 マウスではオートファジーの誘導 (GFP 陽性のドット) が観察された。近位尿管特異的オートファジー不全マウス (KAP-Cre; Atg5^{F/F}) の近位尿管において, 虚血再灌流障害はユビキチン陽性の細胞内封入体の蓄積を誘導した。(文献 5 より引用, 一部改変)
- b: オートファジーはさまざまな腎障害性ストレスに対して防御的に働くことが判明してきた。
- c: オートファジーが防御的に働く機構。オートファジー不全細胞ではミトコンドリア由来の酸化ストレスを認めた。オートファジー不全マウスでは, DNA 損傷の蓄積が起こる。オートファジーは代謝に対してもさまざまな機能を果たす。(文献 7, 8 より引用, 改変)

トファジーには多種の腎疾患に対し多様な防御機構が備わっていた。これらの一連の研究により, オートファジーが幅広い腎臓病の治療戦略になることが示された¹³⁾。

オートファジーの臨床応用と precision autophagy

では, どのように臨床にオートファジーを応用するのか。われわれは, 腎臓における炎症をオートファジーに

よって抑制することを検討している¹⁴⁾。インフラマソームや I 型インターフェロン応答といった自然免疫応答が腎疾患発症に深く関与していることが示されてきたが, オートファジーは自然免疫応答に対して多様な役割を担っている^{15,16)}。オートファジーはもともと, バルクに分解する非選択的な機構と考えられてきたが, 臨床にオートファジーを応用するためには, オートファジーが分解する対象を精密に分解する必要がある¹⁷⁾。そこで, オートファ

