

# 腎臓の老化に対抗する TFEB とオートファジーの協調的な代謝調節機構の解明

代表研究者 大阪大学大学院医学系研究科腎臓内科学 特任助教(常勤) 山本 毅士  
 共同研究者 大阪大学大学院医学系研究科腎臓内科学 教授 猪阪 善隆  
 大阪大学大学院医学系研究科腎臓内科学 医員 中村 隼

## 【抄録】

加齢と共に種々の臓器障害が生じる。腎臓も例外でなく、ほぼ全てのヒトで加齢と共に腎機能が低下する。超高齢化や生活習慣病の増加・長期化に伴い、慢性腎臓病および透析患者数は年々増加し、医療的にも社会的にも問題となっている。近年、老化は秩序ある制御機構を持った生物学的な過程であることが明らかとなってきた。筆者はこれまで、老化と生活習慣病における腎臓におけるオートファジーの研究を行い、老化と肥満の共通の病態としてリソソーム機能不全によるオートファジー停滞があり、ストレス下でのオートファジー活性化が不十分となり傷害脆弱性につながることを明らかにしてきた。一方、近年リソソーム生成・代謝を制御する転写因子 TFEB が大きな注目を浴びているが、腎老化における TFEB の活性や役割は検討されていない。本研究では、TFEB とオートファジーは、細胞内代謝を制御し協調的に腎老化を遅らせるとの仮説をたて、①加齢に伴う TFEB 活性の変化、②TFEB の生理的意義と抗老化作用、③シングルセル解析・脂質解析を用いた、代謝異常が腎老化を加速させる機序を解明することを目的とした。

## 1. 研究の目的

### 1-1 腎臓の老化

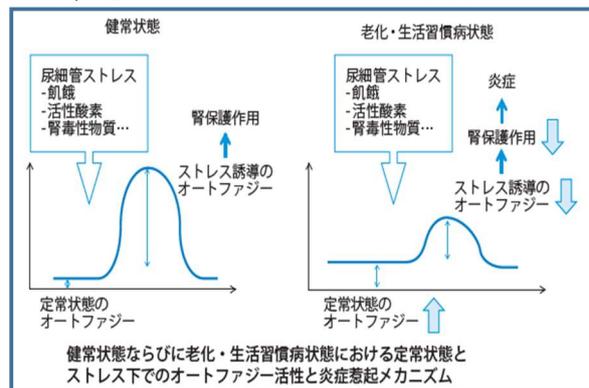
加齢と共に種々の臓器障害が生じる。腎臓も例外でなく、ほぼ全てのヒトで加齢と共に腎機能が低下する。超高齢化や生活習慣病の増加・長期化に伴い、慢性腎臓病 (CKD) および透析患者数は年々増加し、医療的にも社会的にも問題となっている。透析導入に至る患者の平均年齢はおよそ 70 歳と高齢で、今後さらなる高齢社会を迎える我が国においてその対策が急務である。近年、老化メカニズムに関する基礎研究は飛躍的な進歩を遂げ、これまで老化過程は無秩序に生じると考えられてきたのに対し、老化は秩序ある制御機構を持った生物学的な過程であることが明らかとなってきた。

### 1-2 オートファジー・リソソーム系

2016 年、大隅良典博士がオートファジー研究でノーベル生理学・医学賞を受賞された。オートファジーはリソソームにおける細胞質成分分解であり、筆者らはこれまで「腎疾患におけるオートファジーの役割」を研究してきた。これまでに、老化と肥満の共通の病態機序として、オートファジーはミトコンドリア障害などストレスに対抗すべく持続的に亢進するためリソソーム負担となり予備能が低下し(オー

トファジー停滞)、ストレス下でのオートファジー活性化が不十分となり傷害脆弱性につながることを明らかにしている (図) 1-6)。

一方、近年リソソーム生成・代謝を制御する



転写因子 TFEB が発見され大きな注目を浴びている。共同研究者の Andrea Ballabio 教授らは TFEB 制御機構を発見し 7, 8), その生理機能・分子基盤・臓器における役割を解明しているが 9, 10), 腎老化における TFEB の活性や役割は十分に検討されていない。

本研究では、TFEB とオートファジーは、細胞内代謝 (特に脂質代謝) を制御し協調的に腎老化を遅らせるとい仮説をたて、遺伝子改変マウス・シングルセル解析、およびヒト腎生検を用いて、①加齢に伴う TFEB 活性の変化、②

TFEB の生理的意義と抗老化作用, ③シングルセル解析を用いた, 代謝異常が老化を加速させる機序を解明することを目的とした.

