

学位論文の要約

論文題目：Impairment of proteasome function in podocytes leads to chronic kidney disease
(糸球体足細胞におけるプロテアソーム機能不全は慢性腎臓病を引き起こす)

牧野慎市^{1,2,3}、白田成俊^{2,4}、Juan Alejandro Oliva Trejo^{2,5}、山本香苗^{2,3}、山田博之^{1,2,3}、三宅崇文^{2,3}、森潔^{2,6,7}、仲川孝彦^{2,8}、田代善崇⁹、山下博史⁹、柳田素子^{2,3,10}、高橋良輔⁹、浅沼克彦^{1,2}

- 1)Department of Nephrology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan
- 2)Medical Innovation Center, TMK Project, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan
- 3)Department of Nephrology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan
- 4)Sohyaku, Innovative Research Division, Mitsubishi Tanabe Pharmaceutical Corporation, Saitama, Japan
- 5)Department of Cellular and Molecular Neuropathology, Juntendo University Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan
- 6)Department of Molecular and Clinical Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan
- 7)Department of Nephrology, Shizuoka General Hospital, Shizuoka, Japan
- 8)Department of Nephrology, Rakuwakai Otowa Hospital, Kyoto, Japan
- 9)Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan
- 10)Institute for the Advanced Study of Human Biology, Kyoto University, Kyoto, Japan

【背景】

高齢者における慢性腎臓病(CKD)患者の増加が大きな問題となっている。糸球体足細胞(ポドサイト)は糸球体の毛細血管周囲の基底膜を覆い、血液蛋白の最終濾過機能を担う細胞である。ポドサイトが障害を受けて基底膜から脱落すると、血液蛋白が漏れ出して蛋白尿が生じる。障害が持続するとやがて糸球体構造が保てなくなり糸球体硬化を来しCKDが進行する。このためポドサイト障害が起こるメカニズムを解明して障害を抑制することはCKDの進行抑制につながると考えられる。

ユビキチン・プロテアソーム系(UPS)とオートファジー・リソソーム系(APLS)は細胞内の主要な蛋白分解機構であり細胞内の蛋白の発現調節において重要である。ポドサイトは生理的条件においてオートファジー活性が高く、ポドサイトにおけるAPLSの役割については、これまで多数の報告がなされてきた。しかしながら、ポドサイト特異的なオートファジー機能不全マウスは、自然経過では高齢になるまでは腎不全は認めなかった。興味深いことに、このマウスでは若齢では糸球体のプロテアソーム活性が増加しており、反対に高齢に

なると低下していた。このことから、APLSだけでなくポドサイトにおけるUPS機能がCKDの進行に重要な役割を果たしていると考えた。

UPSにおいては、分解の標的となる蛋白にユビキチンと呼ばれる蛋白が結合し（ユビキチン化）、これが核や細胞質に存在する26Sプロテアソームに認識されてATP依存的に分解される。26Sプロテアソームは20S複合体と呼ばれる筒状のコア粒子の両端に19S複合体と呼ばれる制御粒子が結合した蛋白質分解酵素の複合体である。Rpt3は19S複合体の構成蛋白であり、26Sプロテアソームの構築に必須である。全身性にRpt3を欠損したマウスは、胚盤胞形成不全により着床前に致死することが報告されている。

本研究では、ポドサイト特異的にRpt3を欠損させて、ポドサイト特異的なプロアソーム機能不全マウス（pRpt3 KOマウス）を作成し、ポドサイトにおけるプロテアソーム機能の役割を解析した。さらにポドサイトにおけるプロテアソーム機能とオートファジーの相互作用について明らかにし、CKDの進行におけるポドサイトの蛋白分解機構の役割についての新たな知見を得た。