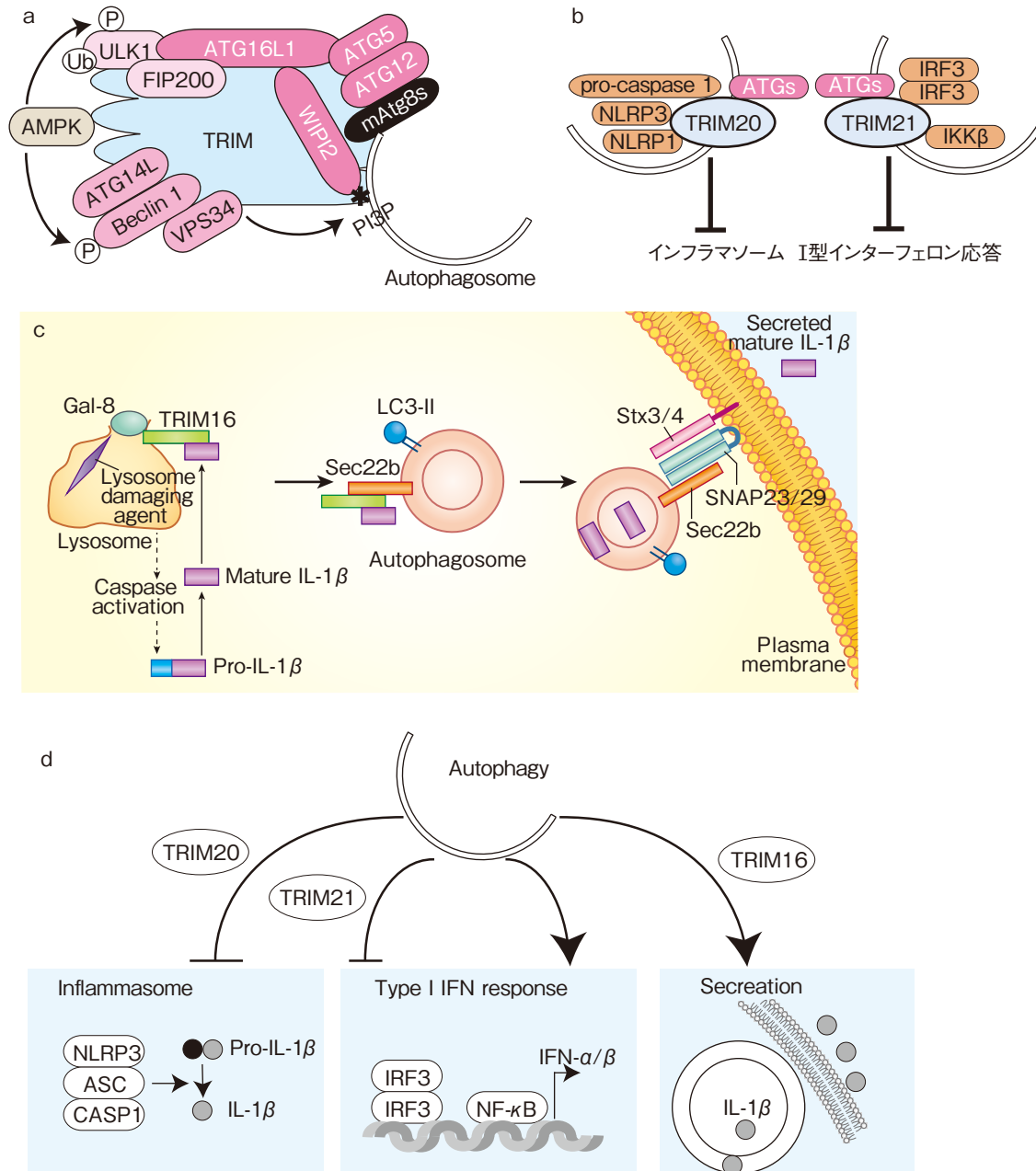


図2 オートファジーによる治療に向けた試み

- a: 精密なオートファジー (precision autophagy) の分子機構。精密なオートファジーは、受容体 (例として TRIM 蛋白を示す) が分解するターゲットを認識すると、オートファジーのマシナリーをリクルートしつつ活性化し、分解する。(文献 19 より引用, 一部改変)
- b: 精密なオートファジーの例。例えば受容体の TRIM20, 21 は、インフラマソームや I 型インターフェロンシグナルの因子を精密に分解することで、過剰な炎症応答を抑制する。
- c: オートファジーは、分解のみならず分泌にも関与することが判明してきており、新たな治療応用性が示唆されている。判明してきた分子機構を示す。(文献 20 より引用, 一部改変)
- d: オートファジーは、受容体を使い分けて精密に分解と分泌を制御していることが判明してきた。自然免疫応答における分解と分泌の制御を示す。(文献 16 より引用, 一部改変)

