

## COMMD5/HCaRGによる腎尿細管保護メカニズムに関する検討

松田裕之<sup>1)</sup>, 舩廣善和<sup>2)</sup>

## Renal protective effects of COMMD5/HCaRG against acute kidney injury

Hiroyuki MATSUDA<sup>1)</sup>, Yoshikazu MASUHIRO<sup>2)</sup>

## 要旨

COMMD5/HCaRGは、腎尿細管において虚血再還流障害により脱分化した上皮細胞の再分化を促進し、尿細管の修復を促す分子である。今回、新たにCOMMD5の腎尿細管保護メカニズムを明らかにするために、近位尿細管特異的COMMD5高発現マウス (COMMD5-Tg) を用いて薬剤性急性腎障害モデルを作製し、実験を行った。COMMD5-Tgマウスでは、シスプラチン投与後の腎機能障害や尿細管組織障害、アポトーシスが、野生型マウスに比べ有意に軽減されており、E-cadherinの発現も保たれていた。さらに、COMMD5は近位尿細管だけでなく、間質や遠位尿細管の障害も軽減していた。以上より、近位尿細管におけるCOMMD5は、障害後の尿細管修復を促進するだけでなく、E-cadherinの発現制御を介して、近位尿細管上皮細胞の細胞間構造を強固にし、尿細管上皮バリアを維持することで、腎臓が障害を受けた際に、尿のうっ滞や炎症細胞の浸潤を防ぎ、間質や遠位尿細管を保護することで、尿細管の恒常性を保ち、腎障害の発症や進展を抑制していると考えられた。

## 1. 緒言

本研究は、2018年度日本大学学術研究助成金 [総合研究] (No. 総18-013) を受け、2年間に渡りCOMMD5/HCaRGを中心に腎臓病の病態生理の解明と新規治療法の開発を目的に行われた。

我が国の血液透析患者数は、2017年に33万人を超えて増加の一途をたどっており、年間1兆6000億円に上ると推計されている医療費も社会的問題となっている。従来、急性腎障害 (AKI) は回復可能な治る病気と考えられていた。しかし、AKIは多臓器不全を伴うことが多く、その死亡率の高さや、糖尿病などの基礎疾患を持つ患者がAKIを起こすと、長期予後が著しく悪化することなどが広く認識されるようになり、AKIが慢性腎臓病 (CKD) に移行するメカニズムについて注目されるようになった。

COMMD5/HCaRGは、Montreal大学のTremblay教授らにより2000年に初めて報告された新規遺伝子で、高血圧自然発症モデル動物で高発現しており、細胞外カルシウム濃度により発現が誘導されることから、Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG) と名付けられた<sup>1)</sup>。後に、C末端側の領域にcopper metabolism gene MURR1 (COMM) domainをもつというよく似たドメイン構造から、COMMDファミリータンパク質に分類された。COMMD5は、腎臓の尿細管に強く発現しており、細胞の増殖・分化・移動などに関与している。近位尿細管特異的COMMD5高発現遺伝子改変 (COMMD5-Tg) マウスを用いて作製した腎虚血再還流モデルの実験では、COMMD5はp21の発現を誘導し、障害を受け脱分化した尿細管上皮細胞の再分化を促し、尿細管

1) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

松田裕之: matsuda.hiroyuki75@nihon-u.ac.jp

の修復を促進し、腎機能及び生存率を改善した<sup>2)</sup>。このCOMMD5の間葉上皮移行を促す作用に着目し、癌細胞株と正常細胞株でCOMMD5の発現を比べたところ、癌細胞株でCOMMD5の発現が低下していることが分かった。次に、腎細胞癌患者の病理標本を用いてCOMMD5の発現を解析したところ、腎細胞癌だけでなく、腫瘍径が大きく予後不良であった患者の正常尿細管においてもCOMMD5の発現が低下していた(図1)<sup>3), 4)</sup>。そして、正常尿細管のCOMMD5発現が高いグループほど、5年生存率が良いことも明らかになった。COMMD5を腎癌細