## 2. 研究方法と経過

### 2-1 加齢に伴うリソソーム形態・機能および TFEB 活性変化の検討

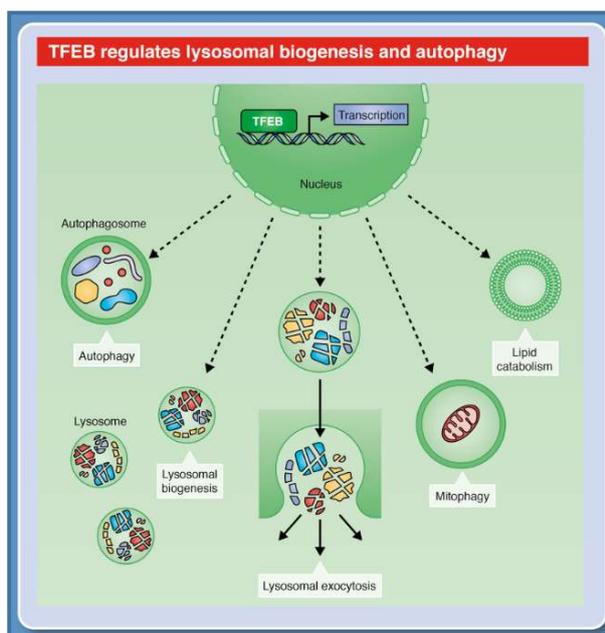
筆者がこれまでのオートファジー研究で明らかにしてきた内容は, 老化では単純にオートファジー活性は低下するのではなく, そのしなやかさを失うことである. その原因として, 加齢に伴いリソソームの数・形態・機能が低下するとの仮説を, 高齢マウスを用いて検討することとした.

### 2-2 腎老化に対抗する代謝維持機構の解明

筆者らは, 共同研究者の吉森保教授・Andrea Ballabio 教授らと世界に先駆けて腎尿細管特異的 TFEB 不全マウスを作製し, これまでに, 結晶性腎障害や高脂肪食肥満・脂肪毒性における TFEB の重要性を報告してきた<sup>11, 12</sup>. 本研究では, 同マウスを 2 年齢まで長期飼育し腎臓の老化における TFEB の役割を詳細に検証することとした.

### 2-3 シングルセル解析を用いた, 代謝異常が老化を加速させる機序の解明

加齢によるリソソーム形態・機能異常は明らかであり, リソソームを制御する転写因子 TFEB の関与は間違いない. TFEB は①オートファジー誘導, ②リソソーム生合成, ③脂質代謝, ④ミトコンドリア品質管理, ⑤リソソーム放出などの広範な細胞代謝機構に寄与しており<sup>9</sup>, TFEB 機能破綻が腎老化病態に関与している可能性が高い.



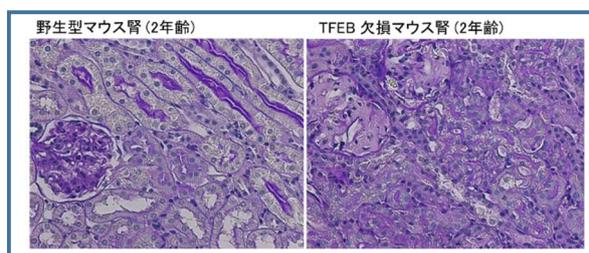
しかしながら, 腎老化に特徴的な役割を見出

すのは容易ではない. 急速なシングルセル RNA-seq 技術の進歩のおかげで, 個々の細胞の個性を維持したまま細胞の性質を解析すること, さらに転写制御機構を推定することや少数細胞の発現変動抽出などが可能となった. 若年・高齢の野生型あるいは TFEB 欠損マウスの腎シングルセル RNA-seq を施行し, 腎構成細胞別にトランスクリプトーム変化を解析することで, 「どの腎構成細胞においてどのような変化が起きているか」を検討することとした.

## 3. 研究の成果

2 年齢まで長期飼育した野生型高齢マウスは若齢マウスと比較して尿細管の TFEB の核内移行が減少しており, 老化により尿細管の TFEB 活性は低下することがわかった.

老化腎の表現型に尿細管の TFEB が影響する可能性が示唆されたため, 2 年齢の高齢腎尿細管特異的 TFEB 不全マウスを評価した. 高齢腎尿細管特異的 TFEB 不全マウスでは, 腎組織障害, 特に尿細管障害の悪化・尿細管空胞病変の増加, 管腔構造の破壊, 炎症所見の増悪が見られ, 複数の個体では, 糸球体に著明な異常蓄積物沈着を認めた (図).



