

博士論文（要約）

Calcioprotein 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

國重 莉奈

目次

—略語表—	4
第 1 章 序論	7
1-1. 慢性腎臓病 (CKD) について	8
1-2. Calciprotein particle (CPP) について	9
1-3. CaPi と CPP における物性と細胞毒性の違い	11
1-4. リソソーム・オートファジー系について	13
1-5. コレステロールについて	19
1-6. 本研究の目的	22
第 2 章 方法	23
2-1. 試薬	24
2-2. 細胞培養	27
2-3. Calciprotein Particle (CPP) の作製	27
2-4. ウェスタンブロッティング	28
2-5. 蛍光抗体法	29
2-6. 画像解析	29
2-7. CPP のエンドサイトーシス機構アッセイ	30
2-8. トランスフェクションによる遺伝子導入	30
2-9. ガラスビーズによる細胞膜傷害実験	31
2-10. レシオ型 pH 感受性蛍光プローブを用いた LELs の pH 測定	31
2-11. 細胞内 ROS 検出	32
2-12. リソソーム加水分解酵素活性の検出	32
2-13. オートファジーフラックスアッセイ	33
2-14. 細胞増殖/細胞毒性アッセイ	33
2-15. Annexin V によるアポトーシスアッセイ	34
2-16. H ₂ O ₂ 誘導性細胞死アッセイ	34
2-17. コレステロール定量	35
2-18. コレステロール輸送アッセイ	35
2-19. トランスフェリン リサイクリングアッセイ	36
2-20. RNA 抽出と定量的 RT-PCR による細胞内 mRNA 量の測定	36

2-21.	Coomassie brilliant blue 染色 (CBB 染色) による CPP に含まれるタンパク質の解析.....	37
2-22.	透過型電子顕微鏡法による CPP の観察	38
2-23.	統計解析	38
第 3 章	結果.....	39
3-1.	本研究で用いた CPP の特性評価	40
3-2.	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	41
3-3.	CPP は外来性コレステロールの細胞内代謝に僅かながら影響を与える	42
3-4.	CPP を取り込んだ細胞は膜障害に対して脆弱になる	43
3-5.	CPP の細胞内取り込みは LELs の pH を上昇させ、膨潤を引き起こす	44
3-6.	CPP により LELs 内腔の pH が約 1.0 上昇する.....	46
3-7.	CPP はリソソーム膜透過性亢進 (LMP) や ROS 発生を引き起こさない.....	46
3-8.	CPP によりリソソームストレス応答性転写因子 TFEB および TFE3 が活性化 する.....	47
3-9.	CPP によりリソソーム内加水分解酵素の活性が低下する	49
3-10.	CPP によるリソソーム機能低下はオートファジーフラックスの阻害を引き 起こす.....	50
3-11.	CPP により非アポトーシス性細胞死が誘導される	51
3-12.	CPP を取り込んだ細胞は H ₂ O ₂ による酸化ストレス負荷に対して脆弱になる	52
第 4 章	考察.....	54
4-1.	CaPi と CPP の違いについて.....	55
4-2.	CPP によるリソソーム・オートファジー経路の攪乱について	57
4-3.	CPP と慢性腎臓病、老化を結ぶリソソーム、オートファジー機能不全.....	58
4-4.	CPP によるコレステロール代謝の攪乱について	59
4-5.	本研究から導出された課題と今後の展望.....	61
4-6.	本研究のまとめ	62
— 謝辞 —	64
第 5 章	参考文献	65
第 6 章	図表.....	76

—略語表—

ABCA1: ATP-binding cassette subfamily A member 1
ABCG1: ATP-binding cassette subfamily G member 1
ACAT: acyl-CoA cholesterol acyltransferase
ALS: amyotrophic lateral sclerosis
Atg4: autophagy-related 4
ATP6V1B2: ATPase H⁺ transporting V1 subunit B2
BafA1: bafilomycin A1
BMP-2: bone morphogenetic protein-2
BSA: bovine serum albumin
CaPi: calcium phosphate precipitates
CBB: Coomassie brilliant blue
CIAP: calf intestinal alkaline phosphatase
CKD: chronic kidney disease (慢性腎臓病)
CLEAR: coordinated lysosomal expression and regulation
CPP: calciprotein particle
CPZ: chlorpromazine
CTSD: cathepsin D
DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP: enhanced green fluorescent protein
EIPA: 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride
ER: endoplasmic reticulum
ESCRT: endosomal sorting complexes required for transport
ESRD: end stage renal disease
FBS: fetal bovine serum
FGF23: fibroblast growth factor 23
FITC: fluorescein isothiocyanate
GFR: glomerular filtration rate (糸球体濾過量)
HRP: horseradish peroxidase
ICP-MS: inductively coupled plasma mass spectrometry

IRI: ischaemia-reperfusion injury

LAMP1: lysosome-associated membrane protein 1

LAMP2: lysosome-associated membrane protein 2

LC3: microtubule-associated protein light chain 3

LDGD: lysosome-dependent cell death

LDH: lactate dehydrogenase

LDL: low density lipoprotein

LELs: late endosomes/lysosomes

LLME: L-leucyl-L-leucine methyl ester

LMP: lysosomal membrane permeabilization (リソソーム膜透過性亢進)

LSD: lysosomal storage disease

LXR: liver X receptor

MAP1LC3B: microtubule associated protein 1 light chain 3 Beta

MCOLN1: mucolipin 1

MIP: maximum intensity projection

MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization

MPR: mannose 6-phosphate receptor

MSDH: O-methyl-serine dodecylamide hydrochloride

mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1

MBCD: methyl-beta-cyclodextrin

NADH: nicotinamide adenine dinucleotide, reduced

NaPi: sodium phosphate

NLRP3: Nod-like receptor pyrin domain containing 3

NPC1: Niemann-Pick disease type C1

NPC2: Niemann-Pick disease type C2

PARP: poly (ADP-ribose) polymerase

PBS: phosphate buffered saline

PE: phosphatidylethanolamine

PFA: paraformaldehyde

PI: propidium iodide

PTH: parathyroid hormone

PVDF: polyvinylidene difluoride

RFP: red fluorescent protein

RIPA: radio-immunoprecipitation assay buffer
ROI: region of interest
ROS: reactive oxygen species
RUNX2: runt-related transcription factor 2
SCAP: SREBP cleavage-activated protein
SDS-PAGE: SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SQSTM1: sequestosome 1
SREBP: sterol regulatory element-binding protein
TBST: tris buffered saline with Tween 20
TEM: transmission electron microscope
TFE3: transcription factor E3
TFEB: transcription factor EB
tfLC3: tandem fluorescence tagged LC3
TGN: trans-Golgi network
TNF- α : tumor necrosis factor α
v-ATPase: vacuolar ATPase
ZO-1: zonula occludens-1

第1章 序論

1-1. 慢性腎臓病（CKD）について

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（一般社団法人日本腎臓学会, 2012）。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り末期腎不全（ESRD; End Stage Renal Disease）に至るが、そうした患者においては人工透析や腎移植が必要となる。人工透析は患者の QOL (Quality of Life) 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。

腎臓は血液をろ過し老廃物を尿として排出するだけでなく、尿細管において水や電解質の再吸収を行うことで体内の恒常性の維持にも重要な役割を果たす。腎臓はネフロンと呼ばれる、糸球体と尿細管からなる機能単位でできている（図 A）。糸球体では血管から流れ込んだ血液のうち血球やタンパク質といった大きな分子以外の血中成分と水分がろ過され、原尿として近位尿細管に流れ込む。原尿には老廃物以外に、アミノ酸やグルコースなどの栄養素や、ナトリウム、カリウム、リン、マグネシウムといった様々な電解質が含まれているため、尿細管においてはそういった人体に必要な成分の再吸収が行われる。

リンは、細胞膜リン脂質や DNA などの細胞構成成分、ATP などの高エネルギーリン酸化化合物などに含まれ、生命に必須の栄養素である。血清リン濃度の調節において、腸管におけるリンの吸収よりも腎臓におけるリンの排泄が大きな役割を果たす（図 B）（Kuro-O, 2013）。副甲状腺ホルモン（PTH; parathyroid hormone）と線維芽細胞増殖因子 23（FGF23; Fibroblast growth factor 23）は尿細管におけるリンの再吸収を抑制することでリン排泄を増加させる重要なホルモンである（Akiyama et al., 2020; Kuro-O, 2013）。CKD では、糸球体濾過量（GFR ; Glomerular Filtration Rate）が徐々に低下し、それに伴ってリン排泄能が低下する。早期 CKD においては FGF23 によりネフロンあたりのリン排泄量を増加させることで血中リン濃度が維持されるが、CKD の進行に伴ってやがてこの代償機構が破綻し、高リン血症を呈するようになる。特に透析患者において高リン血症は血管石灰化を促進し、心血管疾患などによる死亡率を上昇させることが知られている（倉林, 2013）。

1-2. Calciprotein particle (CPP) について

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 (CaPi) と血清タンパク質 (主に、fetuin-A) の凝集体のことである (図 C)。哺乳類の血清中のリン酸とカルシウムイオン濃度は過飽和の状態にあり、必要な場所 (骨など) において即座に析出する状態に維持されている一方、必要な場所以外では fetuin-A が吸着することで結晶が大きく成長するのを防いでいる。そのようにして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 (Miura et al., 2018)。

1-2-1. 血中 CPP と CKD

以前より、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞において細胞外のリン濃度を高めることにより細胞毒性が引き起こされることが知られていた。血管内皮細胞においてはリンを培地に加えることにより酸化ストレスや細胞死が誘導され (Di Marco et al., 2008; Kuro-o, 2014; Shuto et al., 2009)、血管平滑筋細胞においては骨芽細胞関連遺伝子である RUNX2 (runt-related transcription factor 2) や osteopontin の誘導を伴う骨芽細胞様形質転換が確認されている (Jono et al., 2000; Kuro-o, 2014; Steitz et al., 2001)。これらの先行研究では、リンとカルシウムがそれぞれ約 1 mM と 2 mM 含まれた飽和状態に近い培地に対してさらにリンを加えていることから、CaPi (calcium phosphate precipitates) の析出および fetuin-A を含む血清中では CPP が形成されていた可能性が高い (Kuro-o, 2014)。そのため、上記で見られたリンの添加により引き起こされた現象はリンそのものというよりも、CPP によるものである可能性があった (Kuro-o, 2014)。この仮説を支持するいくつかの実験結果が既に報告されている。培地にリンを添加することにより CPP を析出させ、遠心後のペレットを血管平滑筋細胞へ作用させた際に見られた BMP-2 (bone morphogenetic protein-2) と osteopontin といった骨芽細胞関連遺伝子の発現上昇が、遠心後の上清 (高濃度リン培地) や結晶形成を阻害するピロリン酸を添加した場合には見られないという報告がある (Sage et al., 2011)。また CKD 患者においても、血中における CPP の出来やすさを測定した研究において CPP が出来やすい患者

ほど生命予後が悪いという報告や (Smith et al., 2014)、血中 CPP レベルが冠動脈石灰化スコアと相関することを示す実験結果も報告されている (Hamano et al., 2010)。

1-2-2. 腎臓における高リン濃度と CPP

上述のように、心血管の石灰化は CKD 患者において広く見られ、心血管疾患は CKD 患者における主要な死因となっていることから (Coresh et al., 2004; Hu et al., 2013)、これまでの CPP 研究は主に後期 CKD において見られる血中 CPP に集中してきた。一方で、腎臓においてもリンの過剰摂取が腎毒性を引き起こすことは実験動物において確かめられている (Haut et al., 1980; Mackay & Oliver, 1935)。ヒトにおいても、腸管洗浄の用途で経口リン酸ナトリウム製剤を使用した際に急性腎障害とそれに引き続く CKD が生じるリスクが知られている (Hu et al., 2013)。これらは、CKD の進行によりリン恒常性が破綻するだけでなく、リンの過剰摂取が新たに CKD を引き起こす可能性を示唆している。腎臓における組織学的な障害は、ネフロンあたりの推定リン排泄量が一日あたり 1.0 μg を超過する日が数週間続くことにより引き起こされるが、ネフロン数が減少している CKD 患者や高齢者においては、このレベルを超過することは十分起こり得ると考えられている (Hu et al., 2013)。このことから、一旦腎障害や加齢により機能的なネフロン数が減少すると、ネフロンあたりのリン排泄量を増加させる必要が生じ、尿細管内腔におけるリン濃度の上昇とさらなる腎障害が生じるという悪循環に陥ることが考えられる。

リン濃度の上昇により腎障害が引き起こされるメカニズムは未だ明らかになっていないが、尿細管内腔における CPP の形成が原因となっている可能性が提唱されている (図 D)。腎障害がリンではなく CPP により引き起こされていることを示唆する *in vivo* の研究が報告されている。ビスホスホネートは CaPi 形成もしくはアモルファスから結晶性の CaPi への成熟を阻害することが知られているが、高リン食と共にビスホスホネートをラットに与えると、腎障害が阻害されたという報告がある (Haut et al., 1980)。

CPP が実際に尿細管において生じる可能性は古くから論じられている。1978 年に Bank らは微小穿刺法によりラットの尿細管の管腔内液のリン濃度を直接測定する実験を行っており、高リン食を与えたラットの近位尿細管において CPP が析出すると考えられる高濃度のリンとカルシウムを検出している。また、腎垂全摘ラット (3/4 腎摘) においても残存した腎臓により血清リン濃度は保たれた一方で、尿細管においては高リン濃度が検出されている (Bank et

al., 1978)。このことは、高リン血症が起こる前の段階の CKD 患者において、すでに CPP による腎障害が起こっている可能性を示唆している。リンを過剰摂取しても、腎臓でリン排泄を行うことでリンの恒常性が保たれるため、腎臓の機能が決定的に損なわれるまでは高リン血症を発症することはない。実際に、高リン食を与えたラットにおいて、血清のリン濃度の上昇を伴わない尿細管障害が見られている (Haut et al., 1980; Kuro-O, 2013)。早期 CKD 患者においても、血中においては通常のリン濃度が保たれる代償として、尿細管においてリン濃度が上昇し CPP による腎障害が生じている可能性がある。

In vitro (培養細胞系) では、CPP が尿細管上皮細胞に与える影響については未だに報告されていないが、関連研究として CaPi 結晶の一種である brushite を用いて細胞毒性を調べた研究が 2003 年に Aihara らにより報告されている (Aihara et al., 2003)。この研究は腎臓結石の初期にできる結晶を想定しており、市販の brushite を使用しているため、本研究における CPP とは物性が異なると考えられる。Aihara らによると、brushite はブタの近位尿細管上皮細胞においてリソソーム膜透過性亢進 (LMP; lysosomal membrane permeabilization、「1-4-5. リソソーム膜透過性亢進 (LMP)」を参照) と活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) の発生を伴う細胞毒性を引き起こす。Brushite と CPP とでは物性および細胞毒性のメカニズムも異なることは想定されるが、CPP においても brushite 同様、エンドサイトーシスされた先のリソソームにおいて機能不全を引き起こす可能性は十分に考えられるが、その実験的検証は示されていない。

1-3. CaPi と CPP における物性と細胞毒性の違い

1-3-1. CaPi による細胞毒性

CaPi は医療用のインプラントや DNA デリバリー、ドラッグデリバリーの文脈でも研究が行われてきており、多くの in vitro 実験 (培養細胞系) により、CaPi ナノ粒子の細胞毒性が示されてきた。細胞毒性のメカニズムとしては、CaPi が細胞に取り込まれた後、リソソームの酸性環境において速やかに溶解し、LMP を伴うネクローシスを引き起こす、という仮説が提唱されている (Z. Liu et al., 2014)。また、CaPi によるエンドソームへのダメージがオートファジーを誘導するといった報告 (Chen et al., 2014) や、オートファジーフラックスを阻害す

るという報告 (Sarkar et al., 2009)もある。以上のように、brushite を用いた Aihara らの先行研究 (Aihara et al., 2003)を含め、それぞれ使用している CaPi の物性は異なるが、共通してエンドソーム・リソソーム経路の攪乱が見られている。

1-3-2. CPP の物性と細胞毒性

血中など血清タンパク質の fetuin-A 存在下では CaPi が析出しても fetuin-A が素早く吸着しコロイドを形成することで結晶が大きく成長するのを防いでいる。そのため、fetuin-A を欠損させたマウスでは様々な臓器において激しい異所的石灰化が見られる (Schäfer et al., 2003)。In vitro でも、fetuin-A が CaPi による毒性を抑制することは血管平滑筋細胞やマクロファージにおいて報告されている (Ewence et al., 2008; Smith et al., 2013)。Fetuin-A が近位尿細管管腔に存在することが確かめられていることから (Matsui et al., 2013)、原尿中で析出した CaPi は CPP を形成すると考えられる。Fetuin-A による保護的な効果を鑑みると、CPP は近位尿細管上皮細胞に対し、CaPi について報告されているほどの細胞毒性を持たない可能性が高いが、それでも一定の細胞毒性を発揮する可能性がある。本研究では、原尿中で生じる可能性の高い CPP をより良く再現するため、CaPi (析出物)を血清含有培地中で培養することで得られる CPP を使用した。

CPP の物性に関する in vitro の解析結果から、現在では以下のような形成・成熟過程が提唱されている (図 C) (Heiss et al., 2003; Jahnen-Dechent & Smith, 2020)。高濃度のリンとカルシウム存在下では~0.9 nm 程度の CaPi イオンクラスターが作られ、そこに fetuin-A が吸着することで~9 nm 程度の CPP モノマー (CPM; calciprotein monomer) が形成される。CPP モノマーが複数凝集し、30~100 nm の球状の primary CPP が形成される。Primary CPP に含まれる CaPi はアモルファス状であるが、時間経過と共に相転移しヒドロキシアパタイト様の CaPi 結晶を含む secondary CPP に成熟する。Secondary CPP は楕円形をしており、長軸が~500 nm 程度の大きさである。

血中においては食後などに一時的に高リン濃度になり CPP が生じたとしても、通常は素早く除去されるため、ほとんどが CPM や primary CPP として存在し、形成に時間がかかる secondary CPP が生じることは稀である。血中 CPP の除去機構としては、primary CPP は肝類洞壁内皮細胞によって、secondary CPP は肝臓や脾臓に存在するマクロファージによって除去されると考えられている (Köppert et al., 2018)。Primary CPP と secondary CPP と

では細胞に与える影響にも違いがあることが報告されている。血管平滑筋細胞への secondary CPP の添加により TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) の誘導を介した石灰化が見られた一方で primary CPP では石灰化が見られなかったことが示されている (Aghagolzadeh et al., 2016)。一方で、マクロファージにおいては secondary CPP と比較して primary CPP の方が強く炎症を誘導したことが報告されている (Köppert et al., 2018)。以上のように、CaPi と CPP、また CPP の中でも primary CPP と secondary CPP とでは細胞への作用が異なることが示されており、in vitro の実験においてはできる限り生体内と似た CPP を用いることが重要である。

1-4. リソソーム・オートファジー系について

CPP は、エンドサイトーシスされた先のリソソーム、さらにはオートファジーにおいて機能不全を引き起こすことが予想される。以下に、リソソーム・オートファジー系とその機能不全について概説する。

1-4-1. リソソーム

リソソームはその小胞内に加水分解酵素を含み、酸性 pH により様々な基質の分解を行う細胞内小器官である。細胞外からエンドサイトーシスした基質を分解するだけでなく、細胞内の生体分子をアミノ酸や糖、脂質といった再利用可能な形に分解する働きがある。また、リソソームは様々な細胞機能において重要な働きをしており、細胞内外の基質の分解の他にもオートファジー (Settembre et al., 2011) やエキソサイトーシス (Medina et al., 2011)、細胞膜修復 (Reddy et al., 2001) に関わることが知られている。

1-4-2. リソソーム加水分解酵素

多くのリソソーム加水分解酵素は酸性 (pH4~5) において至適 pH を持つが、リソソームにおいては膜上にプロトンポンプ v-ATPase (Vacuolar ATPase) が存在しており、ATP をエネルギー源としてプロトンのリソソーム内腔に運ぶことで酸性環境が保たれている (図 E)。Cathepsin は代表的なリソソーム加水分解酵素であり、小胞体上 (ER; endoplasmic

reticulum) のリソソームにおいて不活性型の前駆体として合成され、生合成経路で様々な修飾や切断を受けた後、最終的にリソソームの酸性 pH において切断されることで活性型の cathepsin に成熟する。ヒトでは現在 15 種の cathepsin が知られており、それぞれ基質タンパク質に対して異なる切断特異性をもつ (Ketterer et al., 2017)。リソソームにおける加水分解酵素活性を調べる簡便な手法として、各種 cathepsin の基質ペプチドに蛍光が付加されたプローブが広く使われている。このプローブは、cathepsin に切断されることで強い蛍光を発するため、リソソーム内腔の pH 上昇などによる加水分解酵素活性の阻害を検出することができる。

リソソーム膜は 8 nm 程度の厚さがあり、LAMP1 (lysosome-associated membrane protein 1) や LAMP2 (lysosome-associated membrane protein 2) といったタンパク質がその限界膜上に多く存在している。こうしたタンパク質は高度にグリコシル化されており、リソソーム内の加水分解酵素により分解されにくくなっている (Wang, Gómez-Sintes, et al., 2018)。

1-4-3. リソソームの生合成

リソソーム新生の経路の一つは、エンドソームが徐々に成熟し、リソソームタンパク質がターゲットされて運ばれてくるという経路である。新しく合成された加水分解酵素はトランスゴルジネットワーク (TGN; trans-Golgi network) においてはマンノース-6-リン酸受容体 (MPR; mannose 6-phosphate receptor) に結合しているが、そこから pH が低いエンドソームに運ばれると受容体から離れ、リソソームへと運ばれる。リソソームは他にもオートファジーを終えたオートリソソームからリソソーム膜タンパクを含むチューブ状の構造を突出させ、プロトリソソーム (proto-lysosome) として絞り出される (図 F)。プロトリソソームは徐々に内腔にリソソームタンパク質を獲得し、酸性化することで新生リソソームができる (Wang, Gómez-Sintes, et al., 2018)。

TFEB (transcription Factor EB) はリソソーム生合成やオートファジーを司るマスター制御因子であり、多くのリソソーム関連遺伝子のプロモーター領域に存在する CLEAR 配列 (coordinated lysosomal expression and regulation) に結合し遺伝子発現を誘導する (図 E) (Palmieri et al., 2011)。TFEB を過剰発現した細胞ではリソソーム酵素やリソソーム膜上のタンパク質の発現上昇とともにリソソームの数が増加し、それに伴ってリソソーム基質であるグリコサミノグリカンやオートファジーの基質であるタンパク凝集体を分解するキャパシテ

の増加が見られる (Palmieri et al., 2011; Peskin et al., 2009)。さらに、TFEB 過剰発現はオートファジー関連遺伝子の発現上昇とオートファジー誘導することや (Settembre et al., 2011)、リソソームのエキソサイトーシスを誘導する (Medina et al., 2011)ことも報告されている。

TFEBは定常状態ではmTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) によるリン酸化を受け、14-3-3 タンパク質と結合した状態で細胞質に留まっているが、栄養飢餓やリソソームの pH 上昇をはじめとするリソソームストレス条件下では脱リン酸化され、14-3-3 タンパク質と解離し核移行することが知られている (図 E)。

TFEB のリン酸化を担う mTORC1 はリソソーム膜表面に局在し活性化状態にあるが、リソソームストレス環境においてはリソソーム膜表面から離脱し不活性化する (Fedele & Proud, 2020)。TFEB の脱リン酸化は calcineurin によって行われており、calcineurin はリソソーム内のカルシウムが mucolipin 1 (MCOLN1)を介して細胞質に流出することにより活性化する (Medina et al., 2015)。核移行した TFEB はオートファジーやリソソーム合成関連遺伝子の発現を誘導し、それによりリソソームストレス状態の解消に寄与すると考えられている。TFE3 (transcription Factor E3) は TFEB と同じ MiT ファミリー (microphthalmia transcription factor)に属しており、過剰発現により転写されるターゲット遺伝子は TFEB と類似していることから、似た機能を持つと考えられている (Martina et al., 2014)。TFE3 においても、栄養状態や mTORC1 活性、Rag GTPase や 14-3-3 タンパク質との結合状態により核・細胞質間の局在が制御されている (Martina et al., 2014)。

1-4-4. リソソーム機能不全

リソソームの機能は多岐にわたっており、その機能不全は細胞の恒常性の攪乱をもたらす。リソソーム機能不全は様々な病態と結び付けられており、その主な例としてはリソソーム蓄積症 (LSD; lysosomal storage disease)、神経変性疾患、自己免疫疾患や癌などが挙げられる。特徴的な変化としては、リソソーム酵素の発現量・活性の変化、リソソームのサイズや数、pH や細胞内局在、運動性、リソソーム膜組成の変化などがある。リソソーム病は、リソソーム酵素などの遺伝子に変異が入ることにより生じ、リソソームで分解されるはずの基質が分解できずに蓄積するといった特徴的な代謝障害が見られる。

1-4-5. リソソーム膜透過性亢進 (LMP)

リソソーム膜透過性亢進 (LMP; lysosomal membrane permeabilization) はリソソーム膜への傷害によりリソソームの内容物が流出する現象のことを指す。LMP を引き起こす要因としては、リソソームに集積する性質を持つ薬剤 (lysosomotropic agent) のうち界面活性剤のような働きをするものや、浸透圧膨張を起こすもの、または活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) などが知られている (Boya, 2012)。Lysosomotropic agent の多くは膜を透過してリソソームのような酸性コンパートメント内に到達した後、プロトン化され膜透過性が減少することでリソソーム内に蓄積する。Lysosomotropic agent のうちアミンを含むものは、プロトンスポンジ効果と呼ばれる作用によりリソソームの膨張を引き起こすと考えられている (Wang, Gómez-Sintes, et al., 2018)。非プロトン化アミンがリソソーム内に蓄積するに従ってプロトンを吸着させるため、リソソーム内により多くのプロトンが汲み上げられ、それと同時に Cl^- (塩化物イオン) と水が流入する。膨張したリソソームの機能は低下していると考えられ、リソソーム蓄積症 (LSD)、神経変性疾患などにも特徴的に見られる (de Araujo et al., 2020)。

大規模な LMP が生じると細胞質の酸性化や細胞構成成分の無分別な分解が起こり、ネクローシスに至る。一方で、部分的な LMP が生じると cathepsin が細胞質に漏れ出し、ミトコンドリア外膜透過性 (MOMP; mitochondrial outer membrane permeabilization) とそれに引き続く caspase 活性化、最終的にアポトーシスが引き起こされる。ナノ粒子などが直接 ROS を発生させ、ROS が原因となって LMP が生じる場合もあるが、LMP が原因となって漏出した cathepsin によりミトコンドリアが損傷を受け、二次的に ROS が産生する場合もあるため、それらを区別することが重要である (Wang, Salvati, et al., 2018)。アポトーシス以外の細胞死として、cathepsin の細胞質への放出によるリソソーム依存的細胞死 (LDCD; lysosome-dependent cell death)、cathepsin の放出と ROS の発生の組み合わせによりインフラマソームが活性化することによるパイロトーシス、鉄の放出と ROS の組み合わせによりフェロトーシスが引き起こされる可能性も提唱されている (Wang, Gómez-Sintes, et al., 2018)。

LMP を検出する手法としては、cathepsin などリソソーム酵素の細胞質への漏出を指標とする手法、LysoTracker や Acridine Orange などリソソームに集積する蛍光色素を取り込ませ、細胞質への漏出を指標とする手法、蛍光付加デキストランをリソソームに取り込ませ、細

胞質への漏出を指標とする手法、galectin のリソソームへの移行を指標とする手法 (galectin 斑点アッセイ)、そして ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) 複合体のリソソームへのリクルートを指標とする手法がある。これらの中では galectin 斑点アッセイは cathepsin 放出を指標とする手法と比べ、早期の LMP を高感度に検出できると考えられている (Aits et al., 2015)。Galectin は通常は細胞質に拡散しているが、リソソーム膜の透過性が亢進している箇所においては、リソソーム内腔に存在する β -ガラクトシドが細胞質側に露出されるため、そこに β -ガラクトシド結合能を持つ galectin がリクルートされる。Galectin は損傷を受けたリソソームがオートファジーにより消化されるリソファジーの際のセンサーとして働くと考えられている (Skowyra et al., 2018)。一方、より小規模な LMP、つまりプロトン透過させる程度の小さな孔が空いた場合はリソファジーではなく、ESCRT 複合体による修復が行われることが近年明らかになった (Skowyra et al., 2018)。

1-4-6. オートファジー

オートファジー (マクロオートファジー) においては、隔離膜が細胞質中のタンパク質やオルガネラの一部を取り囲みオートファゴソームを形成した後、リソソームと融合しオートリソソームとなることで内容物を分解する (図 F)。そうすることで、飢餓状態などの際に細胞質の一部をランダムに分解し栄養源を確保したり、酸化ストレスを受けた際に損傷したタンパク質やオルガネラを特異的に分解しタンパク質やオルガネラの品質管理を行う (Mizushima & Komatsu, 2011)。

オートファジーのマーカーとして広く用いられている LC3 は、前駆体として翻訳された後、速やかに C 末端のペプチドが Atg4 (autophagy-related 4) によって切断され、細胞質において拡散する。この状態は LC3-I と呼ばれ、その後フォスファチジルエタノールアミン (PE; phosphatidylethanolamine) に共有結合し隔離膜・オートファゴソーム膜に局在できるようになった状態は LC3-II と呼ばれる (図 F)。ウェスタンブロット解析においては PE 結合型の LC3-II の方が移動度が大きいため、LC3-I と区別して検出することができる。LC3-II の量はオートファゴソーム・オートリソソームの数と相関するため、その増減によってオートファジーの誘導や抑制を評価することができる。また、LC3 は顕微鏡解析においてもオートファゴソームのマーカーとして用いられる。また、LC3 をオートファゴソームのマーカーとして用いた顕微鏡解析によってもオートファジー活性を評価することができる。ただし、ウェスタ

ンブロット解析における LC3-II の増加あるいは顕微鏡解析における LC3 ポジティブな小胞の増加が必ずしもオートファジー誘導を意味しないという点には注意する必要がある。なぜなら、リソソーム pH の上昇などが原因となりオートリソソームにおける分解が阻害されている場合（オートファジーフラックスが阻害された状況）においても、同様の現象が見られるためである。二重膜構造のオートファゴソームの内膜側の LC3-II は、オートファジーフラックスが通常の場合は基質とともに分解されるが、オートファジーフラックスが阻害された状況においては蓄積する。そのため、結果を正しく解釈するには別の手法によりオートファジーフラックスが攪乱されているかどうかを確かめる必要がある。

近年、LC3 に EGFP (enhanced green fluorescent protein) と RFP (red fluorescent protein) が繋がれたプローブである tfLC3 (tandem fluorescence tagged LC3)が開発され (Kabeya et al., 2000; S. Kimura et al., 2007)、オートファジーフラックスが阻害されているかどうかをより正確に判定できるようになった。オートファゴソームでは EGFP と RFP の双方が蛍光を発するのに対し、リソソームと融合し小胞内が酸性化した状態では EGFP の蛍光が減弱し、pH の影響を受けない RFP のみの蛍光が観察される。そのため、オートファジーフラックスが通常の場合には酸性化し EGFP が減弱した小胞が見られるが、オートファジーフラックスが阻害されると見られなくなる。

p62 は最もよく解析が進んでいる選択的オートファジーの基質であり、隔離膜上の LC3 と直接相互作用しオートファゴソーム内に取り込まれ分解されることが知られている (Mizushima & Komatsu, 2011)。オートファジーの機能障害においては p62 の蓄積が見られ、p62 とユビキチンを含んだ大きな凝集体（封入体）が形成される (Komatsu et al., 2007)。こうした封入体の形成は、アルツハイマー病やパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS; Amyotrophic Lateral Sclerosis) などの神経変性疾患やアルコール性肝炎、脂肪肝、肝細胞癌といった肝疾患においても見られる (Zatloukal et al., 2002)。

1-4-7. 近位尿細管細胞におけるオートファジーの重要性

近位尿細管細胞は、原尿中の電解質や低分子タンパク質の再吸収に必要となる膨大なエネルギーをミトコンドリアにおける好気呼吸により供給しているが、ミトコンドリアの品質を保つためには恒常的にオートファジーが行われることが重要である (Festa et al., 2018; Torelli et al., 1966)。オートファジーを阻害すると損傷ミトコンドリアが蓄積し、過剰な ROS 産生を行

うことで NLRP3 (Nod-like receptor pyrin domain containing 3) インフラマソームが活性化される (Zhou et al., 2011)。そのため、オートファジーの機能不全はインフラマソーム活性化を介した炎症や線維化により CKD が進行する可能性がある。これを裏付ける実験結果として、近位尿細管特異的にオートファジーを欠損させたマウスにおいて損傷ミトコンドリアの蓄積と過剰な ROS 産生が原因とみられる細胞老化の進行と共に、腎不全と線維化が確認されている (T. Kimura et al., 2017)。恒常的なオートファジーの他にも、細胞がストレスを受けた際にもオートファジーが活性化し、損傷オルガネラや損傷タンパク質を消化する働きがある。特に近位尿細管細胞は虚血再灌流障害 (IRI: ischaemia-reperfusion injury) や腎毒性を持つ薬剤 (抗菌薬、非ステロイド性消炎鎮痛薬、抗腫瘍薬など) に晒されやすいため、そうしたストレス環境下においてオートファジーが活性化することが重要である (Lin et al., 2019)。先行研究では、オートファジーを欠損させたマウスでは IRI により p62 蓄積を伴った近位尿細管細胞死が報告されている (T. Kimura et al., 2011)。以上のことから、尿細管上皮細胞におけるオートファジー機能不全はストレスに対して細胞を脆弱にすることで CKD の進行を促進する可能性がある。

1-5. コレステロールについて

コレステロールは、細胞内シグナリングや細胞膜修復など様々な機能に関与する。以下に、本研究において注目したコレステロールとそれに関連する細胞内機能について概説する。

1-5-1. コレステロール

コレステロールはステロイド骨格を持つ脂質であり、細胞膜の構成に重要であるだけでなく、ステロイドホルモンや胆汁酸の前駆物質でもある。細胞膜に存在するコレステロールは膜の流動性や透過性といった物理的性質に影響するとともに、脂質ラフトなどのマイクロドメインを形成することで細胞内のシグナリングにも関与する。細胞におけるコレステロール量は、細胞内におけるコレステロールの生合成と LDL (low density lipoprotein) などのリポタンパク質を介した細胞外からの取り込み量を調節することで一定に保たれている (図 G)。細胞内のコレステロール量の調節に中心的な役割を果たしているのが、SREBP (sterol regulatory

element-binding protein) と LXR (liver X receptor) である。膜貫通型転写因子の SREBP は ER 膜においてステロールセンサータンパク質である SCAP (SREBP cleavage-activated protein) と複合体を形成しているが、コレステロール量が減少すると共にゴルジ体に運ばれ、プロテアーゼによる切断を受けた後、核移行しコレステロール合成酵素や LDL レセプター遺伝子の発現を上昇させる (Brown & Goldstein, 2009)。一方 LXR は、細胞内の過剰なコレステロールを細胞外へ排出するトランスポーターである ABCA1 (ATP-binding cassette protein A1) や ABCG1 (ATP-binding cassette subfamily G member 1) の発現を上昇させる (Tontonoz, 2011)。その他にも、余剰のコレステロールが ER においてコレステロールアシル転移酵素 (ACAT; acyl-CoA cholesterol acyltransferase) によりエステル化され、脂肪滴に貯蔵されるという細胞内のコレステロール量の調節機構も存在する (Meng et al., 2020)。

1-5-2. コレステロールの細胞内輸送

末梢組織へのコレステロールの供給源として重要な低密度リポタンパク質 (LDL; low-density lipoprotein) の細胞内輸送については、以下のことが知られている。LDL は細胞膜上の LDL 受容体を介して細胞内に取り込まれ、リソソームへと運ばれる (図 G)。LDL に含まれるコレステロールは遊離型よりもエステル型が多いが、それらはリソソームに存在する酸性リパーゼにより加水分解され、遊離コレステロールとなる。遊離コレステロールはリソソーム内腔に存在する NPC2 (Niemann-Pick disease type C2) に結合した後、リソソーム膜に存在する NPC1 (Niemann-Pick disease type C1) へと受け渡され、ER や細胞膜、ミトコンドリアなどへと輸送される (Meng et al., 2020)。ニーマン・ピック病 C 型 (NPC; Niemann-Pick disease type C) と呼ばれる常染色体劣性遺伝性の脂質代謝異常症は、NPC1 や NPC2 タンパク質をコードする遺伝子に変異が入ることにより生じ、後期エンドソームからリソソーム (LELs; late endosomes/lysosomes) において遊離コレステロールの蓄積が見られる (Peake & Vance, 2010)。リソソーム以降のコレステロール輸送については明らかでない点も多いが、小胞性輸送の他に細胞質に存在するコレステロール結合性のタンパク質による非小胞性輸送や膜接触部位 (membrane contact sites; MCS) を通じて後期エンドソーム/リソソームから ER などに輸送される経路などが提唱されている (Alpy et al., 2013)。放射性標識をしたコレステロールエステルを含んだ LDL や放射性酢酸 (コレステロール生合成の過程で取り込まれる) を用いた実験により、LDL 由来のコレステロールエステルは 30 分以内に加