胞に高発現させると、癌細胞の分化が促され、細胞周期が抑制され、細胞死が誘導された。このCOMMD5高発現癌細胞をマウスの皮下に移植したところ、腫瘍増大や腫瘍血管新生が抑制された。メカニズム的には、正常尿細管上皮細胞から分泌されたCOMMD5が、腎癌細胞の上皮成長因子受容体の発現を抑制し、腫瘍細胞の生存・増殖の主要伝達経路であるMAPKやPI3K/AKTシグナルの活性化を抑制することが明らかになった。

これらの知見から、糖尿病や高血圧症などの生活習慣病患者の腎臓は、慢性的なストレスに曝されて

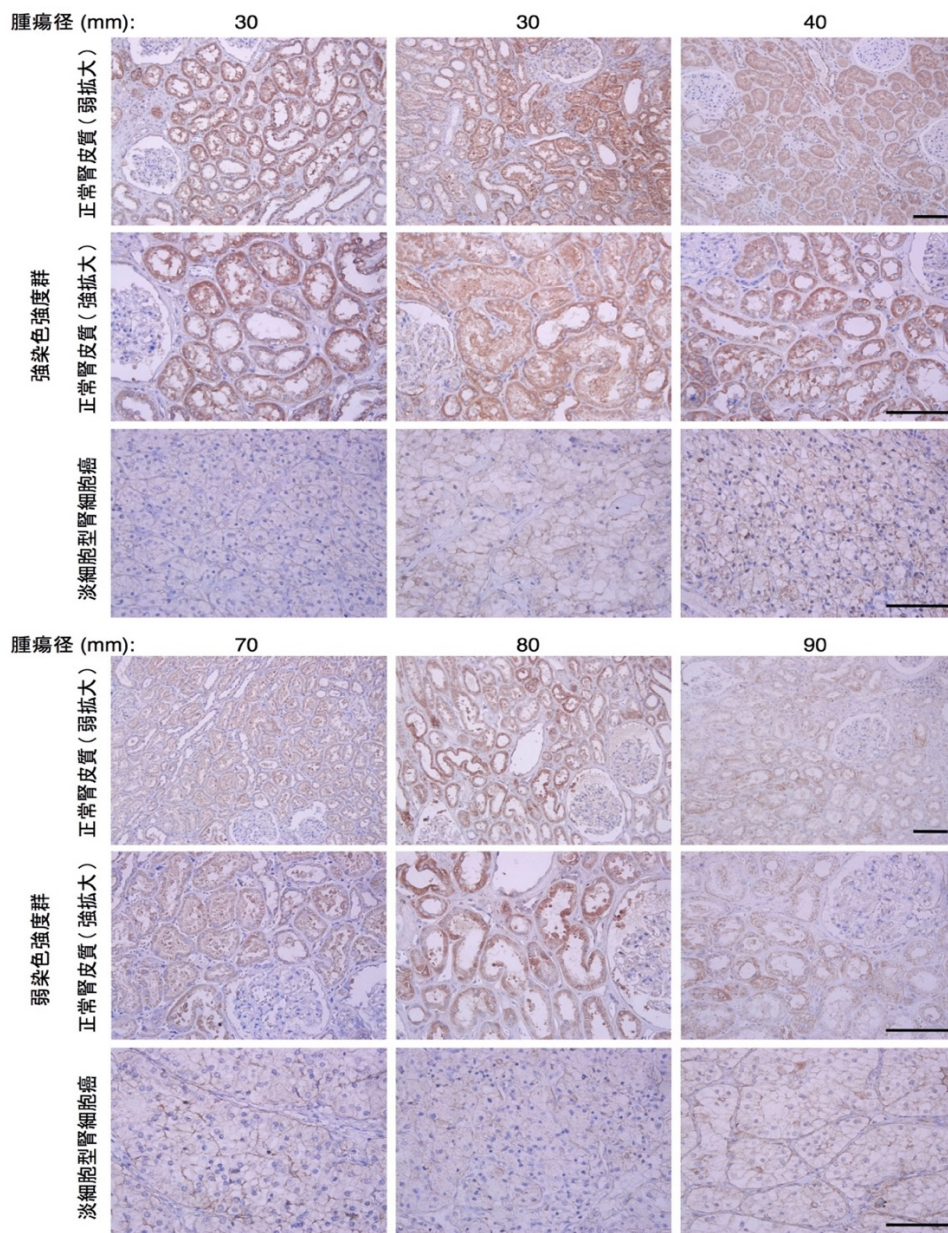


図1 淡明細胞型腎細胞癌患者の腎細胞癌と正常腎皮質におけるCOMMD5の免疫組織染色像。Scale bar = 0.1 mm。(文献4より引用)