【結果】

1. pRpt3 KOマウスは糸球体硬化を来して腎不全を発症する

pRpt3 KOマウスは生下時には、コントロールである同腹子と変わらない外観であった。しかし50週齢まで観察した検討では、pRpt3 KOマウスはコントロールマウスに比べて生存率が有意に低く、pRpt3 KOマウスは平均14週齢で死亡した。14週齢のpRpt3 KOマウスの腎臓は萎縮しており、慢性腎不全の所見が見られた。pRpt3 KOマウスは4週齢からアルブミン尿を認め、8週齢ではコントロールマウスに比べて有意に増加した。またpRpt3 KOマウスでは8週齢で血清クレアチニンがコントロールマウスに比べて有意に上昇していた。これらの結果からpRpt3 KOマウスは若齢で腎不全となり死亡したと考えられた。組織学的な検討ではpRpt3 KOマウスは8週齢で有意に硬化糸球体の数が増加していた。またpRpt3 KOマウスの糸球体におけるポドサイトの数を、ポドサイトマーカーであるWT1で評価したところ、pRpt3 KOマウスではコントロールマウスに比べて、糸球体当たりのWT1陽性細胞数が4週齢で有意に減少していた。またpRpt3 KOマウスではポドサイトのスリット膜に発現しているポドシンとネフリンの局在変化と発現の低下が見られた。これらの結果からpRpt3 KOマウスではポドサイト障害を起こして糸球体硬化と腎不全が進行したと考えられた。また電子顕微鏡による観察では、pRpt3 KOマウスのポドサイトにおいて足突起の消失が見られ、細胞質に均一な電子密度を持った蓄積物が見られた。

2. pRpt3 KOマウスのポドサイトにはユビキチン化蛋白と酸化蛋白が蓄積していた

糸球体のライセートを用いたウェスタンブロッティングや蛍光免疫染色により、pRpt3 KOマウスのポドサイトにおいてユビキチン化蛋白の蓄積が見られた。ポドサイト障害の要因として酸化ストレスを調べたところ酸化ストレスのマーカーである8-OHdGがpRpt3 KOマウスのポドサイトにおいて発現増強していた。これらの結果からプロテアソーム不全

により分解されなかったユビキチン化蛋白や酸化蛋白が pRpt3 KO マウスのポドサイトに蓄積したと考えられた。

3. ポドサイトのアポトーシスがポドサイトの減少に関与する

ポドサイト障害はポドサイトをアポトーシスさせることが報告されている。そのためマウスの腎臓をアポトーシスのマーカーである Cleaved caspase 3 で染色したところ、Cleaved caspase 3 陽性ポドサイトを含む糸球体数は、コントロールマウスに比べて pRpt3 KO マウスで有意に増加していた。またアポトーシスの制御分子である p53 は pRpt3 KO マウスのポドサイトにおいて発現増強が見られた。これらの結果から p53 を介したポドサイトのアポトーシスが pRpt3 KO マウスにおけるポドサイト数の減少に関与していると考えられた。

4. pRpt3 KO マウスのポドサイトでは APLS は抑制される

一般的にはプロテアソーム機能不全は、オートファジーを誘導することが知られている。本研究ではオートファジーのマーカーである LC3 陽性顆粒の数を蛍光免疫染色で評価した。ポドサイトマーカーであるシナプトポディンと共染色される LC3 陽性顆粒の数は、コントロールマウスに比べて pRpt3 KO マウスで有意に少なかった。この結果は pRpt3 KO マウスのポドサイトではオートファジー活性が抑制されていることを示唆する。次に、オートファジー特異的に分解をされる p62 の発現を調べたところ、コントロールマウスに比べて pRpt3 KO マウスのポドサイトにおいて p62 の蓄積が有意に増加していた。これらの結果から、ポドサイトにおいては予想に反してプロテアソーム機能不全によりオートファジーも抑制されることが分かった。

5. プロテアソーム阻害は不死化培養ポドサイトにおいてユビキチン化蛋白と酸化蛋白を蓄積させ、ポドサイトのアポトーシスを誘導する

ポドサイト障害のメカニズムを明らかにするため、培養ポドサイトにプロテアソーム阻害剤である bortezomib を投与する実験を行った。培養ポドサイトに bortezomib を 100nM で投与すると、酸化ストレスのマーカーである 8-OHdG が、bortezomib 投与後 9 時間以降有意に上昇した。また、bortezomib の投与により、ユビキチン化蛋白の蓄積が見られ、アポトーシス制御分子である p53 やアポトーシスマーカーである Cleaved caspase 3 の発現上昇が見られた。さらに抗酸化剤である apocynin を 1mM の濃度で前投与したところ、bortezomib で誘導される p53 や Cleaved caspase 3 の発現上昇が抑制された。このことから酸化ストレスがポドサイトのアポトーシスに関与していると考えられた。