水分解され、その後さらに 30 分経過すると LDL 由来のコレステロールは後期エンドソームから細胞膜へと運ばれることがわかっている (Chang et al., 2006; Sugii et al., 2003)。

ER において新しく合成された内因性コレステロールは 10~20 分程度で速やかに細胞膜へと運ばれるが、その後の輸送については明らかでない点が多い (Chang et al., 2006)。変異型の NPC1 を持つ細胞においては、コレステロールが新しく合成されてから数時間後にリソソームへの蓄積が見られることから、後期エンドソーム/リソソームから細胞膜や ER への輸送が阻害されていると考えられる (Chang et al., 2006; Cruz & Chang, 2000)。

細胞内のコレステロールの分布や代謝を調べる手法の一つが filipin 染色である。Filipin は遊離型コレステロールに特異的に結合する蛍光試薬であり、細胞内におけるコレステロール局在を調べるために広く用いられる。Filipin は細胞内の本来のコレステロールに影響を与えずに観察できる利点がある一方、細胞を固定する必要がある、生細胞のイメージングができないという短所がある (Sezgin et al., 2016)。BODIPY-Cholesterol は生細胞のイメージングが可能であるが、細胞内輸送アッセイにおいてコレステロールとは異なる動態を示すという報告もあるため (Sezgin et al., 2016)、コレステロールの分布や代謝を調べる際は複数の手法を組み合わせることが望ましい。

1-5-3. コレステロールとストレス耐性

実験的に急性腎障害を引き起こした腎臓においては、その後の二次的に与えた虚血や毒物などのストレスに対する抵抗性を獲得 (acquired cytoresistance と呼ばれる) していることは古くから知られている (Zager et al., 1999)。様々な腎毒性物質や虚血再灌流のストレスにより獲得された抵抗性は、異なる種類の二次的なストレスに対しても有効性があるという性質がある。抵抗性の獲得にはコレステロールが関与するという報告もあり、抵抗性を獲得した尿細管ではコレステロール量の大幅な増加が見られること、mevastatin によりコレステロールを元のレベルに減少させると鉄を介した酸化ストレスに対する耐性が低下することが示されている (Zager et al., 1999)。

細胞膜への物理的なストレスに対処する際の膜修復にコレステロールが関与していることを支持する研究も報告されている。細胞は接着しているマトリクスが変形した際などに細胞膜に張力を受けるが、エキソサイトシスにより膜を補充することで細胞膜に破れが生じないようにする働きがある。MBCD (methyl-beta-cyclodextrin) によりコレステロールを減少させる

と、膜の変形誘発性の脂質輸送が減少し、それとともに細胞膜の修復が行われにくくなることが報告されている (Vlahakis et al., 2002)。ストレッチ以外にも、針や剃刀、ガラスビーズを用いた細胞膜傷害手法があるが、これらの手法でもリソソームのエキソサイトーシスにより細胞膜修復が行われる (Reddy et al., 2001)。

細胞膜におけるコレステロールだけでなく、リソソームに存在するコレステロールによる酸化ストレス耐性の向上も知られている (Appelqvist et al., 2012)。U18666A、quinacrine、変異型 NPC1 によりリソソームにコレステロールが蓄積した細胞では、リソソーム集積性の界面活性剤である MSDH (O-methyl-serine dodecylamide hydrochloride) による LMP とそれに引き続くアポトーシスが抑制される。また、リソソームにコレステロールが蓄積した神経細胞に対して H_2O_2 による酸化ストレスを負荷したところ、耐性の向上が認められた。これらのことから、コレステロールによりリソソーム膜が安定化し、LMP が起きにくくなることで酸化ストレス耐性が向上したことが示唆された (Appelqvist et al., 2012)。

1-6. 本研究の目的

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。

第2章 方法

2-1. 試薬

2-1-1. 抗体

- ・ 抗 human galectin-3 抗体 (#556904; BD Pharmingen, CA, USA)
- ・ 抗 phospho-TFEB (Ser211)抗体 (#37681; CST, MA, USA)
- ・ 抗 TFE3 抗体(#HPA023881; Sigma-Aldrich, MO, USA)
- ・ 抗 TFEB 抗体(CST, #4240)
- ・ 抗 Caveolin-1 抗体(CST, #3267)
- ・ 抗 PARP 抗体(#9532)
- ・ 抗 PARP 抗体(CST, #9532)
- ・ 抗 cleaved Caspase-3 抗体(CST, #9661)
- ・ 抗 mTOR 抗体(CST, #2983)
- ・ 抗 LC3 抗体(MBL, #M152-3 for IF, #PM036 for WB, Nagoya, Japan)
- ・ 抗 p62 抗体(MBL, #PM045)
- ・ 抗 LAMP2 抗体(#h4b4; Hybridoma Bank, IA, USA)
- ・ GAPDH 抗体(Millipore, #MAB374)
- ・ 抗 cleaved Caspase-3 抗体(CST, #9661)
- ・ 抗 ZO-1 (zonula occludens-1) 抗体 (生理学研究所の古瀬幹夫教授から供与)
- ・ HRP-linked 抗 rabbit IgG 抗体(CST, #7074)
- ・ HRP-linked 抗 mouse IgG 抗体(Promega, #W402B)
- ・ Alexa Fluor 488 抗 mouse 抗体(Invitrogen, #A-11001)
- ・ Alexa Fluor 546 抗 mouse 抗体(Invitrogen, #A-11030)
- ・ Alexa Fluor 647 抗 mouse 抗体(Invitrogen, #A-21236)
- ・ Alexa Fluor 488 抗 rabbit 抗体(Invitrogen, #A-11034)
- ・ Alexa Fluor 546 抗 rabbit 抗体(Invitrogen, #A-11035)
- ・ Alexa Fluor 647 抗 rabbit 抗体(Invitrogen, #A-21245)

2-1-2. その他試薬

- ・ SiRph5.5-Dex、SiRph5-Dex プローブ: 東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室の花岡健二郎准教授、溝口舞氏から供与
- ・ FITC (fluorescein isothiocyanate)-alendronate: 自治医科大学の黒尾誠教授から供与
- ・ ptfLC3 (pmRFP-EGFP-rLC3) プラスミド: 大阪大学の吉森保教授から供与
- ・ DMEM/F-12 (Dulbecco's modified Eagle medium): Gibco (#11320082)
- ・ Penicilin-Streptomycin Solution (×100): Gibco (#15140-122)
- ・ Filipin: Sigma-Aldrich (#F9765)
- ・ Chlorpromazine (CPZ): Sigma-Aldrich (#C8138)
- ・ EIPA(5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride): Sigma-Aldrich (#F9765)
- ・ Genistein: Sigma-Aldrich (#G6649)
- ・ Methyl- β -cyclodextrin (M β CD): Sigma-Aldrich (#C4555)
- ・ Cholesterol: Sigma-Aldrich (#C4951)
- ・ ガラスビーズ (Glass beads, acid-washed, 425-600 μ m): Sigma-Aldrich (#G8772)
- ・ Cholesterol Quantitation Kit: Sigma-Aldrich (#MAK043)
- ・ Fetuin from fetal bovine serum: Sigma-Aldrich (#F3004)
- ・ 96 ウェルプレート (96-well plates): Corning (#4517; NY, USA), greiner Bio-One (#655090)
- ・ 35mm ガラスベースディッシュ (Glass base dishes): IWAKI (#3911-035)
- ・ 6 ウェルディッシュ: NUNC (#140675)
- ・ 6 cm ディッシュ: NUNC (#150462)
- ・ Lab-Tek 8 ウェルチャンバースライド: NUNC (#155411)
- ・ Immobilon-P PVDF メンブレン: Millipore (#IPVH00010)
- ・ 0.22 μ m Millex-GV フィルター: Millipore (#SLGV004SL)
- ・ Lysotracker Red DND-99: Invitrogen (#L7528)
- ・ Opti-MEM Invitrogen (#31985070)
- ・ L-leucyl-L-leucine, methyl ester, monohydrochloride (LLME): Cayman Chemical (#16008)
- ・ Staurosporine: Cayman Chemical (#81590)
- ・ Hydrogen Peroxide (H₂O₂): Wako (#081-04215)
- ・ 5–20% precast polyacrylamide gels SuperSep Ace: Wako (#197-15011, 197-15021)
- ・ Magic Red Cathepsin B Assay: Immunochemistry Technologies (#937)
- ・ DQ Red BSA: ThermoFisher (#D12051)
- ・ Pierce BCA Protein Assay kit: ThermoFisher (#23225)

- NucSpot Live Cell Nuclear Stain: Biotium (#40082)
- Calcein: Dojindo (#340-00433)
- Hoechst 33342: Dojindo (#H342)
- Cell Counting Kit-8(CCK-8)/ Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST: Dojindo (#CK04)
- TopFluor Cholesterol: Avanti Polar Lipids (#810255P)
- 5(6)-RhR-dRIS: BioVinc (#BV140301)
- Propidium iodide (PI): Molecular Probes (#P3566)
- Bafilomycin A1(Baf-A1) : Selleck (#S1413)
- Alkaline phosphatase (CIAP): Takara (#2250A)
- MEBCYTO Apoptosis Kit (Annexin V-FITC Kit): MBL (#4700)
- FuGENE HD Transfection Reagent: Promega (#E2311)
- RNeasy Mini Kit: Qiagen (#74106)
- ReverTra Ace qPCR RT Kit: Toyobo (#FSQ-101)
- Fast SYBR Green Master Mix : Applied Biosystems (#4385612)
- DCFDA / H2DCFDA - Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit: Abcam (#ab113851)
- Western Lightning Plus-ECL: PerkinElmer
- PBS (phosphate buffered saline; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄)
- TBST (tris buffered saline with Tween 20; 0.05 M Tris、 0.138 M NaCl、 0.0027 M KCl、 0.1% Tween 20)
- RIPA バッファー (radio-immunoprecipitation assay buffer; 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulphate [SDS], 1% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8.0])
- Laemmli's SDS sample buffer (100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% (wt/vol) SDS, 20%(vol/vol) Glycerol)
- SDS-PAGE running buffer (250 mM Tris-base, 192 mM glycine, 0.1% (wt/vol) SDS)
- Semi-dry blotting buffer (39 mM glycine, 48.5 mM Tris-base, 20% (vol/vol) methanol, 0.0376% (wt/vol) SDS)
- CBB 染色液 (0.25% (wt/vol) CBB, 40% (vol/vol) methanol, 7% (vol,vol) acetic acid)

2-2. 細胞培養

ヒト腎近位尿細管上皮細胞である HK-2 細胞 (ATCC CRL-2190) はウシ胎児血清を終濃度 10%、100 U/ml ペニシリン・100 µg/ml ストレプトマイシン (Penicilin-Streptomycin Solution(×100) gibco #15140-122) を 1% 添加した D-MEM/F-12 (#11320082) 培地中で、37°C で加湿された CO₂ 濃度 5% のインキュベータ内で培養した。培養した細胞は、0.25% トリプシン (0.5 mM EDTA) を 3 分間作用させた後培地で懸濁し、細胞数が元の 1/6 になるようにディッシュに播いた。3 日に一度 (約 100% コンフルエントの状態) で継代を行った。

2-3. Calciprotein Particle (CPP) の作製

先行研究では様々な条件で CPP が作製されており、リンやカルシウム濃度、血清タンパク質を用いた方法と精製された fetuin-A タンパク質を用いた方法などがある (Emamian, 2012; Köppert et al., 2018)。本研究では以下の方法で CPP を作製した。75 µL の 1 M CaCl₂ と、625 µL の 200 mM phosphate buffer をエッペン中で混和することで CaPi を析出させ、速やかに 25 mL DMEM/F-12 (5% FBS (fetal bovine serum) 含有) 培地に加えた。DMEM/F-12 (5% FBS 含有) 自体に 2 mM のカルシウムと 1 mM のリンが含まれるため、培地中のカルシウムとリンの最終濃度はそれぞれ 5 mM と 6 mM である。次に、CaPi を加えた培地を 37°C で 24 時間震盪培養し、16000 g で 120 分間遠した。25 mL の上清を除いた後、沈殿した CPP を 25 mL の DMEM/F-12 (10% FBS 含有) 培地に懸濁したものを 1× CPP とし、当初の 1/5 量 (5 mL) の培地で懸濁したものを 5× CPP とした。

上記の方法により作製した CPP を、以下の方法により物性の評価を行った。1× CPP に含まれるカルシウムとリンの総量を ICP-MS Nexion 2000 により定量した (Akiyama et al., 2020)。CPP の粒子サイズの分布は Nanosight NS300 (Nanosight, Amesbury, UK) を用いたナノ粒子トラッキング解析により行った。CPP の形態解析を透過型電子顕微鏡法により行った (「2-22. 透過型電子顕微鏡法による CPP の観察」項参照)。CPP に fetuin-A が含まれていることを確認するため、CPP に含まれるタンパク質を SDS-PAGE (SDS Polyacrylamide gel electrophoresis) と CBB (Coomassie brilliant blue) 染色により調べた (「2-21.

Coomassie brilliant blue 染色（CBB 染色）による CPP に含まれるタンパク質の解析」項参照）。

CaPi 結晶の作製には無血清の DMEM/F-12 を使用し、それ以外の点では CPP と同様の手順により作製した。

蛍光標識 CPP の作製は、カルシウムとリンを析出させる際に蛍光標識されたビスホスホネート（FITC-alendronate または 5(6)-RhR-dRIS）を最終濃度 25 nM になるように加え、それ以降は上記と同様のプロトコルにより行った。

2-4. ウェスタンブロッティング

細胞培養用ディッシュ（φ 3.5 cm）一枚の細胞に対して 100 μ L の RIPA バッファー（1 mM PMFS 添加）を用いて細胞を回収し、27 G 注射針で 10 回ストロークすることでホモジナイズを行った。15,000 \times g で 5 分遠心後、上清を回収し Pierce BCA Protein Assay kit によりタンパク定量を行った。その後、各サンプルのタンパク質濃度が等しくなるように RIPA バッファーで希釈し、溶液量に対して等量の 2 \times Laemmli's SDS sample buffer を加えピペッティングを行った後、100 $^{\circ}$ C で 5 分ボイルした。サンプルをポリアクリルアミドゲル（5–20% グラジエントゲル）にアプライし、室温、定電流の条件下で SDS-PAGE running buffer を用いて泳動を行った。この際、マーカーとして Dual Color Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad) を用いた。その後、ウェット式ブロッティング法により Immobilon-P PVDF (polyvinylidene difluoride) メンブレンに転写反応（トランスファーバッファー：39 mM Glycine、48.5 mM Tris、20% メタノール、0.0376% SDS）を行い、TBST により 1 回洗浄後、5% スキムミルク（雪印）/PBS または 5% BSA/PBS を用いてブロッッキングを行った。その後、1 次抗体を 5% BSA/PBS で希釈した溶液を加え 4 $^{\circ}$ C o/n で振とうさせた。TBST バッファーで 3 回、各回 10 分洗浄後、5% BSA/PBS で希釈した HRP (horseradish peroxidase) 標識 2 次抗体を加え室温で 1 時間振とうさせた。TBST バッファーで 3 回、各回 10 分洗浄後、検出を行った。検出には、Western Lightning Plus-ECL（パーキンエルマー）を使用し、LAS-4000 mini または Amersham Imager 600 を用いて撮影および分析を行った。

ライセートの脱リン酸化処理は、40 μg のライセートに calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP)を 100 unit 加え、37°C で 30 分インキュベートすることにより行った。その後操作は上記と同様に行った。

2-5. 蛍光抗体法

HK-2 細胞を PBS で 2 回洗浄し、4% パラホルムアルデヒド (PFA; paraformaldehyde) /PBS を用いて室温で 15 分固定を行った。LysoTracker 染色は、HK-2 細胞を固定する前に 66 nM の LysoTracker で 30 分インキュベートすることにより行った。抗 galectin-3 抗体、抗 TFE3 抗体、抗 TFEB 抗体を用いた蛍光抗体法では、0.2% TritonX-100/PBS を用いて室温で 3 分透過処理を行った。LysoTracker 染色や Filipin 染色を行った細胞では、透過処理により蛍光が減弱してしまうため、透過処理は行わなかった。また、これらと共染色を行った抗体（抗 LAMP2 抗体と抗 mTOR 抗体）については、透過処理を行わなくても十分染色されることを確認した。その後、3% BSA/PBS を用いて室温で 30 分ブロッキングを行った後、1 次抗体または Filipin を 1% BSA/PBS で希釈し、4°C o/n でサンプルに作用させた。このとき同時に、Hoechst 33342 または NucSpot を用いて核の染色を行った。PBS で 3 回洗浄の後二次抗体を 1% BSA/PBS で希釈し、室温で 1 時間サンプルに作用させた。PBS で 3 回洗浄後、PBS に浸した状態で顕微鏡観察を行った。顕微鏡観察はニコン A1 共焦点レーザー顕微鏡と NIS-Elements ソフトウェアを使用した。

2-6. 画像解析

ニコン A1 共焦点レーザー顕微鏡と NIS-Elements ソフトウェアを使用して顕微鏡画像の取得および解析を行った。自動撮影の際のオートフォーカスには Hoechst 33342 または NucSpot 染色を用い、Z スタック画像を取得した。Z スタック画像の重ね合わせは、Z 軸方向に画像間の最大輝度値を投影させる MIP (maximum intensity projection) 法により行った。

細胞領域の検出には、Hoechst もしくは NucSpot チャンネルを用いて核領域を、caveolin-1 と ZO-1 チャンネルを用いて細胞膜領域を、LAMP2 チャンネルを用いて LELs 領域の検出を行った。その後、各領域上の平均蛍光強度や総蛍光強度、LELs 領域のサイズや一細胞内での個数を解析した。mTOR と LAMP-2 の共局在度の解析には、Pearson の相関係数を NIS-Elements ソフトウェアを用いて算出した。グラフの作成には Python3 及びフリーソフト R を用いた。

2-7. CPP のエンドサイトーシス機構アッセイ

CPP のエンドサイトーシス機構を調べるために、蛍光標識した CPP (RhR-CPP)を用い、各種エンドサイトーシス阻害剤存在下もしくは非存在下で 12 時間培養し、CPP の取り込み量の比較を行った。カベオラ依存的エンドサイトーシス阻害剤として genistein (200 μ M)、クラスリン依存的エンドサイトーシス阻害剤として Chlorpromazine (CPZ、15 μ M)、マクロピノサイトーシス阻害剤として 5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA、25 μ M)をそれぞれ用いた。各阻害剤を培地に溶解させる際は、あらかじめ DMSO もしくは水に溶解させた各阻害剤のストック溶液を培地にて 500 倍以上希釈し、終濃度に調製した。各種阻害剤は RhR-CPP を細胞に加える前に 30 分前処理し、RhR-CPP を加えてからも 12 時間作用させた。12 時間培養後、細胞を 4% PFA により固定処理後、ニコン A1 共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。このとき、細胞内に取り込まれた RhR-CPP と細胞膜に結合した RhR-CPP を区別するために、細胞膜を filipin と抗 Cav1 抗体を用いた蛍光抗体法により染色した。

2-8. トランスフェクションによる遺伝子導入

FuGENE HD Transfection Reagent を用い、Cav1-EGFP と mRFP-GFP tflLC3 の遺伝子導入を行った。HK-2 細胞をサブコンフルエントになるまで 8 ウェルチャンバースライドで培養した後、400 ng のプラスミド DNA と 1.2 μ l の FuGENE HD Transfection Reagent と 200 μ l の Opti-MEM を 1 ウェルに加え、24 時間培養した。

2-9. ガラスビーズによる細胞膜傷害実験

35 mm のガラスベースディッシュ中で HK-2 細胞を CPP 存在下または非存在下で 12 時間培養した。細胞を PBS で洗浄後、100 μ l の培地をガラス底部分に加え、425–600 μ m のガラスビーズを上から撒き、細胞の上をガラスビーズが転がるように 10 回揺すった。その後、ガラスビーズを取り除くためにディッシュごと PBS 中に浸し、逆さにしてガラスビーズを落とした後、PBS で細胞を洗浄した。培地中で 0、3、6 時間培養後 Eclipse Ts2 顕微鏡（ニコン）と DS-Fi3 カメラ（ニコン）を用いて細胞画像の取得を行った。

コントロール実験として、2% M β CD を 40 分 HK-2 細胞に作用させることで細胞膜コレステロールを除く操作、もしくはコレステロールを除いた後再度 16 μ g/ml のコレステロール（0.4% M β CD 含有）を加えた無血清培地で培養することで細胞膜コレステロールを補充する操作を行った後、上記と同様のガラスビーズによる細胞膜傷害実験を行った。ガラスビーズによる細胞膜傷害の際、1 mM calcein を培地中に加えることで細胞膜傷害を受けた細胞に calcein を取り込ませ、その後の培養時間に伴った calcein の保持度合いを指標として膜修復の度合いを調べた。コレステロール除去および補充のステップでは無血清培地を使用し、ガラスビーズによる細胞膜傷以降のステップは 10%FBS 含有培地を用いた。CPP を用いた実験では、calcein が CPP と共に細胞膜に吸着してしまい、細胞内に保持された calcein との区別が難しかったため、膜修復の度合いはコントロール実験のみで調べた。

2-10. レシオ型 pH 感受性蛍光プローブを用いた LELs の pH 測定

SiRpH5.5-Dex は SiRpH5-Dex (Takahashi et al., 2018)を参照することで合成され (Kunishige et al., 2020)、東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室の花岡健二郎准教授、溝口舞氏から供与を受けた。

HK-2 細胞を 8 ウェルチャンバースライドに播種し一晩培養した後、CPP 存在化もしくは非存在下で 0.31 μM (200 $\mu\text{g/mL}$) のレシオ型 pH 感受性蛍光プローブを加えた DMEM/F12 (10% FBS 含有) 培地中で 6 時間培養した。その後、細胞を 3 回 DMEM で洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡 Leica TCS SP5 (63 \times 油浸対物レンズ) と Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) ソフトウェアを用いてイメージングを行った。光源としては白色レーザー SuperK (Leica) を用いた。励起光波長は 580 nm と 660 nm、蛍光波長は 690–750 nm であった。生細胞イメージングを行った後、細胞内 pH キャリブレーションのために細胞を 4% PFA により固定し、pH が 3 から 6.5 の NaPi (Sodium Phosphate) バッファーに固定細胞を浸し、上記と同様に細胞画像を取得した。画像解析による pH 測定にあたっては、Metamorph (Molecular Devices, LLC.)を用い、細胞画像の各 ROI (region of interest; 今回の場合、プローブが取り込まれた小胞領域) 上の平均蛍光強度の 2 波長の比 (580 nm 励起/660 nm 励起) を測定・計算することにより行った。

2-11. 細胞内 ROS 検出

細胞内 ROS の検出には DCFDA/H₂DCFDA キットを用い、蛍光顕微鏡を用いた解析を行った。HK-2 細胞を CPP 存在下で 0、3、6、12 時間インキュベートした後、DCFDA と共に 30 分間インキュベートした。ポジティブコントロールとしては、2 mM LLME で 1 時間処理した細胞を用いた。細胞画像はニコン A1 共焦点レーザー顕微鏡により取得した。ROS の定量には NIS-Elements ソフトウェアを用い、DCFDA プローブの蛍光強度を測定した。

2-12. リソソーム加水分解酵素活性の検出

Cathepsin B 活性の測定には、Magic Red カテプシン B 検出キットを用いた。HK-2 細胞を CPP 存在下もしくは非存在下で培養し、PBS により洗浄後、Magic Red カテプシン B 試薬と共に 1–15 分間インキュベートした。ポジティブコントロールとしては BafA1 (bafilomycin A1) を用いた。次に、細胞を PBS により洗浄し、4% PFA により固定した。細

胞画像はニコン A1 共焦点レーザー顕微鏡により取得し、Magic Red カテプシン B プローブの蛍光強度のフレーム毎の平均を NIS-Elements ソフトウェアを用いて測定した。

エンドサイトーシス経路内の加水分解酵素活性を DQ Red BSA を用いて検出した。HK-2 細胞を CPP 存在下もしくは非存在下で 1、3、6、12 時間培養後、さらに 10 $\mu\text{g/ml}$ の DQ Red BSA と共に 6 時間インキュベートした。次に、細胞を PBS により洗浄し、4% PFA により固定した。細胞画像はニコン A1 共焦点レーザー顕微鏡により取得し、DQ Red BSA の蛍光強度のフレーム毎の平均を NIS-Elements ソフトウェアを用いて測定した。

2-13. オートファジーフラックスアッセイ

ptfLC3 (pmRFP-EGFP-rLC3) プラスミドは大阪大学の吉森保教授から供与を受けた (Kabeya et al., 2000; S. Kimura et al., 2007)。HK-2 細胞に mRFP-GFP tflc3 をトランスフェクション後 (「2-8. トランスフェクションによる遺伝子導入」項参照)、CPP 存在下もしくは非存在下で 12 時間インキュベートした。その後、細胞を 4% PFA により固定し、Hoechst 33342 により核染色を行った後、ニコン A1 共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞の観察を行った。各 LC3 斑点 (オートファゴソームまたはオートリソソーム) 上の RFP と GFP 蛍光強度を測定し、GFP/RFP の比を計測した。GFP/RFP ≥ 0.6 の LC3 斑点を GFP ポジティブの斑点とした。

2-14. 細胞増殖/細胞毒性アッセイ

96 ウェルプレート上の HK-2 細胞を CPP 存在下もしくは非存在下で 3、6、12、24 時間培養後、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) をメーカーの説明書に沿って用いて細胞増殖アッセイを行った。CCK-8 溶液を 10 μl 加えた 100 μl の培地で HK-2 細胞を 1 時間 37°C で培養した後、Epoch 2 マイクロプレート分光光度計 (BioTek, Winooski, VT, USA) を用い 450 nm での吸光度を計測した。CPP に起因するバックグラウンドを除くため、630 nm のリファレンス波長を測定し、450 nm での測定値から引いた。CPP 非存在下で培養した HK-2 細胞での細胞増殖度合いを 100% として計算を行った。

細胞毒性アッセイのためには LDH (lactate dehydrogenase) アッセイキットをメーカーの説明書に沿って用いた。上記と同様に CPP 存在下もしくは非存在下で 3、6、12、24 時間培養した HK-2 細胞の上清を新しい 96 ウェルプレートに移し、100 μ l の Working Solution を加え 30 分間 37°C でインキュベートした。その後、50 μ l の Stop Solution を加え、Epoch 2 マイクロプレート分光光度計 (BioTek) を用い 490 nm での吸光度を計測した。CPP 非存在下で培養した HK-2 細胞での細胞毒性を 0%、lysis buffer を作用させた細胞の細胞毒性を 100% として計算を行った。

2-15. Annexin V によるアポトーシスアッセイ

Annexin V-FITC キット (#4700; MBL) をメーカーの説明書に沿って用い、アポトーシスアッセイを行った。HK-2 細胞 (2.0×10^5 個) を CPP 存在下もしくは非存在下で 6 時間または 16 時間培養した後、PBS で洗浄し、トリプシン溶液を加え、細胞溶液を回収した。4°C、 $2,000 \times g$ で 5 分間遠心した後、上清を除き、85 μ l の binding buffer に懸濁した。次に、10 μ l の Annexin V-FITC と 5 μ l の propidium iodide (PI; 100 μ g/ml) を加え、細胞を 15 分間室温で遮光してインキュベートした。その後、400 μ l の binding buffer を加え、セルソーター SH800S (ソニー) を用いて蛍光の検出を行った。どの実験条件においても、デブリと思われる集団を除いた適切な大きさの細胞集団をゲーティングし、ゲート内の 10,000 個の細胞について蛍光情報を取得した。データの解析には FlowJo ソフトウェア (Tree Star) を用いた。Annexin V-FITC ネガティブかつ PI ネガティブの細胞を生細胞、Annexin V-FITC ポジティブかつ PI ネガティブな細胞を初期アポトーシス細胞、Annexin V-FITC ポジティブかつ PI ポジティブの細胞を終期アポトーシス細胞または非アポトーシス性死細胞とした。

2-16. H₂O₂ 誘導性細胞死アッセイ

HK-2 細胞を CPP 存在下もしくは非存在下で 0、3、6、12 時間培養後、600 μ M H₂O₂ により酸化ストレスを負荷し、12 時間培養後に PI 染色により死細胞の割合を判定した。PI 染色

は終濃度 3.3 $\mu\text{g/ml}$ で 1 時間行い、このとき同時に 0.1 mg/ml の Hoechst 33342 による核染色を行った。細胞画像の取得はニコン A1 共焦点レーザー顕微鏡により行い、PI ポジティブな細胞を NIS-Elements ソフトウェアにより認識し、計算を行った。

2-17. コレステロール定量

CPP もしくは HK-2 細胞に含まれるコレステロール量の定量には Cholesterol Quantitation Kit (MAK043; Sigma-Aldrich) をメーカーの説明書に沿って用いた。CPP にコレステロールが含まれることを確かめるために、CPP とネガティブコントロールの CaPi 結晶に含まれるコレステロールの定量を行った。10% FBS を加えた培地中で CaPi (析出物) を 24 時間培養することにより CPP を作製し、無血清培地中で培養することによりネガティブコントロールの CaPi 結晶を作製した。その後、13,000 $\times g$ で 2 時間の遠心により CPP もしくは CaPi をペレットダウンし、無血清培地でペレットを洗浄した。13,000 $\times g$ で 30 分遠心し、上清を捨てた後、残った CPP もしくは CaPi を chloroform:isopropanol:NP-40 (7:11:0.1) で懸濁することでコレステロールを抽出した。不溶性画分を取り除くため 13,000 $\times g$ で 10 分遠心した上清を新しいエッペンに移した。チューブを開けた状態で有機層を風乾し、さらに真空乾燥機を 30 分用いることで全ての有機層を乾燥させた。乾燥させた脂質を 200 μl の Cholesterol Assay Buffer で再懸濁したものをコレステロール定量用のサンプルとした。サンプル 50 μl を 96 ウェルプレートに移し、そこへ Reaction Mix (Cholesterol Assay Buffer 44 μl 、Cholesterol Probe 2 μl 、Cholesterol Enzyme Mix 2 μl 、Cholesterol Esterase 2 μl) を 50 μl 加え、37°C で 1 時間インキュベートした。蛍光の測定には、蛍光マイクロプレートリーダー ARVO X3 (Perkin Elmer 社) を用い、530 nm 励起による 590 nm 蛍光を検出した。

2-18. コレステロール輸送アッセイ

コレステロールの細胞膜から LELs や他のオルガネラへの輸送を調べるため、蛍光標識コレステロールである TopFluor Cholesterol (Tf-Chol) を用いた。Tf-Chol (50 $\mu\text{g/ml}$) と 10

mg/ml の M8CD を無血清培地中に懸濁し、37°C でソニケーションを行うことでコレステロールを溶解させた後、0.22 μ m polyvinylidene difluoride (PVDF) フィルターを用いて濾過した。次に、この溶液を HK-2 細胞に加え、37°C で 20 分間インキュベートすることにより細胞膜をパルス標識した。その後、細胞を 3 回 PBS で洗浄し、CPP を含む培地、もしくは含まない培地を加え 1、3、6、12、24 時間培養した。細胞画像の取得はニコン A1 共焦点レーザー顕微鏡により行い、NIS-Elements ソフトウェアにより Tf-Chol の平均蛍光強度（画像 1 枚毎）の計算を行った。

2-19. トランスフェリン リサイクリングアッセイ

HK-2 細胞を CPP 存在下もしくは非存在下で 24 時間インキュベートし、蛍光標識されたトランスフェリン transferrin-Alexa Fluor 488 (Tf-AF488) を終濃度 10 μ g/ml で細胞に加え 30 分間インキュベーションすることでパルス標識した。次に 10 μ g/ml の無標識トランスフェリン 10 μ g/ml を含む培地に交換し、0、15、30、60、180 分間インキュベートした後、4% PFA により細胞を固定した。細胞画像の取得はニコン A1 共焦点レーザー顕微鏡により行い、NIS-Elements ソフトウェアにより Tf-AF488 の平均蛍光強度（画像 1 枚毎）の計算を行った。

2-20. RNA 抽出と定量的 RT-PCR による細胞内 mRNA 量の測定

HK-2 細胞からのトータル RNA の精製には、PBS により細胞を洗浄後 QIAGEN の RNeasy Mini Kit を推奨プロトコル通りに使用した。RNase Free Water でトータル RNA を溶出した後 NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて RNA 濃度を測定した。その後、TOYOBO の ReverTra AceqPCR RT Master Mix を推奨プロトコル通りに使用し、逆転写反応を行った。その後、得られた cDNA を用いて SYBR グリーン法による定量的 RT-PCR を行い、GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) を内部標準遺伝子として各種 mRNA の発現量を調べた。キットは Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を用い、測定には Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。

PCR 条件は、初期熱変性を 95℃、20 秒間、サイクリングは、熱変性を 95℃、3 秒間、アニーリング/伸長反応を 60℃、30 秒間で、40 サイクル行った。

本研究の定量 PCR には以下のプライマー (Sigma-Aldrich) を使用した。

Table : Primer oligonucleotides used for real-time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
LAMP1	ACGTTACAGCGTCCAGCTCAT	TCTTTGGAGCTCGCATTGG
CTSD	AACTGCTGGACATCGCTTGCT	CATTCTTCACGTAGGTGCTGGA
MCOLN1	TTGCTCTCTGCCAGCGGTACTA	GCAGTCAGTAACCACCATCGGA
ATP6V1B2	GAGGGGCAGATCTATGTGGA	GGCTTCTTCTCCAACGACAG
SQSTM1	CTGCCTCCTGGTCTCTTCAC	GTTAGGAGGGACAGGGTTCC
MAP1LC3B	ACCATGCCGTCGGAGAAG	ATCGTTCTATTATCACCGGGATTTT
GAPDH	GCCATCAATGACCCCTTCATTGACC	CGCCTGCTTCACCACCTTCTTGATG

2-21. Coomassie brilliant blue 染色 (CBB 染色) による CPP に含まれるタンパク質の解析

CPP に血清タンパク質 (主に fetuin-A) が含まれていることを確かめるために CPP から抽出したタンパク質を SDS-PAGE と CBB 染色により調べた。CPP と CaPi は上記 (「2-3. Calciprotein Particle (CPP) の作製」項参照) の方法により作製した。ポジティブコントロールとしては、FBS から精製されたウシ fetuin を用いて作製した CPP を用いた。具体的な手順としては、CPP を作製する際に、5% FBS を 0.5 mg/mL のウシ fetuin に置き換え、それ以外の手順は通常の CPP 作製と同様に行った。ネガティブコントロールとしては CaPi 結晶 (無血清培地で CaPi 析出物をインキュベートしたもの) を用いた。1 mL の 1×CPP もしくは 1×CaPi を 16,000 ×g で 2 時間遠心し、上清を取り除いた後、ペレットを氷冷した RIPA バッファー (1 mM の PMSF 含有) で懸濁した。15,000 ×g で 5 分間の遠心により不溶性画分をペレットダウンし、上清を回収した。上清に等量の 2× Laemmli's SDS sample バッファ

ーを加え、5 分間ボイルした後、サンプルをポリアクリルアミドゲル (5–20%グラジエントゲル) にアプライし室温、定電流の条件下で SDS-PAGE running buffer を用いて泳動を行った。ゲルを CBB 染色液中で 1 時間震盪した後、milliQ 水で洗浄し、脱色液 (25% (vol/vol) ethanol, 7.5% (vol/vol) acetic acid) 中で 1 時間震盪し、最後に milliQ 水に置き換えた。

2-22. 透過型電子顕微鏡法による CPP の観察

上記 (「2-3. Calciprotein Particle (CPP) の作製」項参照) の通りに作製した CPP を formvar film coated nickel grid 上に吸着させ、室温で乾燥させた。染色操作などはせずにそのままの CPP を、透過型電子顕微鏡 JEM-1400Plus (JEOL Ltd.) を用いて加速電圧 80 kV にて観察を行った。CCD カメラ EM-14830RUBY2 (JEOL Ltd.) を用いてデジタル画像 (3296 × 2472 pixels) を取得した。

2-23. 統計解析

二群間の検定では、Welch の t 検定を用いて差の有意性を検証した。多群間の検定では、Dunnett の t 検定を用いてデータ群間の有意性を検証した。結果を示したそれぞれのグラフにおいて、データは平均値±標準誤差の形で表し、 $P < 0.05$ を有意とした。サンプル数はそれぞれの図のレジェンドに示した。

第3章 結果

3-1. 本研究で用いた CPP の特性評価

上述の方法（「2-3. Calciprotein Particle (CPP) の作製」項参照）により作製した CPP に対し、以下の方法により特性の評価を行った。まず、1× CPP に含まれるカルシウムとリンの総量を ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) Nexion 2000 により定量した (Akiyama et al., 2020)。(インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため未掲載)。

次に、CPP の形態解析を透過型電子顕微鏡法により行った。Primary CPP は 30~100 nm の球状の形をしている一方、secondary CPP は楕円形をしており、長軸が~500 nm 程度の大きさであることが知られている (Heiss et al., 2003; Jahnen-Dechent & Smith, 2020)。図 1 に示したように、本研究の手法で作製した CPP の大部分が楕円形であり、secondary CPP が形成されていることが分かった。

CPP の粒子径の分布は Nanosight NS300 (Nanosight, Amesbury, UK)を用いたナノ粒子トラッキング解析により行った。(インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため未掲載)。