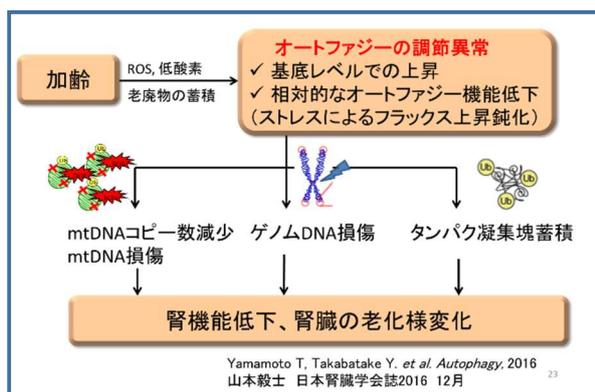
なお, 野生型高齢マウスでも一部糸球体に沈着を認めており, 老化により低下した尿細管 TFEB 活性が影響している可能性が考えられた. この糸球体異常蓄積物は Congo red 染色によりアミロイドであることが判明した. 以上より尿細管の TFEB が糸球体の表現型に寄与していることが示唆され, 尿細管糸球体クロストークが老化において重要な役割を果たす可能性が考えられた.

そのため, 若齢・高齢の野生型あるいは尿細管特異的 TFEB 不全マウスの腎シングルセル RNA-seq を行った. 今後さらに, 代謝異常・障害尿細管の分化経路および制御シグナル同定, TFEB 欠損により異常を生じる尿細管・糸球体の細胞の発現変動遺伝子抽出を行う. さらにシングルセル, シグナル分子・転写因子のリン酸化等を統合解析することにより多階層代謝制御ネットワークを再構築し, 腎老化に寄与する候補遺伝子を抽出する予定である.

#### 4. 今後の課題

腎は加齢に伴い機能が著しく低下する臓器の一つであり、同時に CKD・腎不全は個体の老化を促進させることから腎臓の老化を制御することは極めて重要である。オートファジーは細胞質成分をオートファゴソームで取り囲みリソソームと融合し分解する機構で、細胞内タンパクやオルガネラの品質管理を担うことから、オートファジーの抗老化作用が注目されている。実際、高齢の近位尿細管特異的オートファジー不全 (*atg5* 欠損) マウスでは腎機能低下・腎萎縮を認め、ミトコンドリア DNA コピー数減少、ミトコンドリア機能低下、ゲノム不安定性、タンパク凝集塊蓄積、酸化ストレス亢進といった老化様所見が認められることから、オートファジーが腎老化に対抗することが明らかとなっている。<sup>1)</sup> また、加齢に伴いオートファジーは低下してしまうことが知られていたが、近年、腎尿細管特有のオートファジー停滞状態が明らかになりつつある。<sup>6, 13)</sup>

筆者は以前、腎老化におけるオートファジーの役割を明らかにすべく遺伝子改変マウスを用い検討した。マウス腎オートファジーフラックスアッセイを確立し、「腎オートファジーは加齢ストレスに抗すべく持続的に活性化され、経年的にオートファジー依存性が増す。しかし新たなストレスに対し適切な応答ができず、オートファジー低下となりミトコンドリア機能低下等を介して腎老化につながる」ことを明らかにした (図) <sup>1, 9)</sup>。



一方、その調節不全の代償機構を解明することは、加齢に伴う CKD 進展を防ぐための鍵となりうる。その候補の一つに線維芽細胞増殖因子 (FGF) 21 がある。FGF21 は多臓器間代謝クロストーク調節を介して生活習慣病改善に寄与する。ストレスホルモンとしても機能することが知られており、血中 FGF21 濃度は腎機能低下や加齢とともに上昇する。筆者ら

は以前、代謝ストレス下で FGF21 が近位尿細管から分泌されることを報告したがその役割は不明であった。<sup>14)</sup> 筆者らは最近、高齢近位尿細管特異的 *fgf21+atg5* 欠損マウスを用い、FGF21-オートファジーの相互作用および FGF21 の役割を検討した。オートファジー不全により誘導される近位尿細管由来 FGF21 は、オートファジー停滞を緩和しミトコンドリア恒常性を維持することで腎保護に働くことを報告した。<sup>15)</sup>