おり、常に尿細管の保護と修復のため COMMD5 の発現が亢進しているのではないかと考えた。そして、AKIによる過度な尿細管障害で尿細管上皮細胞が脱落し、COMMD5の発現が著しく低下した場合に、腎尿細管上皮バリアが失われAKIからCKDに進展し、一部の障害細胞の癌細胞化が起こるのではないかという仮説を立てた。

## 2. 概要

これまでに明らかにしてきたCOMMD5のもつ障害後の尿細管修復作用に加え、COMMD5をターゲットとした腎臓病の新たな予防法や治療法を開発する目的で、COMMD5による腎保護メカニズムを明らかにしようと試みた。そこで、COMMD5による尿細管上皮細胞の間葉上皮移行の促進メカニズムと、腎尿細管上皮バリアの制御メカニズムの解明を目的とし、以下の実験を計画した。

### 2-1 COMMD5がE-cadherinの発現を亢進し、尿細管上皮細胞を保護する

虚血や薬剤暴露に曝された尿細管では、ミトコンドリア機能不全が引き起こされ、酸化ストレスが上昇し、尿細管上皮細胞が死に至る。そこで、COMMD5を高発現させた細胞や、ノックダウンした細胞に、抗癌剤であるシスプラチンの投与、または過酸化水素暴露による酸化ストレス刺激を行い、尿細管上皮細胞間の構造変化や、細胞内の恒常性維持機構としてオートファジーに着目し、COMMD5の尿細管上皮細胞保護メカニズムについて検討した。

### 2-2 COMMD5が腎尿細管上皮バリア機構を維持し、腎障害を抑制する

これまでに、COMMD5が尿細管の修復に関わっていることを、*in vivo* 実験を通じて明らかにしてきたが、障害を予防し、軽減する働きがあるのかどうかについては明らかになっていない。そこで、本研究ではCOMMD5-Tgマウスを用いて、薬剤性腎障害モデルであるシスプラチン腎症を作製した。近位尿細管に高発現したCOMMD5は、E-cadherinの発現制御を介して、近位尿細管細胞のアドヘレンス結合を強固にし、管腔側の細胞膜とタイト結合による尿細管上皮バリアを維持することで、尿細管が障害を受けた際に、尿のうっ滞や漏出を防ぎ、間質や遠位尿細管の障害を軽減し、腎障害の発症や進展を抑制しているのではないかと、仮説を立て検討した。

## 3. 方法及び結果

### 3-1 COMMD5はE-cadherinを介し、細胞間構造を維持する

これまでの研究において、COMMD5が上皮系マーカーであるE-cadherinの回復と、間葉系マーカーであるVimentinの低下を伴い、障害により脱分化した尿細管上皮細胞の再分化を促進し、尿細管上皮細胞の修復を促していることを報告している<sup>2)</sup>。本研究では、COMMD5によるE-cadherinの発現制御に着目し、培養ヒト尿細管上皮細胞株(HK-2)に薬剤暴露を行い、COMMD5の細胞保護メカニズムを検討した。コントロールのHK-2細胞では、シスプラチン暴露後2時間後にp21の発現を増強が見られ、同時にE-cadherinの発現ピークが観察された(図2)。p21の転写因子の一つであるFoxOタンパクについても、観察したところ、FoxO1のリン酸化が抑制され、FoxO1のタンパク量がp21の発現と同時に増加していた。siRNAを用いてCOMMD5を抑制したところ、核内FoxO1のリン酸化が亢進し、FoxO1が核外で分解され、p21の発現が低下し、E-cadherinの発現が抑制されていることが分かった。以上の結果から、COMMD5はFoxOを介して、E-cadherinの転写因子であるp21を誘導し、E-cadherinの発現を制御している可能性が考えられた。