次に、CPP に fetuin-A が含まれていることを確認するため、CPP に含まれるタンパク質を SDS-PAGE と CBB 染色により調べた。ポジティブコントロールとして、ウシ fetuin の精製タンパク質を用いて作製した CPP を用いた。ウシ fetuin は質量約 48.4 kDa であるが、糖鎖修飾により約 64 kDa の位置にバンドが見られる。図 3 に示すように、CPP においてウシ fetuin と同じ質量約 64 kDa の位置にバンドが見られたことから、CPP には fetuin-A が含まれていることが示唆された。また、約 25 kDa の位置にもバンドが見られたことから、fetuin-A 以外のタンパク質も含まれていることが分かった。ネガティブコントロールの血清を含まない培地で作製した CaPi にはタンパク質は検出されなかった。

以上より、本研究で作製した CPP は大部分が粒径 100~300 nm の secondary CPP であり、fetuin-A と思われる血清タンパク質を含むことが分かった。

3-2. 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

蛍光ビスホスホネート 5(6)-RhR-dRIS により赤色蛍光標識した CPP (RhR-CPP) を、培地 (10% FBS 含有) に懸濁した溶液 (RhR-CPP 培地) を調製した。それを HK-2 細胞に添加し CO₂ インキュベータ内で様々な時間培養した後に、PFA 固定し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光観察した。その結果、この蛍光標識 CPP は、細胞膜に吸着した後細胞内にエンドサイトーシスされ、最終的には細胞内に蓄積していく様子が観察された。そこで、まずは CPP の細胞膜からの取り込み過程を詳細に調べるため、細胞を各種エンドサイトーシス阻害剤により 30 分事前処理した後、阻害剤存在下で RhR-CPP 培地を添加し、12 時間後の細胞サンプルに対し、上記の方法で蛍光抗体法を行った。このとき、細胞膜を標識するために抗 caveolin-1 抗体と filipin を用いて染色を行い、核を Nucspot により染色した。コントロール (阻害剤無し) 条件では、エンドサイトーシスされた蛍光性 CPP を含む膜構造体が細胞の核近傍に蓄積する様子が観察された (図 4 の +CPP -inhibitor 参照。矢印は細胞内の CPP を示す)。一方、カベオラ依存的エンドサイトーシスを阻害することが知られる Genistein 処理 (200 μ M) により、RhR-CPP の細胞内取り込みが実質的に抑制されることがわかった (図 4 の +CPP Genistein 参照。白破線は細胞膜を示す)。実際、caveolin-1 の GFP 融合タンパク質 (Cav1-GFP) を一過性に発現させた HK-2 細胞に RhR-CPP を 12 時間取り込ませた細胞サンプルを蛍光抗体法で観察したところ、細胞膜周縁近傍に、caveolin-1 ポジティブな膜構造に RhR-CPP が内包されている像が観察された (図 5)。このことは、CPP が caveolae 依存的に細胞内に取り込まれることを強く示唆するものである。また、マクロピノサイトーシスを阻害する EIPA (25 μ M) 処理により、細胞膜に吸着する CPP の減少が見られ、細胞内への取り込み自身も有意に減少していることがわかった (図 4 の +CPP EIPA 参照)。一方、クラスリン依存的なエンドサイトーシスを阻害することが知られる Chlorpromazine 処理 (15 μ M) では、むしろ CPP の細胞内蓄積の増加が見られた (図 4 の +CPP CPZ 参照)。以上の検索結果から、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内に取り込まれることが示唆された。

3-3. CPP は外来性コレステロールの細胞内代謝に僅かながら影響を与える

RhR-CPP を取り込んだ細胞内の膜構造体を特定するために、様々なオルガネラマーカの抗体やプローブを用いた蛍光抗体法を行った。RhR-CPP を取り込んだ小胞は核近傍に蓄積しており、後期エンドソーム/リソソームマーカである LAMP2 ポジティブな小胞と共局在していたことから、この小胞は後期エンドソーム/リソソーム (LELs; late endosomes/lysosomes) であることがわかった (図 6)。さらに、この小胞はコレステロールを標識する filipin とも共局在していた。また、CPP を取り込ませた細胞とコントロールの細胞で細胞内のコレステロール染色を比較すると、CPP を取り込ませた細胞では filipin により標識されるコレステロールが核近傍により多く蓄積されていた (図 7)。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るため、CPP 添加後 1~24 時間の細胞内コレステロールを filipin で標識し、蛍光画像の定量を行なった。その結果、CPP を添加した細胞では、培養時間に伴って LELs (LAMP2 ポジティブな領域) におけるコレステロールの蓄積が見られた (図 8)。同時に、CPP を加えた約 6 時間後から細胞膜のコレステロールの減少も観察された (図 9)。このとき顕微鏡画像の定量に用いた LELs マスク (LAMP2 ポジティブな領域) と細胞膜マスク (caveolin-1 および ZO-1 ポジティブな領域) を図 10 に示した。

以上の結果から、CPP はコレステロール分子と親和性があることが考えられた。そこで、10% FBS を含む培地中で CaPi (析出物) を 24 時間震盪培養して得られた CPP にコレステロール分子が含まれているかどうかを生化学的手法により確かめた。図 11 に示すように、CPP にはコレステロールが含まれていることがわかった。CPP に吸着したコレステロールが細胞にエンドサイトーシスされることで、細胞全体のコレステロール量が増加することが予想されたが、CPP 添加後 24 時間培養した細胞の総コレステロール量を同様の手法で定量したところ、ほとんど変化は見られなかった (図 12)。これらの結果を合わせると、CPP はコレステロール分子との親和性により細胞外の培地または細胞膜由来のコレステロールと結合し、共に細胞内の LELs に取り込まれた可能性が考えられる。また、細胞内の LELs においてコレステロールの蓄積が見られたが、CPP に吸着して細胞外部から取り込まれたコレステロールの寄与は小さく、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。

こうしたコレステロールの局在の変化は、CPP とコレステロールとの親和性が原因となり細胞におけるコレステロール輸送や代謝の攪乱を招いている、つまりコレステロールが細胞膜とリソソーム、ER の間を行き来するプロセスや細胞外部からの取り込み/排出のプロセスが影響を受けている可能性が考えられた。そこで、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コレステロールをパルス標識し、その標識コレステロールを蛍光顕微鏡で追跡することで生細胞におけるコレステロール輸送や代謝に CPP が影響を与えているかどうかを調べた。Tf-Chol は M β CD と複合体を形成させた状態で細胞に作用させることで迅速に細胞膜に取り込まれる。その後、細胞内のリソソーム、ER や細胞膜の間を行き来し、次第に細胞外に排出される。この外来性蛍光標識コレステロールの代謝過程を、CPP の有無による Tf-Chol の細胞代謝（細胞外排出）速度の違いを基に比較検討した。その結果、CPP 非添加条件では、外部より細胞膜に挿入された蛍光標識コレステロールは約 24 時間でほぼ代謝された（図 13 A、B）。CPP と共に培養した細胞でも 24 時間の培養により大部分の Tf-Chol が細胞外に排出されたが、その排出にわずかな遅延が見られることがわかった（図 13 C）。実際、図 13 (D) の強拡大図に見られるように、確かに CPP 添加条件ではより多くの Tf-Chol が核付近の後期エンドソーム/リソソームに蓄積している像が観察された。以上の結果から、CPP は細胞膜あるいは培地中のコレステロールを吸着させ、複合体として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内に取り込まれ、次第に後期エンドソーム/リソソームに蓄積すると結論した。

3-4. CPP を取り込んだ細胞は膜障害に対して脆弱になる

コレステロールは膜傷害を受けた後の膜修復に関わることが知られている (Vlahakis et al., 2002)。M β CD によるコレステロール除去操作を行った細胞では、ストレッチ刺激による損傷細胞が増加することが報告されている (Reddy et al., 2001)。実際に、HK-2 細胞に対し、M β CD によるコレステロール除去操作を行い、ガラスビーズにより細胞膜傷害を与える実験を行った。このとき、M β CD により細胞膜コレステロールを除去した細胞のコレステロール量を生化学的手法により定量し、この操作で細胞膜コレステロールが十分に減少することを確かめた（図 14）。ガラスビーズによる細胞膜傷害実験では、傷害を与える際の培地に calcein

を加えておくことで、細胞膜傷害を受けた細胞に calcein を取り込ませ、その後の培養時間に伴った calcein の保持度合いを指標として膜修復の度合いを調べた。その結果、何も操作を加えなかった細胞では細胞膜損傷後、時間経過に伴いガラスビーズにより破壊された細胞単層の回復が見られた（図 15）。一方、M8CD によるコレステロール除去操作を行った細胞では細胞膜損傷後の calcein の保持量が少なく、細胞死により底面から剥離する細胞が多く見られた。さらに、M8CD によるコレステロール除去操作後に再度 16 $\mu\text{g/ml}$ のコレステロールを加えた培地で培養することでコレステロールを補充する操作を行った細胞では、calcein の保持量が回復し、細胞死により底面から剥離する細胞も減少した（図 15）。このことから、細胞膜コレステロールが減少すると膜傷害を受けた後に膜修復が十分に行われず、細胞死に至りやすいことが考えられた。

そこで、次に CPP 添加細胞において見られたコレステロール動態や局在の攪乱により同様の膜修復障害が生じるかどうか調べる実験を行った。細胞膜傷害に対する CPP 添加細胞の脆弱性を調べるために、CPP を加えた培地で 12 時間培養した HK-2 細胞に 425-600 μm のガラスビーズを用いて膜傷害を行い、6 時間後までの変化を観察した。その結果、CPP を添加しなかった条件では損傷後、時間経過に伴って細胞がディッシュの底面を覆い 6 時間後には損傷前と同様の状態に戻ったのに対し、CPP 添加条件では細胞死により底面から剥離する細胞が多く見られた（図 16）。以上の実験から、CPP を取り込んだ細胞では膜傷害ストレスに対して脆弱になることが確認された。

3-5. CPP の細胞内取り込みは LELs の pH を上昇させ、膨潤を引き起こす

シリカ粒子や尿酸結晶などの微粒子は細胞内にエンドサイトーシスされるとリソソームを傷害し、細胞毒性を引き起こすということが報告されている（Stern et al., 2012; Thomas et al., 2009; Wang, Salvati, et al., 2018）。そこで、CPP においても同様にリソソームへの影響があると考えられたため、まずは蛍光顕微鏡観察によりリソソームの pH や大きさ、数といった点に変化があるかどうかを調べた。CPP を培地に懸濁した溶液を HK-2 細胞に添加し CO_2 インキュベータ内で様々な時間培養した後に、LysoTracker を用いて酸性コンパートメント

を標識し、PFA 固定後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光観察した。この際、抗 LAMP2 抗体を用いた蛍光抗体法により LELs を標識し、LAMP2 ポジティブな領域の面積や数を定量化した。

図 17 に CPP 添加 24 時間後の蛍光顕微鏡画像の代表例を示した。各培養時間における LAMP2 および LysoTracker の蛍光顕微鏡画像を図 18 に示した。定量の結果、一細胞あたりの LAMP2 ポジティブな領域の面積 (μm^2) が CPP 添加後 1 時間から 6 時間にかけて次第に大きくなることがわかった (図 19A、20A)。これが LAMP2 ポジティブな小胞の数が増加しているからなのか、個々の小胞のサイズが増大しているからなのかを調べたところ、LAMP2 ポジティブな小胞の 1 個あたりのサイズ (μm^2) が CPP 添加後 1 時間から 6 時間にかけて次第に大きくなっていることがわかった (図 19B、20B)。LAMP2 小胞の細胞当たりの個数は CPP 添加後 1 時間から 6 時間まではほとんど変化しておらず、24 時間後には僅かな増加が見られるだけだった (図 19C、20C)。

次にリソソーム pH の指標となる LysoTracker の蛍光強度に注目した。図 17 の画像から明らかなように、pH 上昇を示唆する LysoTracker の蛍光強度の低下が見られた。そこで、LAMP2 ポジティブな小胞上の LysoTracker の平均蛍光強度の定量化を行ったところ、確かに CPP 添加後 1 時間から平均蛍光強度が減少していたことから、リソソームの pH が上昇していることが示唆された (図 19D、20D)。

さらに、リソソーム膜上の v-ATPase を阻害することでリソソームの pH を上昇させることが知られる bafilomycin A1 を用い、上記で見られた CPP によるリソソームの pH 上昇が、bafilomycin A1 の効果と比較してどの程度に相当するかを調べた。3~100 nM の範囲で bafilomycin A1 を 1 時間 HK-2 細胞に作用させ、LAMP2 領域上の LysoTracker の平均蛍光強度を一細胞毎に定量化したところ、CPP と 3 時間培養した細胞では bafilomycin 10 nM を 1 時間作用させた場合と同程度 pH が上昇することが分かった (図 21)。

Bafilomycin A1 によりエンドソーム/リソソームの酸性化が阻害されるとトランスフェリンリサイクリングが攪乱されることが知られている (Presley et al., 1997)。そこで、CPP による pH 上昇でもトランスフェリンリサイクリングが攪乱されるかどうか調べた。その結果、CPP によるトランスフェリンリサイクリングの攪乱は見られなかった (図 22)。このことから、CPP は LELs の pH を上昇させるがその幅は小さく、トランスフェリンリサイクリングなどのメンブレントラフィック様式の影響は小さいと考えられた。

3-6. CPP により LELs 内腔の pH が約 1.0 上昇する

以上のように、LysoTracker と LAMP2 を用いた実験により pH 上昇が示唆されたが、この手法では pH の絶対値を計測することはできない。また、LAMP2 小胞のサイズが変化しているため、LysoTracker の平均蛍光強度の減少が pH 上昇を必ずしも反映していない可能性がある。そこで次に、SiR-pH 5.5-dextran (SiR-pH 5.5-Dex、 $pK_a = 5.5 \sim 5.6$ 、図 23A) もしくは SiR-pH 5-Dex ($pK_a = 6.0$ 、図 24A) という新規レシオ型 pH 感受性蛍光プローブを用いた pH 変化の測定を行った。レシオ型プローブは異なる 2 波長での蛍光強度の比により pH を測定するため、LysoTracker などの 1 波長のプローブと比較して pH 変化をより正確に定量することができる (Takahashi et al., 2018)。この新規レシオ型 pH 感受性蛍光プローブでは、pH が高いほど 580 nm 励起により発せられる蛍光が低下し、660 nm 励起により発せられる蛍光が大きくなる。また、LysoTracker は膜透過性であり細胞内の酸性コンパートメントを非特異的に標識するのにに対し、dextran が付加されている蛍光プローブはエンドソームやリソソーム小胞のみを特異的に標識することができる。(インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため未掲載)。

3-7. CPP はリソソーム膜透過性亢進 (LMP) や ROS 発生を引き起こさない

シリカ粒子や尿酸結晶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、こうしたリソソーム膜の透過性亢進 (LMP; lysosomal membrane permeabilization) が原因となってリソソームの pH が上昇することが知られている (Papadopoulos et al., 2020; Stern et al., 2012; Uchimoto et al., 1999)。LMP は、brushite と呼ばれるリン酸カルシウム化合物や DNA トランスフェクションを目的として作製されるリン酸カルシウム結晶においても報告されており (Aihara et al., 2003; Chen et al., 2014)、CPP で見られた pH 上昇も LMP が原因

である可能性が考えられた。ただし、本研究で使用している CPP はリン酸カルシウムと血清蛋白 Fetuin-A の凝集体であり、腎臓尿細管に生じるリン酸カルシウム化合物を模して作製された粒子である。こうした作製方法の違いにより粒子の性質や細胞に与える効果も異なる可能性があった。以下の実験では、LMP のマーカーとして知られる galectin-3 のリソソームへの集積 (Aits et al., 2015) と、LMP により誘導される ROS 産生 (Stern et al., 2012) を調べた。

CPP を HK-2 細胞に加えた後 1~24 時間培養し、抗 galectin-3 抗体を用いた蛍光抗体法により LMP の検出を行った (図 26A)。その結果、ポジティブコントロールである 2 μ M LLME (L-leucyl-L-leucine methyl ester) を 1 時間処理した細胞では galectin-3 の斑点が見られた一方、CPP ではいずれの時間においても斑点は見られなかった (図 26B、C)。

次に、CPP により ROS の産生が見られるかどうか DCFDA を用いて測定した。ポジティブコントロールの LLME を 4 時間処理した細胞では ROS 産生が見られたのに対し、CPP を添加して 1,12,24 時間後の細胞のいずれにおいても ROS 産生は見られなかった (図 27)。これらの結果から、エンドサイトーシスされた CPP は LMP や ROS を誘導しないことが示唆された。

3-8. CPP によりリソソームストレス応答性転写因子 TFEB および TFE3 が活性化する

TFEB および TFE3 は定常状態では mTORC1 によるリン酸化を受け細胞質に留まっているが、栄養飢餓やリソソームの pH 上昇をはじめとするリソソームストレス条件下では脱リン酸化され核移行することが知られている (Settembre et al., 2012)。核移行した TFEB および TFE3 はオートファジーやリソソーム合成関連遺伝子の発現を誘導し、それによりリソソームストレス状態の解消に寄与すると考えられている。そこで、これらの一連の現象が CPP により引き起こされるリソソーム pH 上昇によっても見られるかどうか確かめた。

まず、CPP が TFEB および TFE3 のリン酸化状態に与える影響をウェスタンブロットにより調べた。CPP 添加 3、6、12、24 時間のサンプルでリン酸化 TFEB(S211)の抗体を用いたウェスタンブロット法を実施した結果、CPP によりリン酸化 TFEB が減少することがわかった (図 28A)。次に、TFEB および TFE3 それぞれのトータル抗体を用いたウェスタンブロットを行なったところ、バンドの低分子量側への移動が見られた (図 28A)。このバンドシフトが脱リン酸化を表しているかどうかを確かめるため、アルカリホスファターゼにより細胞ライセート中の TFEB および TFE3 を脱リン酸化したサンプルを作製し、同様にウェスタンブロットを行なった。その結果、図 28 (B) に見られるように、アルカリホスファターゼ処理によりバンドの低分子量側への移動が見られたことから、このバンドシフトが脱リン酸化を表すことが確かめられた。

CPP により TFEB および TFE3 が脱リン酸化されることがわかったため、次にこれら分子の核移行が実際に促進されているか蛍光抗体法により調べた (図 30A)。その結果、両タンパク質が確かに細胞質から核内に一定量移行していることを画像により確認した。また、それら画像の定量化の結果、CPP を加えて 1~12 時間後にかけて核領域における TFEB および TFE3 の蛍光強度の上昇がみられた (図 30B)。この現象は、リソソームの pH 上昇を誘起する bafilomycin A1 処理した細胞においても確認された (図 30C)。

次に、リソソームストレス応答性転写因子 TFEB および TFE3 により発現が誘導されることが知られる *ATP6V1B2*、*CTSD*、*MAP1LC3B*、*MCOLN1*、*SQSTM1*、*LAMP1*、の発現量の変化を qPCR により調べた。その結果、CTSD、MCOLN1、SQSTM1 において有意な発現量の上昇が見られ、その効果は CPP 添加後 6、12 時間において時間経過に伴って増加した (図 31)。

上で見られた TFEB および TFE3 の脱リン酸化は、mTORC1 の活性低下により引き起こされた可能性が考えられた。リソソームストレス環境において mTORC1 はリソソーム膜表面から離脱し不活性化するため (図 E) (Fedele & Proud, 2020)、mTOR のリソソームへの局在を蛍光抗体法により調べた。その結果、CPP 添加 3 時間後から mTOR と LAMP2 (LELs マーカー) の共局在度の有意な低下が観察された (図 32)。

以上の結果から、CPP により mTOR がリソソームから離脱・不活性化することで TFEB および TFE3 のリン酸化を減少させ、その結果核移行した TFEB および TFE3 によりオートファジーやリソソーム合成関連遺伝子の発現が誘導されることがわかった。これらは、CPP

がリソソーム内腔の pH 上昇を介して、リソソームストレスを誘起していることを強く示唆している。

3-9. CPP によりリソソーム内加水分解酵素の活性が低下する

CPP により LELs 内腔の pH が約 1.0 上昇することがわかったが、この小幅な pH 上昇であってもリソソーム内加水分解酵素の活性低下を引き起こす可能性があった。そこで、CPP 添加後 3 時間、12 時間における cathepsin B 活性の変化を Magic Red アッセイにより調べた。Magic Red (赤色蛍光) が付加された cathepsin B 基質を加えた培地中で細胞を培養すると、細胞膜を透過し、リソソームに存在する cathepsin B に切断されることで強い赤色蛍光シグナルを発する (Noorden, 2010)。実験の結果、CPP を添加しなかった条件では細胞内のリソソームと見られる小胞が強い赤色蛍光を発したが、CPP 添加条件では cathepsin B の活性が低下していることをあらかず蛍光の減弱が見られた (図 33)。また、cathepsin B の活性低下は特に長時間 (12 時間)、高濃度 (5×CPP) の CPP 添加条件において顕著であった。リソソームの pH を上昇させるポジティブコントロールである bafilomycin A1 100 nM においては CPP よりも顕著な活性低下が見られた。

3、10、30、100 nM の bafilomycin A1 について同様の実験を行った結果、濃度依存的な cathepsin B の活性低下が見られた。また、CPP を加えて 3 時間培養した条件では 3 nM の bafilomycin A1 を加え 1 時間培養した場合と同等の cathepsin B の活性低下が見られることが分かった (図 34)。CPP による pH 上昇効果が 10 nM の bafilomycin A1 と同等であったことと比較すると概ね整合的な結果であった。

次に、DQ-Red BSA を用いて CPP が細胞内の加水分解酵素の活性に与える影響を調べた。膜透過性のプローブである Magic Red と異なり、DQ Red BSA は膜を透過するのではなくエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、加水分解されることにより強い蛍光を発するプローブである。CPP を HK-2 細胞に添加して 1、3、6、12 時間培養後、DQ Red BSA を加え 6 時間培養した。その結果、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この実験でも示された (図 35)。

3-10. CPP によるリソソーム機能低下はオートファジーフラックスの阻害を引き起こす

マクロオートファジーにおいては、隔離膜が細胞質やオルガネラの一部を取り囲みオートファゴソームを形成した後、リソソームが融合しオートリソソームとなることで内容物が分解される (Kabeya et al., 2000)。リソソームの pH 上昇による機能不全は、そのようなオートファジーの流れ(オートファジーフラックス)の阻害を引き起こす (Mauvezin & Neufeld, 2015)。そこで、CPP によるリソソームの機能低下がオートファジーフラックスの阻害につながると予想し、以下の実験を行なった。

まず、CPP を添加し 3、6、12、24 時間培養したサンプルを用いたウェスタンブロットを行ない、オートファジーフラックス阻害で見られる p62、LC3-II の蓄積が CPP により見られるかどうかを調べた。その結果、CPP 添加後の時間を経るごとに p62、LC3-II が蓄積していくことがわかった (図 36)。

この結果はオートファジーフラックスの阻害を強く示唆するものの、LC3-II の蓄積はオートファジーの分解が阻害されている場合だけでなくオートファジー自体が亢進している場合にも見られる可能性がある。そこで、オートファジーフラックス自身が阻害されているかどうかをより正確に判定するために EGFP と RFP が繋がれた LC3 である tfLC3 (tandem fluorescence tagged LC3) を用いたオートリソソーム形成検出実験を行った (Kabeya et al., 2000; S. Kimura et al., 2007)。オートファゴソームでは EGFP と RFP の双方が蛍光を発するのに対し、リソソームと融合し小胞内が酸性化した状態では EGFP の蛍光が減弱し、pH の影響を受けない RFP のみの蛍光が観察される。tfLC3 を発現させた HK-2 細胞に CPP を添加し、12 時間培養を行なった後に観察を行った結果が図 38 (A) である。オートファジーフラックスが正常な場合には、酸性化により EGFP の減弱したオートリソソームが見られるが、そうした GFP ネガティブな斑点は CPP を添加しなかった条件では多く見られたのに対し、CPP 添加条件では減少していた。オートファゴソーム/オートリソソーム の斑点毎に RFP と GFP の蛍光強度を定量し、蛍光強度の比である GFP/RFP を算出した結果、CPP 添加条件では添加しなかった条件と比較して GFP/RFP の値が高いことが分かった (図 38B)。また、GFP/RFP が 0.6 以上の斑点を GFP ポジティブとし、その割合を算出した結果、CPP 添加を

していない条件では約 25%であったのが CPP 添加により 75%まで増加した（図 38C）。これらの結果から、CPP はオートファジーフラックスを阻害することが分かった。次に、オートファジーフラックスの阻害がオートファゴソームとリソソームの融合が阻害されていることが原因かどうかを調べるために、LAMP2 と tfLC3 の共局在が見られるかどうか顕微鏡観察を行った。その結果、図 39 に示すように、CPP 添加の有無に関わらず LAMP2 と tfLC3 の共局在が見られたことから、CPP を取り込んだ細胞においてオートファゴソームとリソソームの融合は行われていることがわかった。以上の結果から、CPP を内に含むリソソームとオートファゴソームが融合してもオートリソソームの酸性化が起こらず内容物の分解が正常に行われず、オートファジーフラックス阻害が引き起こされていることが示唆された。

3-11. CPP により非アポトーシス性細胞死が誘導される

リソソームの機能低下やそれによるオートファジーフラックスの阻害は細胞毒性を引き起こすことが考えられたため、細胞毒性と細胞生存（viability）を、それぞれ LDH アッセイと CCK-8 アッセイにより調べた。LDH アッセイは死細胞または細胞膜に傷害を受けた細胞が放出する乳酸脱水素酵素（LDH; lactate dehydrogenase）を指標とするアッセイである。CCK-8 アッセイは生細胞中の脱水素酵素により産生される NADH（nicotinamide adenine dinucleotide, reduced）を指標とするアッセイである。

LDH アッセイの結果、CPP 添加により培地中の LDH は時間経過に伴って増加し、その効果は高濃度の CPP において特に顕著であった（図 40A）。CCK-8 アッセイの結果、CPP 添加により時間経過に伴って細胞の代謝活性の低下が見られ、その効果は高濃度の CPP において顕著であった（図 40B）。

また、CPP により細胞死を引き起こす細胞の割合を CaPi による細胞死と比較した。低濃度（1×）および高濃度（5×）の CPP もしくは CaPi と共に HK-2 細胞を 24 時間培養後、死細胞を PI により染色し、Hoechst 染色された全細胞の内どの程度の割合で細胞死が見られるかを調べた。その結果、特に高濃度（5×）の CaPi では 95%以上の細胞で細胞死が誘導されたのに対し、CPP では 8%未満であった（図 41）。これらの結果から、CPP により時間と共に細胞死が起こるが、その効果は限定的であることが分かった。

次に、細胞死の様式を調べるために Annexin V-FITC と PI を用いたアポトーシス検出 (Vermes et al., 1995) を行なった結果、CPP 添加後 6、16 時間と時間の経過に伴って PI ポジティブな死細胞は増加したものの、いずれの時点においてもアポトーシス初期を表す Annexin V のみポジティブ (PI ネガティブ) の細胞が見られなかった (図 42)。このことから、CPP により引き起こされる細胞死は非アポトーシス性であることが示唆された。

次に、cleaved caspase-3 と PARP 抗体を用いたウェスタンブロットを行い CPP により引き起こされる細胞死の性質をより詳細に調べた。アポトーシスを誘導することが知られている Staurosporine により cleaved caspase-3 と cleaved PARP (85 kDa) の増加が見られた (図 43) のに対し CPP ではいずれも見られなかった (図 44)。

これらの結果より、CPP は時間経過に伴って非アポトーシス性の細胞死を誘導するが、その細胞死誘導効果は限定的であることが分かった。

3-12. 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 (Lin et al., 2019)。そのため、CPP によりオートファジー機能障害が引き起こされた細胞に対してさらなる酸化ストレスを与えた場合、細胞死に向かいやすい可能性が考えられた。そこで、CPP を加えた培地で 3、6、12 時間培養した HK-2 細胞に H_2O_2 曝露 (600 μM) を行い、12 時間後に PI 染色により細胞死の割合を調べた。その結果、CPP との培養時間に伴って H_2O_2 による細胞死が劇的に増加した (図 46)。これらのことから、CPP それ自体は HK-2

細胞に対してわずかな細胞死しか引き起こさないが、CPP を取り込んだ細胞は酸化ストレスに対して脆弱化することが示唆された。

以上の結果から、CPP はオートファジー機能障害を引き起こし、 H_2O_2 による酸化ストレスに対して細胞を脆弱化することが示唆された。

第4章 考察

4-1. CaPi と CPP の違いについて

CPP とは CaPi と fetuin-A を中心とする血清タンパク質の複合体である。Fetuin-A は血漿に生じた CaPi に結合することで CaPi 結晶の集合・成長を防ぎ、骨外の組織で CaPi が沈着することを防ぐことが知られてきた。Fetuin-A を欠乏させたマウスは様々な臓器において異所的なカルシウム沈着を引き起こす (Schäfer et al., 2003)。In vitro でも Fetuin-A により CaPi の毒性が抑制されるという知見は血管平滑筋細胞やマクロファージを用いた研究において報告されている (Ewence et al., 2008; Smith et al., 2013)。

腎臓尿細管上皮細胞においては、これまでに CPP に注目した研究は報告されていなかったが、人工的な CaPi 結晶を用いて腎臓尿細管における細胞毒性を調べた研究が 2003 年に Aihara らにより報告されている (Aihara et al., 2003)。この研究によると、CaPi 結晶の一種である brushite はブタの近位尿細管上皮細胞においてリソソーム膜透過性亢進 (LMP) と ROS の発生を伴う細胞毒性を引き起こした。本研究においても、CaPi 結晶が最大 91% の細胞に細胞死を誘導することが PI 染色により確認できた一方で、CPP により誘導された細胞死は 3% 未満であった (図 41)。CPP により誘導される細胞死については PI 染色と顕微鏡法によるアッセイの他にも、LDH アッセイ (図 40) や Annexin V/PI によるアポトーシスアッセイ (図 42) により解析した。各手法によって感度が異なると考えられるが、最も多くの細胞死が見られた Annexin V/PI によるアポトーシスアッセイでも CPP により誘導された細胞死は 17% 程度であった。このことから、CPP は CaPi よりも弱い細胞毒性しか持っておらず、そのメカニズムも CaPi と異なることが示唆された。

Aihara らによる CaPi 結晶 (brushite) の結果と異なり、CPP では LMP や ROS の産生が見られなかった (図 26、27)。本研究においては LMP を検出する手法として galectin 斑点アッセイという高感度に LMP を検出することのできる手法を用いた。リソソーム膜の透過性が亢進している箇所においてはリソソーム内腔に存在する β -ガラクトシドが細胞質側に露出され、細胞質に存在し β -ガラクトシド結合能を持つ galectin がリクルートされる。この変化は比較的大規模な LMP においてみられる cathepsin 放出よりも早く起こるため、galectin 斑点アッセイは cathepsin 放出を指標とする LMP アッセイ法と比べて早期の LMP を高感度に検出できると考えられている。

興味深いことに、ポジティブコントロールである LLME により引き起こされる LMP を galectin 斑点アッセイで検出すると、LLME を加えてから 1 時間後が最も LMP の程度が高く、その後 3、6 時間と培養時間を経るにつれて LMP の程度が低くなっていった (図 26C)。このことは、LLME を加えた直後に LMP が引き起こされるが、LMP が生じたリソソームには galectin が集積し、リソファジーにより速やかに消化されたと考えられる。一方の CPP 添

加条件では 1~24 時間のいずれの時間においても LMP は検出されず、DCFDA アッセイにおいても ROS が検出されなかった。このことは細胞毒性を持つことが知られる多くのナノ粒子と CPP とでは細胞毒性を引き起こすメカニズムが異なることを示す観察結果として特筆すべき点である。

CPP が大規模な LMP を引き起こさないことは確認できたが、小規模な LMP が起こっている可能性は否定できない。プロトン透過させる程度の小さな孔が空いた場合は、galectin の集積を介したリソファジーではなく、ESCRT 複合体による修復が行われることが近年明らかになった (Skowrya et al., 2018)。その場合、ESCRT 複合体のリソソームへのリクルートを検出することで CPP が小規模な LMP を引き起こすかどうかを確かめることができるかもしれない。

CaPi が LMP を引き起こすメカニズムとして以下の仮説が提唱されている (Z. Liu et al., 2014)。CaPi は酸性環境において溶解度が上がるため、CaPi が細胞に取り込まれると、リソソームにおいて CaPi が溶解し、浸透圧の上昇によりリソソームの膨張および LMP が引き起こされる。LMP による細胞死としては複数の経路が提唱されており、cathepsin の細胞質への放出によるリソソーム依存的細胞死 (LDCD) の他にも、漏出した cathepsin がミトコンドリア外膜透過性 (MOMP) とそれに引き続く caspase 活性化、最終的にアポトーシスを引き起こす経路、cathepsin の放出と ROS の発生の組み合わせによりインフラマソームが活性化することによるパイロトーシス経路、鉄の放出と ROS の組み合わせによりフェロトーシスが引き起こされるという経路が提唱されている (Wang, Gómez-Sintes, et al., 2018)。

CPP においても上記のメカニズムと部分的には同様の現象が起きていると考えられる。リソソームに取り込まれた CPP に含まれる CaPi 結晶部分が溶解する可能性は高く、たしかに CPP においても浸透圧膨張が原因とみられる LAMP2 小胞の膨張が確認できた (図 17 の画像及び図 19 の定量グラフ)。しかし、CaPi との重要な違いは、CPP が (大規模な) LMP を引き起こさないという点である。このような違いが見られる原因として考えられるのは、fetuin により結晶形成が抑制されるため CPP に含まれる CaPi 結晶量が少なく、浸透圧膨張も CaPi と比較すると弱いという可能性である。結果的に CPP は LMP を引き起こさず、細胞死を起こす細胞も CaPi と比較して少ないと考えられる。Fetuin-A が尿細管内腔に存在することを鑑みると、尿細管において生じた CaPi は速やかに CPP を形成すると考えられる。そのため、実際の尿細管において CPP は CaPi で考えられていたほど強い細胞毒性は発揮しないと考えられる。

4-2. CPP によるリソソーム・オートファジー経路の攪乱について

CPP は LMP や ROS の発生を誘導することはなかったが、LELs の pH を約 1.0 上昇させることが明らかになった (図 23)。CaPi やその他の細胞毒性を持つナノ粒子においてみられる LELs の pH 上昇は LMP が原因となって生じることが知られているが (Papadopoulos et al., 2020; Stern et al., 2012; Uchimoto et al., 1999)、CPP においては別のメカニズムであると考えられる。CPP に含まれる CaPi が溶解し HPO_4^{2-} イオンが生じることを考えると、リン酸緩衝系により pH が上昇した可能性が考えられる (Mekmene et al., 2009)。

CPP による LELs の pH 上昇は 1.0 程度であり、一般的にリソソーム pH 上昇を引き起こすために用いられる bafilomycin A1 100 nM と比較すると弱い効果 (bafilomycin A1 10 nM 相当) であることがわかった (図 21)。この小幅な pH 上昇でもリソソーム加水分解酵素の活性低下が十分起こることを Magic Red Cathepsin B アッセイと DQ Red BSA アッセイにより確かめた (図 33、34、35)。また、LELs の pH 上昇によりオートファジーフラックスが阻害されることを tfLC3 (tandem fluorescence tagged LC3) を用いて確認することができた (図 38)。一方で CPP 添加条件においても LAMP2 と tfLC3 斑点の共局在が見られたことから、オートファゴソームとリソソームの融合は阻害されていないことがわかった (図 39)。近年の研究により、オートファゴソームとリソソームの融合にリソソームの酸性化は必ずしも必要ではないことが報告されている。以上を考え合わせると、オートファゴソームと CPP を含んだリソソームは CPP によるリソソーム pH 上昇条件下でも融合することはできるが、その後 CPP を含んだオートリソソーム内腔の pH を十分に酸性化することができず、内容物の分解が行われないと考えられる。

リソソームストレスに対する細胞応答として、TFEB/3 経路の活性化が知られている。本研究においても、TFEB/3 経路に関する一連の実験結果から、CPP によってリソソームに局在する mTOR が減少すること (図 32)、TFEB/TFE3 の脱リン酸化 (図 28) と核移行 (図 30) が促進されること、そしてリソソーム・オートファジー関連の遺伝子発現が上昇すること (図 31) が確認できた。TFEB/3 経路の活性化の引き金となっているのが何であるかは明らかになっておらず、本研究でみられた LELs における pH 上昇や膨張、あるいは基質の蓄積といった変化のいずれかを細胞が感知している可能性が考えられる。近年の研究によると、スクロースをリソソームに蓄積させることによりリソソームの pH を上昇させることなく mTORC1 活性の低下が見られたことから、リソソームにおいて分解されずに蓄積する基質の存在が mTORC1 不活性化の直接の原因となり得ることが示された (Fedele & Proud, 2020)。これらの先行研究と本研究の結果を考え合わせると、CPP によるリソソームのアルカリ化が

リソソームにおける基質の蓄積を介して mTORC1 不活性化を引き起こし、TFEB/3 のターゲット遺伝子の発現を上昇させたと考えられる。

しかしながら、こうしたリソソームストレスを解消する方向への細胞応答が見られたにもかかわらず LC3-II や p62 は一貫して蓄積し続けた。このことは、CPP がリソソームに存在する限りリソソームの分解活性は低いままであるため、リソソームタンパク質の発現だけではオートファジーフラックスの阻害を改善することはできなかったことを示唆した。一方で、TFEB を過剰発現させるとリソソームのエクソサイトーシスによりリソソーム蓄積症 (LSD) を改善できる可能性が提案されている (Medina et al., 2011)。本研究においては CPP を継続的に加えたが、生体内の尿細管において CPP はリン排出が増加した際に一過的に生じるものである可能性があるため、一度蓄積した CPP を TFEB 経路の活性化により細胞外に排出させるという戦略が有効である可能性も考えられる。

