

転写因子 TFEB を標的とした血管石灰化治療の検討

石渡 遼

防衛医科大学校・生理学講座

【研究の背景】

慢性腎不全には国内で 1000 万人以上が罹患していると推計されている。末期の慢性腎不全患者では、高リン酸血症の発症に伴い血管石灰化が進行する。血管石灰化は血管コンプライアンスを低下させ、慢性腎不全患者における心血管関連死の素因となることが示唆されている¹⁾。これまで、複数のリン吸収阻害剤が開発されてきたが、血管石灰化治療への有効性についてコンセンサスは得られていない。

無機リン酸は、それ自身が石灰化基質の材料となるのみならず、血管平滑筋細胞の形質転換を誘導することで、石灰化の形成を促進することが知られている。この過程ではオートファジー-ライソゾーム系の機能不全が進行することが報告されている²⁾が、不全に機序は不明である。Transcription Factor EB (TFEB) は、ライソゾーム関連遺伝子群の発現を誘導するマスター因子として知られている³⁾が、血管石灰化における TFEB の関与は知られていない。

【目 的】

血管石灰化の進行にTFEBが関与するか、また TFEB が血管石灰化の治療標的たりうるか、明らかにする。

【方 法】

野生型マウス(8 週齢、オス)の大動脈組織の器官培養系、ラットおよびヒト大動脈平滑筋の初代培養系において無機リン酸が TFEB の発現に与える影響を検討した。カルシウム沈着量は OCPC アッセイにより定量した。RNA-seq により、血管平滑筋において TFEB により発現促進される可能性の高い遺伝子群を同定した。アデニン含有食(0.75%)の摂取により、ラット慢性腎不全モデルを作成し、大動脈組織中の TFEB の発現変動を Western Blot により定量した。

【結 果】

マウスの大動脈組織の器官培養系、ラット大動脈平滑筋細胞およびヒト大動脈平滑筋細胞の培養系において無機リン酸は石灰化を促進した。いずれのモデルにおいても、TFEB のタンパク質発現は減少しており、その減少は無機リン酸の濃度依存的であった。マウス大動脈組織では血管石灰化の発症部位における中膜の TFEB の減少が免疫染色により示された。

ラット大動脈平滑筋細胞において、siRNA による *Tfeb* 遺伝子のノックダウンにより無機リン酸依存性の石灰化は増悪した。また、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析により、*Tfeb* ノックダウンにより発現変動する遺伝子群が同定され、この遺伝子群の中には、特に細胞分裂関連遺伝子が多く含まれていた。ラット慢性腎不全モデルにおいて、TFEB のタンパク質発現は、血管石灰化の発症初期で減少し、アデニン食中止後の石灰化からの回復期において正常レベルに戻る傾向が見られた。

無機リン酸によって TFEB が減少した平滑筋細胞では、*Tfeb* の mRNA 発現はむしろ増加していたことから、TFEB の減少はタンパク質レベルの現象であることが示唆された。無機リン酸による TFEB の減少は、プロテアソーム阻害剤である MG-132 の添加によってキャンセルされたことから、ユビキチン-プロテアソーム系による分解によって TFEB が減少することが示唆された。ラット慢性腎不全モデルでは、大動脈組織において TFEB のユビキチン化が亢進していることが示された。

アデノ随伴ウイルス(AAV)による *Tfeb* の過大発現を行ったところ、血管平滑筋細胞では mRNA 発現の有意な増加に対して TFEB タンパク質の増加は認められなかった。AAV 感染後に MG-132 を添加した場合は TFEB タンパク質の過大発現が認められたことから、血管平滑筋細胞では、TFEB 量の過剰を防ぐようにユビキチン-プロテアソーム系が機能していることが示唆された。

TFEB のユビキチン化認識部位を同定すれば、TFEB 分解抑制による血管石灰化の治療戦略の立脚につながる。ユビキチン認識配列を網羅的に同定した Akimov らの報告⁴⁾より、TFEB の 150 番目のリジン(K150)がユビキチン認識部位であると推定されたが、K150 をアルギニンに変換した変異体の過大発現によっても、TFEB タンパク質の増加は見られなかった。筆者は、K150 を含む17か所の各リジン残基をそれぞれアルギニンに変換した変異体を作成し、血管平滑筋細胞に発現させる実験を行った。その結果、TFEB のユビキチン化部位は複数あり、かつ helix-loop-helix ドメインの近傍に存在する可能性が高いことが判明した。