6. プロテアソーム阻害は不死化培養ポドサイトにおいてオートファジーを抑制する

培養ポドサイトにおいてプロテアーゼ阻害によるオートファジー活性の変化を調べた。bortezomib を 100nM で培養ポドサイトに投与すると細胞質に p62 の蓄積が見られた。さらにオートファジー活性を調べるために、LC3-II/LC3-I 比を評価した。オートファゴソーム膜上で LC3-I が LC3-II に変化されるため、LC3-II/LC3-I 比はオートファゴソームの数と相関し、オートファジー活性の指標となる。bortezomib 投与した細胞はコントロールである DMSO(vehicle)を投与した細胞に比べて、投与 6 時間以降で、有意に LC3-II/LC3-

I 比が低下した。LC3-II/LC3-I 比はオートファゴソームの分解の亢進によっても低下する。そのため bortezomib に加えてプロテアーゼ阻害剤 (E64d, pepstatinA) を投与して、オートファゴソームの分解を阻害した条件で LC3-II/LC3-I 比を確認したが、やはり bortezomib の投与により LC3-II/LC3-I 比は低下していた。このことから、bortezomib の投与によりオートファジーが抑制されたことが確認された。これらの結果から、マウスと同様に培養ポドサイトにおいても、プロテアソーム機能の阻害により、オートファジーが抑制されることが示された。

7. rapamycin はプロテアソーム阻害により誘導されるポドサイトのアポトーシスを抑制し、pRpt3 KO マウスの硬化糸球体を減少させる

ポドサイトにおいて、プロテアソームの機能不全がオートファジーを抑制したメカニズムを調べるため、オートファジーを負に制御している mTOR シグナルについて調べた。mTOR の下流分子である ULK1 のセリン 757 のリン酸化を評価したところ、pRpt3 KO マウスの糸球体ではセリン 757 リン酸化 ULK1 が増加しており、mTOR の活性化が示唆された。同様に培養ポドサイトに bortezomib を 100nM で投与すると、投与 3~9 時間でセリン 757 リン酸化 ULK1 の増加が見られた。これらの結果から mTOR の活性化によりオートファジーが抑制されていると考えられた。そこで、mTOR の抑制薬である rapamycin を投与してオートファジーを活性化させ、ポドサイト障害が改善するかどうか検討した。培養ポドサイトに 500nM で rapamycin を前投与したところ、bortezomib により誘導される p53 や Cleaved caspase 3 などのアポトーシスマーカーの発現上昇が抑制された。さらに生後 3 週齢のマウスに 4mg/kg の投与量で rapamycin を腹腔内に隔日投与を行い、8 週齢で硬化糸球体の数を評価したところ、rapamycin を投与した pRpt3 KO マウスは DMSO(vehicle)を投与した pRpt3 KO マウスと比べて有意に硬化糸球体の数が少なかった。これらの結果から rapamycin によるオートファジーの活性化は pRpt3 KO マウスの糸球体障害を改善することが示唆された。

8. ポドサイトのプロテアソーム機能不全により老化が促進する

加齢に伴って臓器や細胞のプロテアソーム機能が低下し、ユビキチン化蛋白や酸化蛋白の蓄積が見られることが知られている。我々はポドサイトのプロテアソーム機能低下が老化に関与していると考え、老化マーカーである p19^{ARF} を調べたところ、pRpt3 KO マウスのポドサイトで p19^{ARF} の発現上昇が見られた。また培養ポドサイトに bortezomib を投与すると、同様に p19^{ARF} の発現が上昇した。これらの結果から、ポドサイトのプロテアソーム機能低下が腎老化を促進していることが示唆された。