4-3. CPP と慢性腎臓病、老化を結ぶリソソーム、オートファジー機能不全

近位尿細管細胞は、原尿中の電解質や低分子タンパク質の再吸収に必要となる膨大なエネルギーをミトコンドリアにおける好気呼吸により供給している。従って、ミトコンドリアの品質を保つために恒常的にオートファジーが行われることが近位尿細管細胞にとっては特に重要である。近位尿細管特異的にオートファジーを欠損させたマウスを用いた先行研究では損傷ミトコンドリアの蓄積と過剰な ROS 産生が原因とみられる細胞老化の進行と共に、腎不全と線維化が確認された (T. Kimura et al., 2017)。本研究においてもオートファジーフラックスの阻害が見られたため、損傷ミトコンドリアが蓄積し ROS が発生することが期待されたが、今回の実験条件では ROS の発生は認められなかった (図 27)。このことは、CPP によるオートファジーフラックスの阻害が完全ではなく部分的に分解能力が残されていることにより損傷ミトコンドリアを消化することができたためと考えられる。本研究で行った CPP 添加後 24 時間までの培養では損傷ミトコンドリアが十分に蓄積せず、検出感度以下の微量の ROS しか発生しなかったと考えられた。

その一方で、CPP を添加した細胞に対してさらに H₂O₂ 曝露を行った実験では、CPP 添加細胞における顕著な酸化ストレスへの脆弱性が見られた (図 46)。近位尿細管は酸化ストレスを介して細胞毒性を発揮することが知られる虚血再灌流障害やシスプラチンといった腎毒性物質による傷害の危険性に曝されていることを考えると、この結果は重要な示唆を与える。CPP そのものによる細胞毒性は弱かったとしても、さらなる酸化ストレスが負荷された際に

細胞死を起こしやすくすることにより、腎臓の機能低下が引き起こされる可能性は大いに考えられる。

CPP によりオートファジーフラックスが阻害された結果 (図 38) をふまえると、CPP 添加細胞における H_2O_2 への脆弱性の原因としてまず考えられるのは、オートファジーの機能不全である。オートファジーはストレス環境においてダメージを受けたタンパク質やオルガネラを消化することで細胞を保護している。オートファジー機能不全マウスを用いた先行研究において虚血再灌流障害を与えると近位尿細管細胞において p62 の蓄積とアポトーシスの誘導が確認されている (T. Kimura et al., 2011)。この先行研究と一致して、本研究においても CPP 添加細胞において H_2O_2 によりより多くの細胞死が誘導されたことは、CPP によりオートファジー/リソソーム分解系のキャパシティが低下し損傷ミトコンドリアが蓄積しやすかったことが原因である可能性がある。興味深いことに、CKD のリスク要因として知られる老化と糖尿病は両者ともオートファジー不全と深い関わりを持つことが知られている。老齢マウスの腎臓では定常的なオートファジーの亢進が見られる一方、ストレス時におけるさらなるオートファジー活性化が障害されており、このことが腎障害を進行させると考えられている (Yamamoto et al., 2016)。また、終末糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs) がオートファジー・リソソーム系を阻害することで糖尿病性腎臓病を引き起こす可能性を示唆する先行研究も行われている (W. J. Liu et al., 2015)。本研究で得られた結果は、慢性腎臓病・糖尿病性腎臓病・加齢による腎障害に共通する因子としてのオートファジー・リソソーム系の重要性を改めて強調するものである。

4-4. CPP によるコレステロール代謝の攪乱について

コレステロール量は細胞膜やリソソーム膜における膜の流動性や安定性を決める重要な要因であり、細胞の恒常性維持にとって重要であると考えられる (Appelqvist et al., 2012; Zager et al., 1999)。本研究により、CPP はコレステロールとアフィニティーがあり (図 11)、共に細胞内にエンドサイトーシスされ LELs に蓄積することや (図 8)、コレステロールが細胞膜において減少すること (図 9) が明らかになった。

CPP とコレステロールとのアフィニティーを調べた生化学実験では cholesterol esterase を加えたサンプルを測定しているため、CPP に吸着しているコレステロールがどのような形 (遊離型・エステル型・リポタンパク質) であっても検出される。現在のところ、CPP に吸着しているコレステロールがどのような結合状態であるかは不明であるが、cholesterol esterase を加えたサンプルと加えないサンプルを比較することで、CPP に吸着しているコレ

ステロールが遊離型なのかエステル型なのか確かめることができる。一方、filipin 染色では、遊離型のコレステロールのみが標識される。図 4 の蛍光標識 CPP (RhR-CPP) を用いた実験により、CPP が細胞膜に吸着する性質があることがわかったが、もしも CPP に遊離型コレステロールが含まれている場合、細胞表面の CPP と共に filipin 染色が見られるはずである。しかし、図 4 の filipin 染色の様子からは細胞膜表面に粒状の染色などは見られなかったことから、CPP に吸着しているコレステロールは遊離型ではない、もしくは遊離型であったとしても少量のコレステロールしか CPP に吸着していないと考えられた。また、CPP 添加により細胞全体のコレステロール量には変化が見られなかったことから、培地中の外来性コレステロールが CPP と共に取り込まれる効果はほとんどないと考えられる (図 12)。

細胞膜コレステロールの減少と同時に細胞内の LELs におけるコレステロールの増加が見られたことと (図 8、9)、上記の考察を考え合わせると、リソソームと細胞膜の間を頻繁に行き来するコレステロールの内の一部が CPP と共にリソソームに留まりやすくなっている可能性が高い。Tf-Chol を用いた実験でも、僅かながら CPP 添加条件ではコレステロール排出に遅れが見られ、核付近における蓄積が認められた (図 13)。

細胞内におけるコレステロール蓄積の原因として考えられるのは、リソソームにおいてコレステロールの受け渡しを担う NPC の機能低下である。リソソーム病の一つである Niemann-Pick 病 C 型 (NPC) は細胞内の脂質輸送を担う NPC1 または NPC2 の遺伝子変異が原因であり、リソソームにおいてコレステロールの異常蓄積が見られることが知られている。先行研究により、LELs におけるコレステロールを他の細胞内コンパートメントに輸送する際、NPC2 から NPC1 へとコレステロールが受け渡されたためには酸性環境である必要があることが明らかになっている (Deffieu & Pfeffer, 2011)。このことから、CPP によるリソソーム pH の上昇が、NPC の機能低下を通じてリソソームにコレステロールを蓄積させ、細胞膜での減少を引き起こしている可能性が示唆される。

もう一つの可能性としては、CPP がコレステロールを豊富に含むカベオラ依存的にエンドサイトーシスされることから、細胞膜のコレステロールが細胞内に取り込まれるということが考えられる。細胞内の LELs の面積の増加 (図 19A) と LELs 領域における filipin の総蛍光強度 (図 8B) が同じような時間変化を示すことから、LELs の小胞あたりに含まれるコレステロール量が増加しているというよりも、リソソーム面積の増加に伴ってコレステロールが増加していると考えられる。通常であればカベオラ依存的エンドサイトーシスが行われると、細胞内から細胞膜への輸送によりコレステロールが戻されることでバランスが保たれているが、CPP により細胞膜に戻されるコレステロール量が減少していると考えられる。CPP により細胞内コレステロール代謝がどのように攪乱されているのか、より詳細な機構を知るにはさらなる研究が必要である。

細胞膜コレステロールは酸化ストレスや物理的な傷害に対して保護的に作用するということが先行研究により報告されている。例えば、コレステロールが近位尿細管細胞を虚血発作から保護する作用があることや (Zager et al., 1999)、MBCD により細胞膜コレステロールを減少させた細胞では膜傷害を与えた際に修復されにくいことをが知られている (Vlahakis et al., 2002)。そこで本研究でも CPP 添加による細胞膜コレステロールの減少が細胞を物理的な傷害に対して脆弱化しているかどうか調べた。CPP を添加して 12 時間培養した細胞に対してガラスビーズで傷害を与える実験を行った結果、CPP 添加条件では細胞死が起こりやすいことがわかった。この結果から、CPP による細胞膜コレステロールの減少に伴って膜修復が起こりにくくなるという、先行研究と一致する結果が得られた。細胞膜の修復においては、リソソームのエキソサイトーシスによる膜の補充が重要であることが知られている (Reddy et al., 2001)。CPP がリソソームの pH 上昇をはじめとする様々な変化を引き起こすことを考えると、リソソームのエキソサイトーシスの過程が攪乱されている可能性も考えられる。

4-5. 本研究から導出された課題と今後の展望

4-5-1. CPP により引き起こされる細胞傷害機構について

本研究では僅かではあるが CPP による非アポトーシス細胞死が見られたが、この細胞死のメカニズムを明らかにすることはできなかった。CPP と類似した細胞応答を引き起こす微粒子として、フラーレンが挙げられる (Johnson-lyles et al., 2010)。フラーレンも CPP と同様に近位尿細管細胞においてオートファジーフラックスを阻害することが知られており、細胞毒性のメカニズムとしては、アクチン骨格の崩壊によりオートファジーフラックス阻害とミトコンドリア機能不全が引き起こされ、結果的に ATP 欠乏と細胞死を誘導することが提唱されている。本研究では明らかにできなかったが、CPP の細胞死のメカニズムを調べるには、フラーレンによる細胞死との類似点や相違点をより詳細に調べることで有用であると考えられる。さらなる研究によりナノ粒子に共通の細胞死メカニズムを解き明かすことが期待される。

本研究においては CPP の細胞傷害機構として主にオートファジー・リソソーム系とコレステロール恒常性という二つの可能性を提示したが、これら二つがクロストークをしている可能性を含め、生体内においてどのメカニズムが最も CKD の悪化に寄与しているかを知るためにはさらなる研究が必要である。

4-5-2. 尿細管管腔で形成される CPP の物性について

本研究により、CaPi と CPP とでは細胞毒性に大きな違いがあることが確認でき、LMP や ROS 産生といった点で細胞毒性のメカニズムに違いがあることがわかった。このことから、CPP がどのように CKD の進展に寄与しているのかを知るには、実際の尿細管において生じている可能性が高い CPP を用いて研究することが重要である。

さらに CPP には primary CPP や secondary CPP など複数の種類が存在することが知られている。これまでのところ、実際に尿細管管腔で形成される CPP の物性を調べた研究は行われていないため、現状では推測することしかできないが、図 4 で見られたように、CPP が細胞膜表面に吸着する性質を有することを鑑みると、尿細管においても CPP は上皮細胞表面に吸着し時間とともに蓄積すると考えられる。CPP は時間経過に伴ってアモルファスの CaPi を含む primary CPP から、より結晶性の CaPi を含む secondary CPP に成熟すると考えられているため (Jahnen-Dechent & Smith, 2020)、近位尿細管内腔において生じた CPP は時間とともに尿細管上皮細胞表面で成熟すると推測される。また、血中と比較すると低濃度の fetuin-A しか存在しない原尿中では、血中よりも CaPi が結晶化しやすく、secondary CPP が形成されやすい可能性がある。

近年、CPP が様々な生理活性物質を運搬する役割を持つ可能性に着目した研究が報告されており、CPP の無機成分だけでなく CPP と結合したタンパク質や脂質、核酸といった生理活性物質が細胞に影響を与えている可能性が提案されている (Smith et al., 2018)。尿毒症の患者の血清から単離した CPP と in vitro で合成した CPP とを比較すると僅かではあるが無機成分やタンパク質、脂質の組成に違いが認められている。CKD の患者と健常者とは CPP の組成が異なる可能性も含め、CPP がどのように CKD の進行に寄与しているのかを知るためには、CPP の特性を詳細に調べることが望まれる。

4-6. 本研究のまとめ

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図 47 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。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。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。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。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。

CKD 患者においては心血管疾患が主要な死因となっていることもあり、これまでの CPP 研究では、後期 CKD 患者の血中に生じる CPP が注目されてきた。CPP が血管内皮細胞や平滑筋細胞に与える障害機構が調べられてきた一方で、尿細管管腔に形成される CPP による細胞障害については見過ごされてきた。しかし、CKD の早期の段階から、血清リン濃度を保つためにネフロンあたりのリン排泄量を増加させるという代償機構が働くことにより、尿細管においてリン濃度が上昇し CPP が形成されている可能性がある。尿細管管腔において生じた CPP が尿細管上皮細胞に毒性を引き起こし、機能的なネフロン数が減少すると、ネフロンあたりのリン排泄量を増加させる必要が生じ、尿細管内腔におけるリン濃度の上昇とさらなる腎障害が生じるという悪循環に陥ることが考えられる。本研究では上記の仮説の下、CPP が尿細管上皮細胞に与える細胞障害機構を調べ、リソソーム・オートファジー系やコレステロール代謝の攪乱により細胞が酸化ストレスや物理的な傷害に対して脆弱化していることを明らかにした。本研究の結果をふまえた上で、さらに尿細管における CPP の細胞障害機構を詳細に調べることで CKD のより早い段階で腎障害を阻止することが可能となる。

— 謝辞 —

本研究を遂行するにあたり、学部時代より長きに渡り御指導、御高配を賜りました東京大学大学院総合文化研究科 村田昌之教授に深く御礼申し上げます。自由に研究ができる環境を下さり、また研究者としての将来を見据え、親身に面倒を見ていただきました。

慢性腎臓病と CPP というテーマに携わるきっかけを作っていただき、背景知識をご教授いただいた自治医科大学抗加齢医学研究部 黒尾誠先生に深謝いたします。同研究部の黒須洋先生には論文作成にあたりご助言いただき、三浦裕先生には CPP の物性に関する実験を行っていただき、厚く御礼申し上げます。

リソソームの pH 測定に関する共同研究を快諾いただいた東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室の浦野泰照教授に心より謝意を表します。同教室の花岡健二郎准教授には pH 測定実験に関する的確なご助言をいただき、溝口舞さんには実際のプローブ作製から測定まで行っていただきました。心より感謝いたします。

顕微鏡画像の定量にあたっては、ニコン株式会社ヘルスケア事業部 米谷信彦様に丁寧にご指導いただき、厚く御礼申し上げます。

図表の作成にあたっては、東京芸術大学 藤田紅於様にご支援いただき、厚く御礼申し上げます。

実験の補佐をはじめ研究生活において様々なご助言、ご支援をいただきました村田研究室の皆様には深く感謝申し上げます。坪内朝子特任助教には私が CPP の実験を始める際に実験方法の指導をしていただきました。この場をお借りして深く感謝致します。

最後に、学部、修士課程、博士課程と長きに渡り温かく見守り研究生活を支えてくれた家族に心より感謝します。

第5章 参考文献

- Aghagolzadeh, P., Bachtler, M., Bijarnia, R., Jackson, C., Smith, E. R., Odermatt, A., Radpour, R., & Pasch, A. (2016). Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- α . *Atherosclerosis*, *251*, 404–414. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.044>
- Aihara, K., Byer, K. J., & Khan, S. R. (2003). Calcium phosphate-induced renal epithelial injury and stone formation: Involvement of reactive oxygen species. *Kidney International*, *64* (4), 1283–1291. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00226.x>
- Aits, S., Krickler, J., Liu, B., Ellegaard, A. M., Hämälistö, S., Tvingsholm, S., Corcelle-Termeau, E., Høgh, S., Farkas, T., Jonassen, A. H., Gromova, I., Mortensen, M., & Jäättelä, M. (2015). Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay. *Autophagy*, *11* (8), 1408–1424. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1063871>
- Akiyama, K. ichi, Miura, Y., Hayashi, H., Sakata, A., Matsumura, Y., Kojima, M., Tsuchiya, K., Nitta, K., Shiizaki, K., Kurosu, H., & Kuro-o, M. (2020). Calciprotein particles regulate fibroblast growth factor-23 expression in osteoblasts. *Kidney International*, *97* (4), 702–712. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.10.019>
- Alpy, F., Rousseau, A., Schwab, Y., Legueux, F., Stoll, I., Wendling, C., Spiegelhalter, C., Kessler, P., Mathelin, C., Rio, M. C., Levine, T. P., & Tomasetto, C. (2013). STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *Journal of Cell Science*, *126* (23), 5500–5512. <https://doi.org/10.1242/jcs.139295>
- Appelqvist, H., Sandin, L., Björnström, K., Saftig, P., Garner, B., Öllinger, K., & Kågedal, K. (2012). Sensitivity to lysosome-dependent cell death is directly regulated by lysosomal cholesterol content. *PLoS ONE*, *7* (11), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050262>
- Bank, N., Su, W., Aynedjian, H. S., & Division, R. (1978). A micropuncture study of renal phosphate transport in rats with chronic renal failure and secondary hyperparathyroidism. *Journal of Clinical Investigation*, *61* (4), 884–894. <https://doi.org/10.1172/JCI109014>
- Boya, P. (2012). Lysosomal function and dysfunction: Mechanism and disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, *17* (5), 766–774. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4405>

- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2009). Cholesterol feedback: From Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *Journal of Lipid Research*, *50* (SUPPL.), 15–27.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R800054-JLR200>
- Chang, T. Y., Chang, C. C. Y., Ohgami, N., & Yamauchi, Y. (2006). Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *22*, 129–157. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104656>
- Chen, X., Khambu, B., Zhang, H., Gao, W., Li, M., Chen, X., Yoshimori, T., & Yin, X. M. (2014). Autophagy induced by calcium phosphate precipitates targets damaged endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, *289* (16), 11162–11174.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.531855>
- Coresh, J., Astor, B., & Sarnak, M. J. (2004). Evidence for increased cardiovascular disease risk in patients with chronic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, *13* (1), 73–81. <https://doi.org/10.1097/00041552-200401000-00011>
- Cruz, J. C., & Chang, T. Y. (2000). Fate of endogenously synthesized cholesterol in Niemann-Pick type C1 cells. *Journal of Biological Chemistry*, *275* (52), 41309–41316.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M008272200>
- de Araujo, M. E. G., Liebscher, G., Hess, M. W., & Huber, L. A. (2020). Lysosomal size matters. *Traffic*, *21* (1), 60–75. <https://doi.org/10.1111/tra.12714>
- Deffieu, M. S., & Pfeffer, S. R. (2011). Niemann-Pick type C 1 function requires luminal domain residues that mediate cholesterol-dependent NPC2 binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108* (47), 18932–18936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110439108>
- Di Marco, G. S., Hausberg, M., Hillebrand, U., Rustemeyer, P., Wittkowski, W., Lang, D., & Pavenstädt, H. (2008). Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *294* (6), 1381–1387. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00003.2008>
- Emamian, E. S. (2012). AKT/GSK3 signaling pathway and schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *5* (March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00033>
- Ewence, A. E., Bootman, M., Roderick, H. L., Skepper, J. N., McCarthy, G., Epple, M., Neumann, M., Shanahan, C. M., & Proudfoot, D. (2008). Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: A potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circulation Research*, *103* (5), 28–35.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.181305>

- Fedele, A. O., & Proud, C. G. (2020). Chloroquine and bafilomycin A mimic lysosomal storage disorders and impair mTORC1 signalling. *Bioscience Reports*, 40 (April), 1–20.
- Festa, B. P., Chen, Z., Berquez, M., Debaix, H., Tokonami, N., Prange, J. A., Hoek, G. Van De, Alessio, C., Raimondi, A., Nevo, N., Giles, R. H., Devuyst, O., & Luciani, A. (2018). Impaired autophagy bridges lysosomal storage disease and epithelial dysfunction in the kidney. *Nature Communications*, 9(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02536-7>
- Hamano, T., Matsui, I., Mikami, S., Tomida, K., Fujii, N., Imai, E., Rakugi, H., & Isaka, Y. (2010). Fetuin-mineral complex reflects extraosseous calcification stress in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21 (11), 1998–2007.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2009090944>
- Haut, L. L., Alfrey, A. C., Guggenheim, S., Buddington, B., & Schrier, N. (1980). Renal toxicity of phosphate in rats. *Kidney International*, 17(6), 722–731.
<https://doi.org/10.1038/ki.1980.85>
- Heiss, A., DuChesne, A., Denecke, B., Grötzinger, J., Yamamoto, K., Renneé, T., & Jahnen-Dechent, W. (2003). Structural basis of calcification inhibition by α 2-HS glycoprotein/fetuin-A: Formation of colloidal calciprotein particles. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 13333–13341.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M210868200>
- Hu, M. C., Shiizaki, K., Kuro-O, M., & Moe, O. W. (2013). Fibroblast growth factor 23 and klotho: Physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annual Review of Physiology*, 75, 503–533.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183727>
- Jahnen-Dechent, W., & Smith, E. R. (2020). Nature’s remedy to phosphate woes: calciprotein particles regulate systemic mineral metabolism. *Kidney International*, 97(4), 648–651. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.12.018>
- Johnson-lyles, D. N., Pei, K., Lockett, S., Neun, B. W., Hansen, M., Clogston, J., Stern, S. T., & Mcneil, S. E. (2010). Fullerenol cytotoxicity in kidney cells is associated with cytoskeleton disruption , autophagic vacuole accumulation , and mitochondrial dysfunction. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 248, 249–258.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.08.008>

- Jono, S., McKee, M. D., Murry, C. E., Shioi, A., Nishizawa, Y., Mori, K., Morii, H., & Giachelli, C. M. (2000). Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation Research*, *87*(7). <https://doi.org/10.1161/01.res.87.7.e10>
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO Journal*, *19*(21), 5720–5728. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg454>
- Ketterer, S., Gomez-Auli, A., Hillebrand, L. E., Petrera, A., Ketscher, A., & Reinheckel, T. (2017). Inherited diseases caused by mutations in cathepsin protease genes. *FEBS Journal*, *284*(10), 1437–1454. <https://doi.org/10.1111/febs.13980>
- Kimura, S., Noda, T., & Yoshimori, T. (2007). Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy*, *3*(5), 452–460. <https://doi.org/10.4161/auto.4451>
- Kimura, T., Isaka, Y., & Yoshimori, T. (2017). Autophagy and kidney inflammation. *Autophagy*, *13*(6), 997–1003. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1309485>
- Kimura, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., Kaimori, J. Y., Matsui, I., Namba, T., Kitamura, H., Niimura, F., Matsusaka, T., Soga, T., Rakugi, H., & Isaka, Y. (2011). Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, *22*(5), 902–913. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010070705>
- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y. shin, Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J. ichi, Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S. ichiro, Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., ... Tanaka, K. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, *131*(6), 1149–1163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.035>
- Köppert, S., Büscher, A., Babler, A., Ghallab, A., Buhl, E. M., Latz, E., Hengstler, J. G., Smith, E. R., & Jahnen-Dechent, W. (2018). Cellular clearance and biological activity of calciprotein particles depend on their maturation state and crystallinity. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1991. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01991>
- Kunishige, R., Mizoguchi, M., Tsubouchi, A., Hanaoka, K., Miura, Y., Kurosu, H., Urano, Y., Kuro-o, M., & Murata, M. (2020). Calciprotein particle-induced cytotoxicity via

- lysosomal dysfunction and altered cholesterol distribution in renal epithelial HK-2 cells. *Scientific Reports*, 10 (1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77308-3>
- Kuro-o, M. (2014). Calciprotein particle (CPP): A true culprit of phosphorus woes? *Nefrologia*, 34 (1), 1–4. <https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2013.Dec.12385>
- Kuro-O, M. (2013). Klotho, phosphate and FGF-23 in ageing and disturbed mineral metabolism. *Nature Reviews Nephrology*, 9 (11), 650–660. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.111>
- Lin, T.-A., Wu, V. C.-C., & Wang, C.-Y. (2019). Autophagy in chronic kidney diseases. *Cells*, 8 (1), 61. <https://doi.org/10.3390/cells8010061>
- Liu, W. J., Shen, T. T., Chen, R. H., Wu, H. L., Wang, Y. J., Deng, J. K., Chen, Q. H., Pan, Q., Fu, C. M. H., Tao, J. L., Liang, D., & Liu, H. F. (2015). Autophagy-lysosome pathway in renal tubular epithelial cells is disrupted by advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Journal of Biological Chemistry*, 290 (33), 20499–20510. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.666354>
- Liu, Z., Xiao, Y., Chen, W., Wang, Y., Wang, B., Wang, G., Xu, X., & Tang, R. (2014). Calcium phosphate nanoparticles primarily induce cell necrosis through lysosomal rupture: The origination of material cytotoxicity. *Journal of Materials Chemistry B*, 2 (22), 3480–3489. <https://doi.org/10.1039/c4tb00056k>
- Mackay, B. Y. E. M., & Oliver, J. (1935). Renal damage following the ingestion of a diet containing an excess of inorganic phosphate. *The Journal of Experimental Medicine*, 61 (3), 319.
- Martina, J. A., Diab, H. I., Lishu, L., Jeong-A, L., Patange, S., Raben, N., & Puertollano, R. (2014). The nutrient-responsive transcription factor TFE3 promotes autophagy, lysosomal biogenesis, and clearance of cellular debris. *Science Signaling*, 7 (309), 1–16. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004754>
- Matsui, I., Hamano, T., Mikami, S., Inoue, K., Shimomura, A., Nagasawa, Y., Michigami, T., Ohnishi, T., Fujii, N., Nakano, C., Kusunoki, Y., Kitamura, H., Iwatani, H., Takabatake, Y., Kaimori, J. Y., Matsuba, G., Okoshi, K., Kimura-Suda, H., Tsubakihara, Y., ... Isaka, Y. (2013). Retention of fetuin-A in renal tubular lumen protects the kidney from nephrocalcinosis in rats. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 304 (6), 751–760. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00329.2012>
- Mauvezin, C., & Neufeld, T. P. (2015). Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent

- autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, *11* (8), 1437–1438.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1066957>
- Medina, D. L., Di Paola, S., Peluso, I., Armani, A., De Stefani, D., Venditti, R., Montefusco, S., Scotto-Rosato, A., Prezioso, C., Forrester, A., Settembre, C., Wang, W., Gao, Q., Xu, H., Sandri, M., Rizzuto, R., De Matteis, M. A., & Ballabio, A. (2015). Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nature Cell Biology*, *17* (3), 288–299. <https://doi.org/10.1038/ncb3114>
- Medina, D. L., Fraldi, A., Bouche, V., Annunziata, F., Mansueto, G., Spampinato, C., Puri, C., Pignata, A., Martina, J. A., Sardiello, M., Palmieri, M., Polishchuk, R., Puertollano, R., & Ballabio, A. (2011). Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Developmental Cell*, *21* (3), 421–430.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.016>
- Mekmene, O., Quillard, S., Rouillon, T., Bouler, J. M., Piot, M., & Gaucheron, F. (2009). Effects of pH and Ca/P molar ratio on the quantity and crystalline structure of calcium phosphates obtained from aqueous solutions. *Dairy Science and Technology*, *89* (3–4), 301–316. <https://doi.org/10.1051/dst/2009019>
- Meng, Y., Heybrock, S., Neculai, D., & Saftig, P. (2020). Cholesterol handling in lysosomes and beyond. *Trends in Cell Biology*, *30* (6), 452–466.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.02.007>
- Miura, Y., Iwazu, Y., Shiizaki, K., Akimoto, T., Kotani, K., Kurabayashi, M., Kurosu, H., & Kuro-O, M. (2018). Identification and quantification of plasma calciprotein particles with distinct physical properties in patients with chronic kidney disease. *Scientific Reports*, *8* (1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19677-4>
- Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell*, *147* (4), 728–741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>
- Noorden, C. J. F. Van. (2010). Imaging enzymes at work: metabolic mapping by enzyme histochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *58* (6), 481–497.
<https://doi.org/10.1369/jhc.2010.955518>
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., & Ballabio, A. (2011). Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Human Molecular Genetics*, *20* (19), 3852–3866.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddr306>

- Papadopoulos, C., Kravic, B., & Meyer, H. (2020). Repair or lysophagy: dealing with damaged lysosomes. *Journal of Molecular Biology*, 432(1), 231–239.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.08.010>
- Peake, K. B., & Vance, J. E. (2010). Defective cholesterol trafficking in Niemann-Pick C-deficient cells. *FEBS Letters*, 584(13), 2731–2739.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.047>
- Peskin, C. S., Tranchina, D., Vargas, D. Y., Tyagi, S., Oudenaarden, A. Van, Shea, E. K. O., Hong, J. W., Zeitlinger, J., Rokhsar, D. S., Boettiger, A. N., Berezhkovskii, A. M., Shvartsman, S. Y., Bialek, W., Tank, D. W., Wieschaus, E. F., Tank, D. W., Wieschaus, E. F., Bialek, W., Wieschaus, E. F., ... Carroll, S. B. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*, 325, 473–478.
- Presley, J. F., Mayor, S., McGraw, T. E., Dunn, K. W., & Maxfield, F. R. (1997). Bafilomycin A1 treatment retards transferrin receptor recycling more than bulk membrane recycling. *Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13929–13936.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13929>
- Reddy, A., Caler, E. V., & Andrews, N. W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca²⁺-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*, 106(2), 157–169.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00421-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00421-4)
- Sage, A. P., Lu, J., Tintut, Y., & Demer, L. L. (2011). Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney International*, 79(4), 414–422. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.390>
- Sarkar, S., Korolchuk, V., Renna, M., Winslow, A., & Rubinsztein, D. C. (2009). Methodological considerations for assessing autophagy modulators: A study with calcium phosphate precipitates. *Autophagy*, 5(3), 307–313.
<https://doi.org/10.4161/auto.5.3.7664>
- Schäfer, C., Heiss, A., Schwarz, A., Westenfeld, R., Ketteler, M., Floege, J., Müller-esterl, W., Schinke, T., & Jahn-dechent, W. (2003). The serum protein α_2 -Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *Journal of Clinical Investigation*, 112(3), 357–366.
<https://doi.org/10.1172/JCI200317202.Introduction>
- Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V. A., Arencibia, M. G., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S. U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., Rubinsztein, D. C., & Ballabio,

- A. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science*, *332* (6036), 1429–1433. <https://doi.org/10.1126/science.1204592>
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M. C., Facchinetti, V., Sabatini, D. M., & Ballabio, A. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO Journal*, *31* (5), 1095–1108. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.32>
- Sezgin, E., Can, F. B., Schneider, F., Clausen, M. P., Galiani, S., Stanley, T. A., Waithe, D., Colaco, A., Honigsmann, A., Wüstner, D., Platt, F., & Eggeling, C. (2016). A comparative study on fluorescent cholesterol analogs as versatile cellular reporters. *Journal of Lipid Research*, *57* (2), 299–309. <https://doi.org/10.1194/jlr.M065326>
- Shuto, E., Taketani, Y., Tanaka, R., Harada, N., Isshiki, M., Sato, M., Nashiki, K., Amo, K., Yamamoto, H., Higashi, Y., Nakaya, Y., & Takeda, E. (2009). Dietary phosphorus acutely impairs endothelial function. *Journal of the American Society of Nephrology*, *20* (7), 1504–1512. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008101106>
- Skowyra, M. L., Schlesinger, P. H., Naismith, T. V., & Hanson, P. I. (2018). Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair. *Science*, *360* (6384). <https://doi.org/10.1126/science.aar5078>
- Smith, E. R., Ford, M. L., Tomlinson, L. A., Bodenham, E., McMahon, L. P., Farese, S., Rajkumar, C., Holt, S. G., & Pasch, A. (2014). Serum calcification propensity predicts all-cause mortality in predialysis CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, *25* (2), 339–348. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013060635>
- Smith, E. R., Hanssen, E., McMahon, L. P., & Holt, S. G. (2013). Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS ONE*, *8* (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060904>
- Smith, E. R., Hewitson, T. D., Hanssen, E., & Holt, S. G. (2018). Biochemical transformation of calciprotein particles in uraemia. *BONE*, *110*, 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.02.023>
- Steitz, S. A., Speer, M. Y., Curinga, G., Yang, H. Y., Haynes, P., Aebersold, R., Schinke, T., Karsenty, G., & Giachelli, C. M. (2001). Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: Upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circulation Research*, *89* (12), 1147–1154. <https://doi.org/10.1161/hh2401.101070>

- Stern, S. T., Adiseshaiah, P. P., & Crist, R. M. (2012). Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Particle and Fibre Toxicology*, 9(20). <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-20>
- Sugii, S., Reid, P. C., Ohgami, N., Du, H., & Chang, T. Y. (2003). Distinct endosomal compartments in early trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 27180–27189. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300542200>
- Takahashi, S., Kagami, Y., Hanaoka, K., Terai, T., Komatsu, T., Ueno, T., Uchiyama, M., Koyama-Honda, I., Mizushima, N., Taguchi, T., Arai, H., Nagano, T., & Urano, Y. (2018). Development of a series of practical fluorescent chemical tools to measure pH values in living samples. *Journal of the American Chemical Society*, 140, 5925–5933. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b00277>
- Thomas, T. P., Majoros, I., Kotlyar, A., Mullen, D., Holl, M. M. B., & Baker, J. R. (2009). Cationic poly (amidoamine) dendrimer induces lysosomal apoptotic pathway at therapeutically relevant concentrations. *Biomacromolecules*, 10, 3207–3214.
- Tontonoz, P. (2011). Transcriptional and posttranscriptional control of cholesterol homeostasis by liver X receptors. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 76, 129–137. <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.010702>
- Torelli, G., Milla, E., Faelli, A., & Costantini, S. (1966). Energy requirement for sodium reabsorption in the in vivo rabbit kidney. *The American Journal of Physiology*, 211(3), 576–580. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1966.211.3.576>
- Uchimoto, T., Nohara, H., Kamehara, R., Iwamura, M., Watanabe, N., & Kobayashi, Y. (1999). Mechanism of apoptosis induced by a lysosomotropic agent, L-leucyl-L-leucine methyl ester. *Apoptosis*, 4(5), 357–362. <https://doi.org/10.1023/A:1009695221038>
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39–51. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-i](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-i)
- Vlahakis, N. E., Schroeder, M. A., Pagano, R. E., & Hubmayr, R. D. (2002). Role of deformation-induced lipid trafficking in the prevention of plasma membrane stress failure. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(9), 1282–1289. <https://doi.org/10.1164/rccm.200203-207OC>

- Wang, F., Gómez-Sintes, R., & Boya, P. (2018). Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic*, *19*(12), 918–931. <https://doi.org/10.1111/tra.12613>
- Wang, F., Salvati, A., & Boya, P. (2018). Lysosome-dependent cell death and deregulated autophagy induced by amine-modified polystyrene nanoparticles. *Open Biology*, *4*(8). <https://doi.org/10.1098/rsob.170271>
- Yamamoto, T., Takabatake, Y., Kimura, T., Takahashi, A., Namba, T., Matsuda, J., Minami, S., Kaimori, J. Y., Matsui, I., Kitamura, H., Matsusaka, T., Niimura, F., Yanagita, M., Isaka, Y., & Rakugi, H. (2016). Time-dependent dysregulation of autophagy: Implications in aging and mitochondrial homeostasis in the kidney proximal tubule. *Autophagy*, *12*(5), 801–813. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1159376>
- Zager, R. A., Burkhart, K. M., Johnson, A. C. M., & Sacks, B. M. (1999). Increased proximal tubular cholesterol content: Implications for cell injury and “acquired cytoresistance.” *Kidney International*, *56*(5), 1788–1797. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00745.x>
- Zatloukal, K., Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Heid, H., Schnoelzer, M., Kenner, L., Kleinert, R., Prinz, M., Aguzzi, A., & Denk, H. (2002). p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *American Journal of Pathology*, *160*(1), 255–263. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64369-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64369-6)
- Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., & Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, *469*(7329), 221–226. <https://doi.org/10.1038/nature09663>
- 一般社団法人日本腎臓学会. (2012). Ckd 診療ガイド2012. 日本腎臓学会誌, *54*(8).
- 倉林正彦. (2013). 透析患者における心血管疾患の成因と病態. 心臓, *45*(5), 494–501. <https://doi.org/10.11281/shinzo.45.494>
- MSD マニュアル家庭版, (<http://www.msdmanuals.com/ja-jp/>, 最終確認 2020年12月2日)