【考 察】

高濃度の無機リン酸の負荷下では、血管平滑筋細胞における TFEB のタンパク質発現が減少することが明らかになった。このとき、*Tfeb* の mRNA 発現はむしろ増加しており、タンパク質レベルでの調節機構が働いていることが示唆された。ユビキチン-プロテアソーム経路は、ライソゾーム-オートファジー経路と並んで主要なタンパク質除去機構である。高リン酸環境下(TFEB 減少時)では後者の機能は低下していることが推察され、前者の関与を検討したところ、TFEB はユビキチン-プロテアソーム経路により分解されていることが明らかとなった。ラット慢性腎不全モデルにおいては、TFEB を含めてユビキチン化タンパク質の総量が増加しており、石灰化の発症プロセスにおいてライソゾーム-オートファジー経路の機能不全に対する代償機構としてのユビキチン-プロテアソーム経路の活性化が生じる可能性がある。

タンパク質のユビキチン化は、ユビキチンリガーゼによる酵素反応により触媒される反応である。本研究では、TFEB の天然変性領域ではなく、転写因子としての主要構造近傍にユビキチン認識部位が存在する可能性が高いことが示唆された。これには酵素-基質特異性を生じさせるメリットがあるかもしれない。

Tfeb をノックダウンした細胞のトランスクリプトーム解析から、血管平滑筋では、TFEB がライソゾーム関連遺伝子に加えて細胞分裂関連の遺伝子の発現を促進する可能性が示唆された。実際 *Tfeb* ノックダウンによりアポトーシスが亢進していたことから、TFEB はアポトーシスを抑制することで血管石灰化を防ぐ機能もあることが推察された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

TFEB の機能不全は、アルツハイマー型認知症等の神経変性疾患においても知られており⁵⁾、AAV による TFEB 過大発現がこれらの症状を緩和させる可能性が報告されている⁶⁾。本研究では、AAV による TFEB 過大発現によって血管石灰化を予防・治療できるのではないかと期待して実験を行ったが、血管平滑筋細胞における TFEB タンパク質の増加はみられず、リン酸依存性の石灰化に対する抑制効果もわずかで有意ではなかった。しかしながら、今回の検討結果から、血管平滑筋細胞にはユビキチン-プロテアソーム系により TFEB 量が過剰になることを防ぐ調節機構が存在することが示唆された。よって、血管平滑筋を標的とする場合は、単純な過大発現ではなく TFEB の分解抑制を狙ったアプローチが奏功する可能性が高いことが明らかになった。筆者はすでに、TFEB のユビキチン認識部位である可能性の高いドメインを同定している。このドメインをデコイペプチドとして発現させることにより、TFEB の過剰な分解を抑制し、血管石灰化の予防・治療する効果が表れる可能性がある。今後はこの可能性を明らかにするためにさらに検討を進めていく。

【参考・引用文献】

1. X.R. Wang, J.J. Zhang, X.X. Xu, Y.G. Wu, Prevalence of coronary artery calcification and its association with mortality, cardiovascular events in patients with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis, *Ren. Fail.* 41 (2019) 244-256.
2. C.H.G. Neutel, J.O. Hendrickx, W. Martinet, G.R.Y. De Meyer, P.J. Guns, The protective effects of the autophagic

- and lysosomal machinery in vascular and valvular calcification: a systematic review, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020).
3. M. Sardiello, M. Palmieri, A. di Ronza, D.L. Medina, M. Valenza, V.A. Gennarino, C.Di Malta, F. Donaudy, V. Embrione, R.S. Polishchuk, S. Banfi, G. Parenti, E. Cattaneo, A. Ballabio, A gene network regulating lysosomal biogenesis and function, *Science (New York, N.Y.)* 325 (2009) 473-477.
 4. Vyacheslav Akimov, Inigo Barrio-Hernandez, Sten V. F. Hansen, Philip Hallenborg, Anna-Kathrine Pedersen, Dorte B. Bekker-Jensen, Michele Puglia, Stine D. K. Christensen, Jens T. Vanselow, Mogens M. Nielsen, Irina Kratchmarova, Christian D. Kelstrup, Jesper V. Olsen & Blagoy Blagoev, *Nature Structural & Molecular Biology* 25 (2018) 631-640
 5. Fumiko Yamamoto, Kaori Taniguchi, Naomi Mamada, Akira Tamaoka, Fuyuki Kametani, Madepalli K.Lakshmana, Wataru Arakia, TFEB-mediated Enhancement of the Autophagy-lysosomal Pathway Dually Modulates the Process of Amyloid β -Protein Generation in Neurons, *Neuroscience*, 402 (2019) 11-22.
 6. Vinicia A Polito, Hongmei Li, Heidi Martini-Stoica, Baiping Wang, Li Yang, Yin Xu, Daniel B Swartzlander, Michela Palmieri, Alberto di Ronza, Virginia M-Y Lee, Marco Sardiello, Andrea Ballabio, Hui Zheng. Selective clearance of aberrant tau proteins and rescue of neurotoxicity by transcription factor EB, *EMBO Mol Med*, 6 (2014) 1142-1160.