これまでに、COMMD5がRab5との相互作用により、上皮成長因子受容体の細胞内輸送に関与していることを報告したが<sup>5)</sup>、COMMD5の相互因子や受容体の存在など、まだ明らかになっていない点が多くある。本研究では、COMMD5の関わる新たな伝達経路を明らかにする目的で、COMMD5の相互因子の探索を行った。ヒトCOMMD5のN末端、またはC末端にFlagタグを結合させた2種類のCOMMD5発現プラスミドを作製し、ヒト胎児腎臓由来のHEK-293細胞に遺伝子導入を行った。この遺伝子導入された細胞のタンパク質を用いて免疫沈降と質量分析を行ったところ、COMMD5の相互因子の候補として新たに23のタンパク質が同定された。これらの候補タンパク質の中には、COMMDファミリーであるCOMMD7やCOMMD9、細胞内輸送に関わるタンパク複合体、遺伝子制御に関わる核内分子などが含まれていた。これらの候補タンパクの中から、今回はE-cadherinのエンドサイトーシスに関わるタンパク複合体であるVPSsタンパク質に

注目し、検討を行った。COMMD5をノックダウンしたHK-2細胞にシスプラチン処理を行ったところ、E-cadherinの発現ピークと同時にVPS29の発現亢進が見られたが、コントロール細胞に比べ、シスプラチン処理前から処理後まで継続したVPS29の発現抑制が認められた(図2)。VPS29には、E-cadherinの細胞内リサイクリングに関与しているとの報告がある。

以上より、COMMD5のE-cadherin発現制御メカニズムとしては、①p21の誘導を介して、E-cadherinのmRNA発現を亢進している可能性と、②VPSタンパク質との相互作用により、E-cadherinのリサイクリングを促進している可能性が考えられた。

次に、タイト結合はE-cadherinが構成するアドヘレンス結合に依存しており、アドヘレンス結合が破壊されると、上皮バリアとして機能するタイト結合も破壊されることが知られている。そこで、HK-2細胞のタイト結合の機能を、Trans epithelial/trans endothelial electrical resistance (TEER)を用いて評価した。シスプラチン処理を行ったコントロールのHK-2細胞シートでは経時的にTEERが低下しており、上皮バリア機能が低下していると推測され

た。COMMD5をノックダウンすると、コントロールの細胞シートに比べ、さらにTEERが短時間で低下していることが分かった。これらの知見から、COMMD5は、E-cadherinの発現を亢進させることでアドヘレンス結合を強固にし、タイト結合を含む尿細管上皮バリア構造を維持することにより、腎障害を予防するのではないかと考えられた。

### 3-2 COMMD5はミトコンドリアの障害を軽減する

オートファジーは、栄養飢餓時にエネルギー産生のために、細胞内のタンパク質を分解し、アミノ酸を供給する目的で強く誘導されることが知られている。また、虚血や薬剤性腎障害において、傷害されたミトコンドリアなどの細胞内小器官や、変性タンパク質を除去する細胞内の恒常性維持機構として、尿細管保護に関与していることも知られている。一方で、オートファジー制御の破綻から生じる過剰なオートファジーは、臓器障害を進行させることも報告されている。今回、マウス尿細管上皮細胞(TCMK-1)にCOMMD5を高発現させ、酸化ストレス下における細胞死や、オートファジーに与える影響について検討した。TCMK-1細胞を0.03%過酸化水素に10分間暴露したところ、コントロール細胞