第6章 図表

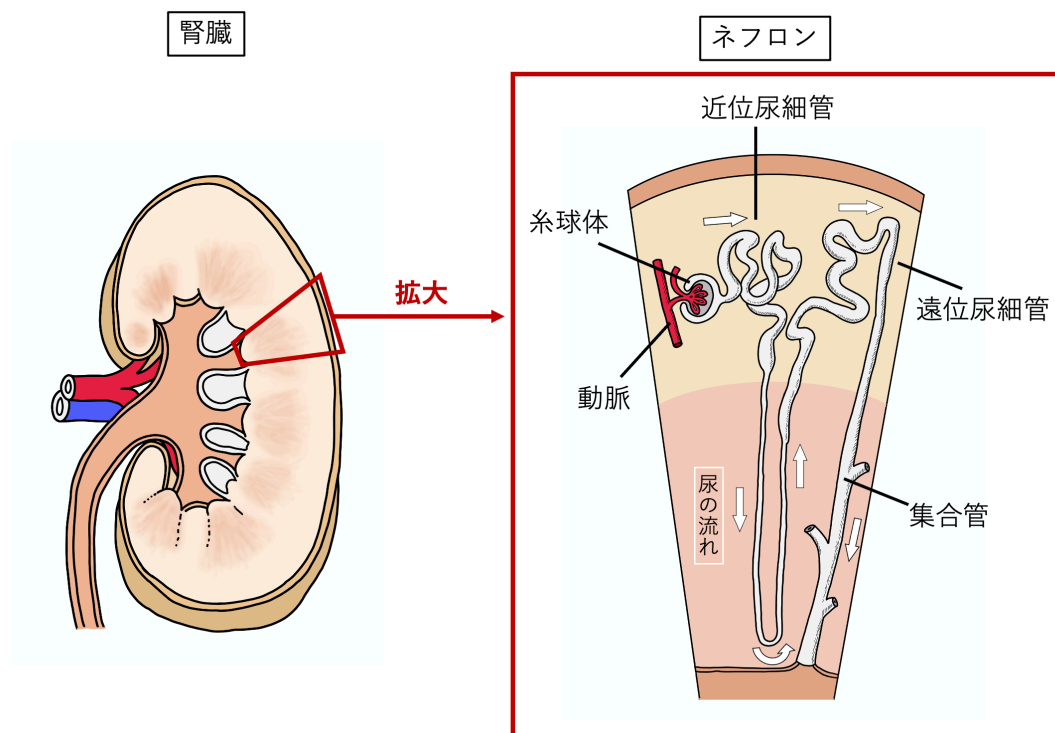


図 A 腎臓およびネフロンの概略図

(MSD マニュアル家庭版 (<http://www.msdmanuals.com/ja-jp/>, 最終確認 2020 年 12 月 2 日)を基に作成、一部改変)

腎臓はネフロンと呼ばれる、糸球体と尿細管からなる機能単位でできている。糸球体では血管から流れ込んだ血液のうち血球やタンパク質といった大きな分子以外の血中成分と水分がろ過され、原尿として近位尿細管に流れ込む。原尿には老廃物以外に、アミノ酸やグルコースなどの栄養素や、ナトリウム、カリウム、リン、マグネシウムといった様々な電解質が含まれているため、尿細管においてはそういった人体に必要な成分の再吸収が行われる。

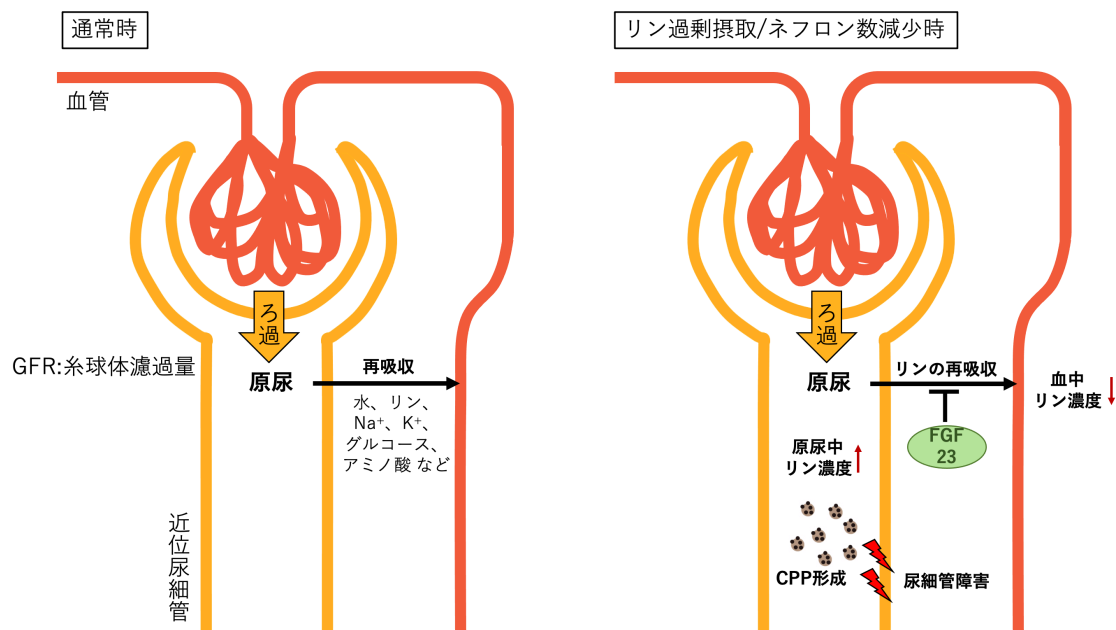


図 B 尿細管におけるリン再吸収と本研究の仮説を表す概略図

尿細管においてはアミノ酸やグルコースなどの栄養素や、ナトリウム、カリウム、リン、マグネシウムといった様々な電解質など、人体に必要な成分の再吸収が行われる。血清リン濃度の調節において、腎臓におけるリンの排泄が大きな役割を果たす。リンの過剰摂取時や、加齢などによりネフロン数が減少すると、血中リン濃度を保つために、ネフロンあたりのリン排泄量を増加させる必要がある。FGF23 は尿細管におけるリンの再吸収を抑制することでリン排泄を増加させる重要なホルモンである。CKD が進行した場合などネフロン数が一定以下になると FGF23 による代償機構が破綻し、高リン血症を呈するようになる。

FGF23 による代償機構は、血中リン濃度の恒常性を保つ一方で、尿細管においてリン濃度を増加させ CPP 形成を促進させ尿細管障害を引き起こしている可能性がある。本研究では、このような仮説の下、CPP が近位尿細管上皮細胞に与える障害メカニズムの解明を目指した。

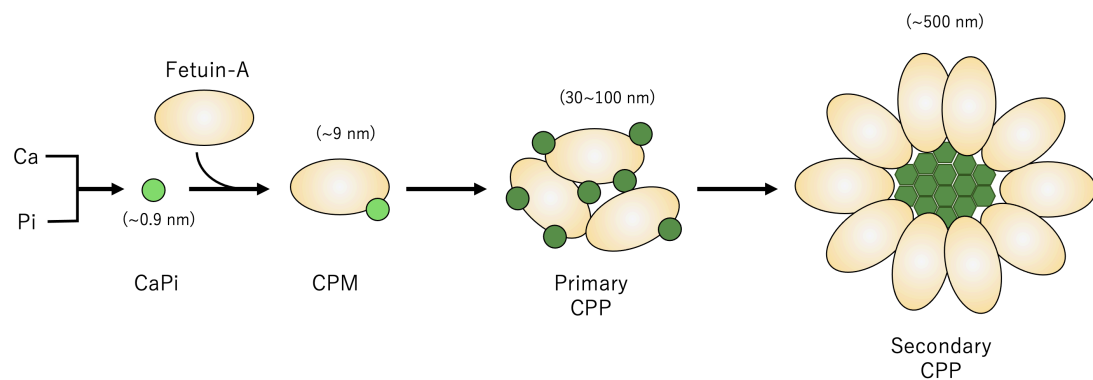


図 C CPP の形成・成熟過程の概略図

(Jahnen-Dechent & Smith, 2020; Figure 1 を基に作成、一部改変)

高濃度のリンとカルシウム存在下では~0.9 nm 程度の CaPi イオンクラスターが作られ、そこに fetuin-A が吸着することで~9 nm 程度の CPP モノマー (CPM; calciprotein monomer) が形成される。CPP モノマーが複数凝集し、30~100 nm の球状の primary CPP が形成される。Primary CPP に含まれる CaPi はアモルファス状であるが、時間経過と共に相転移しヒドロキシアパタイト様の CaPi 結晶を含む secondary CPP に成熟する。Secondary CPP は楕円形をしており、長軸が~500 nm 程度の大きさである。

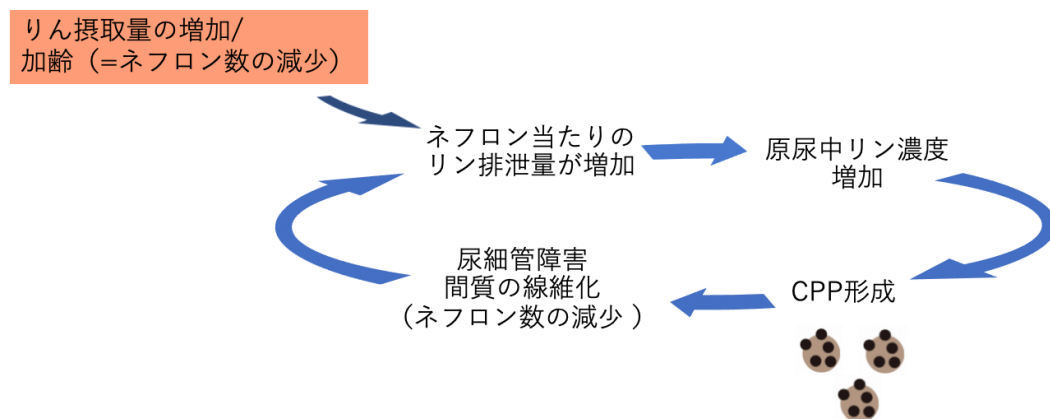


図 D CPP による尿細管障害と CKD 発症・進行のメカニズムを表す概略図

リンの過剰摂取時や、加齢などによりネフロン数が減少すると、血中リン濃度を保つためにネフロンあたりのリン排泄量を増加させる必要がある。このことは、原尿中のリン濃度の上昇と CPP 形成につながり、CPP が尿細管障害を引き起こすことでネフロン数の減少に寄与する可能性がある。一旦ネフロン数が減少すると、さらにネフロンあたりのリン排泄量を増加させる必要が生じ、さらに CPP が形成されやすくなるという悪循環に陥る。CPP は以上のようなメカニズムで CKD を発症・進行させる可能性がある。本研究ではこのような仮説の下、これまで不明であった細胞レベルでの尿細管上皮細胞障害メカニズムの解明を目指した。

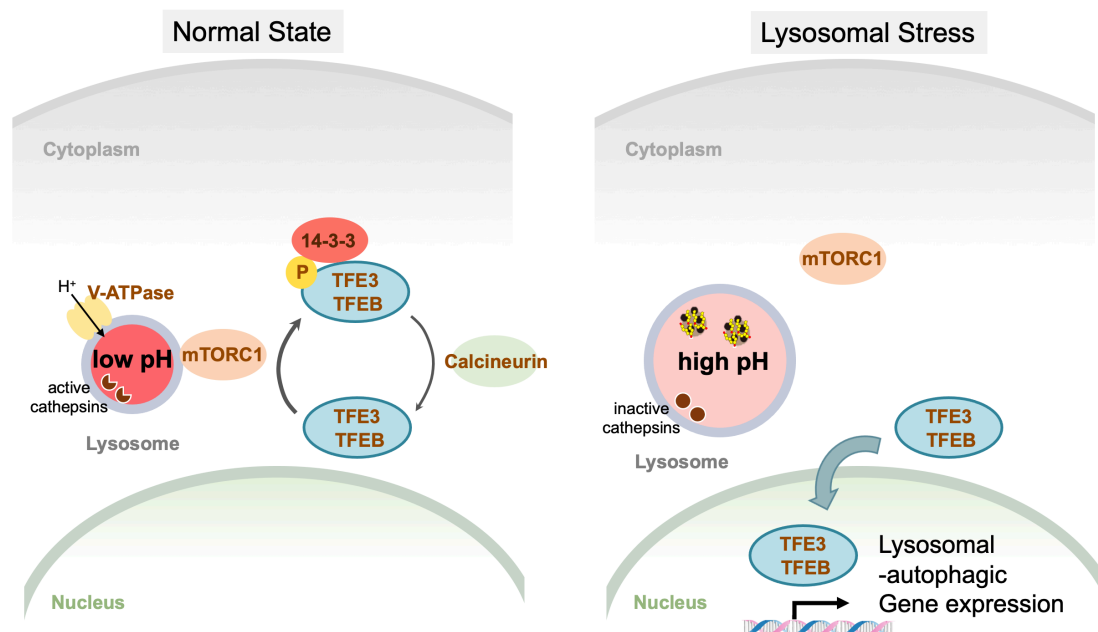


図 E TFEB/3 によるリソソーム制御を表す概略図

定常状態においてリソソーム内腔の pH は膜上のプロトンポンプ v-ATPase (Vacuolar ATPase) の働きにより低く保たれている。Cathepsinをはじめとする多くのリソソーム加水分解酵素は酸性 (pH4~5) において至適 pH を持っている。

リソソーム生合成やオートファジーを司るマスター制御因子である TFEB/3 は定常状態では mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) によるリン酸化を受け、14-3-3 タンパク質と結合した状態で細胞質に留まっているが、栄養飢餓やリソソームの pH 上昇をはじめとするリソソームストレス条件下では脱リン酸化され、14-3-3 タンパク質と解離し核移行する。TFEB/3 のリン酸化を担う mTORC1 はリソソーム膜表面に局在し活性化状態にあるが、リソソームストレス環境においてはリソソーム膜表面から離脱し不活性化する。TFEB/3 の脱リン酸化は calcineurin によって行われており、calcineurin はリソソーム内のカルシウムが mucolipin 1 (MCOLN1) を介して細胞質に流出することにより活性化する。核移行した TFEB/3 はオートファジーやリソソーム合成関連遺伝子の発現を誘導し、それによりリソソームストレス状態の解消に寄与すると考えられている。

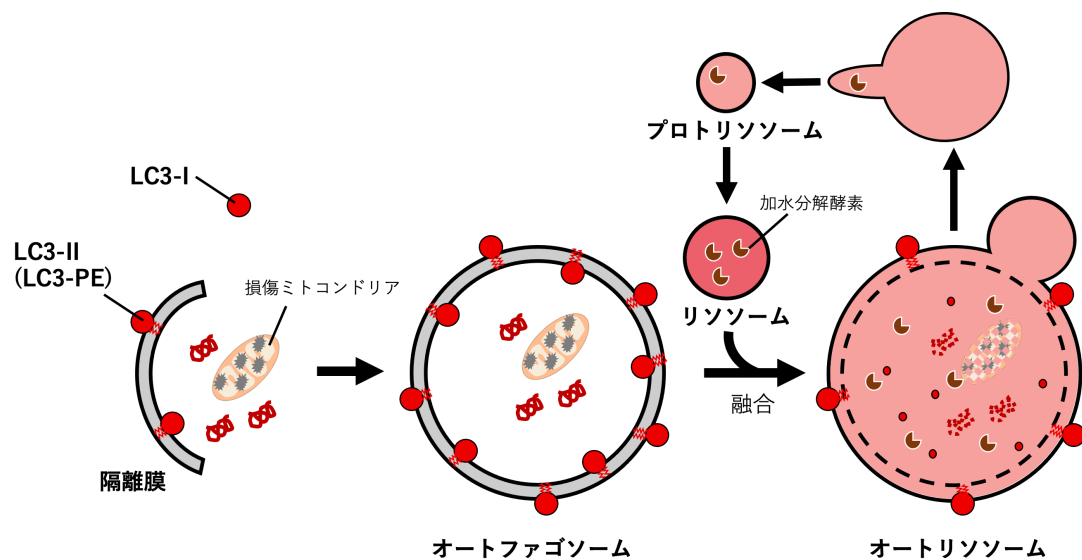


図 F オートファジーの概略図

オートファジー（マクロオートファジー）においては、隔離膜が細胞質中のタンパク質やオルガネラの一部を取り囲みオートファゴソームを形成した後、リソソームと融合しオートリソソームとなることで内容物を分解する。そうすることで、飢餓状態などの際に細胞質の一部をランダムに分解し栄養源を確保したり、酸化ストレスを受けた際に損傷したタンパク質やオルガネラを特異的に分解しタンパク質やオルガネラの品質管理を行う。細胞質において拡散している LC3-I は、フォスファチジルエタノールアミン（PE; phosphatidylethanolamine）に共有結合し（LC3-II）、隔離膜・オートファゴソーム膜に局在する。二重膜構造のオートファゴソームの内膜側の LC3-II は、基質とともに分解される。オートファジーを終えたオートリソソームからリソソーム膜タンパクを含むチューブ状の構造を突出させ、プロトリソソーム（proto-lysosome）として絞り出される。プロトリソソームは徐々に内腔にリソソームタンパク質を獲得し、酸性化することで新生リソソームができる。

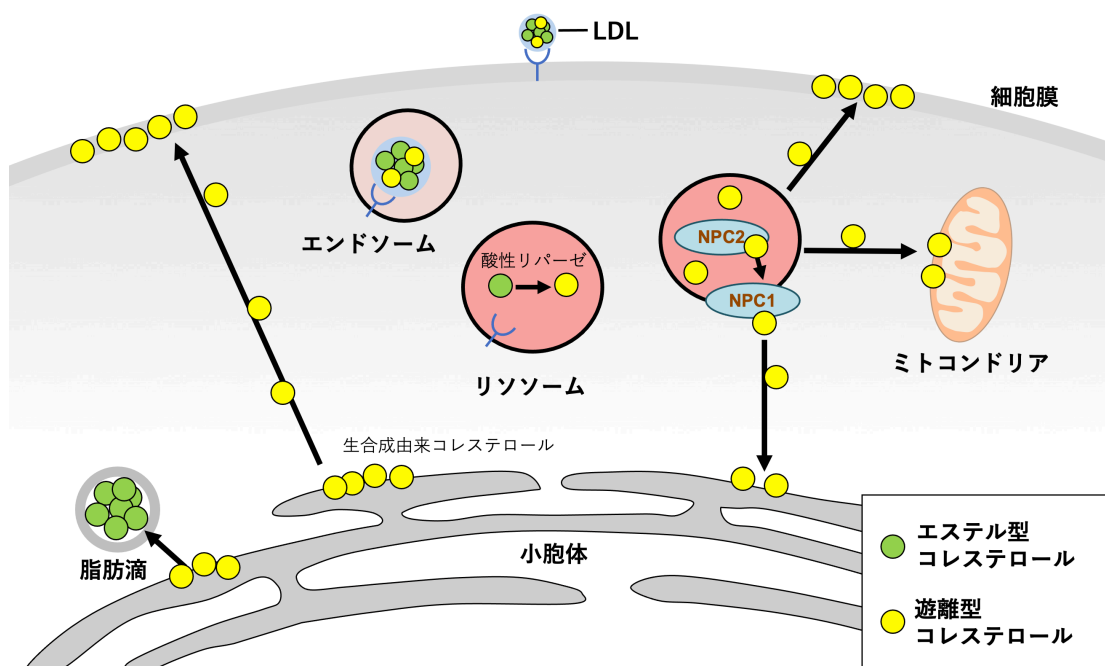


図 G 細胞内コレステロール輸送の概略図

(Chang et al., 2006; Figure 2 を基に作成、一部改変)

低密度リボタンパク質 (LDL; low-density lipoprotein)は細胞膜上の LDL 受容体を介して細胞内に取り込まれ、リソソームへと運ばれる。LDL に含まれるコレステロールは遊離型よりもエステル型が多いが、それらはリソソームに存在する酸性リパーゼにより加水分解され、遊離コレステロールとなる。遊離コレステロールはリソソーム内腔に存在する NPC2 (Niemann-Pick disease type C2) に結合した後、リソソーム膜に存在する NPC1 (Niemann-Pick disease type C1) へと受け渡され、ER や細胞膜、ミトコンドリアなどへと輸送される。リソソーム以降のコレステロール輸送については明らかでない点も多いが、小胞性輸送の他に細胞質に存在するコレステロール結合性のタンパク質による非小胞性輸送や膜接触部位 (membrane contact sites; MCS) を通じて後期エンドソーム/リソソームから ER などに輸送される経路などが提唱されている。LDL 由来のコレステロールエステルは 30 分以内に加水分解され、その後さらに 30 分経過すると後期エンドソームから細胞膜へと運ばれることが知られている。ER において新しく合成された内因性コレステロールは 10~20 分程度で速やかに細胞膜へと運ばれるが、その後の輸送については明らかでない点が多い。余剰のコレステロールは小胞体においてコレステロールアシル転移酵素 (ACAT; acyl-CoA cholesterol acyltransferase) によりエステル化され、脂肪滴に貯蔵される。

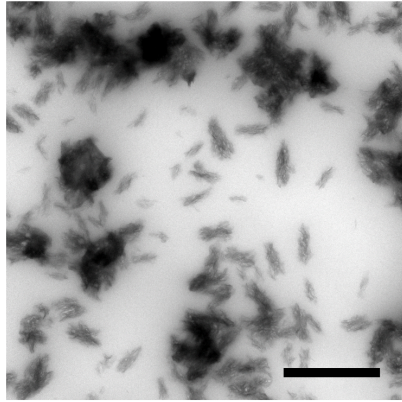
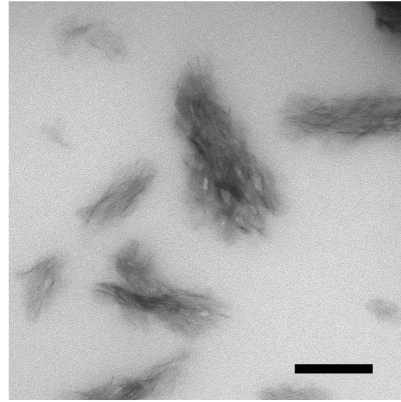
A**B**

図 1 本研究において作製した CPP の透過型電子顕微鏡画像

(A) CPP を透過型電子顕微鏡により観察した。スケールバーは 500 nm。

(B) A の拡大図。secondary CPP に特徴的な楕円形の結晶が観察された。スケールバーは 100 nm。

図 2 (インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため未掲載)

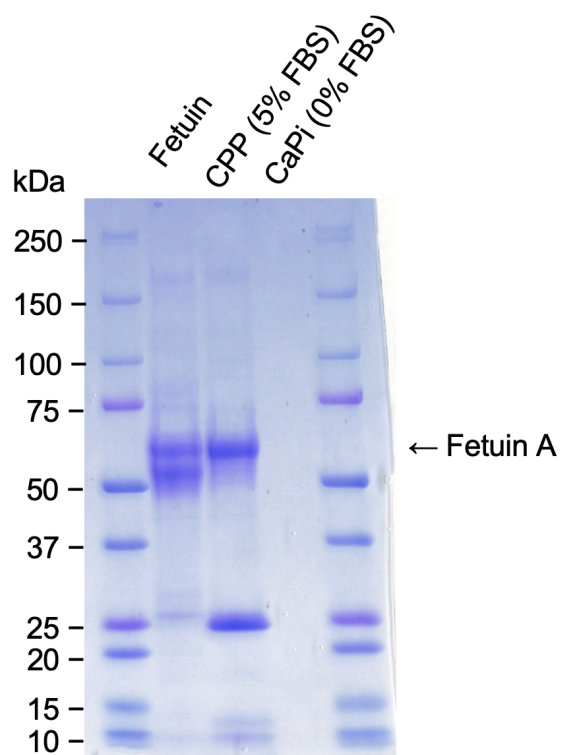


図 3 本研究において作製した CPP には fetuin-A が含まれる

CPP に fetuin-A が含まれていることを確認するため、CPP に含まれるタンパク質を SDS-PAGE と Coomassie brilliant blue 染色により調べた。ポジティブコントロールとして、ウシ fetuin の精製タンパク質を用いて作製した CPP を用い、ネガティブコントロールとして血清を含まない培地で作製した CaPi を用いた。本研究のウシ血清を用いた CPP 作製法により、ウシ fetuin-A (約 64 kDa) を含む CPP が作製されたことが示された。

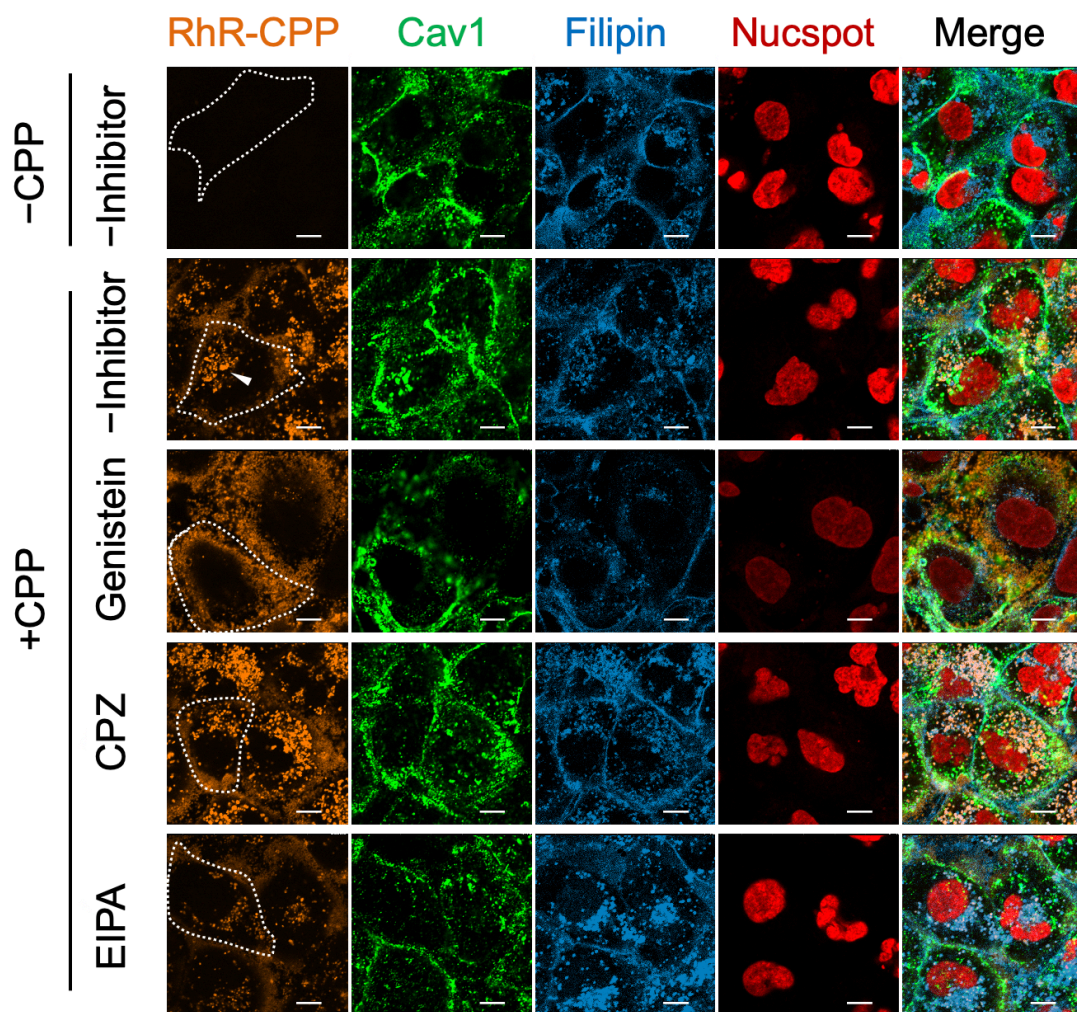


図 4 CPP はカベオラ依存的エンドサイトーシスおよびマクロピノサイトーシスにより細胞に取り込まれる

蛍光ビスホスホネート 5(6)-RhR-dRIS により蛍光標識した CPP (RhR-CPP)を取り込んだ HK-2 細胞の共焦点顕微鏡画像。HK-2 細胞を RhR-CPP を含んだ培地中で 12 時間培養後、PFA 固定し、caveolin-1 抗体を用いた蛍光抗体法と filipin によるコレステロール染色、Nucspot による核染色を行った後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光観察を行った。

+CPP (-Inhibitor) 条件の画像で見られるように、この蛍光性 CPP は細胞膜に吸着すると共に、一部はエンドサイトーシスされ細胞内に蓄積した。

CPP の細胞膜からの取り込み過程を詳細に調べるため、細胞を各種エンドサイトーシス阻害剤により 30 分事前処理した後、阻害剤存在下で RhR-CPP 培地を添加し上記の要領で蛍光抗体法観察を行った画像が 3~5 段目のパネルである。

コントロール（阻害剤無し）サンプルでは、エンドサイトーシスされた蛍光性 CPP を含む膜構造体が細胞の核近傍に蓄積する様子が観察された（+CPP -inhibitor 参照。矢印は細胞内の CPP を示す）。カベオラ依存的エンドサイトーシスを阻害することが知られる genistein 処理（200 μ M）では、RhR-CPP の細胞内取り込みが抑制された（+CPP genistein 参照。白破線は細胞膜を示す）。マクロピノサイトーシス阻害剤である EIPA（25 μ M）処理条件では、細胞膜に吸着する CPP が減少するとともに細胞内への取り込みも有意に減少した（+CPP EIPA 参照）。クラスリン依存的なエンドサイトーシス阻害剤である chlorpromazine 処理条件（15 μ M）では、むしろ CPP の細胞内蓄積の増加が見られた（+CPP CPZ 参照）。スケールバーは 10 μ m。RhR-CPPs: 5(6)-RhR-dRIS-標識 CPP、Cav1: caveolin-1、CPZ: chlorpromazine。

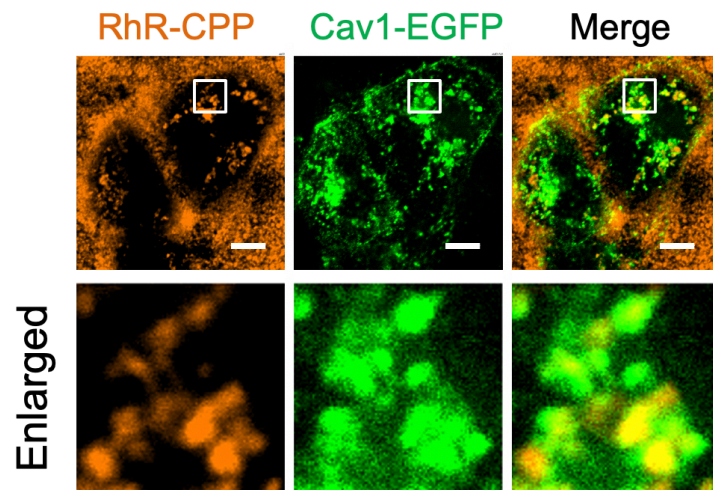


図5 RhR-CPP は caveolin-1 と共局在する

RhR-CPP と Cav1-EGFP の共局在を示す顕微鏡画像。Caveolin-1 の GFP 融合タンパク質を一過性に発現させた HK2 細胞に RhR-CPP を 12 時間取り込ませた細胞サンプルを蛍光抗体法で観察した。細胞膜周縁近傍に、caveolin-1 ポジティブな膜構造に RhR-CPP が内包されている像が観察された。Cav1: caveolin-1。

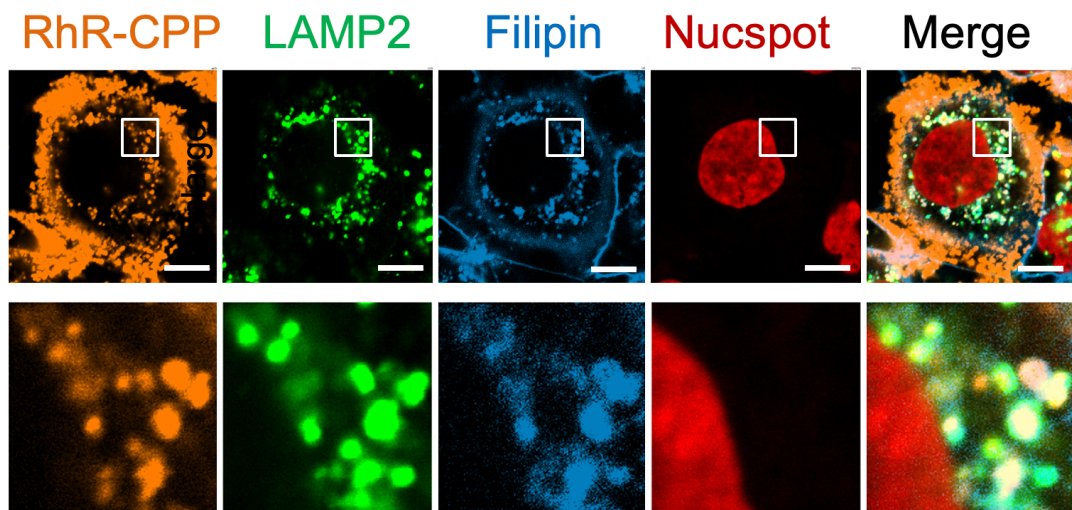


図 6 エンドサイトーシスされた RhR-CPP はコレステロールと共に後期エンドソーム/リソソーム (LELs) において蓄積する

RhR-CPP を含んだ培地中で HK-2 細胞を 3 時間培養後、4%PFA により固定し、抗 LAMP2 抗体を用いた蛍光抗体法による LELs 標識、filipin によるコレステロール染色、Nucspot による核染色を行った後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光観察を行った。RhR-CPP を取り込んだ小胞は各近傍に蓄積しており、LAMP2 ポジティブな小胞や filipin (遊離コレステロールの局在を示す) と共局在していた。上段の拡大画像を下段に示した。スケールバーは 10 μm 。

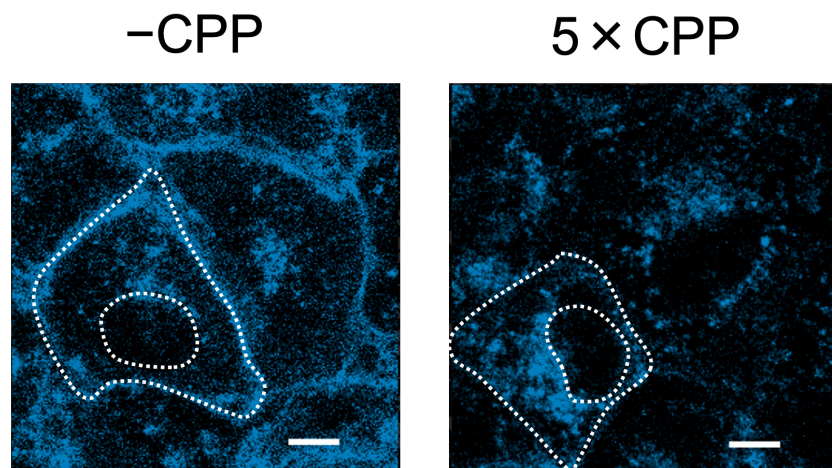


図 7 CPP を添加した細胞ではコレステロールが核近傍において蓄積し細胞膜において減少する

CPP を添加した培地で 24 時間培養した細胞に対し filipin によるコレステロール染色を行い、CPP を添加しなかった細胞と比較した。CPP を添加した細胞では filipin により標識されるコレステロールが核近傍により多く蓄積されると同時に、細胞膜のコレステロールの減少が観察された。スケールバーは 10 μm 。

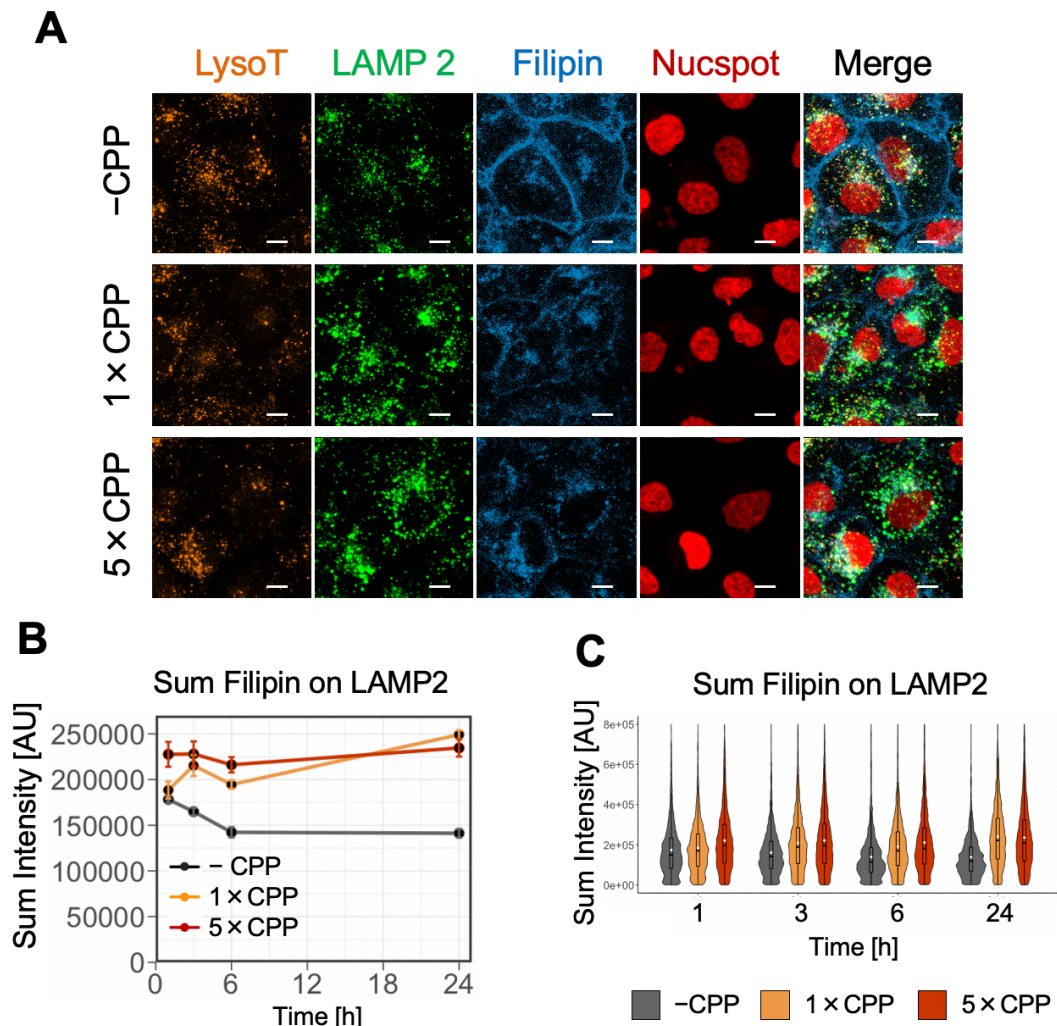


図 8 CPP を添加した細胞ではコレステロールが LELs 内において蓄積する

- (A) CPP による LELs 内コレステロール量の時間変化を定量するために、CPP 添加後 1~24 時間培養し固定した細胞に対し、filipin によるコレステロール染色、LAMP2 抗体を用いた蛍光抗体法による LELs 標識、Nucspot による核染色を行った。CPP を添加した細胞もしくは添加しなかった細胞を 24 時間培養した際の代表的な画像を示した。スケールバーは 10 μ m。LysoT: LysoTracker。
- (B) LELs における filipin の総蛍光強度の時間変化を表す折れ線グラフ。 蛍光画像の定量には、図 10A に示すように LAMP2 ポジティブな領域から LELs マスクを作成し、LELs 領域上の filipin の総蛍光強度の定量を行った。CPP を添加した細胞では、培養時間によって LELs (LAMP2 ポジティブな領域) におけるコレステロールの蓄積が見られた。
- (C) B と同様に定量を行ったデータをバイオリンプロットとして表した。

