

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

# Calciprotein particle により尿細管上皮細胞に誘導される 細胞機能障害機構の解明

氏名 國重 莉奈

### 背景と研究目的

慢性腎臓病（CKD; Chronic kidney disease）とは、その原因に関わらず 3 カ月以上持続する腎障害または腎機能の低下を示す病態の総称であり、日本の成人の 8 人に 1 人が罹患していると考えられている。CKD の初期症状はほとんどないため早期発見が難しく、一度低下した腎機能を改善できる治療薬は存在していない。CKD が進行すると腎臓の線維化が起これば末期腎不全に至るが、そうした患者においては人工透析が必要不可欠となる。人工透析は患者の QOL を著しく低下させるだけでなく、国・個人に対する高額な医療費負担が社会的にも大きな問題となっている。

Calciprotein particle (CPP) とは、リン摂取量の増加や加齢により血中・原尿中のリン濃度が上昇した際に析出するリン酸カルシウムと血清タンパク質（主に、fetuin-A）の凝集体のことである。血中ではコロイド分子として分散している CPP は、食事で摂取したリンとカルシウムを骨へと運ぶ単体として生理的な機能を持つ一方で、老化や生活習慣病、慢性腎臓病とその合併症である血管石灰化の原因物質であることが明らかにされつつある。

これまでの CPP 研究は後期 CKD において見られる血中 CPP に集中しており、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞における CPP の細胞障害機構は調べられてきた一方、尿細管において生じた CPP が尿細管上皮細胞に傷害を与える可能性は見過ごされてきた。しかし、加齢によるネフロン数の減少やリン摂取量の増加をきっかけとし、ネフロン当たりのリン排泄量が増加すれば、結果として CPP が析出する可能性が高いことが理論的

に確かめられている。形成された CPP は尿細管障害を誘導することでより一層ネフロン数を減少させ、さらに CPP が析出しやすくなるという悪循環により CKD が進行している可能性がある。本研究では以上のような仮説の下、CPP が尿細管上皮細胞に与える「細胞障害機構の解明」を目指した。

CaPi 結晶が尿細管細胞に与える細胞毒性に関する先行研究は報告されているが、CPP を用いた同様の研究はいまだ行われていない。尿細管において fetuin-A が存在することを鑑みると、原尿中に析出した CaPi は速やかに CPP を形成すると考えられる。そのため、本研究では尿細管における状況をよりよく再現するために CaPi を血清含有培地中でインキュベートすることで得られた CPP を用いて検討を行った。

## 結果

### (1) CPP によりコレステロール代謝が攪乱される

蛍光標識 CPP を添加した培地で HK-2 細胞（ヒト腎近位尿細管上皮細胞）を培養したところ、蛍光標識 CPP は細胞膜に吸着した後にエンドサイトーシスされ、次第に細胞内に蓄積していく様子が観察された。後期エンドソーム/リソソーム（LELs）マーカーである LAMP2 に対する抗体を用いた蛍光抗体法や細胞内コレステロールを標識することのできる filipin を用いた同様の実験により、蛍光標識 CPP がコレステロールと共に細胞内の LELs において蓄積することが確認された。そこで、CPP による細胞内コレステロールの局在や量の時間変化を調べたところ、CPP を加えた約 6 時間後から細胞膜コレステロールの減少と LELs におけるコレステロールの蓄積が見られた。

蛍光標識コレステロールである TopFluor Cholesterol (Tf-Chol) を用いて生細胞の細胞膜をパルス標識し、その標識コレステロールを蛍光顕微鏡で追跡した実験により、CPP 添加条件においては Tf-Chol が核付近の後期エンドソーム/リソソームへの蓄積がわずかに増加し、Tf-Chol の細胞外排出に遅延が見られた。

また、生化学的手法の結果、CPP にはコレステロールが吸着している一方で、CPP を添加し 24 時間培養した細胞では非添加条件と比べて細胞全体のコレステロール量は増加しないことがわかった。以上のことから、CPP にはコレステロールが吸着しているが、LELs に蓄積したコレステロールは細胞外の培地由来のコレステロールではなく、主に細胞膜に局在すると言われるコレステロールがリソソームへと局在を変化させている影響が大きいと考えられた。

細胞膜コレステロールを除去した細胞では膜傷害を受けた際に膜修復が十分に行われず、損傷細胞が増加することが知られているため、細胞膜コレステロールの減少が確認された CPP 添加条件の細胞においても同様の現象が見られるかを確かめる実験を行った。その結果、CPP を添加して 12 時間培養した細胞においては CPP 非添加条件の細胞と比べてガラスビーズによる細胞膜の物理的損傷後に細胞死を起こす細胞がより多く見られた。

## (2) CPP によりリソソーム・オートファジー経路が攪乱される

CPP が LELs に蓄積するという観察結果を受け、CPP が LELs に与える影響を顕微鏡画像の解析により詳細に調べたところ、CPP により LELs 小胞が膨張していることがわかった。また、酸性コンパートメントに集積することでリソソーム pH の指標となる LysoTracker により細胞を染色したところ、CPP 添加により LysoTracker の蛍光強度の低下が見られ、LELs における pH 上昇が示唆された。そのため、次にリソソーム pH の絶対定量が可能な新規レシオ型 pH 感受性蛍光プローブを用い、CPP による LELs 内腔の pH 上昇に関してさらなる検証を行った。その結果、元の LELs 内腔 pH が平均 5.48 であったところ、CPP 添加後 6 時間培養した細胞では、pH が平均 6.44 であり、約 1.0 pH が上昇することが確認された。また、蛍光標識 CPP を用いた同様の実験により、CPP を多く取り込んだ LELs ほど pH が上昇することが示された。