【考察】

ポドサイトは生理的条件下ではオートファジー活性が高いが、ポドサイト特異的なオートファジー不全マウスは自然経過では高齢になるまで腎不全は見られない。興味深いことに、このマウスは若齢では糸球体のプロテアソーム活性が増加しており、一方高齢になるとプロテアソーム活性の低下が見られた。またポドサイト特異的なオートファジー不全マウス

に片腎摘行行って残腎に負荷をかけると、一過性に26Sプロテアソームの発現が上昇する。これらの結果はポドサイトのオートファジー不全をUPSが代償していることが考えられる。さらに我々の作成したpRpt3 KOマウスは、若齢より尿蛋白とポドサイトのアポトーシスが見られ、腎不全の進行が見られた。これらの結果からポドサイトの恒常性維持においては、UPSがAPLSより重要な役割を担っていると考えられる。

プロテアソーム機能不全によりポドサイトにおいてp53の発現上昇が見られた。生理条件では、p53は転写翻訳後にユビキチン化を受けてプロテアソームで分解されることで、その発現は低く保たれている。そのためプロテアソーム機能不全によりポドサイトで発現上昇したp53は、ユビキチン化されたp53であると考えた。しかし実際には、ウェスタンブロットティングによる検討ではユビキチン化p53は検出されなかった。一方酸化ストレスはp53のユビキチン化を阻害することでp53の発現を上昇させる。抗酸化剤がプロテアソーム機能阻害により誘導されるp53の発現を抑制した結果も併せると、p53の発現上昇の主因は、酸化ストレスによるp53のユビキチン化の阻害であると考えられる。

一般的にはプロテアソーム機能不全は、オートファジーを誘導することが知られている。ポドサイト障害を誘導したマウスにプロテアソーム阻害剤を投与した報告では、プロテアソーム阻害剤の投与によりポドサイトのオートファジーが誘導されることが報告されている。本研究でも、当初pRpt3 KOマウスのポドサイトにp62が増加しているのを観察した時は、蓄積したユビキチン化蛋白をオートファジーで分解するためにp62の発現が増強していると考えた。しかし、予想に反してpRpt3 KOマウスのポドサイトではLC3は増加しておらずむしろ低下しており、オートファジーは抑制されていた。そのためp62の発現増強は、オートファジーの抑制によりp62が蓄積したと考えられた。またオートファジーが抑制されたメカニズムについて調べるためにオートファジーを負に制御しているmTORシグナルについて検討を行ったところ、プロテアソーム機能不全のポドサイトでmTORが活性化していた、さらにmTOR阻害剤であるrapamycinの投与により、プロテアソーム阻害により誘導されるポドサイトのアポトーシスが抑制され、pRpt3 KOマウスの硬化糸球体の数が減少した。このようなプロテアソーム阻害で引き起こされる細胞障害に対するrapamycinの保護効果は、神経細胞でも報告されている。しかしポドサイトにおいてプロテアソーム機能不全によりmTORが活性化したメカニズムは今回の検討では解明できていない。

加齢に伴って臓器や細胞のプロテアソーム機能が低下し、ユビキチン化蛋白や酸化蛋白の蓄積が見られることが知られている。また全身性にプロテアソーム機能を低下させたマウスでは短命や筋萎縮などの表現型が見られた。このマウス由来の初代培養の線維芽細胞では老化マーカーの β ガラクトシダーゼの発現レベルが上昇していた。本研究ではpRpt3 KOマウスのポドサイトにおいてユビキチン化蛋白や酸化蛋白の蓄積を認め、さらに老化マーカーであるp19^{ARF}の発現が上昇していた。これらの知見から、高齢者におけるCKDの病態として、加齢とともにポドサイトのプロテアソーム機能が低下し、これがポドサイトの

老化と糸球体障害を来してCKDを進行させる機序が予想される。

本研究により、ポドサイトのプロテアソーム機能不全がポドサイト障害を来してCKDを進行させることが分かった。さらに抗酸化剤やオートファジーの活性化剤は、CKDの進行抑制の治療戦略となることが分かった。