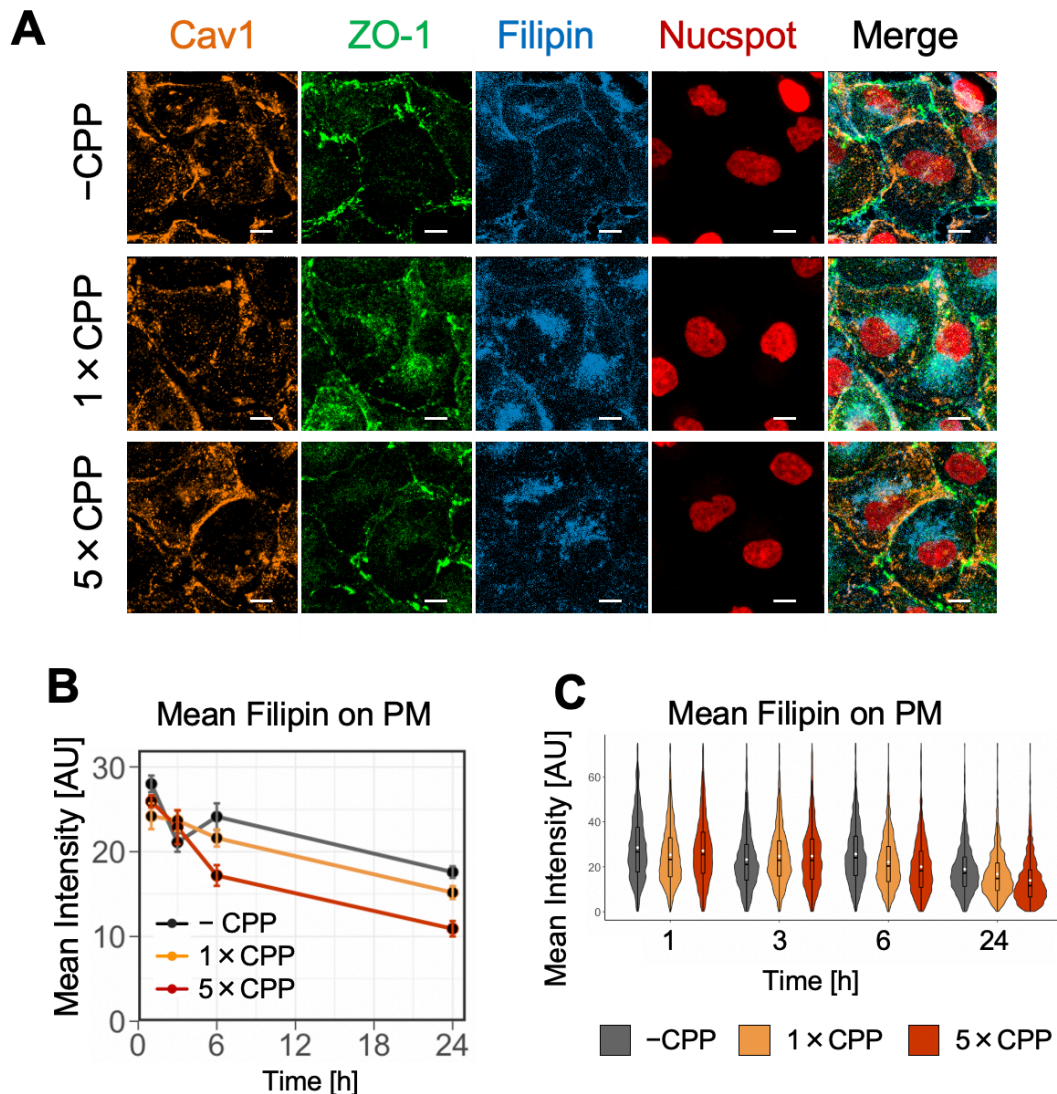


図9 CPPを添加した細胞では細胞膜におけるコレステロールが減少する

- (A) CPPによるコレステロールの細胞膜における量の時間変化を定量するために、CPP添加後1~24時間培養し固定した細胞に対し、filipinによるコレステロール染色、caveolin-1抗体とZO-1抗体を用いた蛍光抗体法による細胞膜標識、Nucspotによる核染色を行った。CPPを添加した細胞もしくは添加しなかった細胞を24時間培養した際の代表的な画像を示した。スケールバーは10 μ m。Cav1: caveolin-1。
- (B) 細胞膜における filipin の総蛍光強度の時間変化を表す折れ線グラフ。蛍光画像の定量には、図10Bに示すように caveolin-1 および ZO-1 ポジティブな領域から細胞膜マスクを作成し、細胞膜領域上の filipin の平均蛍光強度の定量を行った。CPPを加えた約6時間後から細胞膜のコレステロールの減少が見られた。
- (C) Bと同様に定量を行ったデータをバイオリンプロットとして表した。

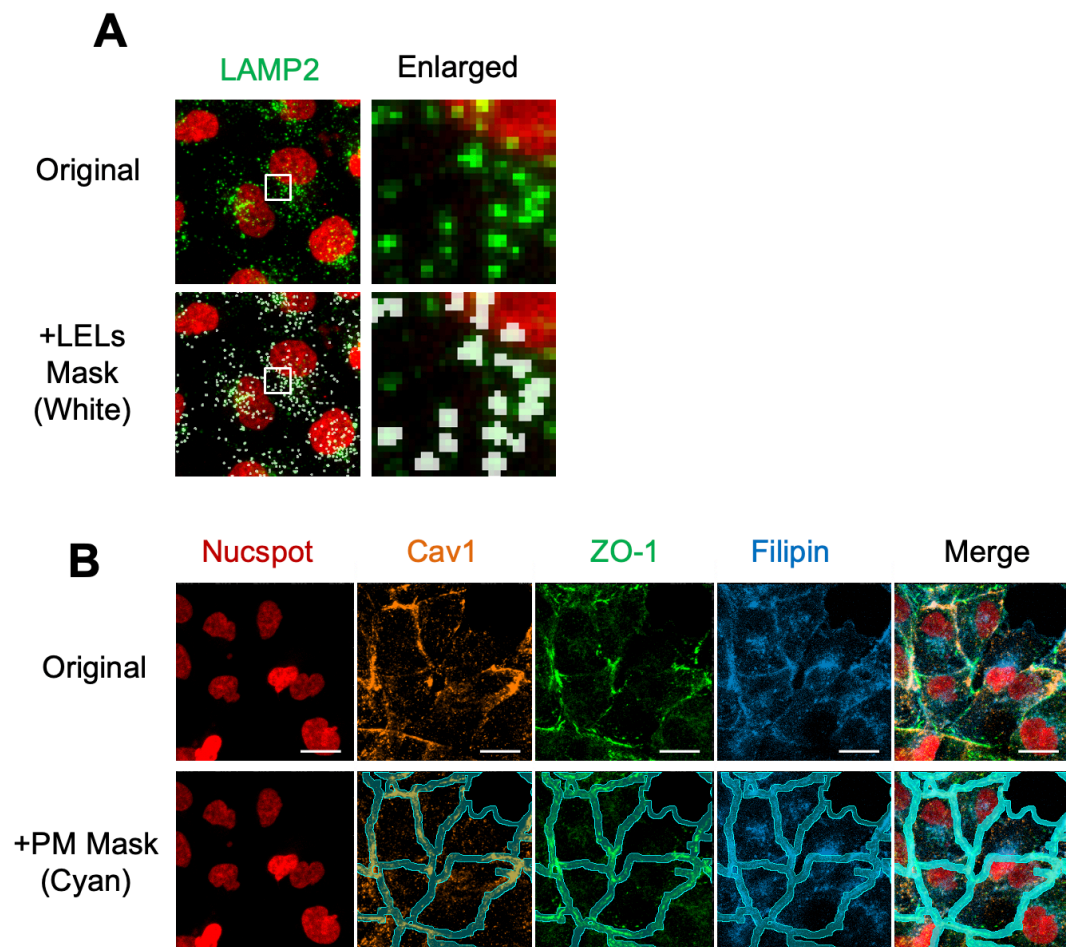


図 10 コンピュータ・アルゴリズムに基づいて検出された LELs 領域および細胞膜領域

(A) LAMP2 チャンネルを用いて LELs 領域の検出を行った。上段に元画像を示し、下段にコンピュータ・アルゴリズムに基づいて検出された LELs 領域を白色マスクで重ねた画像を示した。

(B) Cav1 チャンネルおよび ZO-1 チャンネルを用いて細胞膜領域の検出を行った。上段に元画像を示し、下段にコンピュータ・アルゴリズムに基づいて検出された細胞膜領域をシアン色マスクで重ねた画像を示した。画像解析には NIS-Elements ソフトウェア（ニコン、RRID:SCR_014329）を用いた。LELs: late endosomes/lysosomes、PM: plasma membrane、LAMP2: lysosomal-associated membrane protein 2、Cav1: caveolin-1。

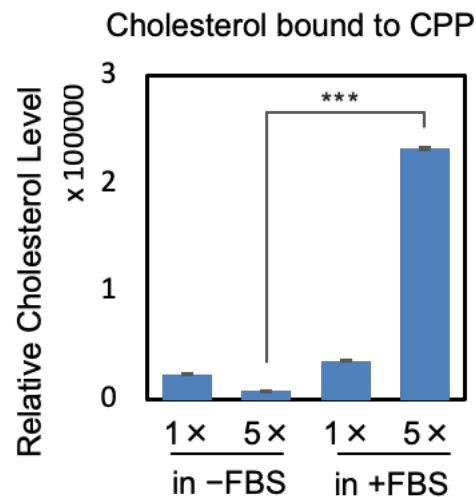


図 11 CPP はコレステロール分子に対し親和性を有する

CPP がコレステロール分子に対し親和性を有するかどうかを調べるために、CPP に含まれるコレステロール量を生化学的手法により測定し、結果を棒グラフで示した。10%血清を含む培地中で CaPi（析出物）を 24 時間震盪培養後、 $16,000 \times g$ により沈殿させることで得られた CPP に含まれるコレステロールの測定とともに、ネガティブコントロールとして血清不含有培地（コレステロールを含まない）を用いたコレステロール量の測定を行った。データは平均 \pm SEM ($n = 3$)で示した。*** $P < 0.001$ 。

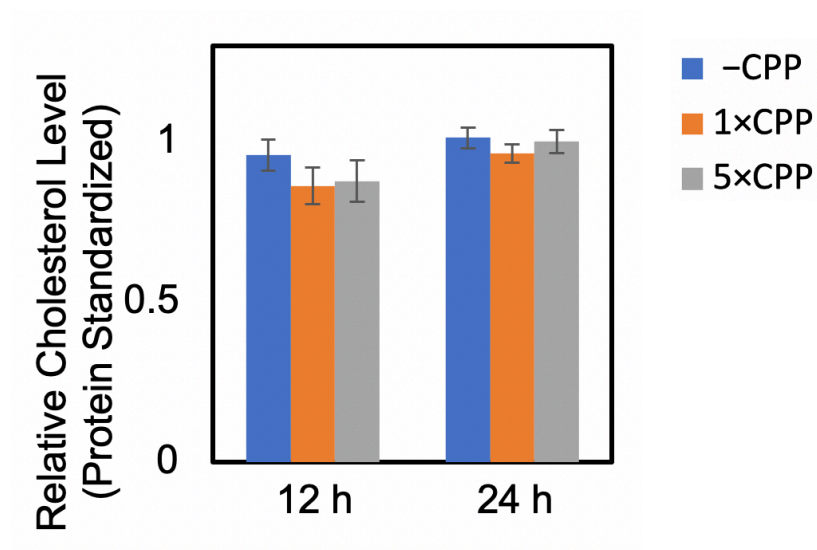


図 12 CPP とともに 24 時間培養した HK-2 細胞内の総コレステロール量は変化しない

CPP を添加、もしくは非添加条件で HK-2 細胞を 24 時間培養した後、細胞内の総コレステロール量を生化学的手法により測定した。同様の操作を行った細胞を RIPA バッファーで回収し、Pierce BCA Protein Assay kit によりタンパク定量を行った。コレステロール量をタンパク質量により規格化したデータのグラフを示した。データは $n=3$ の平均 \pm SEM として表した。

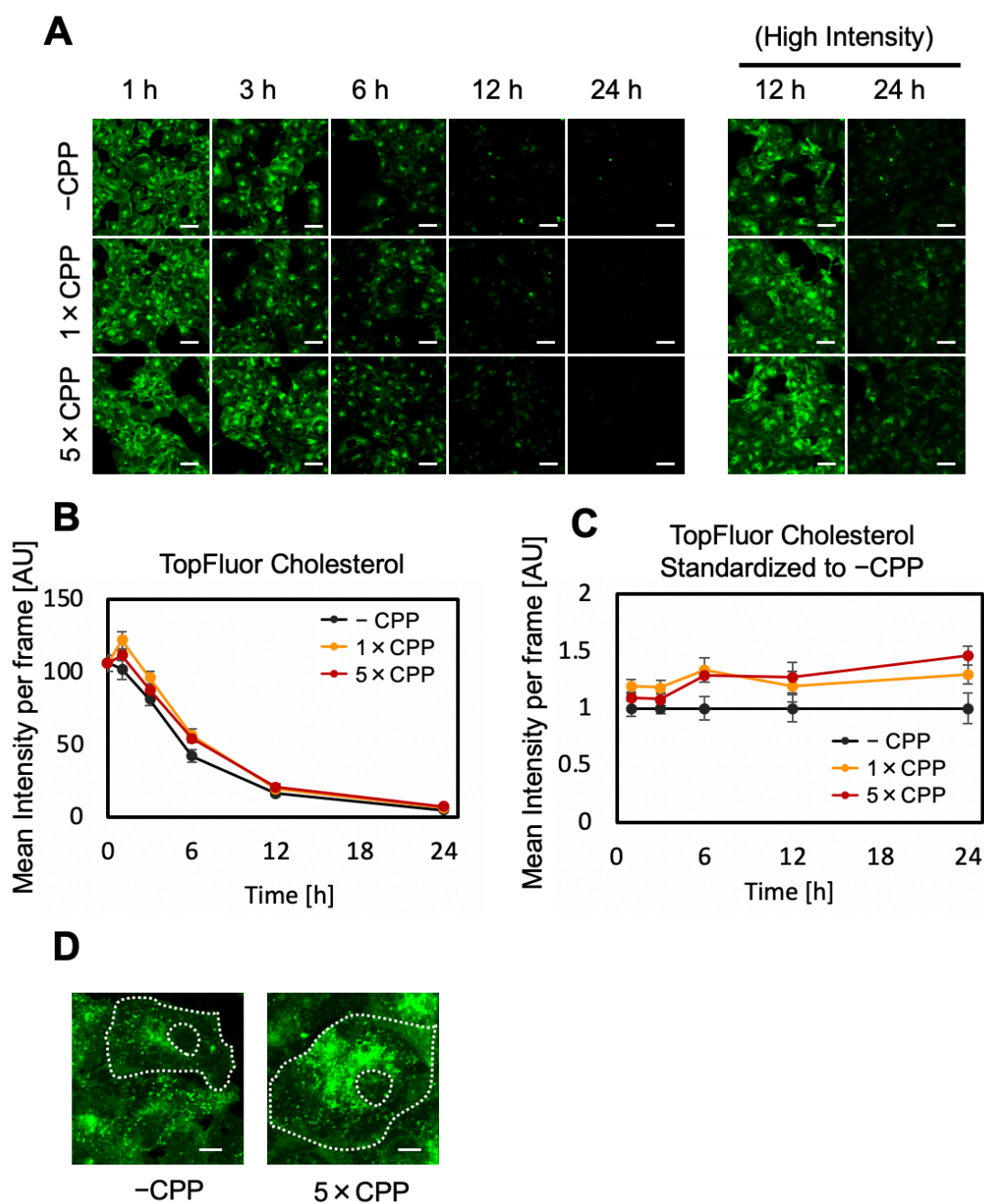


図 13 CPP 添加により TopFluor Cholesterol の細胞外排出に遅滞が生じる

(A) 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コレステロールをパルス標識し、その標識を追跡することで生細胞におけるコレステロール輸送や代謝に CPP が影響を与えているかどうかを調べた。CPP 非添加条件では、パルス標識した Tf-Chol は約 24 時間でほぼ細胞外に排出された。CPP と共に培養した細胞でも 24 時間の培養により大部分の Tf-Chol が細胞外に排出されたが、右側のパネル(High Intensity) で示したように、より高輝度で蛍光顕微鏡観察を行ったところ、CPP 添加条

件では細胞内に滞留している Tf-Chol 量がわずかに多かった。スケールバーは 50 μm 。

- (B) A で示した画像における Tf-Chol の蛍光強度を画像一枚毎に定量した際の平均の時間変化を表した折れ線グラフ。CPP 添加条件ではわずかながら Tf-Chol の細胞外排出に遅滞が生じた。データは 8 枚のフレームの平均蛍光強度 \pm SEM ($n = 8$) で示した。
- (C) B と同様のデータを、各時点において CPP 非添加条件で規格化した場合の時間変化を表す折れ線グラフ。CPP 添加後の時間経過に従って細胞内に留まる Tf-Chol の相対量が増加した。データは 8 枚のフレームの平均蛍光強度 \pm SEM ($n = 8$) で示した。
- (D) CPP 添加条件ではより多くの Tf-Chol が核付近に蓄積していることを示す拡大図。

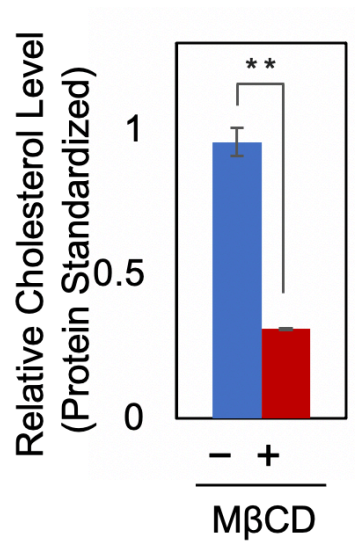


図 14 HK-2 細胞に 2%MβCD を 20 分処理することによるコレステロール除去効果

HK-2 細胞を、2%MβCD を添加した培地中で 20 分培養することによりコレステロールの除去を行った後、生化学的手法によりコレステロール量の定量を行った。同様の操作を行った細胞を RIPA バッファーで回収し、Pierce BCA Protein Assay kit によりタンパク定量を行った。コレステロール量をタンパク質量により規格化したデータのグラフを示した。データは $n = 3$ の平均 \pm SEM として表した。 ** $P < 0.01$ 。

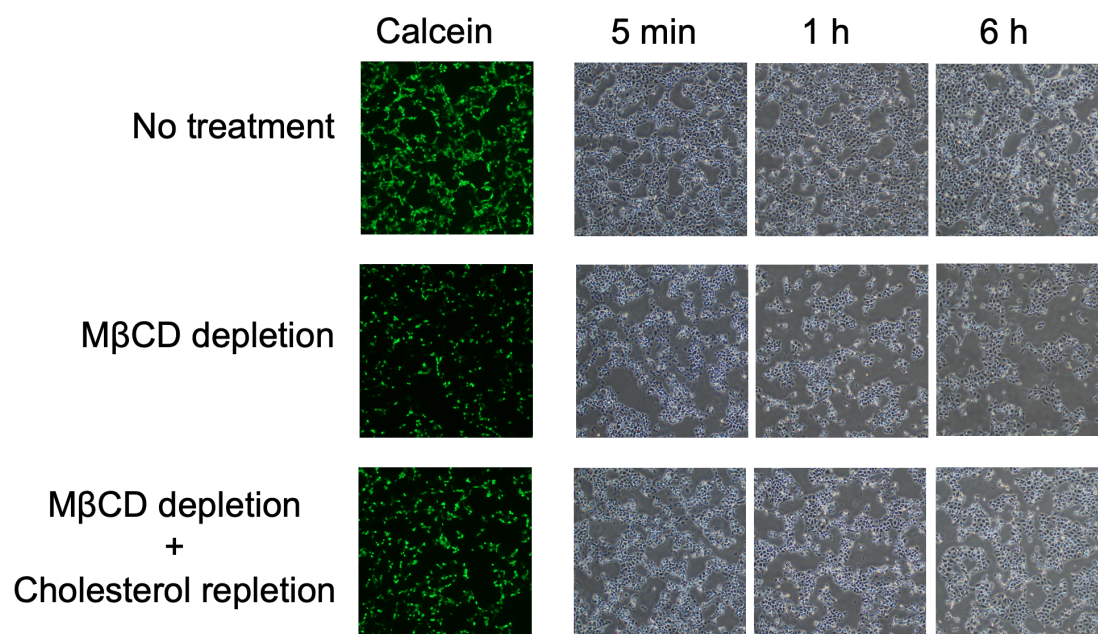


図 15 細胞膜コレステロールを減少させた HK-2 細胞ではガラスビーズによる細胞膜傷害に対し脆弱になる

細胞膜のコレステロールの除去および補充を行った HK-2 細胞に対し、calcein 存在下でガラスビーズ (425-600 μm) により細胞膜を傷害し、その後の calcein の細胞内保持量や細胞の残存率を指標として細胞膜傷害に対する脆弱性を調べた。コレステロール除去条件 (M β CD depletion) では、2% M β CD を添加した培地中で細胞を 40 分培養した後、無血清培地中で 1 時間細胞を培養した。コレステロール除去後再補充条件 (M β CD depletion + Cholesterol repletion) では、上記のコレステロール除去操作後の細胞を 16 $\mu\text{g/ml}$ を添加した培地中で 1 時間培養した。その後、細胞膜不透過性の calcein を加えた培地中でガラスビーズによる傷害を行った。コレステロール除去を行わなかった (No treatment) 条件では、細胞膜に傷害を受け calcein を取り込んだ細胞は PBS 洗浄後も細胞中に calcein を保持しており、その後時間経過に伴いガラスビーズにより破壊された細胞単層の回復が見られた。コレステロール除去条件 (M β CD depletion) では、calcein 保持率が低く、その後時間経過に伴い細胞がディッシュ底から剥離していく様子が見られた。コレステロール除去後再補充条件 (M β CD depletion + Cholesterol repletion) では、コレステロール除去条件と比較して calcein 保持率の改善と細胞単層の回復が見られた。

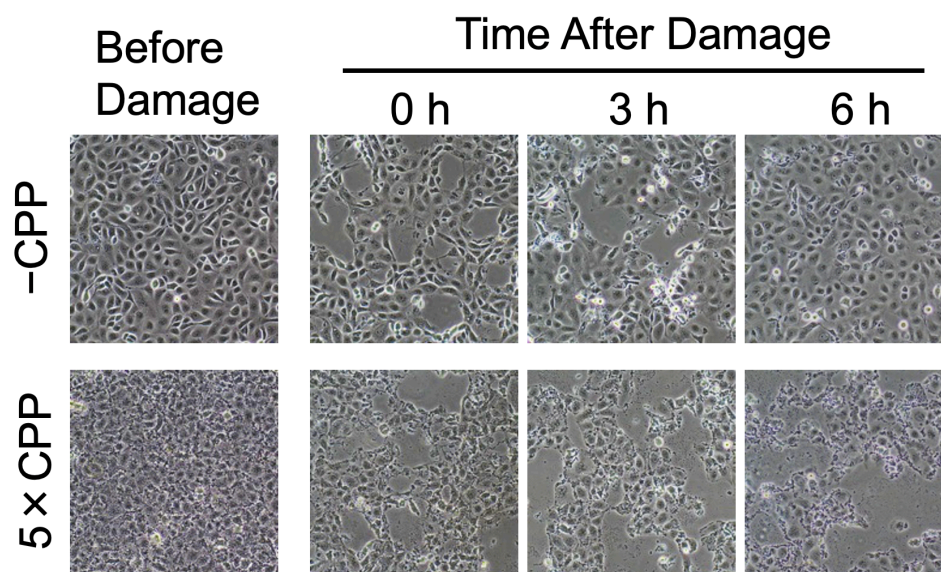


図 16 CPP を添加した HK-2 細胞はガラスビーズによる細胞膜傷害に対し脆弱になる

CPP を加えた培地で 12 時間培養した HK-2 細胞に対し、425-600 μm のガラスビーズを用いて膜傷害を行い、その後の細胞の生存率を指標として細胞膜傷害に対する脆弱性を調べた。CPP を添加しなかった条件では損傷後、時間経過に伴って細胞がディッシュの底面を覆い 6 時間後には損傷前と同様の状態に戻ったのに対し、CPP 添加条件では細胞死により底面から剥離する細胞が多く見られた。

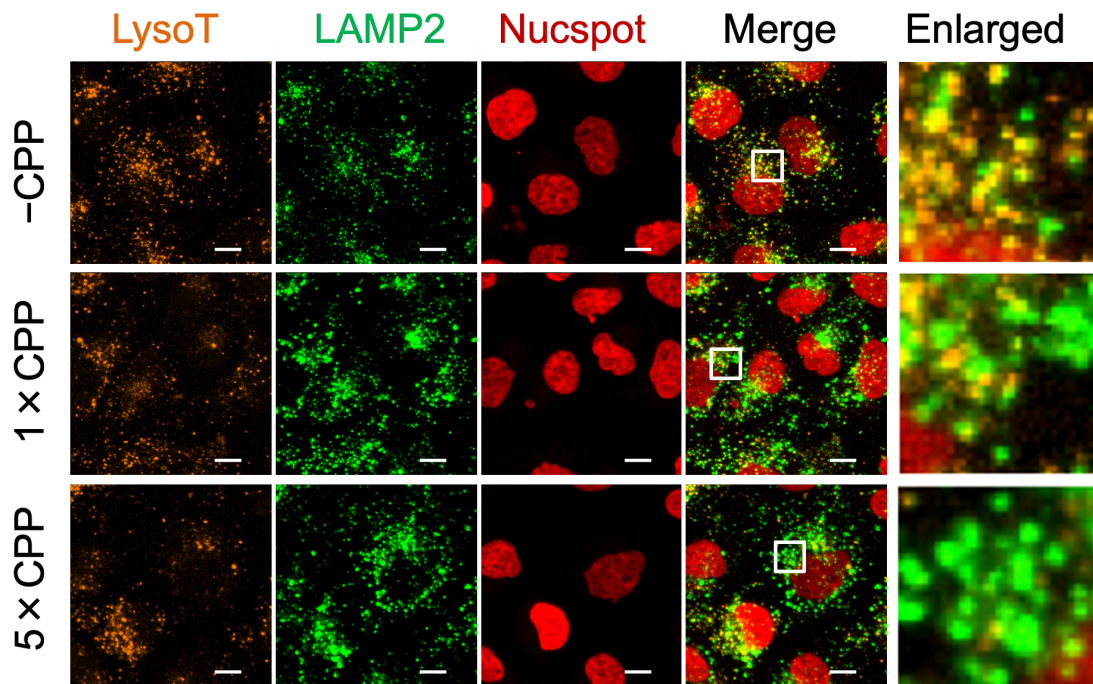


図 17 CPP の細胞内取り込みは LELs の pH を上昇させ、LELs の膨潤を引き起こす

CPP 添加もしくは非添加の培地中で 24 時間培養した HK-2 細胞に対し、LysoTracker 染色、4% PFA 固定、LAMP2 抗体を用いた蛍光抗体法および NucSpot による核染色を行った。Merge 画像において白線で囲った領域の拡大図を右のパネルに示した (Enlarged)。CPP 添加条件では、LAMP2 ポジティブな領域 (LELs) の面積の増加とともに、LELs 領域上における LysoTracker 染色の減弱がみられ、LELs の pH 上昇が示唆された。スケールバーは 10 μ m。

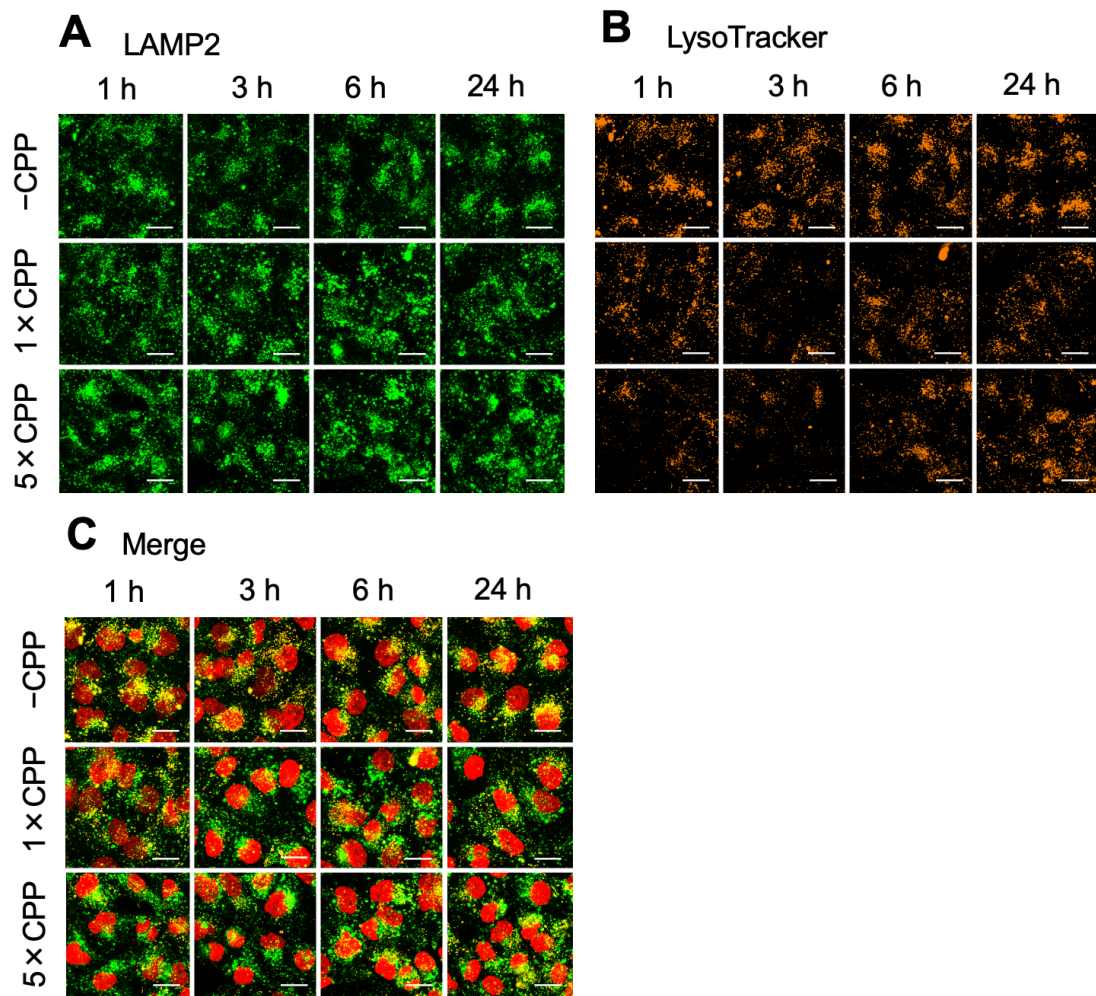


図 18 CPP の細胞内取り込みによる LELs の pH 上昇および膨潤の経時変化を示す蛍光顕微鏡画像

図 17 と同様の実験を行った際の 1~24 時間における代表的な画像を示した。CPP 添加もしくは非添加の培地中で 1~24 時間培養した HK-2 細胞に対し、LysoTracker 染色、4%PFA 固定、LAMP2 抗体を用いた蛍光抗体法および NucSpot による核染色を行った。

(A) LAMP2 抗体を用いた蛍光抗体法により LELs の検出を行った。スケールバーは 20 μm 。

(B) LysoTracker によりリソソームを主とする酸性コンパートメントの染色を行った。スケールバーは 20 μm 。

(C) LAMP2 抗体 (緑色)、LysoTracker 染色 (橙色)、および NucSpot 染色 (赤色) のマージ画像。CPP 添加条件では非添加条件と比べて LysoTracker の蛍光が減弱しており、この変化は 1 時間から見られた。スケールバーは 20 μm 。

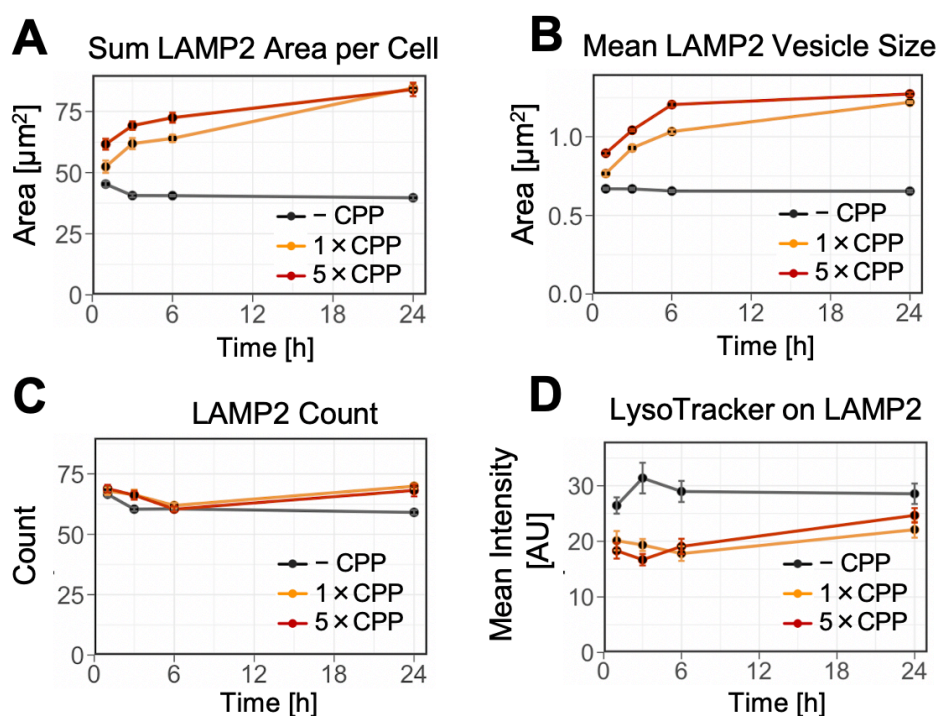


図 19 CPP の細胞内取り込みによる LELs の pH 上昇および膨潤の経時変化を示す折れ線グラフ

図 18 に示した画像の定量を行い、折れ線グラフとして表した。CPP 添加もしくは非添加の培地中で 1~24 時間培養した HK-2 細胞に対し、LysoTracker 染色、4%PFA 固定、LAMP2 抗体を用いた蛍光抗体法および NucSpot による核染色を行った。LAMP2 抗体を用いた蛍光抗体法により LELs を標識し、LELs 領域の面積や数の測定を行った。

- (A) 一細胞内における LAMP2 ポジティブな領域の面積 (μm^2)の合計を計測し、折れ線グラフとして表した。CPP 添加により LAMP2 領域の増加が見られた。データは 4 ウェルの平均 \pm SEM として表した。
- (B) LELs (LAMP2 ポジティブな領域) の一個あたりの面積(μm^2)の平均を計測し、折れ線グラフとして表した。LELs 小胞サイズが 1~6 時間にかけて増加しており、LELs の膨潤が示唆された。データは 4 ウェルの平均 \pm SEM として表した。
- (C) LELs (LAMP2 ポジティブな領域) の一細胞あたりの個数を計測し、折れ線グラフとして表した。LAMP2 小胞の細胞当たりの個数は CPP 添加後 1 時間から 6 時間まではほとんど変化しておらず、24 時間後には僅かな増加が見られた。データは 4 ウェルの平均 \pm SEM として表した。
- (D) LELs (LAMP2 ポジティブな領域) 上の LysoTracker の平均蛍光強度を計測し、折れ線グラフとして表した。CPP 添加後 1 時間から平均蛍光強度が減少しており、LELs の pH が上昇していることが示唆された。データは 4 ウェルの平均 \pm SEM として表した。

