

京都大学	博士 ( 医学)	氏 名	牧野 慎市
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)		
(論文内容の要旨)			
<p><b>【背景】</b>慢性腎臓病(CKD)患者の増加が問題となっており、CKD 進行のメカニズムの解明と治療薬の開発が課題となっている。血液は腎臓の糸球体において濾過されるが、糸球体の毛細血管周囲を糸球体足細胞(ポドサイト)が覆っており血液蛋白の最終濾過機能を担っている。ポドサイトが障害を受けると血液蛋白が漏れ出して蛋白尿が生じる。障害が進行するとポドサイトが糸球体から脱落して糸球体を維持できなくなり、最終的には糸球体が硬化して CKD が進行する。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。</p> <p>ユビキチン・プロテアソーム(UPS)とオートファジー(Autophagy)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下では Autophagy 活性が高く、ポドサイトにおける Autophagy の役割についてこれまで多数報告されてきた。しかしながら、ポドサイト特異的な Autophagy 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。</p> <p><b>【目的】</b>ポドサイトにおいては、UPS がポドサイトの恒常性の維持に重要な役割を担っていると考え、ポドサイトにおける UPS の役割を明らかにすることを目的とした。</p> <p><b>【方法】</b>UPS では、分解の標的となる蛋白にユビキチンと呼ばれる標識蛋白が結合し(ユビキチン化)、これが 26S プロテアソームにより認識されて分解される。26S プロテアソームは、コア分子である 20S 複合体の両端に、制御分子である 19S 複合体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の蛋白である。Rpt3 を全身性に欠損したマウスは、胚盤胞形成不全により着床前に致死する。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テ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。</p> <p><b>【結果】</b>pRpt3 KO マウスは4週齢からポドサイト数の減少と蛋白尿を認め、8週齢で硬化糸球体が増加して腎機能が悪化し、平均14週齢で死亡した。pRpt3 KO マウスのポドサイトでは、ユビキチン化蛋白が蓄積しており、プロテアソーム不全により分解できずに蓄積したと考えられた。また酸化ストレスマーカーの 8OHdG や、アポトーシス調整因子である p53 やアポトーシスマーカーである Cleaved caspase 3 の発現が上昇しており、酸化ストレスにより p53 を介したアポトーシスが誘導されてポドサイトが細胞死したと考えられた。不死化培養ポドサイトを用いた実験において、プロテアソーム阻害剤である bortezomib の投与でポドサイトのアポトーシスが誘導されたが、抗酸化剤である apocynin の追加投与によりこれは抑制された。UPS と Autophagy は相互に機能を代償しており、UPS の機能不全により Autophagy 活性が代償性に上昇することが一般に知られている。しかし pRpt3 KO マウスのポドサイトでは、Autophagy で特異的に分解される p62 が蓄積していた。さらに Autophagy 活性のマーカーである LC3 を用いて評価したところ、Rpt3 KO マウスのポドサイトでは Autophagy が抑制されていた。このメカニズムを検討するため、オートファジーを負に制御している mTOR シグナルを調べたところ、pRpt3 KO マウスの糸球体や、プロテアソーム阻害剤で処理した培養ポドサイトにおいて、mTOR の下流分子であるリボソーム蛋白質 S6 や ULK1 のリン酸が増加しており mTOR シグナルの活性化により Autophagy 活性が抑制されたことが分かった。そこで mTOR 阻害剤である rapamycin を pRpt3 KO マウスに投与したところ、投与していない pRpt3 KO マウスに比べて8週齢での硬化糸球体の数が有意に減少した。</p> <p><b>【結論】</b>UPS はポドサイトにおいて重要な役割を担っており、プロテアソームの機能不全は CKD を進行させる。抗酸化剤や mTOR 阻害剤は CKD の進行抑制の治療戦略となり得る。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

ユビキチン・プロテアソーム(UPS)とオートファジー・リソソームは細胞内の主要な蛋白分解機構である。糸球体足細胞(ポドサイト)は生理的にオートファジー活性が高く、ポドサイトの恒常性維持のためにオートファジーが重要だと考えられてきた。しかしポドサイト特異的オートファジー機能不全マウスは腎不全を認めないことが報告され、ポドサイトの恒常性維持には UPS がより重要であると仮説を立てた。

ポドサイトにおける UPS の役割を解析するため、プロテアソームの構築に必須の分子である Rpt3 をポドサイト特異的に欠損させ、ポドサイト特異的プロテアソーム機能不全マウス(pRpt3 KO マウス)を作成した。

pRpt3 KO マウスは若齢からポドサイト数の減少と蛋白尿を認め、腎不全により死亡した。pRpt3 KO マウスのポドサイトでは、酸化ストレスにより p53 を介したアポトーシスが引き起こされた。またポドサイトにおいてオートファジーの分解基質である p62 が蓄積し、さらにオートファジー活性を示す LC3 の発現が減少しており、オートファジーが抑制されていることが分かった。そこでオートファジーの活性化薬であるラパマイシンを pRpt3 KO マウスに投与したところ、プロテアソーム不全による糸球体障害の改善が見られた。

以上の研究は、ポドサイトにおける UPS の役割の解明と慢性腎臓病の進行抑制の治療探索に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和3年8月30日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降