【参考文献】

1. Asanuma K, Tanida I, Shirato I, Ueno T, Takahara H, Nishitani T, et al.: MAP-LC3, a promising autophagosomal marker, is processed during the differentiation and recovery of podocytes from PAN nephrosis. *FASEB J* 17: 1165–1167, 2003 10.1096/fj.02-0580fje
2. Hartleben B, Gödel M, Meyer-Schwesinger C, Liu S, Ulrich T, Köbler S, et al.: Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *J Clin Invest* 120: 1084–1096, 2010 10.1172/JCI39492
3. Oliva Trejo JA, Asanuma K, Kim EH, Takagi-Akiba M, Nonaka K, Hidaka T, et al.: Transient increase in proteinuria, poly-ubiquitylated proteins and ER stress markers in podocyte-specific autophagy-deficient mice following unilateral nephrectomy. *Biochem Biophys Res Commun* 446: 1190–1196, 2014 10.1016/j.bbrc.2014.03.088
4. Sakao Y, Kawai T, Takeuchi O, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al.: Mouse proteasomal ATPases Psmc3 and Psmc4: Genomic organization and gene targeting. *Genomics* 67: 1–7, 2000 10.1006/geno.2000.6231
5. Tashiro Y, Urushitani M, Inoue H, Koike M, Uchiyama Y, Komatsu M, et al.: Motor neuron-specific disruption of proteasomes, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 287: 42984–42994, 2012 10.1074/jbc.M112.417600
6. Moeller MJ, Sanden SK, Soofi A, Wiggins RC, Holzman LB: Podocytespecific expression of cre recombinase in transgenic mice. *Genesis* 35: 39–42, 2003 10.1002/gene.10164
7. Yamamoto-Nonaka K, Koike M, Asanuma K, Takagi M, Oliva Trejo JA, Seki T, et al.: Cathepsin D in podocytes is important in the pathogenesis of proteinuria and CKD. *J Am Soc Nephrol* 27: 2685–2700, 2016 10.1681/ASN.2015040366
8. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, et al.: Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 108: 1621–1629, 2001 10.1172/JCI200112849
9. Shirata N, Ihara K-I, Yamamoto-Nonaka K, Seki T, Makino SI, Oliva Trejo JA, et al.: Glomerulosclerosis induced by deficiency of membraneassociated guanylate kinase inverted 2 in kidney podocytes. *J Am Soc Nephrol* 28: 2654–2669, 2017 10.1681/ASN.2016121356
10. Mundel P, Reiser J, Zúñiga Mejía Borja A, Pavenstädt H, Davidson GR, Kriz W, et al.: Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 236: 248–258, 1997 10.1006/excr.1997.3739

11. Ueno T, Kobayashi N, Nakayama M, Takashima Y, Ohse T, Pastan I, et al.: Aberrant Notch1-dependent effects on glomerular parietal epithelial cells promotes collapsing focal segmental glomerulosclerosis with progressive podocyte loss. *Kidney Int* 83: 1065–1075, 2013 10.1038/ki.2013.48
12. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, et al.: Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7- deficient mice. *J Cell Biol* 169: 425–434, 2005 10.1083/jcb.200412022
13. Asanuma K, Akiba-Takagi M, Kodama F, Asao R, Nagai Y, Lydia A, et al.: Dendrin location in podocytes is associated with disease progression in animal and human glomerulopathy. *Am J Nephrol* 33: 537–549, 2011 10.1159/000327995
14. Kim YH, Goyal M, Kurnit D, Wharram B, Wiggins J, Holzman L, et al.: Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int* 60: 957–968, 2001 10.1046/j.1523-1755.2001.060003957.x
15. Macconi D, Bonomelli M, Benigni A, Plati T, Sangalli F, Longaretti L, et al.: Pathophysiologic implications of reduced podocyte number in a rat model of progressive glomerular injury. *Am J Pathol* 168: 42–54, 2006 10.2353/ajpath.2006.050398
16. Mundel P, Shankland SJ: Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 13: 3005–3015, 2002 10.1097/01.ASN.0000039661.06947.FD
17. Gavilán E, Pintado C, Gavilan MP, Daza P, Sánchez-Aguayo I, Castaño A, et al.: Age-related dysfunctions of the autophagy lysosomal pathway in hippocampal pyramidal neurons under proteasome stress. *Neurobiol Aging* 36: 1953–1963, 2015 10.1016/j.neurobiolaging.2015.02.025
18. Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, et al.: HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 447: 859–863, 2007 10.1038/nature05853
19. Mizushima N, Yoshimori T: How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3: 542–545, 2007 10.4161/auto.4600
20. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G: The hallmarks of aging. *Cell* 153: 1194–1217, 2013 10.1016/j.cell.2013.05.039
21. Chondrogianni N, Gonos ES: Proteasome dysfunction in mammalian aging: Steps and factors involved. *Exp Gerontol* 40: 931–938, 2005 10.1016/j.exger.2005.09.004
22. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y: In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15: 1101–1111, 2004 10.1091/mbc.E03
23. Kruse J-P, Gu W: Modes of p53 regulation. *Cell* 137: 609–622, 2009 10.1016/j.cell.2009.04.050