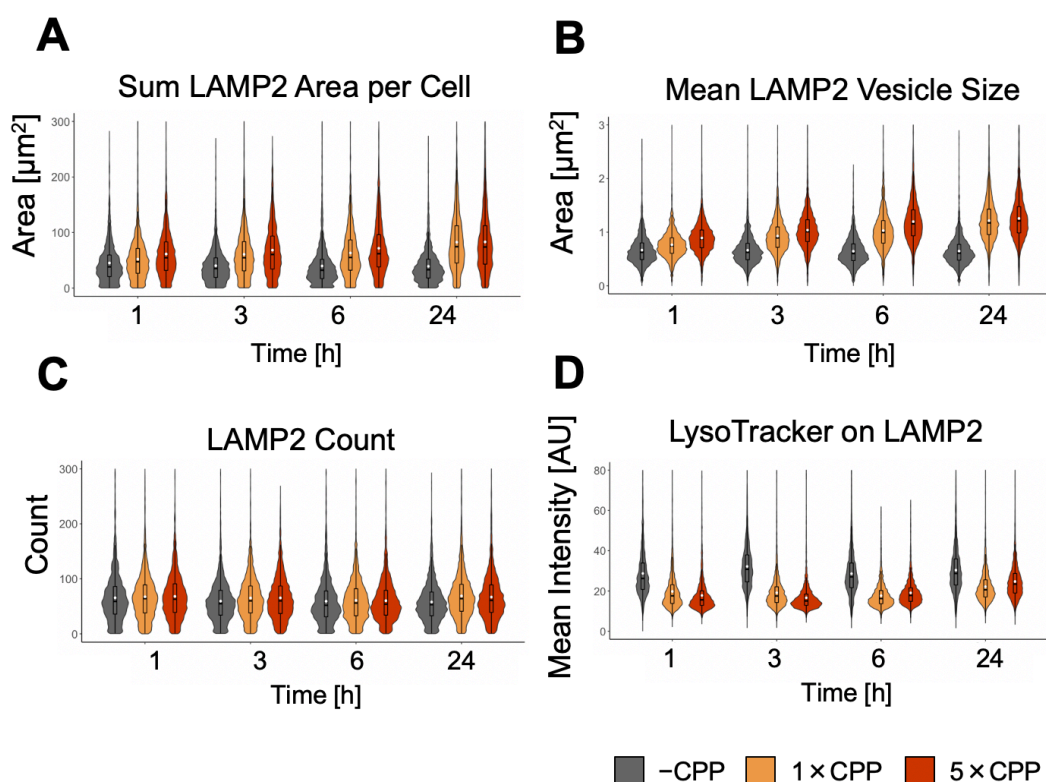


図 20 CPP を添加し 1、3、6、24 時間培養後における LELs の pH 上昇および膨潤を示すバイオリンプロット

図 18 に示した画像の定量を行い、バイオリンプロットとして表した。CPP 添加もしくは非添加の培地中で 1~24 時間培養した HK-2 細胞に対し、LysoTracker 染色、4%PFA 固定、LAMP2 抗体を用いた蛍光抗体法および NucSpot による核染色を行った。LAMP2 抗体を用いた蛍光抗体法により LELs を標識し、LELs 領域の面積や数の測定を行った。

- (A) 一細胞内における LAMP2 ポジティブな領域の面積 (μm^2)の合計を計測し、バイオリンプロットとして表した。CPP 添加により LAMP2 領域の増加が見られた。
- (B) LELs (LAMP2 ポジティブな領域) の一個あたりの面積(μm^2)の平均を計測し、バイオリンプロットとして表した。LELs 小胞サイズが 1~6 時間にかけて増加しており、LELs の膨潤が示唆された。
- (C) LELs (LAMP2 ポジティブな領域) の一細胞あたりの個数を計測し、バイオリンプロットとして表した。LAMP2 小胞の細胞当たりの個数は CPP 添加後 1 時間から 6 時間まではほとんど変化しておらず、24 時間後には僅かな増加が見られた。
- (D) LELs (LAMP2 ポジティブな領域) 上の LysoTracker の平均蛍光強度を計測し、バイオリンプロットとして表した。CPP 添加後 1 時間から平均蛍光強度が減少しており、LELs の pH が上昇していることが示唆された。

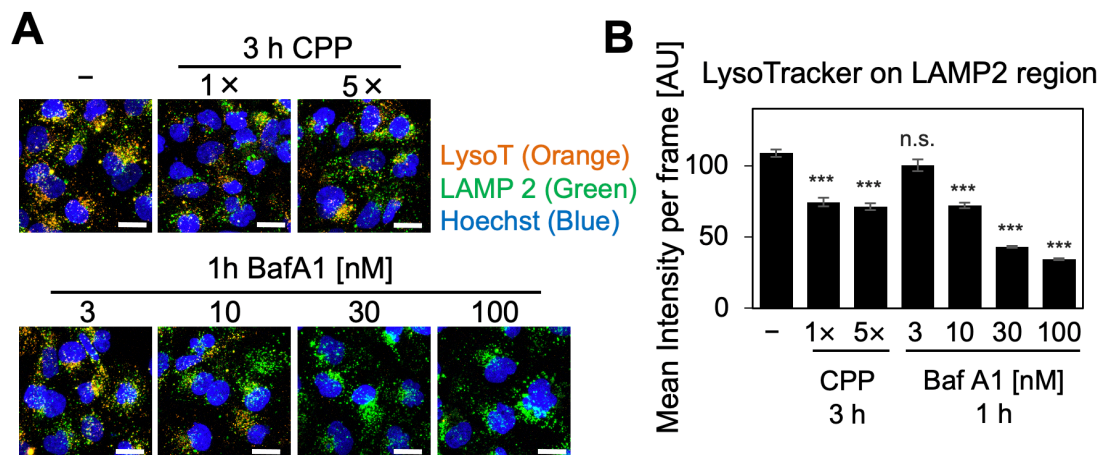


図 21 CPP による LELs の pH 上昇効果は 10 nM bafilomycin A1 を 1 時間細胞に作用させた際と同等である

CPP による LELs の pH 上昇効果が bafilomycin A1 (Baf A1) の効果と比較してどの程度に相当するかを調べるため、3~100 nM の範囲で Baf A1 を 1 時間 HK-2 細胞に作用させ、LysoTracker 染色および LAMP2 抗体を用いた蛍光抗体法を行った。LELs における pH の指標として、LAMP2 領域上の LysoTracker の平均蛍光強度を一細胞毎に定量した。

(A) LAMP2 抗体（緑色）と LysoTracker 染色（橙色）のマージ画像を示した。CPP 添加条件および Baf A1 添加条件では非添加条件と比べて LysoTracker の蛍光が減弱した。スケールバーは 20 μ m。

(B) A における画像を定量し棒グラフとして表した。CPP を添加し 3 時間培養した細胞では 10 nM の Baf A1 を 1 時間作用させた場合と同程度 LELs の pH が上昇することが示唆された。データは 8 枚の画像の平均 \pm SEM として表した。*** $P < 0.001$, n.s: not significant。

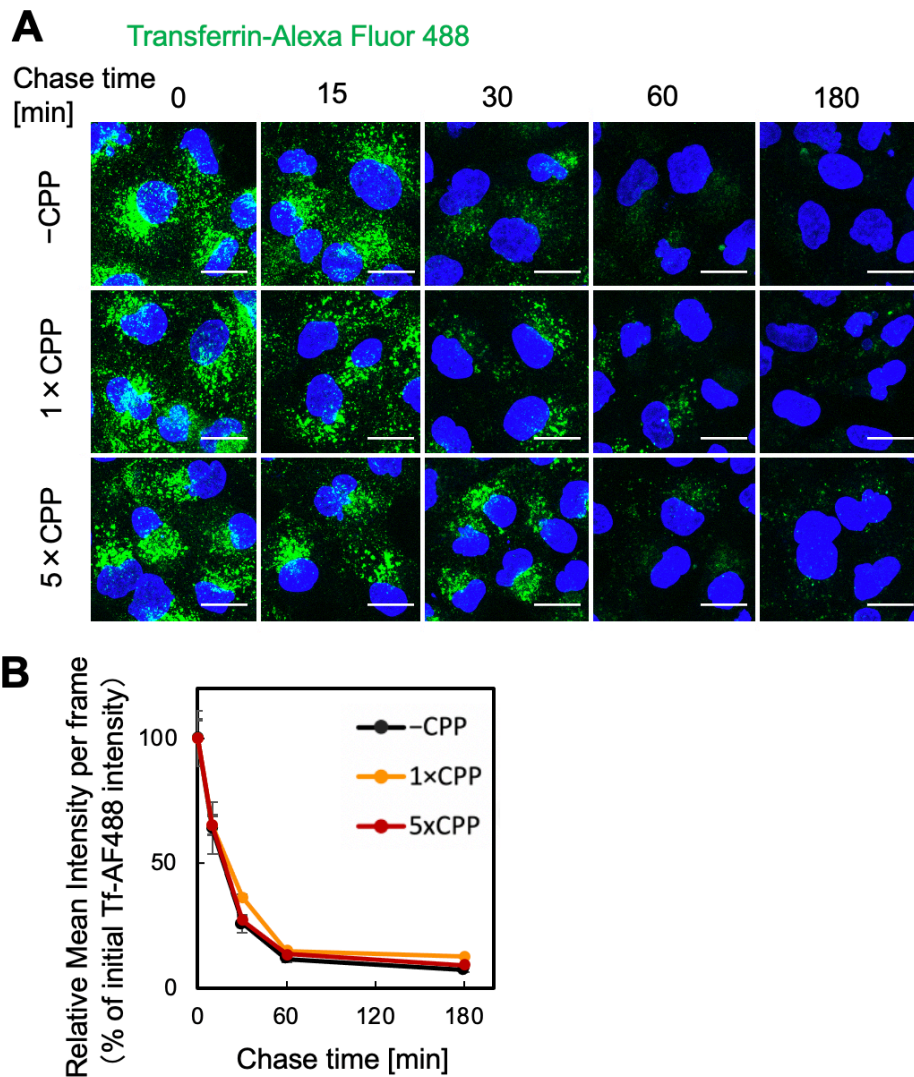


図 22 CPP を取り込んだ HK-2 細胞においてトランスフェリンリサイクリングは攪乱されない

(A) 蛍光標識トランスフェリン (Tf-AF488) を用いたパルス-チェイス実験により、CPP は HK-2 細胞のトランスフェリンリサイクリングを攪乱しないことが示された。CPP 添加もしくは非添加の培地中で 24 時間培養した HK-2 細胞に対し、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Tf-AF488 により 30 分パルスラベルを行い、引き続き非標識トランスフェリン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ により 0、15、30、60、180 分チェイスを行った。4%PFA 固定を行った後、蛍光顕微鏡観察を行った際の画像を示した。CPP 添加の有無にかかわらず Tf-AF488 は次第に細胞から排出された。スケールバーは 20 μm 。

(B) A における画像を定量し平均蛍光強度を折れ線グラフとして表した。Tf-AF488 によりパルスラベルを行った直後を 100% とした。Tf-AF488 が排出されるペースは CPP 添加の有無にかかわらず同程度だった。データは 6 枚の画像の平均 \pm SEM として表した。

図 23 （インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため未掲載）

図 24 (インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため未掲載)

図 25 (インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため未掲載)

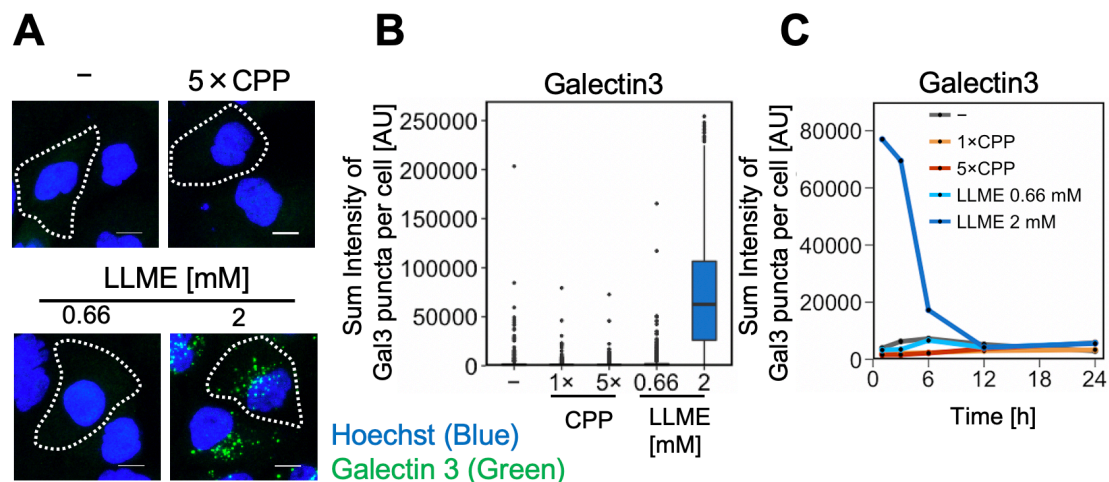


図 26 CPP はリソソーム膜透過性亢進 (LMP)を引き起こさない

- (A) ポジティブコントロールの 2 mM LLME 添加条件では LMP が引き起こされるが、CPP 添加条件では LMP が引き起こされないことを示す蛍光顕微鏡画像。HK-2 細胞を CPP 添加培地中もしくはポジティブコントロールの LLME を加えた培地中で 1 時間培養し、 4% PFA により固定後、galectin-3 抗体を用いた蛍光抗体法により LMP を起こしたリソソームを標識した。スケールバーは $10\text{ }\mu\text{m}$ 。
- (B) A の画像を定量し、galectin-3 の輝点の一細胞内総蛍光強度をプロットした箱ひげ図として表した。
- (C) A と同様の実験を 1 、 3 、 6 、 12 、 24 時間で行い、各時間における galectin-3 の一細胞内総蛍光強度の細胞平均を折れ線グラフとして表した。 2 mM LLME を添加すると 1 時間から LMP を起こすが、CPP では $1\sim 24$ 時間のいずれの培養時間でも LMP を引き起こさなかった。

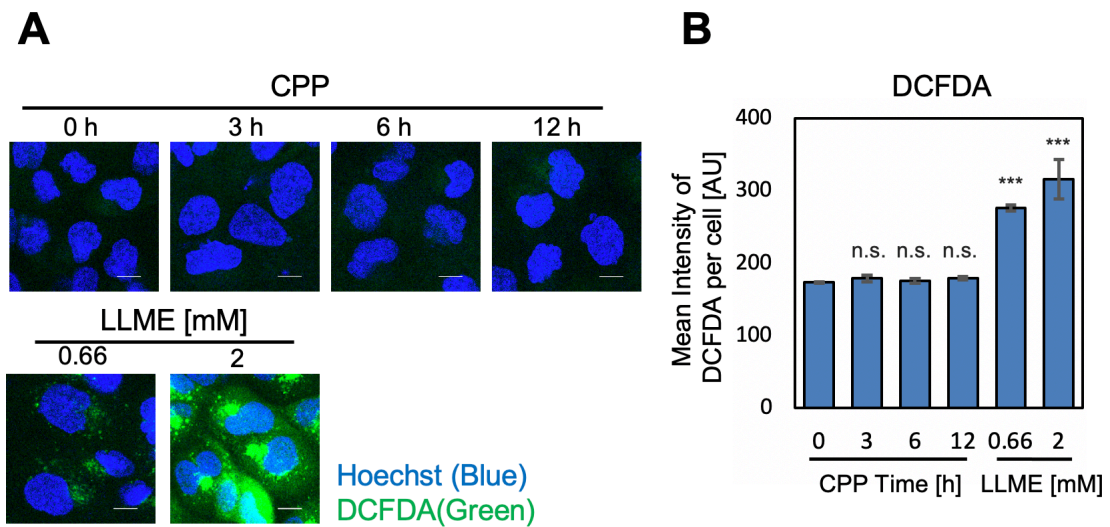


図 27 CPP は HK-2 細胞に ROS を発生させない

- (A) HK-2 細胞を CPP 添加培地中で 3、6、12 時間時間培養した後、細胞内 ROS の発生を DCFDA/H2DCFDA キットを用いて検出した。ポジティブコントロールとして LLME を加えた培地中で 4 時間培養した細胞を用いた。ROS 産生はポジティブコントロールである LLME 添加細胞では見られたが、CPP は 3~12 時間のいずれの培養時間でも ROS 産生を引き起こさなかった。スケールバーは 10 μ m。
- (B) A の画像を定量し、DCFDA の一細胞毎の平均蛍光強度を棒グラフとして表した。データは 3 枚の画像の平均 \pm SEM として表した。*** $P < 0.001$ 、 n.s: not significant。LLME: L-leucyl-L-leucine methyl ester、DCFDA: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate。

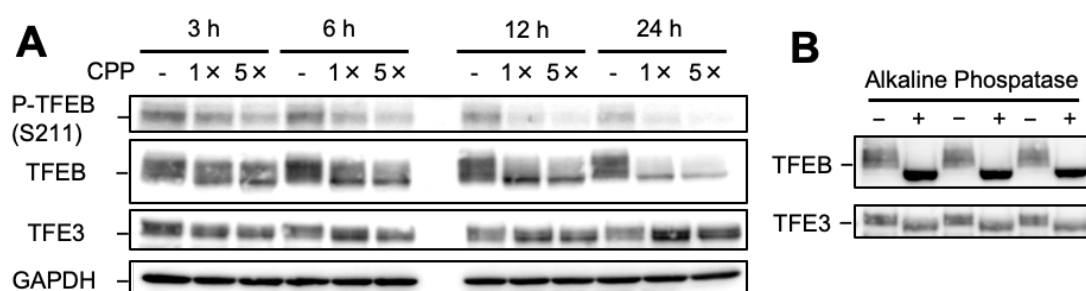


図 28 CPP によりリソソームストレス応答性転写因子 TFEB および TFE3 が脱リン酸化される

- (A) CPP 添加 3、6、12、24 時間後の細胞を回収し、ウェスタンブロットにより CPP が TFEB および TFE3 のリン酸化状態に与える影響を調べた。リン酸化 TFEB (S211) の抗体を用いたウェスタンブロットによりリン酸化 TFEB が CPP により減少することがわかった。TFEB および TFE3 それぞれのトータル抗体を用いたウェスタンブロットでは、バンドの低分子量側への移動が見られた。ブロット全長は図 29 (A) に示した。
- (B) バンドの低分子量側への移動が脱リン酸化を表しているかどうかを確認するため、アルカリホスファターゼにより細胞ライセート中の TFEB および TFE3 を脱リン酸化したサンプルを作製し、ウェスタンブロットを行なった。アルカリホスファターゼ処理によりバンドの低分子量側への移動が見られたことから、A で見られたバンドシフトが脱リン酸化を表すことが確かめられた。ブロット全長は図 29 (B) に示した。

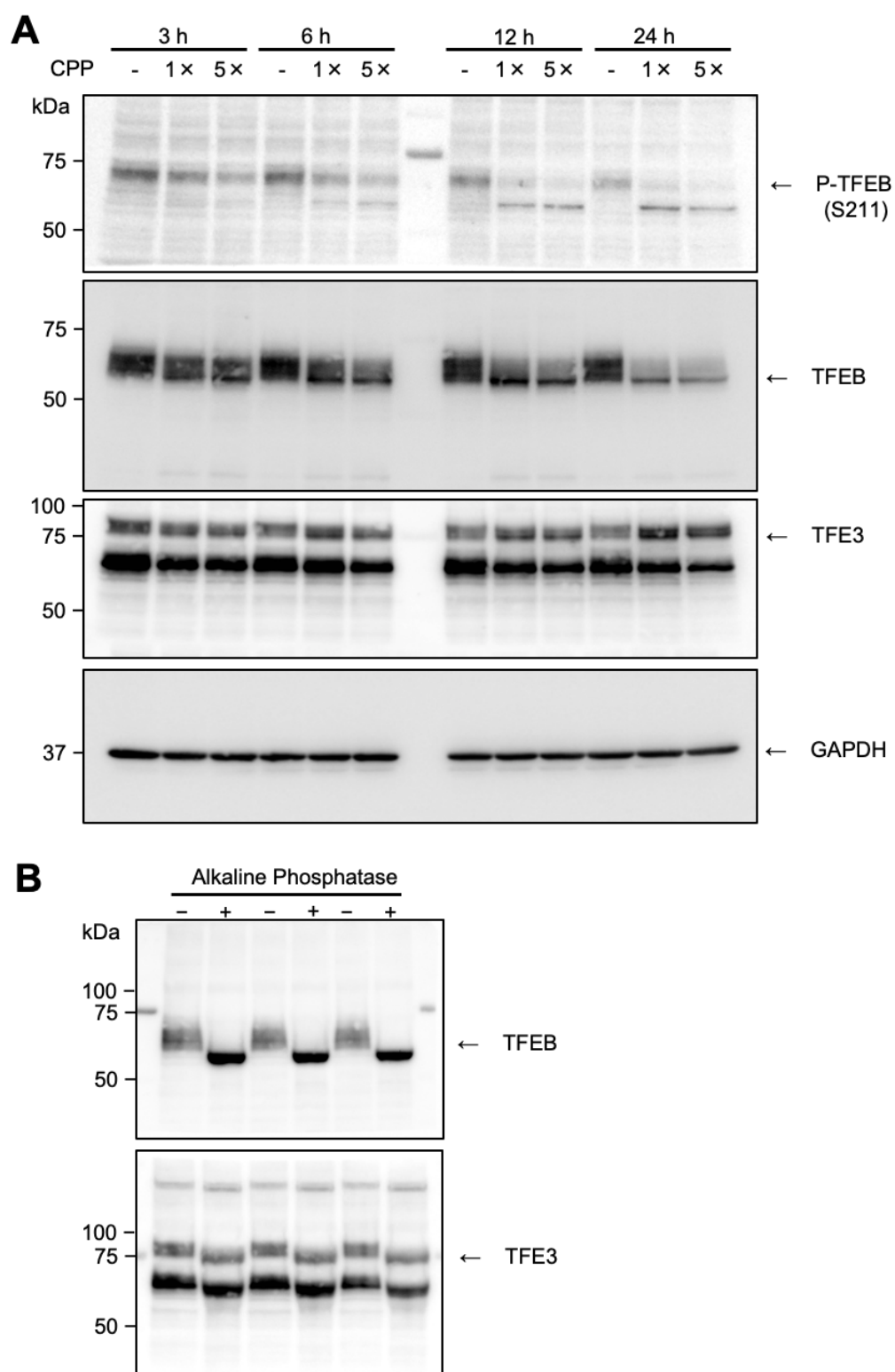


図 29 図 28 のプロット全長

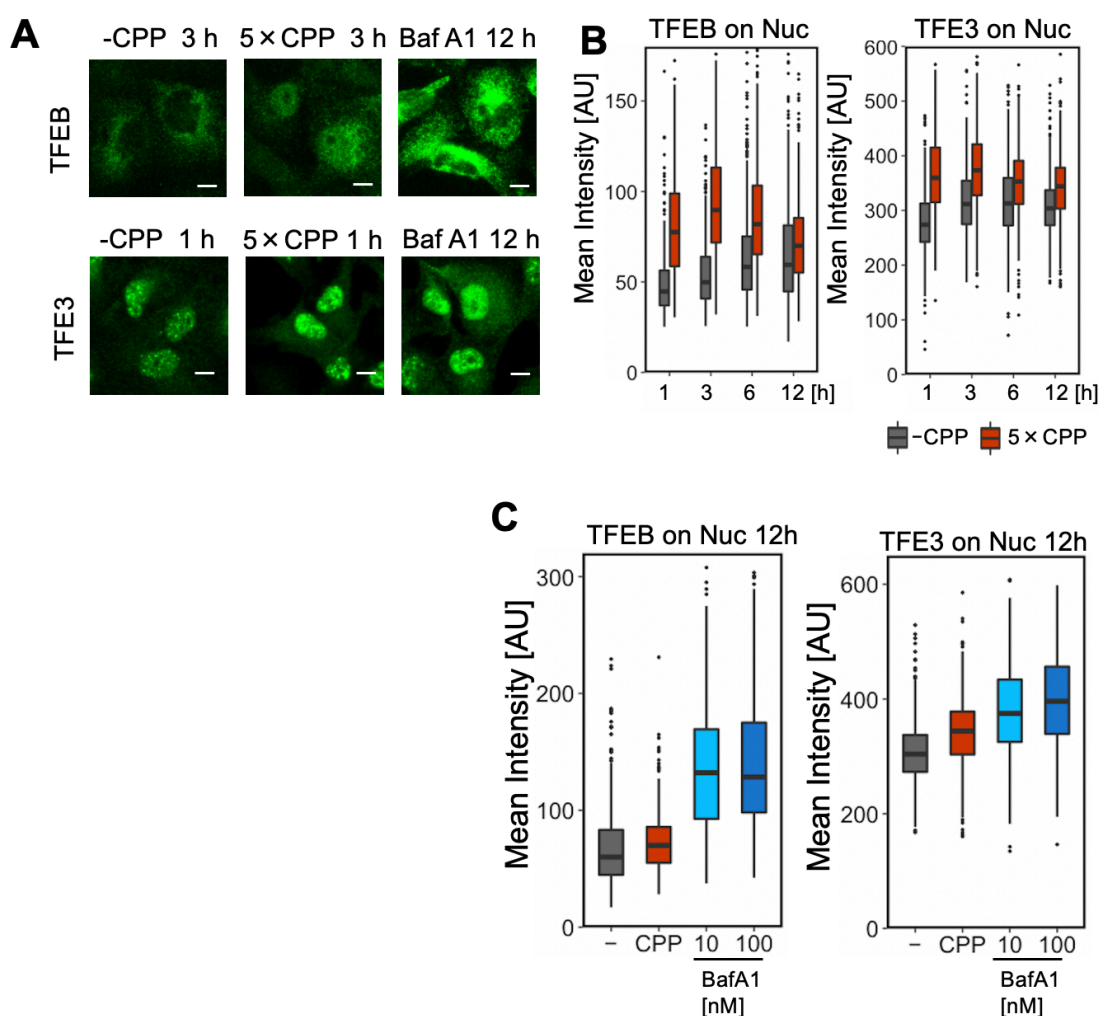


図 30 CPP によりリソソームストレス応答性転写因子 TFEB および TFE3 が核移行する

CPP 添加 1、3、6、12 時間後の細胞を PFA 固定し、蛍光抗体法により CPP が TFEB および TFE3 の核移行を促進するかどうか調べた。ポジティブコントロールとして Baf A1 を添加して 12 時間培養した細胞を用いた。

(A) CPP による TFEB の核移行と TFE3 の核における蛍光強度の増加を示す代表画像。スケールバーは 10 μm 。

(B) A の実験で得られた画像について、核における TFEB および TFE3 の平均蛍光強度を計測したデータをプロットした箱ひげ図。CPP を加えて 1~12 時間後に核領域における TFEB および TFE3 の蛍光強度の上昇がみられた。

(C) CPP および Baf A1 を添加後 12 時間培養した際の TFEB および TFE3 の平均蛍光強度の増加を表す箱ひげ図。

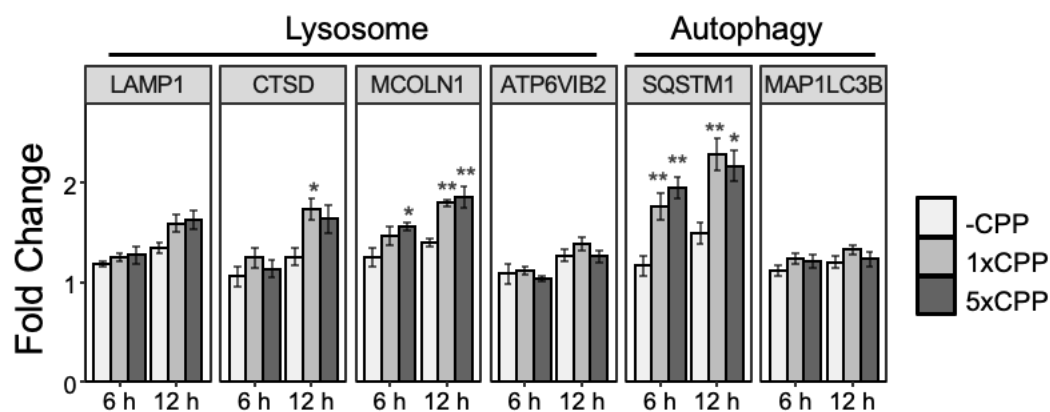


図 31 CPP によりリソソームストレス応答性転写因子 TFEB および TFE3 のターゲットの発現量が増加する

CPP 添加 6、12 時間後の細胞の RNA を回収し、リソソームストレス応答性転写因子 TFEB および TFE3 により発現が誘導されることが知られる *ATP6V1B2*、*CTSD*、*MAP1LC3B*、*MCOLN1*、*SQSTM1*、*LAMP1*、の発現量の変化を qPCR により調べた。*CTSD*、*MCOLN1*、*SQSTM1* において有意な発現量の上昇が見られ、その効果は CPP 添加後 6、12 時間において時間経過に伴って増加した。 $n=4$ 。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。TFEB: transcription factor EB、TFE3: transcription factor E3、BafA1: bafilomycin A1、qPCR: quantitative PCR.

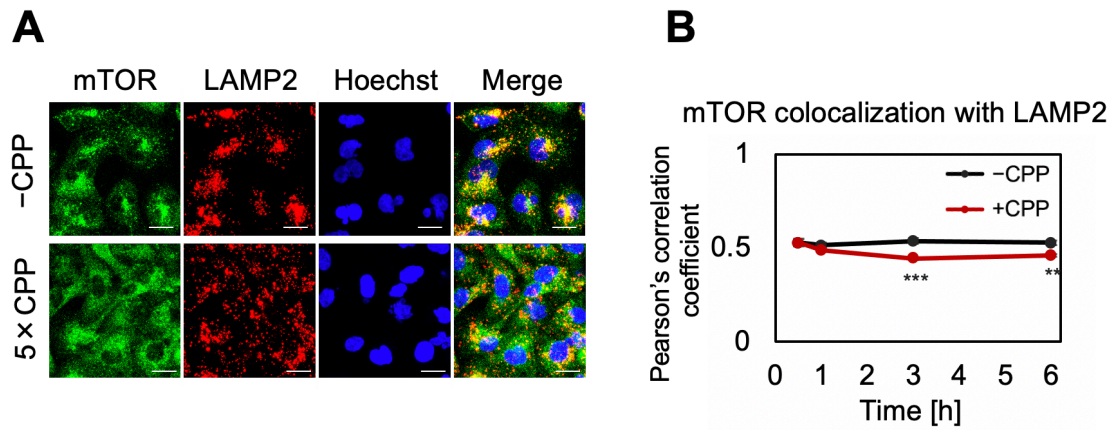


図 32 CPP により mTOR が LELs から離脱する

CPP 添加 0.5、1、3、6 時間後の細胞を PFA 固定し、抗 mTOR 抗体と抗 LAMP2 抗体を用いた蛍光抗体法により mTOR の LELs への局在が CPP により影響を受けるかどうかを調べた。

(A) CPP 添加培地もしくは非添加培地で 3 時間培養後の mTOR および LAMP2 の蛍光顕微鏡画像を示した。マージ画像から、CPP により mTOR と LAMP2 の共局在の程度が低下していることが示され、CPP による mTOR の LELs からの離脱が示唆された。スケールバーは 20 μm 。

(B) A の実験で得られた画像について、mTOR と LAMP2 の共局在の程度を定量し、折れ線グラフで表した。CPP 添加 3 時間後から mTOR と LAMP2 の共局在度の有意な低下が示された。データは 6 枚の画像の平均 \pm SEM として表した。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

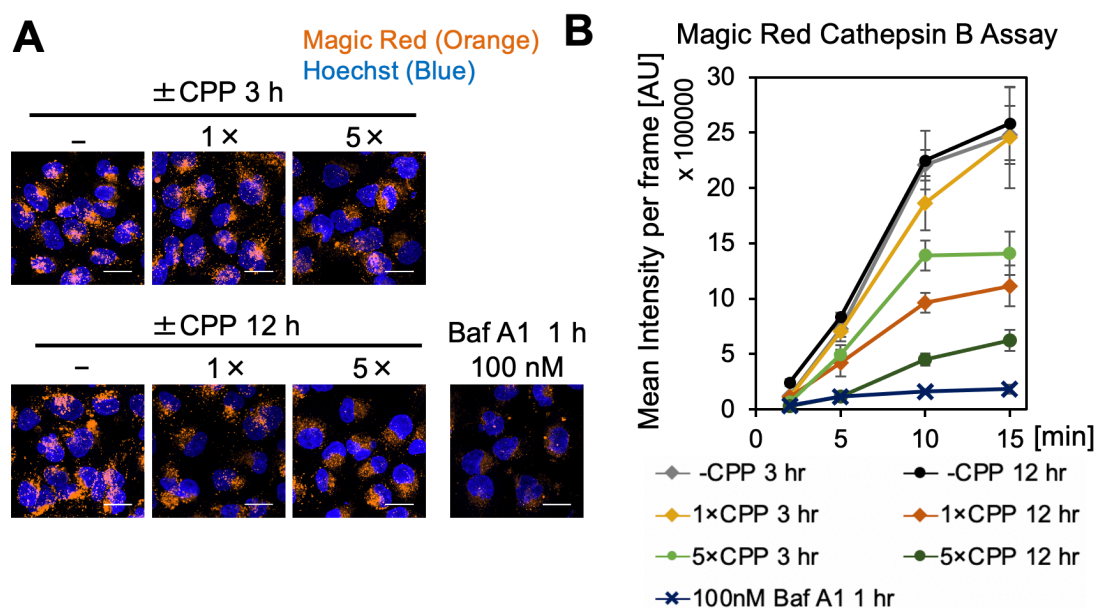


図 33 CPP によりリソソーム内加水分解酵素 cathepsin B の活性が低下する

CPP 添加後 3 時間、12 時間における cathepsin B 活性の変化を Magic Red アッセイにより調べた。Magic Red は赤色蛍光が付加された cathepsin B 基質であり、細胞膜を透過しリソソームに存在する cathepsin B に切断されることで強い赤色蛍光シグナルを発する。

- (A) CPP 添加培地もしくは非添加培地で 3、12 時間培養後の Magic Red の蛍光顕微鏡画像を示した。CPP を添加しなかった条件では細胞内のリソソームと見られる小胞が強い赤色蛍光を発したが、CPP 添加条件では cathepsin B の活性が低下していることをあらわす蛍光の減弱が見られた。リソソームの pH を上昇させるポジティブコントロールである BafA1 100nM においては CPP よりも顕著な活性低下が見られた。スケールバーは 20 μm 。
- (B) A と同様の実験で得られた画像について、Magic Red の平均蛍光強度を定量し、折れ線グラフで表した。Magic Red を添加してからの培養時間を横軸にとった。Cathepsin B の活性低下は特に長時間（12 時間）、高濃度（5×CPP）の CPP 添加条件において顕著であった。データは 6 枚の画像の平均 \pm SEM として表した。

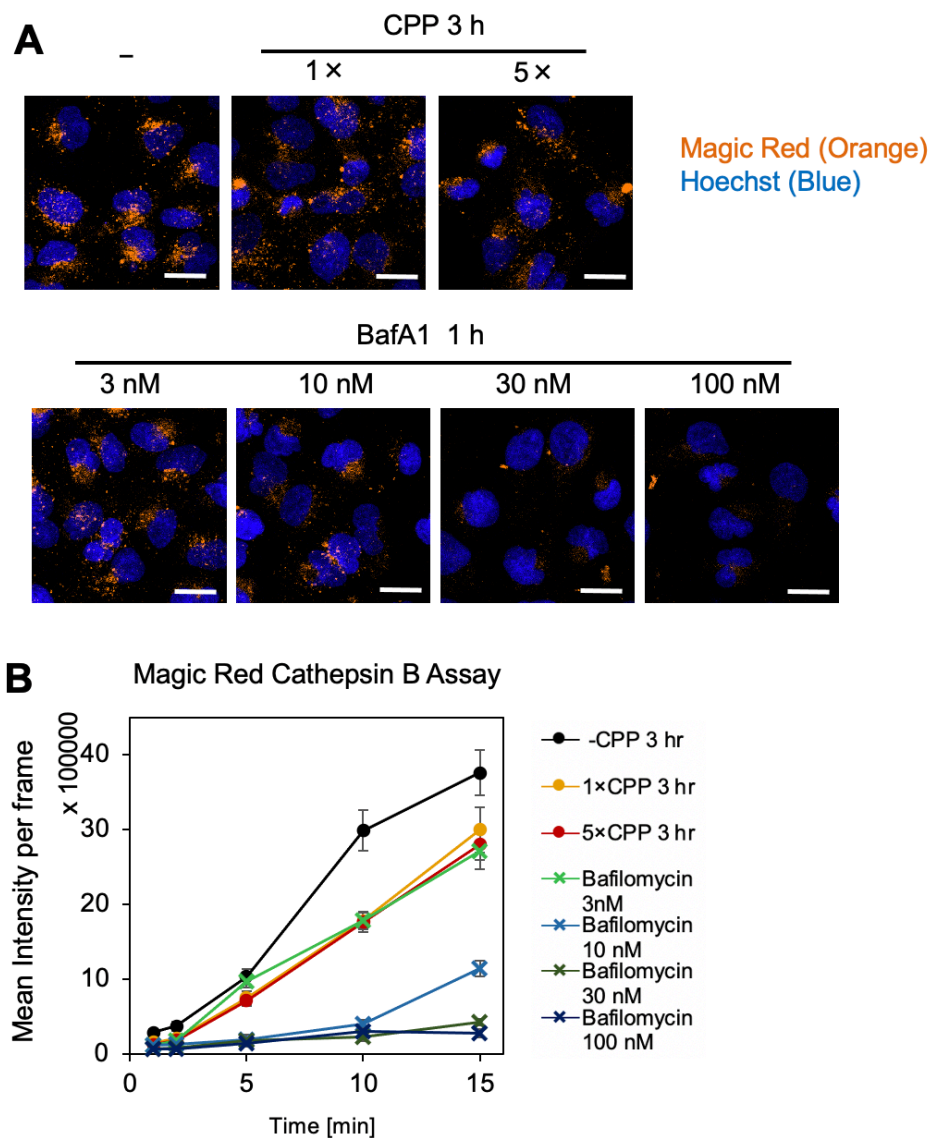


図 34 CPP 添加後 3 時間培養した HK-2 細胞では 3 nM の bafilomycin A1 を添加後 1 時間培養した場合と同等の cathepsin B 活性低下が見られる