ジーにより、炎症を精密に制御することを検討した¹⁴⁾。

細胞生物学的なアプローチにより、precision autophagy (精密なオートファジー) を概念化することができた (図 2)^{18,19)}。

精密なオートファジーにおいては、特異的なターゲット、例えばインフラマソームの構成因子がオートファジーの受容体によって認識される。するとその受容体は、オート

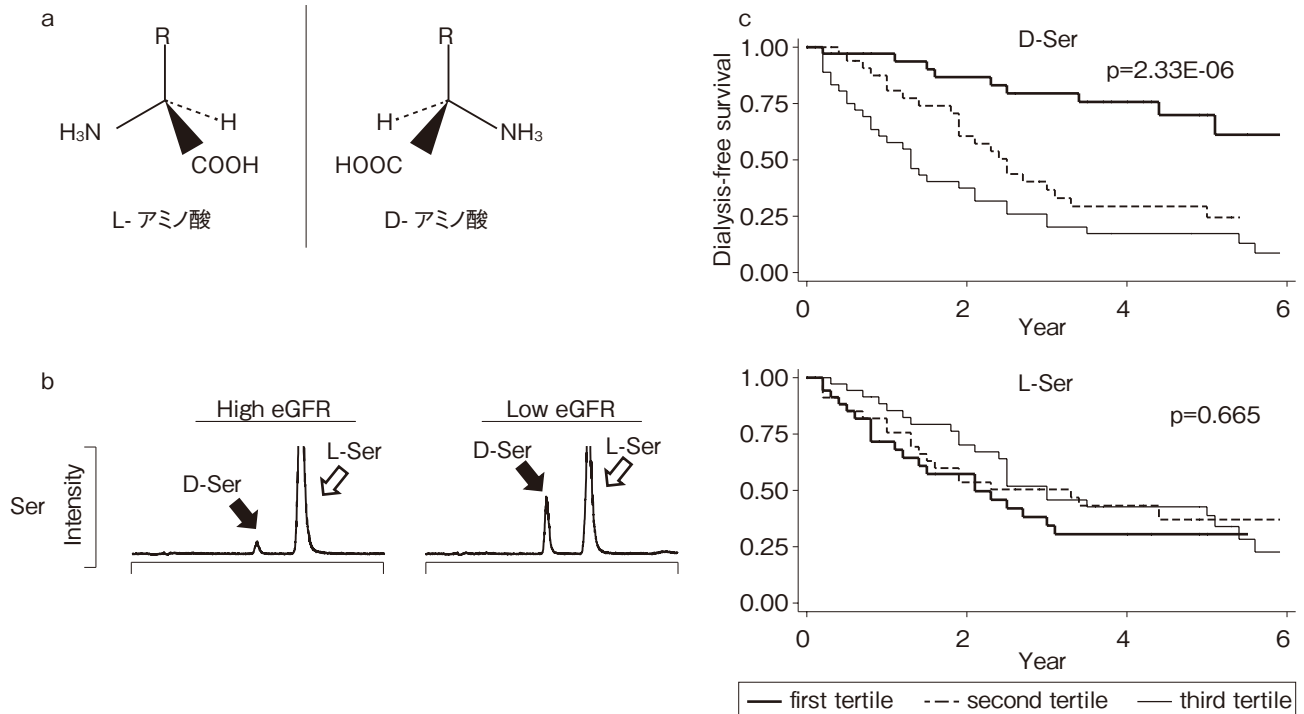


図3 キラルアミノ酸による慢性腎臓病予後予測

a: アミノ酸には、光学異性体のL型とD型が存在する。自然界にはL型のみしか存在しないと長らく考えられてきた。

b: 慢性腎臓病患者の血中からD-アミノ酸を検出した。図にはセリンのクロマトグラフィを示す。

c: D-アミノ酸濃度により、慢性腎臓病患者の予後が推定された。この傾向はL-アミノ酸によっては認められなかった。

(文献22より引用、一部改変)

ファジーの分子をリクルートしつつ、活性化し、精密にターゲットを分解する。文献的調査により、精密なオートファジーは各種疾患で機能していることも判明した¹⁹⁾。さらには、この検討の過程でオートファジーが分解ではなく分泌する機構の分子機構を同定することができた²⁰⁾。オートファジーの分泌機構は近年ようやく検討が進んできた分野であり、疾患との関与も検討されている。詳細は総説に譲る²¹⁾。

キラルアミノ酸による予後予測

一連の解析から腎臓病の発症に代謝が重要な役割を果たしていることを再認識し、最初の臨床的疑問であったCKDの予後予測を、代謝物によって推測できないか検討した(図3)^{22,23)}。この目的のためにキラルアミノ酸メタボロミクスを活用した²⁴⁾。アミノ酸にはL体とD体の光学異性体(キラル体)が存在するが、自然界にはL体しかないと思われてきた。しかし、近年の技術の発展により、ごく少量のD-アミノ酸を検出できるようになってきており、

この技術を応用した。この結果、CKD患者の血中にごく微量ではあるがD-アミノ酸が存在すること、また、L-アミノ酸ではなくD-アミノ酸によりCKDの予後を推定することができることが判明した²²⁾。生体に存在しないと考えられてきたD-アミノ酸が、CKDのバイオマーカーとなる可能性を秘めていることを示唆している²⁵⁾。