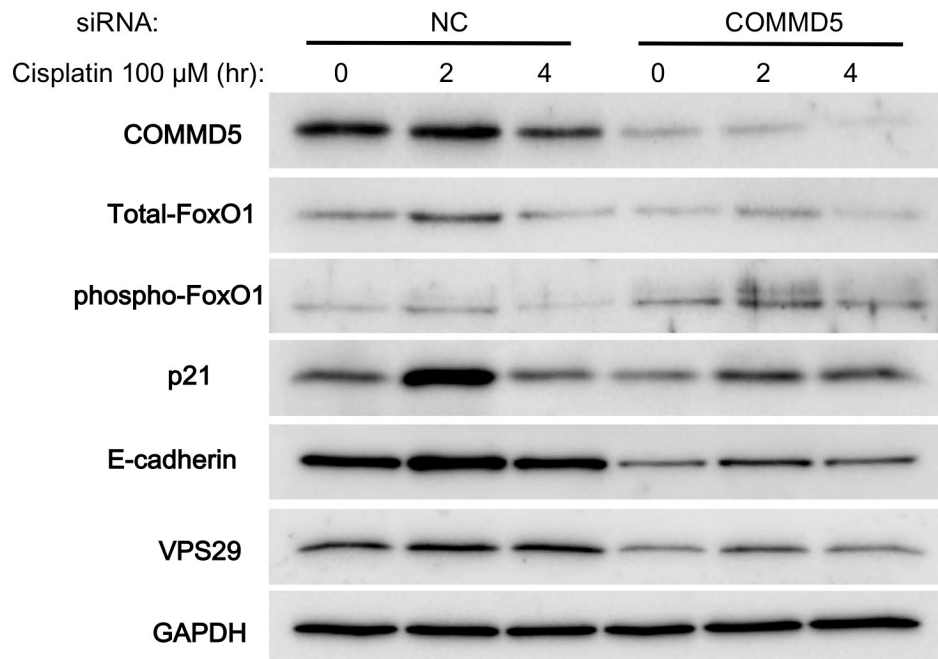


図2 尿細管上皮細胞(HK-2)にシスプラチン処理を行った際のWestern blot像。NC細胞(non-target controlを導入)とCOMMD5細胞(COMMD5標的のsiRNAを導入)を用いて経時的なタンパク発現の変化を比較した。(文献4より引用、改変)

では暴露後12時間後までオートファジーが遅延し、アポトーシスが増加していた (図3A)。0.0003%過酸化水素に10分間暴露した低刺激においては、LC3B-IからLC3B-IIへの移行が3時間後には暴露前の状態に戻っており、0.03%過酸化水素の過度な障害が、JNKの活性化を伴う過剰なオートファジーを引き起こしていると考えられた。COMMD5高発現細胞では、0.03%過酸化水素に10分間暴露した刺激において、コントロール細胞に比べ活性酸素の増加が抑制され、ATP産生能も保たれており、ミトコンドリアの障害は軽度であった。オートファジーの反応は、過酸化水素暴露後3時間以内に終息し、アポ

トーシスは抑制されていた。0.03%過酸化水素に10分間暴露し、12時間後にTCMK-1細胞の細胞内小器官を、電子顕微鏡を用いて観察したところ、コントロール細胞ではミトコンドリアを含んだ2次リソソームとリポフスチン封入体が多く観察され、COMMD5高発現細胞に比べリソソームによる分解経路が停滞していることが分かった (図3B)。以上より、尿管上皮細胞では、過度な刺激によりミトコンドリアが障害され、過剰なオートファジーの遷延が起こり、リソソームによる細胞内消化経路が停滞し、細胞死が誘導されたと考えられた。COMMD5はミトコンドリアの障害を軽減し、オートファ