本研究では、これらの腎老化に関する最新の知見からさらに発展させ、転写因子 TFEB に着目している。まず老化により尿細管の TFEB 活性は低下することを見出した。さらに、高齢腎尿細管特異的 TFEB 不全マウスでは、腎組織障害、特に尿細管障害の悪化・尿細管空胞病変の増加、管腔構造の破壊、炎症所見の増悪が見られ、複数の個体では、糸球体に著明な異常蓄積物沈着を認めた。今後、シングルセル解析や脂質プロファイルを解析することにより、腎老化における TFEB 制御機構の解明を深めていく予定である。

本研究の意義は、TFEB-オートファジー-代謝と老化病態との関連を解明し、加齢腎の健康を維持する予防策・治療まで視野に入れた研究であり、社会へのインパクトは極めて大きい。今後、TFEB の新たな生理機能の発見のみならず、急務である高齢者 CKD への対策に新たな視点と可能性を提供すべくさらに検討を進めていきたい。

本研究では、腎臓の老化において、TFEB の活性低下が生じることを見出し、老化腎における TFEB の役割について現在も鋭意検討を進めているところである。TFEB の腎保護作用は、本研究で紹介したオートファジーリソソーム系の制御・ミトコンドリア機能維持・脂質代謝を介した役割のほかにも、リソソーム内リン脂質の放出 (リソソームアルエクソサイトシス) など様々な作用を介することが近年明らかになっており <sup>5, 12)</sup>、これらの作用が多面的・相乗的に働くことにより腎保護・抗老化作用につながっていると考えられる。今後、TFEB とオートファジーの協調的な腎保護・抗老化作用に関する基礎的な検討により、CKD 対策や抗老化研究がより一層発展することを期待したい。

#### 5. 研究成果の公表方法

第 67 回日本腎臓学会学術総会 (2024 年 6 月横浜)、第 24 回日本抗加齢医学会総会 (2024 年 6 月熊本) 等で報告予定である。また、2024 年度に国際学術誌への投稿を予定している。