多くの毒性を有するナノ粒子は、細胞にエンドサイトーシスされるとリソソームの膜を損傷させることでリソソーム pH の上昇や cathepsin の漏出、活性酸素種 (ROS) の産生を引き起こし、細胞毒性を発揮することが知られている。こうしたリソソーム膜の透過性亢進 (LMP; lysosomal membrane permeabilization) が CPP により引き起こされるかどうかを LMP マーカーである galectin-3 に対する抗体を用いた蛍光抗体法により調べた。その結果、CPP は 1~24 時間のいずれの培養時間においても LMP を引き起こさず、また DCFDA アッセイにより ROS の産生も引き起こさないことが確認された。

リソソームストレス応答性転写因子 TFEB および TFE3 は、リソソームの pH 上昇をはじめとするリソソームストレス条件下において脱リン酸化され核移行することが知られている。そこで、CPP 添加により TFEB/3 経路が活性化しているかどうか調べたところ、ウェスタンブロットにより TFEB/3 の脱リン酸化が、蛍光抗体法により核移行が確認できた。さらに、TFEB/3 のターゲット遺伝子である CTSD, MCOLN1, SQSTM1 といったリソソーム・オートファジー関連タンパク質の発現上昇が qPCR により確かめられた。また、TFEB/3 をリン酸化することが知られる mTOR が、CPP 添加によりリソソーム膜表面から離脱している様子が観察され、このことが mTOR の活性低下と TFEB/3 のリン酸化抑制につながることを示唆された。

CPP により LELs 内腔の pH が約 1.0 上昇することを受け、次にリソソーム内加水分解酵素の活性低下が引き起こされているかどうかを、Magic Red アッセイおよび DQ-Red BSA を用いて調べた。これらのプローブは加水分解酵素により切断されることにより強い蛍光を発する。いずれの手法においても CPP 添加条件では添加しなかった条件と比較して蛍光が弱く、加水分解酵素の活性低下が示された。

リソソームにおける加水分解酵素活性はオートファジー機能にとっても重要であるため、次に CPP がオートファジーフラックス (オートファゴソームがリソソームと融合し、内容物を分解するという流れ) を阻害するかどうか調べた。その結果、オートファジーフラックスが阻害された場合に見られる p62、LC3-II の蓄積が、ウェスタンブロットにより確認された。さらに、オートファジーフラックスの阻害をより正確に判定することができる tfLC3 (tandem fluorescence tagged LC3) というプローブを用いた実験により、確かに CPP 添加細胞のオートファゴソーム/オートリソソームにおいては酸性化が正常に行われないことがわかった。

### (3) CPP を取り込んだ細胞は $H_2O_2$ による酸化ストレス負荷に対して脆弱になる

生体内において近位尿細管上皮細胞は虚血再灌流障害やシスプラチンをはじめとする腎毒性のある薬剤など様々な傷害にさらされやすい。そういったストレス条件下において、オートファジーは傷害を受けたタンパク質や細胞内小器官を消化することで細胞を保護する作用がある。CPP 自体は HK-2 細胞に対して僅かな細胞毒性しか有していないことが LDH アッセイや Annexin V/PI によるアポトーシスアッセイ、PI 染色後の顕微鏡画像解析により明らかになったが、CPP により引き起こされたオートファジーフラックス阻害により細胞が酸化ストレスに対して脆弱化している可能性が考えられた。そこで、CPP を添加し 12 時間培養した細胞に対して  $H_2O_2$  を用いた酸化ストレス負荷を行ったところ、CPP 非添加条件と比較してより多くの細胞に細胞死が見られた。

## 考察と結論

本研究の結果から、CPP が近位尿細管細胞において引き起こすと考えられる細胞毒性メカニズムを下図の模式図に示した。まず、CPP はカベオラ依存的エンドサイトーシスおよびマクロピノサイトーシスにより細胞に取り込まれる (A)。その後、LELs における酸性環境下で溶解した CPP は LELs の膨張と pH 上昇を引き起こし、加水分解酵素の活性を低下させる (B)。CPP によるリソソーム機能不全は TFEB/3 経路のリソソームストレス応答を引き起こし、リソソーム・オートファジー関連遺伝子の発現を誘導するが、CPP がリソソーム内に存在する限りリソソームストレス状態は解消されないと考えられる (C)。CPP によるリソソーム機能不全はオートファジーフラックスの阻害を引き起こし、HK-2 細胞を酸化ストレスに対して脆弱化させる (D)。一方で CPP は細胞膜コレステロールを減少させ、細胞膜を物理的ストレスに対して脆弱化させる (E)。

以上のように CPP は、多くの細胞毒性を持つナノ粒子とは異なり LMP や ROS 産生を引き起こさず、CPP により誘導される細胞死も限定的であるが、細胞膜への物理的ストレスや酸化ストレスに対して細胞を脆弱化することがわかった。尿細管においては上記の機構により CPP がネフロン数の減少に寄与し、CKD の発症や進展の一因となると考えられる。