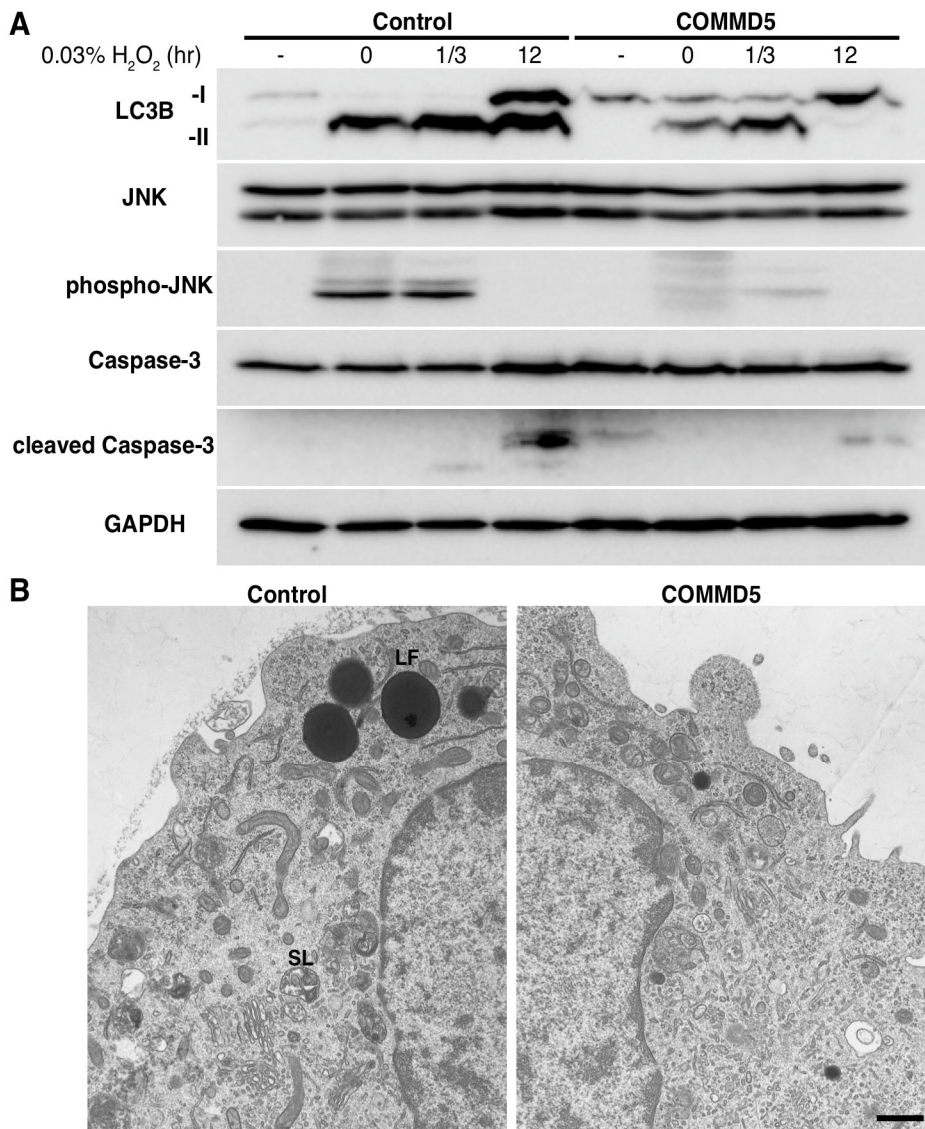


図3 (A) マウス尿管上皮細胞 (TCMK-1) に0.03%過酸化水素処理を行った際のWestern blot像。コントロール細胞 (Control) とCOMMD5高発現細胞 (COMMD5) を用いて経時的なタンパク発現の変化を比較した。(B) 過酸化水素処理12時間後の電子顕微鏡画像。SL:2次リソソーム, LF:リポフスチン。Scale bar = 500 nm。