## 6. 引用文献

1. 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., and Rakugi, H.:Time-dependent dysregulation of autophagy: Implications in aging and mitochondrial homeostasis in the kidney proximal tubule. *Autophagy* 12, 801 (2016)
2. Yamamoto, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., Kimura, T., Namba, T., Matsuda, J., Minami, S., Kaimori, J. Y., Matsui, I., Matsusaka, T., Niimura, F., Yanagita, M., and Isaka, Y.:High-Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to Lipotoxicity in the Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 28, 1534 (2017)
3. Yamamoto, T., Takabatake, Y., Minami, S., Sakai, S., Fujimura, R., Takahashi, A., Namba-Hamano, T., Matsuda, J., Kimura, T., Matsui, I., Kaimori, J. Y., Takeda, H., Takahashi, M., Izumi, Y., Bamba, T., Matsusaka, T., Niimura, F., Yanagita, M., and Isaka, Y.:Eicosapentaenoic acid attenuates renal lipotoxicity by restoring autophagic flux. *Autophagy* 17, 1700 (2021)
4. Takabatake, Y., Yamamoto, T., and Isaka, Y.:Stagnation of autophagy: A novel mechanism of renal lipotoxicity. *Autophagy* 13, 775 (2017)
5. Yamamoto, T., Nakamura, J., Takabatake, Y., and Isaka, Y.:Obesity-related proximal tubulopathy: an emerging threat to kidney health. *Autophagy Reports* 2(2023)
6. Minami, S., Yamamoto, T., Yamamoto-Imoto, H., Isaka, Y., and Hamasaki, M.:Autophagy and kidney aging. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 179, 10 (2023)
7. Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D. L., Valenza, M., Gennarino, V. A., Di Malta, C., Donaudo, F., Embrione, V., Polishchuk, R. S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E., and Ballabio, A.:A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325, 473 (2009)
8. Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V. A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S. U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., Rubinsztein, D. C., and Ballabio, A.:TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* 332, 1429 (2011)
9. Napolitano, G., and Ballabio, A.:TFEB at a glance. *J. Cell Sci.* 129, 2475 (2016)
10. Settembre, C., De Cegli, R., Mansueto, G., Saha, P. K., Vetrini, F., Visvikis, O., Huynh, T., Carissimo, A., Palmer, D., Klisch, T. J., Wollenberg, A. C., Di Bernardo, D., Chan, L., Irazoqui, J. E., and Ballabio, A.:TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nature cell biology* 15, 647 (2013)
11. Nakamura, S., Shigeyama, S., Minami, S., Shima, T., Akayama, S., Matsuda, T., Esposito, A., Napolitano, G., Kuma, A., Namba-Hamano, T., Nakamura, J., Yamamoto, K., Sasai, M., Tokumura, A., Miyamoto, M., Oe, Y., Fujita, T., Terawaki, S., Takahashi, A., Hamasaki, M., Yamamoto, M., Okada, Y., Komatsu, M., Nagai, T., Takabatake, Y., Xu, H., Isaka, Y., Ballabio, A., and Yoshimori, T.:LC3 lipidation is essential for TFEB activation during the lysosomal damage response to kidney injury. *Nature cell biology* 22, 1252 (2020)
12. Nakamura, J., Yamamoto, T., Takabatake, Y., Namba-Hamano, T., Minami, S., Takahashi, A., Matsuda, J., Sakai, S., Yonishi, H., Maeda, S., Matsui, S., Matsui, I., Hamano, T., Takahashi, M., Goto, M., Izumi, Y., Bamba, T., Sasai, M., Yamamoto, M., Matsusaka, T., Niimura, F., Yanagita, M., Nakamura, S., Yoshimori, T., Ballabio, A., and Isaka, Y.:TFEB-mediated lysosomal exocytosis alleviates high-fat diet-induced lipotoxicity in the kidney. *JCI insight* 8(2023)
13. Yamamoto-Imoto, H., Minami, S., Shioda, T., Yamashita, Y., Sakai, S., Maeda, S., Yamamoto, T., Oki, S., Takashima, M., Yamamuro, T., Yanagawa, K., Edahiro, R., Iwatani, M., So, M., Tokumura, A., Abe, T., Imamura, R., Nonomura, N., Okada, Y., Ayer, D. E., Ogawa, H., Hara, E., Takabatake, Y., Isaka, Y., Nakamura, S., and Yoshimori, T.:Age-associated decline of MondoA drives cellular senescence through impaired autophagy and mitochondrial homeostasis. *Cell reports* 38, 110444 (2022)
14. Minami, S., Yamamoto, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., Namba, T., Matsuda, J., Kimura, T., Kaimori, J. Y., Matsui, I., Hamano, T., Takeda, H., Takahashi, M., Izumi, Y., Bamba, T., Matsusaka, T., Niimura, F., and Isaka, Y.:Lipophagy maintains energy homeostasis in the kidney proximal tubule during prolonged starvation. *Autophagy* 13, 1629 (2017)
15. Minami, S., Sakai, S., Yamamoto, T., Takabatake, Y., Namba-Hamano, T., Takahashi, A., Matsuda, J., Yonishi, H., Nakamura, J., Maeda, S., Matsui, S., Matsui, I., and Isaka, Y.:FGF21 and autophagy coordinately counteract kidney disease progression during aging and obesity. *Autophagy*, 1 (2023)

# Cooperative metabolic regulation of TFEB and autophagy against kidney aging

**Primary Researcher:** Takeshi Yamamoto  
Specially Appointed Assistant Professor (Full time), Department of Nephrology, Osaka University Graduate School of Medicine

**Co-researchers:** Yoshitaka Isaka  
Professor, Department of Nephrology, Osaka University Graduate School of Medicine  
Jun Nakamura  
Clinical Fellow, Department of Nephrology, Osaka University Graduate School of Medicine

With aging, various organ dysfunctions occur. The kidneys are no exception, as renal function declines with aging in almost all humans. With the increase and prolongation of aging and lifestyle-related diseases, the number of patients with chronic kidney disease and those requiring dialysis is increasing every year, becoming a medical and societal concern. In recent years, aging has been revealed to be a biologically regulated process with an orderly control mechanism. The authors have conducted research on autophagy in the kidneys in aging and lifestyle-related diseases. It has been elucidated that autophagy stagnation due to lysosomal dysfunction is a common pathophysiology in aging and obesity. Under such stresses, inadequate activation of autophagy leads to vulnerability to injury. On the other hand, the transcription factor TFEB, which controls lysosome biosynthesis and metabolism, has gained significant attention recently. However, the activity and role of TFEB in kidney aging have not been investigated. In this study, we hypothesize that TFEB and autophagy cooperatively regulate cellular metabolism and delay kidney aging. The objectives include exploring: 1) changes in TFEB activity associated with aging, 2) the physiological significance and anti-aging effects of TFEB, and 3) elucidating the mechanisms by which metabolic abnormalities accelerate kidney aging using single-cell analysis.