おわりに

腎臓病は難病中の難病である。抜本的な治療方法もなく、十分なバイオマーカーもない。これを生み出すには、十分な技術と考察に裏付けられた基礎研究、臨床的なセンスと、何よりも熱意が必要であるのは論を待たない。

複雑な腎臓の解剖学的構造と生理機構、分子動態は、基礎研究の対象として腎臓を非常に魅力的な臓器にする一方で、研究対象として簡単な臓器にはしていない。また、簡単に腎臓を採取できないといった実務上の事情は、研究を困難にしている。こういった事情が、純粋な基礎研究者の参入をしばしば妨げてきたため、本邦では、現在の腎臓病

学基礎研究の担い手は実臨床関係者である。一方で、世界全体の研究レベルは向上し、簡単な研究では十分な成果にならなくなってきている。日進月歩で新しい技術が導入されてきており、生半可な理解ではこれらを選別して使いこなすことはできない。基礎研究離れが促進されやすい状況である。

しかし、難病研究において、新しい価値を生み出す力は基礎研究にある。特に、臨床上の疑問を基礎研究において解決するリバーストランスレーショナルリサーチは、非常にパワフルな手法である。

現在、われわれは、臨床上の疑問を研究上の疑問に変換しながら研究を進め、リバーストランスレーショナル研究を実践している。若手臨床医の疑問をうまく基礎研究上の疑問に変換し、最初のデータを入手した時の興奮は、何にも代えがたい魅力がある。このような初心を忘れることなく、今後とも、CKDを巡って臨床研究と基礎研究を行き来するリバーストランスレーショナル研究を行い、研究成果を腎臓病臨床に返していききたい。

謝 辞

本稿にて報告させていただいた研究は多数の関係者のご指導、ご協力の下、進められてきました。大阪大学医学部腎臓内科 猪阪善隆先生、高島義嗣先生、老年内科 楽木宏美先生、大阪急性期・総合医療センター腎高血圧内科 林晃正先生をはじめ、多くのメンターや同僚、共同研究者および関係者、ならびに医薬基盤・健康・栄養研究所 KAGAMI プロジェクトのメンバーに、この場を借りて感謝申し上げます。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