CPP によるリソソーム内加水分解酵素 cathepsin B の活性低下を、3、10、30、100 nM の BafA1 による活性低下と比較した。CPP 添加後 3 時間、および各濃度の BafA1 添加後 1 時間における cathepsin B 活性の変化を Magic Red アッセイにより調べた。

(A) Magic Red の蛍光顕微鏡画像の代表例を示した。スケールバーは 20 μ m。

BafA1: bafilomycin A1。

(B) A と同様の実験で得られた画像について、Magic Red の平均蛍光強度を定量し、折れ線グラフで表した。Magic Red を添加してからの培養時間を横軸にとった。CPP を加えて 3 時間培養した条件では 3 nM の BafA1 を加え 1 時間培養した場合と同等の cathepsin B の活性低下が見られた。データは 6 枚の画像の平均 \pm SEM として表した。

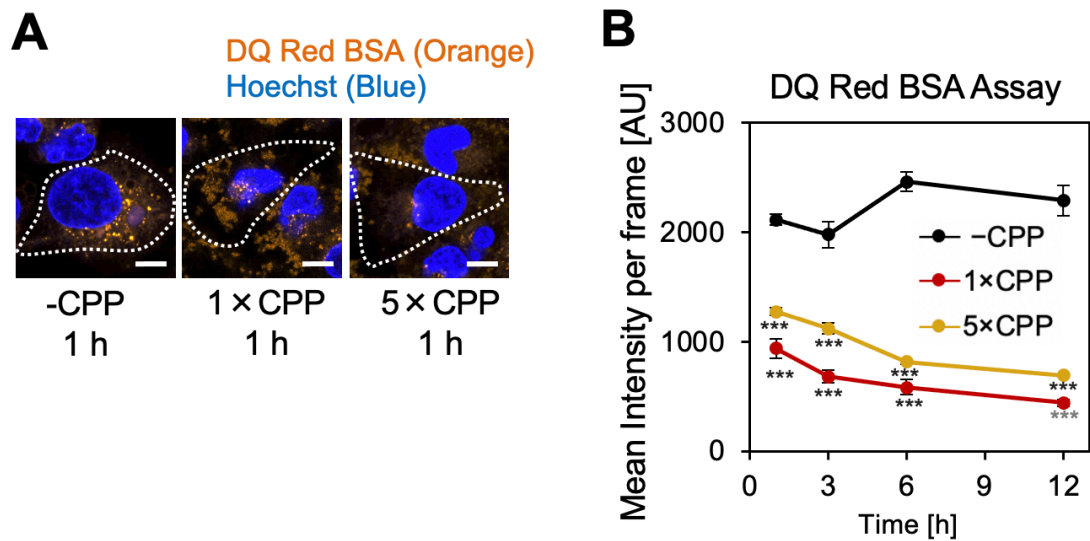


図 35 CPP によりリソソーム内加水分解酵素の活性が低下する

CPP を HK-2 細胞に添加して 1、3、6、12 時間培養後、DQ Red BSA を加え 6 時間培養し細胞内の加水分解酵素の活性を調べた。細胞膜不透過性の DQ Red BSA はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、加水分解されることにより強い蛍光を発する。

(A) CPP 添加培地もしくは非添加培地で 1 時間培養後、DQ Red BSA を加え 6 時間培養した際の蛍光顕微鏡画像を示した。CPP を添加しなかった条件では細胞内のリソソームと見られる小胞が強い赤色蛍光を発したが、CPP 添加条件では加水分解酵素の活性が低下していることをあらわす蛍光の減弱が見られた。スケールバーは 10 μm 。

(B) A と同様の実験で得られた画像について、DQ Red BSA の平均蛍光強度を定量し、折れ線グラフで表した。CPP を添加後の培養時間を横軸にとった。CPP 添加後 1 時間培養した条件から長時間になるにつれて加水分解酵素の活性低下が見られた。データは 6 枚の画像の平均 \pm SEM として表した。

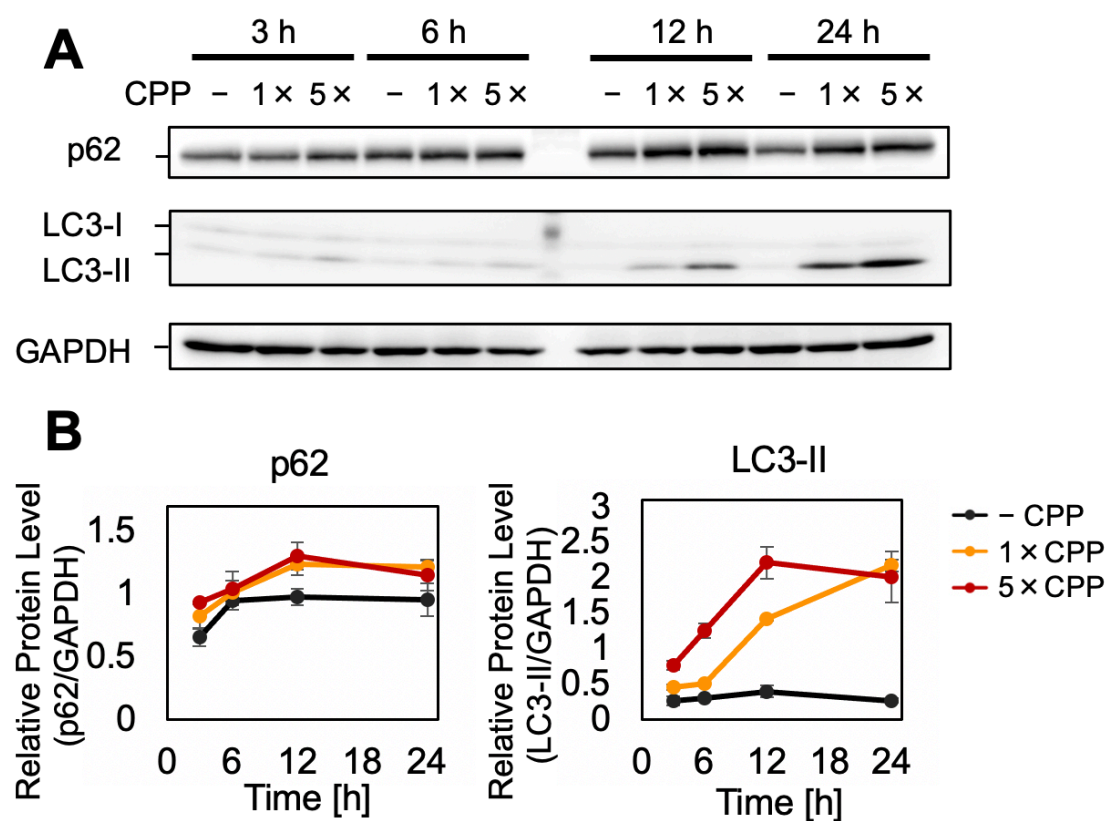


図 36 CPP により LC3-II と p62 の蓄積が誘導される

CPP を添加し 3、6、12、24 時間培養したサンプルを用いたウェスタンブロットを行ない、オートファジーフラックス阻害で見られる p62、LC3-II の蓄積が CPP により見られるかどうかを調べた。

(A) CPP 添加後、時間経過に伴って p62、LC3-II が蓄積することを示したウェスタンブロット。ブロット全長は図 37 に示した。

(B) A のバンドを定量し、GAPDH により規格化した値を折れ線グラフとして表した。データは $n=3$ の平均 \pm SEM。

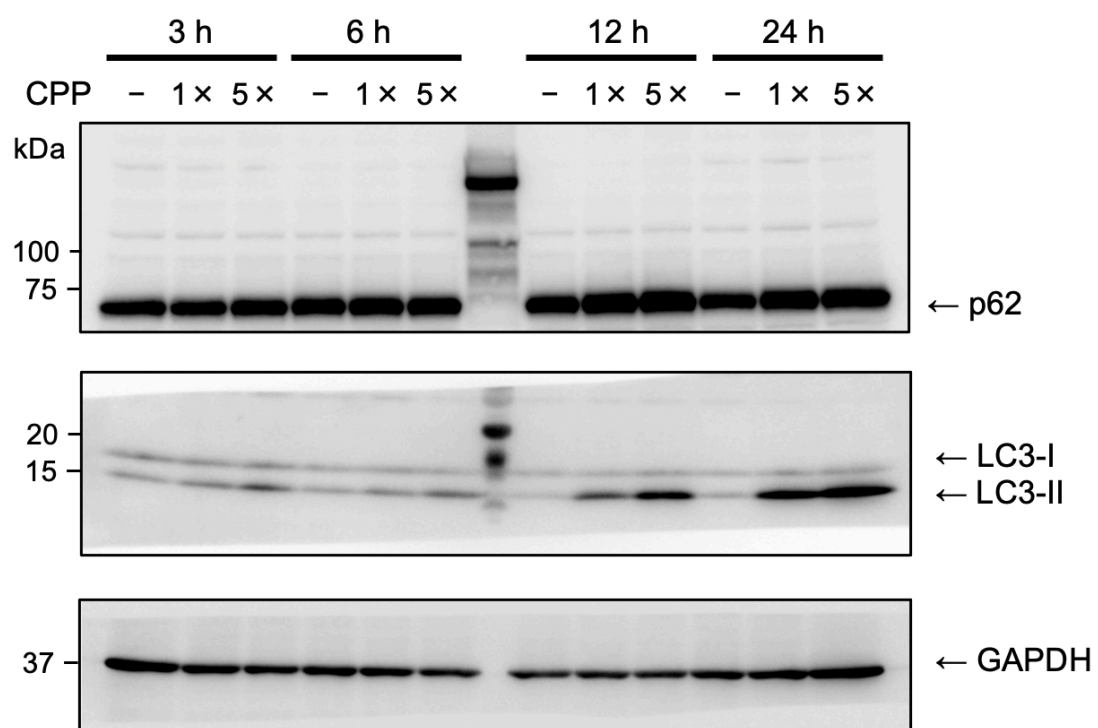


図 37 図 36 のプロット全長

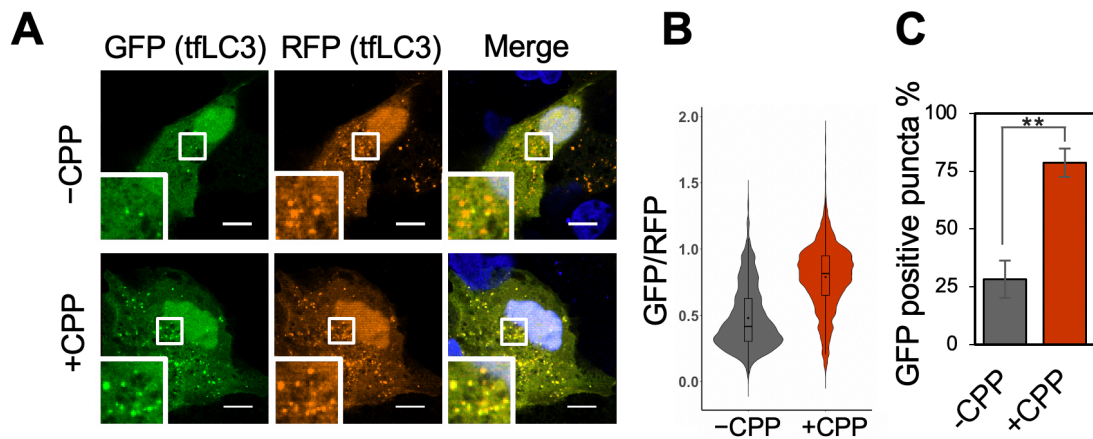


図 38 CPP を取り込んだ細胞ではオートファジーフラックスが阻害される

オートファジーフラックスが阻害されているかどうかを EGFP と RFP が繋がれた LC3 である tfLC3 (tandem fluorescence tagged LC3) を発現させた HK-2 細胞を用いて調べた。オートファゴソームでは EGFP と RFP の双方が蛍光を発するのに対し、リソソームと融合し小胞内が酸性化した状態では EGFP の蛍光が減弱し、pH の影響を受けない RFP のみの蛍光が観察される。

- (A) tfLC3 を発現させた HK-2 細胞に CPP を添加し、12 時間培養を行なった後に観察を行った際の蛍光顕微鏡画像の代表例を示した。CPP 非添加条件では、酸性化により EGFP が減弱し RFP のみが蛍光を発するオートリソソームが見られた。CPP 添加条件では GFP ネガティブな斑点の数が減少しており、オートファジーフラックスが阻害されていることが示唆された。スケールバーは 10 μ m。
- (B) オートファゴソーム/オートリソソーム の斑点毎に RFP と GFP の蛍光強度を定量し、蛍光強度の比である GFP/RFP を算出しバイオリンプロットとして表した。CPP 添加条件では添加しなかった条件と比較して GFP/RFP の値が高かった。データは各条件 3 枚の画像から、各 800 個以上の斑点を定量した結果である。
- (C) B と同じデータに対し、GFP/RFP が 0.6 以上の斑点を GFP ポジティブとし、その割合を算出した際の棒グラフを示した。CPP 非添加条件では約 25%であった GFP ポジティブな斑点が CPP 添加により 75%まで増加し、CPP によりオートファジーフラックスが阻害されていることが示唆された。データは各条件 3 枚の画像について定量し、平均 \pm SEM として表した。**P < 0.01。

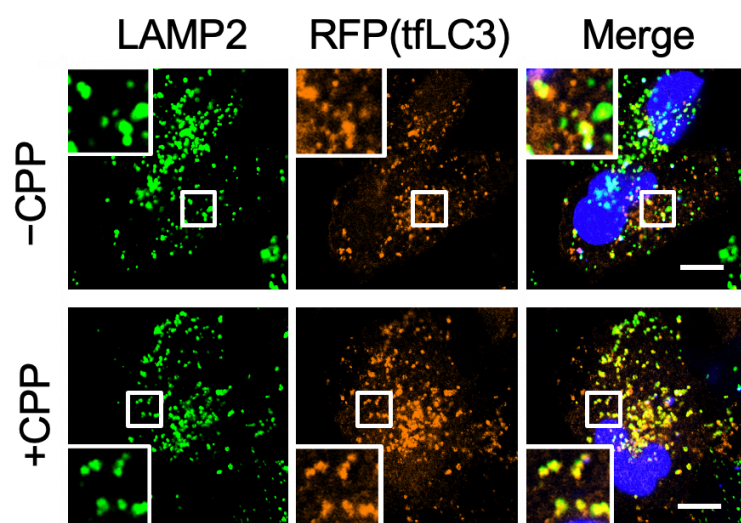


図 39 CPP を取り込んだ細胞ではオートファゴソームとリソソームの融合は阻害されない

CPP を取り込んだ細胞においてオートファゴソームとリソソームの融合が阻害されているかどうかを調べるために、LAMP2 と tfLC3 の共局在が見られるかどうか顕微鏡観察を行った。tfLC3 を発現させた HK-2 細胞に対し、CPP 添加培地もしくは非添加培地中で 12 時間培養し、PFA 固定後 LAMP2 抗体を用いた蛍光抗体法を行った際の代表的な蛍光顕微鏡画像を示した。CPP 添加の有無に関わらず LAMP2 と tfLC3 の共局在が見られたことから、CPP を取り込んだ細胞においてオートファゴソームとリソソームの融合は pH 上昇の影響なく進んでいることが示唆された。スケールバーは 20 μm 。

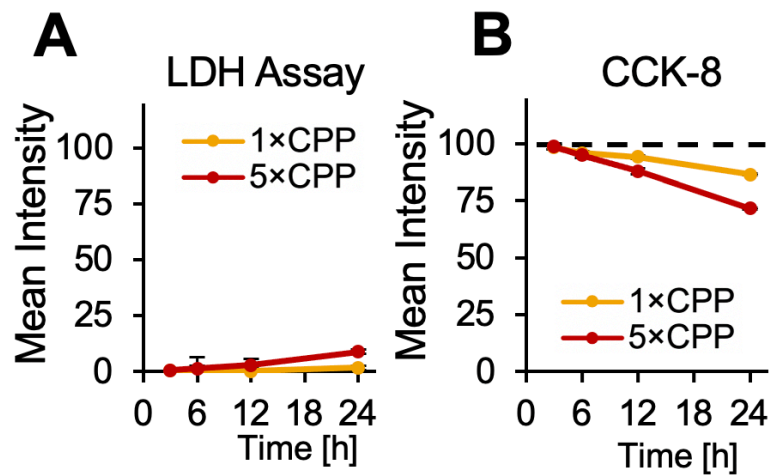


図 40 CPP は HK-2 細胞に対し弱い細胞毒性を有する

CPP 添加後 3、6、12、24 時間培養した HK-2 細胞における細胞毒性と細胞生存能 (viability) を、それぞれ LDH アッセイと CCK-8 アッセイにより調べた。LDH アッセイは死細胞または細胞膜に傷害を受けた細胞が放出する乳酸脱水素酵素 (LDH) を指標とするアッセイである。CCK-8 アッセイは生細胞中の脱水素酵素により産生される NADH を指標とするアッセイである。

- (A) 培地中の LDH が CPP 添加後の培養時間に伴って増加することを表す折れ線グラフを示した。LDH の放出は高濃度の CPP においてより多く見られたが、その増加率は最大でも 8.9% 程度であった。データは $n=3$ の平均 \pm SEM として表した。
- (B) 細胞の代謝活性が CPP 添加後の培養時間に伴って低下することを表す折れ線グラフを示した。代謝活性は高濃度の CPP においてより低下していたが、その低下率は最大でも 28% 程度であった。以上の結果より、CPP 自身による細胞死誘導能や細胞生存能低下の誘導能は限定的であることがわかった。
- (C) データは $n=3$ の平均 \pm SEM として表した。

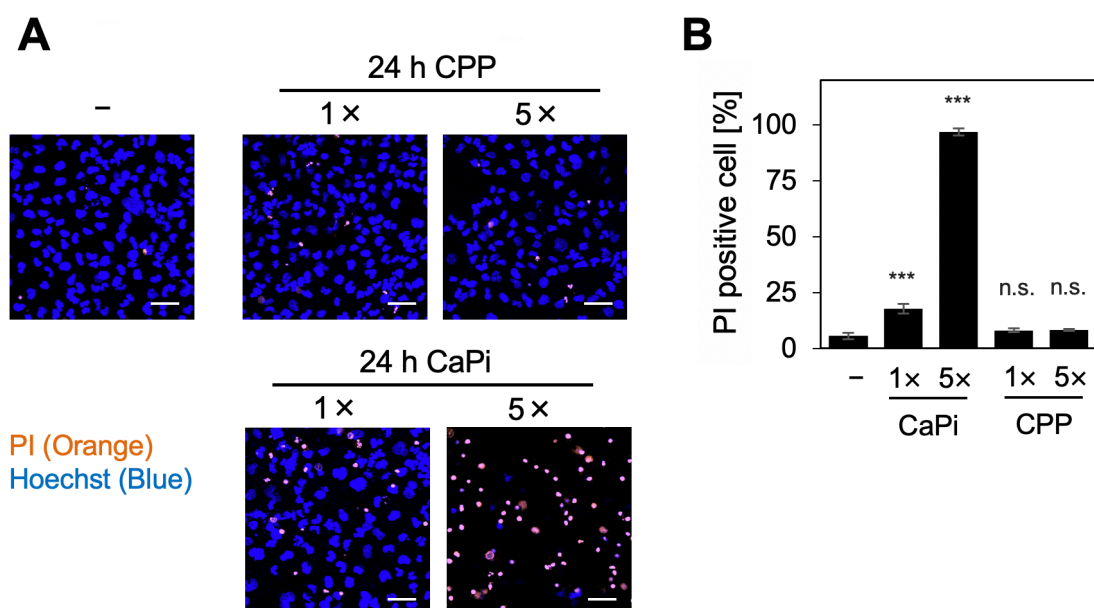


図 41 HK-2 細胞に対する CPP の細胞毒性は CaPi と比較して弱い

CPP により細胞死を引き起こす細胞の割合を CaPi による細胞死と比較するため、低濃度 (1x) および高濃度 (5x) の CPP もしくは CaPi と共に HK-2 細胞を 24 時間培養後、死細胞を PI により染色した。

(A) CaPi 添加条件では多くの細胞が PI により染色されており、細胞死が引き起こされていることを示す代表的な蛍光顕微鏡画像。スケールバーは 50 μm 。

(B) A と同様の実験で得られた画像を用いて PI ポジティブな細胞の割合を定量した。Hoechst 染色により全細胞の認識を行い、PI 染色により死細胞の認識を行った。特に高濃度 (5x) の CaPi では 95% 以上の細胞で細胞死が誘導されたのに対し、CPP では 8% 未満であった。データは各条件 3 枚の画像について定量し、平均 \pm SEM として表した。*** $P < 0.001$, n.s.: not significant。

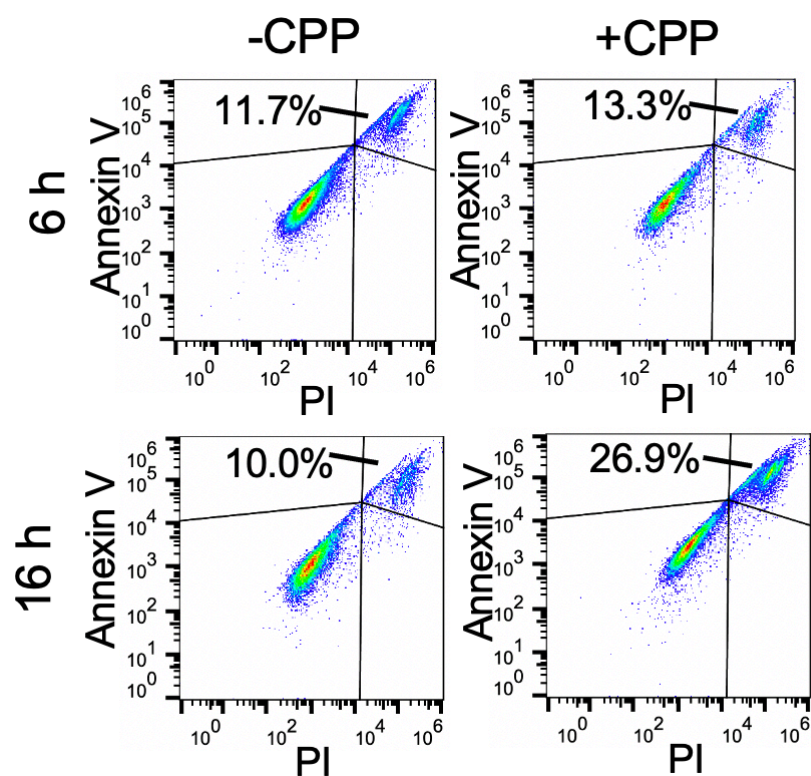


図 42 CPP は HK-2 細胞に非アポトーシス性細胞死を誘導する

細胞死の様式を調べるために Annexin V-FITC と PI を用いたアポトーシス検出を行なった。CPP 添加後 6、16 時間と時間の経過に伴って死細胞を表す PI⁺の細胞（右上の象限；細胞の割合を図中に示した）は増加したものの、いずれの時点においてもアポトーシス初期を表す Annexin V⁺/PI⁻（左上の象限）の細胞が見られなかったことから、CPP により引き起こされる細胞死は非アポトーシス性であることが示唆された。データの解析には FlowJo ソフトウェア version 10.5.1 (RRID:SCR_008520, Tree Star, <https://www.flowjo.com>) を用いた。

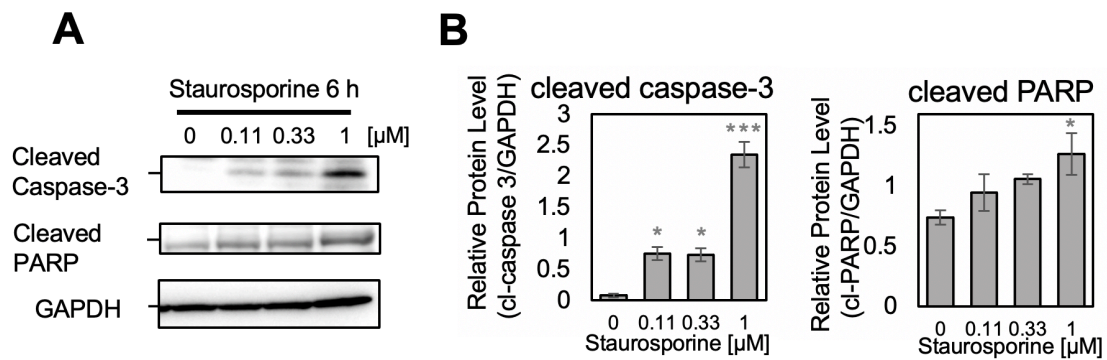


図 43 Staurosporine 処理によりアポトーシスマーカーである cleaved caspase-3 と cleaved PARP が増加した

アポトーシスを誘導することが知られている staurosporine を HK-2 細胞に作用させ、cleaved caspase-3 と cleaved PARP の増加をウェスタンブロットにより確かめた。

(A) 各濃度の staurosporine を添加後 6 時間培養した細胞において cleaved caspase-3 と cleaved PARP のバンドが増加することを示したウェスタンブロット。ブロット全長は図 45 に示した。

(B) A のバンドを定量し、GAPDH により規格化した値を折れ線グラフとして表した。データは $n=3$ の平均 \pm SEM。* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。

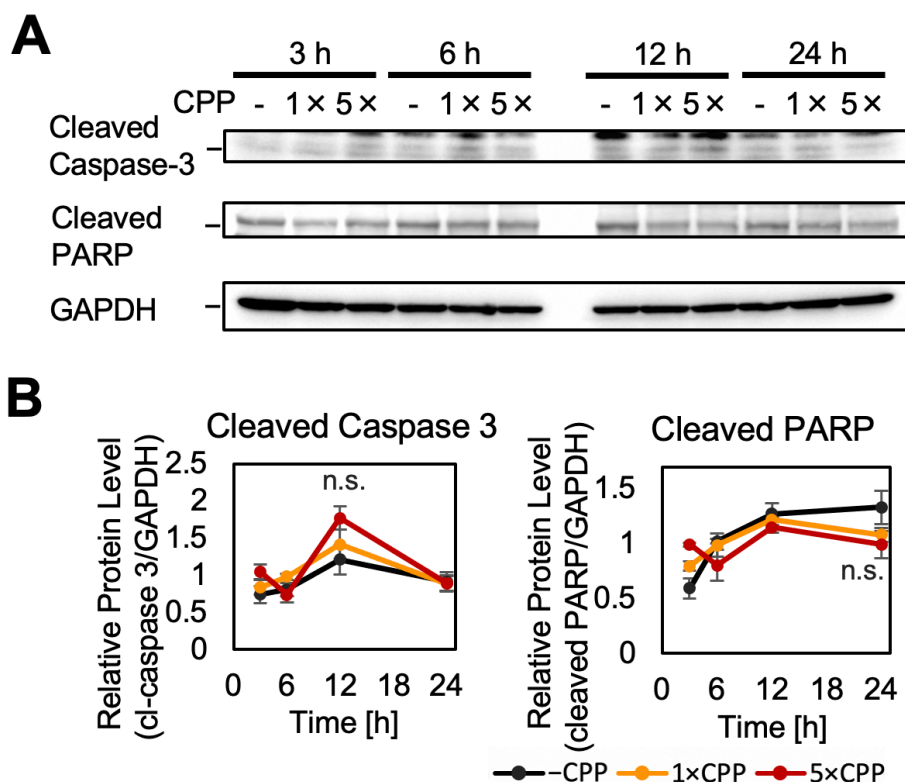


図 44 CPP は cleaved caspase-3 と cleaved PARP の増加を引き起こさない

CPP により引き起こされる細胞死がアポトーシスではないことを確かめるため、アポトーシスの際に増加することが知られる cleaved caspase-3 と cleaved PARP についてウェスタンブロットを行った。

(A) CPP 添加 3、6、12、24 時間後の細胞において cleaved caspase-3 と cleaved PARP のバンドの増加は見られないことを示したウェスタンブロット。ブロット全長は図 45 に示した。

(B) A のバンドを定量し、GAPDH により規格化した値を折れ線グラフとして表した。データは $n=3$ の平均 \pm SEM。n.s: not significant。

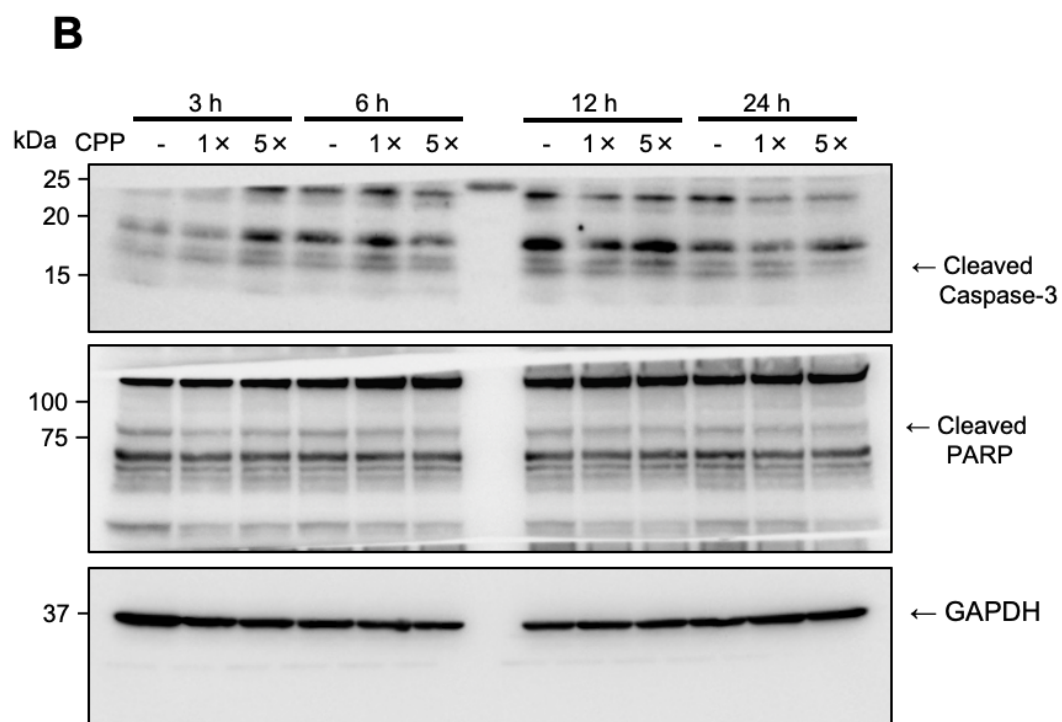
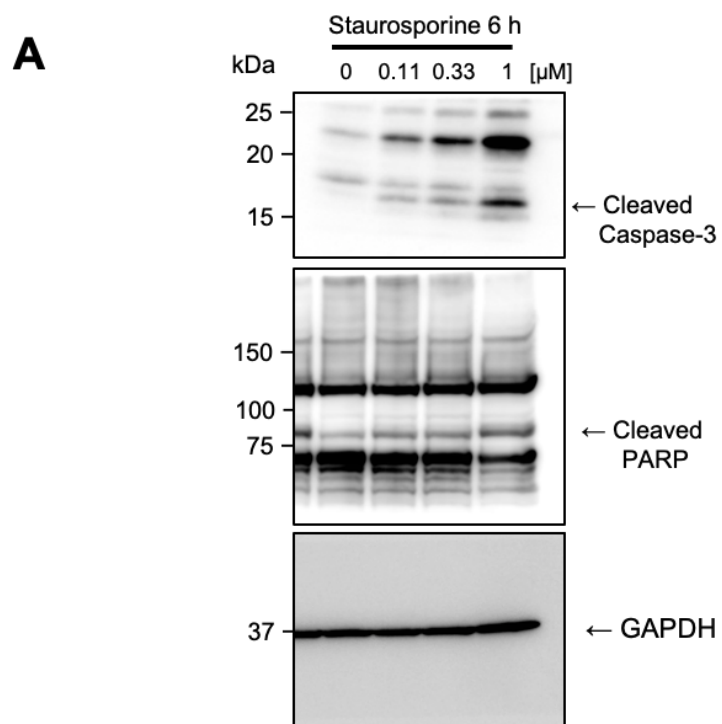


図 45 図 43、図 44 のプロット全長

(A) 図 43A のプロット全長。

(B) 図 44A のプロット全長。

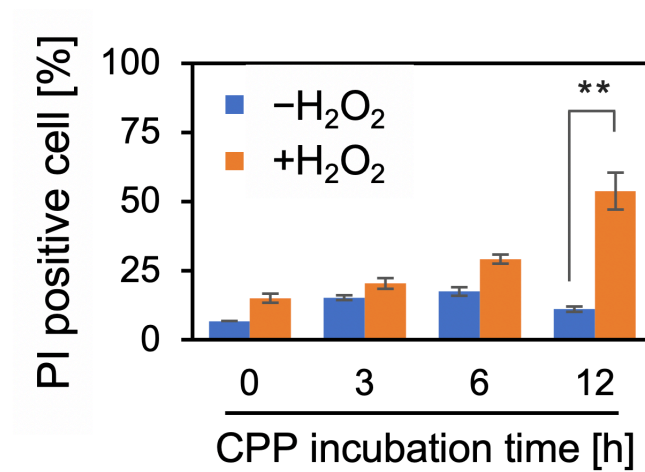


図 46 CPP を取り込んだ細胞は H₂O₂ により誘導される酸化ストレスに対して脆弱になる

CPP を加えた培地で 0、3、6、12 時間培養した HK-2 細胞に対し H₂O₂ 曝露 (600 μ M) を行い、12 時間後に PI 染色により細胞死の割合を調べた。Hoechst 染色により全細胞の認識を行い、PI 染色により死細胞の認識を行った。CPP との培養時間に伴って H₂O₂ による細胞死が劇的に増加した。データは $n=3$ の平均 \pm SEM。**P < 0.01。

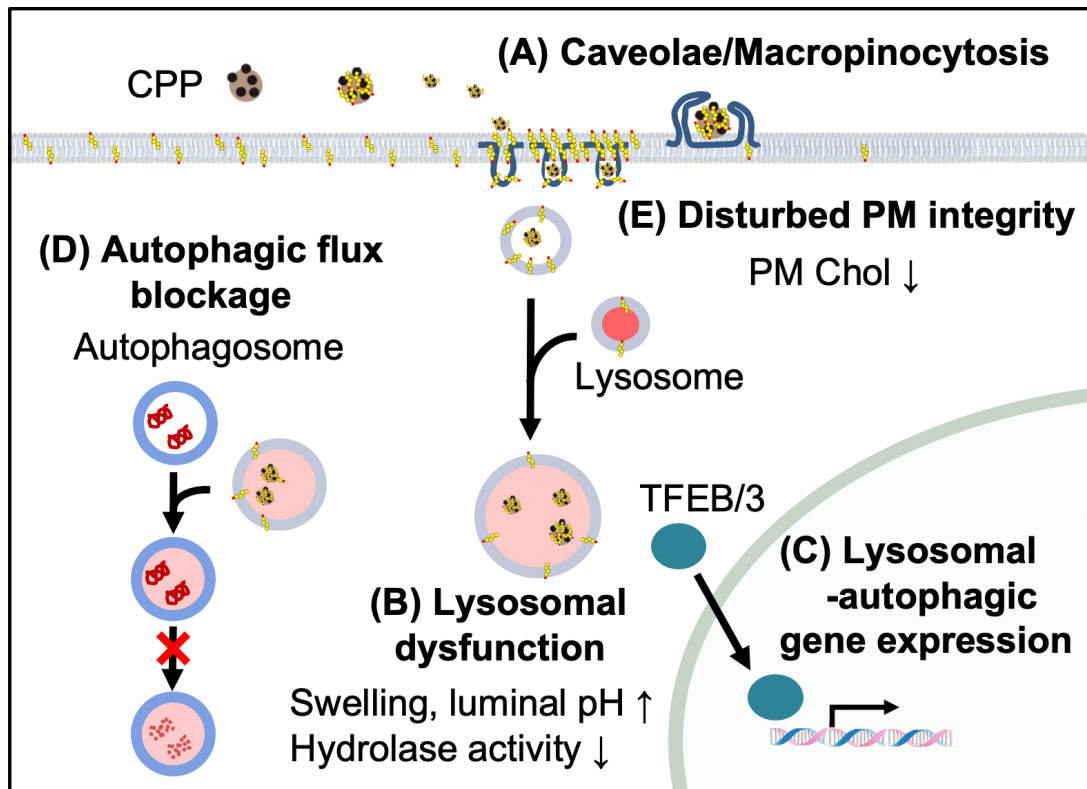


図 47 CPP が誘導する細胞毒性の模式図

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（図中 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（図中 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（図中 C）、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。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（図中 D）。また、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（図中 E）。 PM, plasma membrane; Chol, cholesterol。