24. Thomasova D, Bruns HA, Kretschmer V, Ebrahim M, Romoli S, Liapis H, et al.: Murine double minute-2 prevents p53-overactivation-related cell death (podoptosis) of podocytes. *J Am Soc Nephrol* 26: 1513–1523, 2015 10.1681/ASN.2014040345
25. Acharya P, Engel JC, Correia MA: Hepatic CYP3A suppression by high concentrations of proteasomal inhibitors: A consequence of endoplasmic reticulum (ER) stress induction, activation of RNA- dependent protein kinase-like ER-bound eukaryotic initiation factor 2a (eIF2a)-kinase (PERK) and general control nonderepressible-2 eIF2a kinase (GCN2), and global translational shutoff. *Mol Pharmacol* 76: 503–515, 2009 10.1124/mol.109.056002
26. Otda T, Takamura T, Misu H, Ota T, Murata S, Hayashi H, et al.: Proteasome dysfunction mediates obesity-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *Diabetes* 62: 811–824, 2013 10.2337/db11-1652
27. Guo C, Liu Y, Zhao W, Wei S, Zhang X, Wang W, et al.: Apelin promotes diabetic nephropathy by inducing podocyte dysfunction via inhibiting proteasome activities. *J Cell Mol Med* 19: 2273–2285, 2015 10.1111/jcmm.12619
28. Beeken M, Lindenmeyer MT, Blattner SM, Radón V, Oh J, Meyer TN, et al.: Alterations in the ubiquitin proteasome system in persistent but not reversible proteinuric diseases. *J Am Soc Nephrol* 25: 2511–2525, 2014 10.1681/ASN.2013050522
29. Inoki K: mTOR signaling in autophagy regulation in the kidney. *Semin Nephrol* 34: 2–8, 2014 10.1016/j.semnephrol.2013.11.002.mTOR
30. Pan T, Kondo S, Zhu W, Xie W, Jankovic J, Le W: Neuroprotection of rapamycin in lactacystin-induced neurodegeneration via autophagy enhancement. *Neurobiol Dis* 32: 16–25, 2008 10.1016/j.nbd.2008.06.003
31. Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR: Possible involvement of proteasome inhibition in aging: Implications for oxidative stress. *Mech Ageing Dev* 113: 61–70, 2000 10.1016/S0047-6374(99)00101-3
32. Cui J, Bai XY, Shi S, Cui S, Hong Q, Cai G, et al.: Age-related changes in the function of autophagy in rat kidneys. *Age (Dordr)* 34: 329–339, 2012 10.1007/s11357-011-9237-1
33. Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, et al.: Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am J Pathol* 180: 963–972, 2012 10.1016/j.ajpath.2011.11.012
34. Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR: Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 75: 436–439, 2000 10.1046/j.1471-4159.2000.0750436.x
35. Jenner P: Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci* 24: 245–247, 2001
36. Myeku N, Duff KE: Targeting the 26S proteasome to protect against proteotoxic diseases. *Trends Mol Med* 24: 18–29, 2018 10.1016/j.molmed.2017.11.006.Targeting