- Kimura T, Obi Y, Yasuda K, Sasaki KI, Takeda Y, Nagai Y, Imai E, Rakugi H, Isaka Y, Hayashi T. Effects of chronic kidney disease and post-angiographic acute kidney injury on long-term prognosis after coronary artery angiography. *Nephrol Dial Transplant* 2011 ; 26(6) : 1838-1846.
- Obi Y, Kimura T, Nagasawa Y, Yamamoto R, Yasuda K, Sasaki K, Kitamura H, Imai E, Rakugi H, Isaka Y, Hayashi T. Impact of age and overt proteinuria on outcomes of stage 3 to 5 chronic kidney disease in a referred cohort. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010 ; 5 : 1558-1565.
- Yasuda K, Kimura T, Sasaki K, Obi Y, Iio K, Yamato M, Rakugi H, Isaka Y, Hayashi T. Plasma B-type natriuretic peptide level predicts kidney prognosis in patients with predialysis chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2012 ; 27 : 3885-3891.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011 ; 27 : 107-132.
- Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Kaimori JY, Matsui I, Namba T, Kitamura H, Niimura F, Matsusaka T, Soga T, Rakugi H, Isaka Y. Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2011 ; 22 : 902-913.
- Isaka Y, Kimura T, Takabatake Y. The protective role of autophagy against aging and acute ischemic injury in kidney proximal tubular cells. *Autophagy* 2011 ; 7 : 1085-1087.
- Takahashi A, Kimura T, Takabatake Y, Namba T, Kaimori J, Kitamura H, Matsui I, Niimura F, Matsusaka T, Fujita N, Yoshimori T, Isaka Y, Rakugi H. Autophagy guards against cisplatin-induced acute kidney injury. *Am J Pathol* 2012 ; 180 : 517-525.
- Kimura T, Takahashi A, Takabatake Y, Namba T, Yamamoto T, Kaimori JY, 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* 2013 ; 9 : 1876-1886.
- 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* 2014 ; 25 : 2254-2266.
- Maejima I, Takahashi A, Omori H, Kimura T, Takabatake Y, Saitoh T, Yamamoto A, Hamasaki M, Noda T, Isaka Y, Yoshimori T. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J* 2013 ; 32 : 2336-2347.
- Takahashi A, Takabatake Y, Kimura T, Maejima I, Namba T, Yamamoto T, Matsuda J, Minami S, Kaimori JY, Matsui I, Matsusaka T, Niimura F, Yoshimori T, Isaka Y. Autophagy inhibits the accumulation of advanced glycation end products by promoting lysosomal biogenesis and function in the kidney proximal tubules. *Diabetes* 2017 ; 66 : 1359-1372.
- Yamamoto T, Takabatake Y, Kimura T, Takahashi A, Namba T, Matsuda J, Minami S, Kaimori JY, Matsui I, Kitamura H, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Isaka Y, Rakugi H. Time-dependent dysregulation of autophagy : implications in aging and mitochondrial homeostasis in the kidney proximal tubule. *Autophagy* 2016 ; 12 : 801.
- Takabatake Y, Kimura T, Takahashi A, Isaka Y. Autophagy and the kidney : health and disease. *Nephrol Dial Transplant* 2014 ; 29 : 1639-1647.
- Kimura T, Isaka Y, Yoshimori T. Autophagy and kidney inflammation. *Autophagy* 2017 ; 13 : 997-1003.
- 木村友則. [医学用語解説] オートファジー. 炎症と免疫 2018 ; 26 : 177-180.
- 木村友則. オートファジーと自然免疫応答. 最新医学 2017 ; 72 : 250-255.
- Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Isaka Y. Chloroquine in cancer therapy : a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res*

- 2013 ; 73 : 3-7.
18. Kimura T, Jain A, Choi S, Mandell MA, Schroder K, Johansen T, Deretic V. TRIM-mediated precision autophagy targets cytoplasmic regulators of innate immunity. *J Cell Biol* 2015 ; 210 : 973-989.
 19. Kimura T, Mandell M, Deretic V. Precision autophagy directed by receptor regulators - emerging examples within the TRIM family. *J Cell Sci* 2016 ; 129 : 881-891.
 20. Kimura T, Jia J, Kumar S, Choi SW, Gu Y, Mudd M, Dupont N, Jiang S, Peters R, Farzam F, Jain A, Lidke KA, Adams CM, Johansen T, Deretic V. Dedicated SNAREs and specialized TRIM cargo receptors mediate secretory autophagy. *EMBO J* 2017 ; 36 : 42-60.
 21. 木村友則. ライソファジー:TRIM によるダメージ認識とユビキチン化. *実験医学* 2017 ; 35 : 1818-1823.
 22. Kimura T, Hamase K, Miyoshi Y, Yamamoto R, Yasuda K, Mita M, Rakugi H, Hayashi T, Isaka Y. Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease. *Scientific Reports* 2016 ; 6 : 26137.
 23. Kimura T, Yasuda K, Yamamoto R, Soga T, Rakugi H, Hayashi T, Isaka Y. Identification of biomarkers for development of end-stage kidney disease in chronic kidney disease by metabolomic profiling. *Scientific Reports* 2016 ; 6 : 26138.
 24. Hamase K, Miyoshi Y, Ueno K, Han H, Hirano J, Morikawa A, Mita M, Kaneko T, Lindner W, Zaitso K. Simultaneous determination of hydrophilic amino acid enantiomers in mammalian tissues and physiological fluids applying a fully automated micro-two-dimensional high-performance liquid chromatographic concept. *J Chromatogr A* 2010 ; 1217 : 1056-1062.
 25. Kimura T. The Importance of chiral metabolomics. *Analytical Scientist* 2017 ; 53 : 16-17.