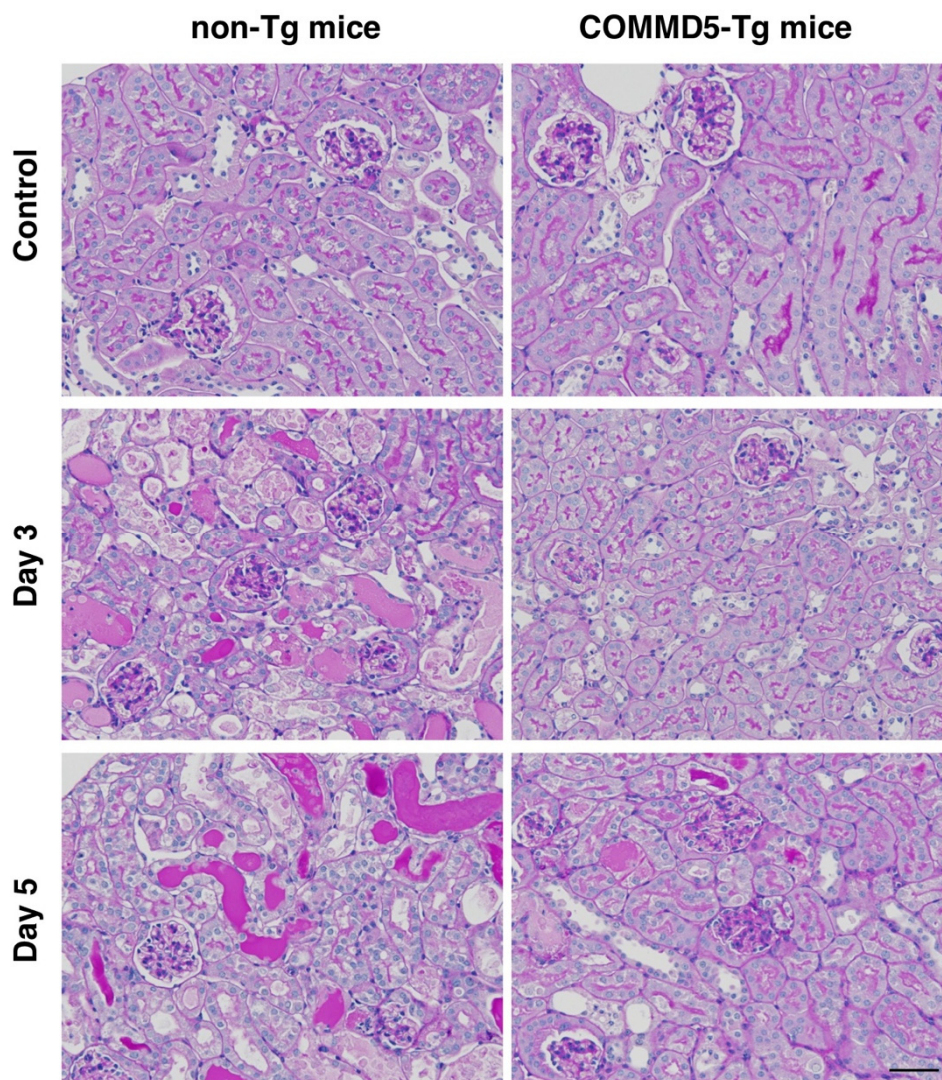


図4 COMMD5高発現遺伝子改変マウスを用いたシスプラチン腎症モデルの腎臓のPAS (Periodic acid-Schiff) 染色像。Scare bar = 0.1 mm。(文献4より引用)

ジーを速やかに終息させ、細胞保護に作用していると推測された。

### 3-3 腎尿細管上皮バリアによる腎保護効果

薬剤性AKIモデルとして、抗がん剤であるシスプラチンをCOMMD5-Tgマウスに腹腔内投与(20 mg/kg)し、腎障害の程度を確認した。シスプラチン投与5日後の血清クレアチニンは、COMMD5-Tgマウスで $0.70 \pm 0.34SD$  mg/dl、野生型(non-Tg)マウスで $2.73 \pm 0.96SD$  mg/dlと有意な低下が見られた。組織学的にもCOMMD5-Tgマウスでは、non-Tgマウスに比べ尿細管障害が軽減されており(図4)<sup>4)</sup>、アポトーシスやミトコンドリア障害も抑制されていた。

各尿細管セグメントのマーカーを用いて、尿細管障害の程度を各セグメント毎に評価したところ、

COMMD5-Tgマウスでは、non-Tgマウスに比べ近位尿細管の障害は軽減されており、遠位尿細管の障害は見られなかった。タンパク質発現を見てみると、non-TgマウスではCOMMD5が低下し、尿細管間質のエリスロポエチン産生細胞から分泌される造血因子であるエリスロポエチンが低下し、遠位尿細管由来の腎保護因子である $\alpha$  Klothoの分解が促進していた(図5)。non-Tgマウスでは、尿細管全体に障害が及んでいたが、COMMD5-Tgマウスでは、近位尿細管に障害が限局されており、COMMD5の発現が軽度低下していたが、エリスロポエチンや $\alpha$  Klothoの発現は保たれていた。また、E-cadherinは、non-Tgマウスではシスプラチン投与により分解されていたが、COMMD5-Tgマウスでは、非投与群に

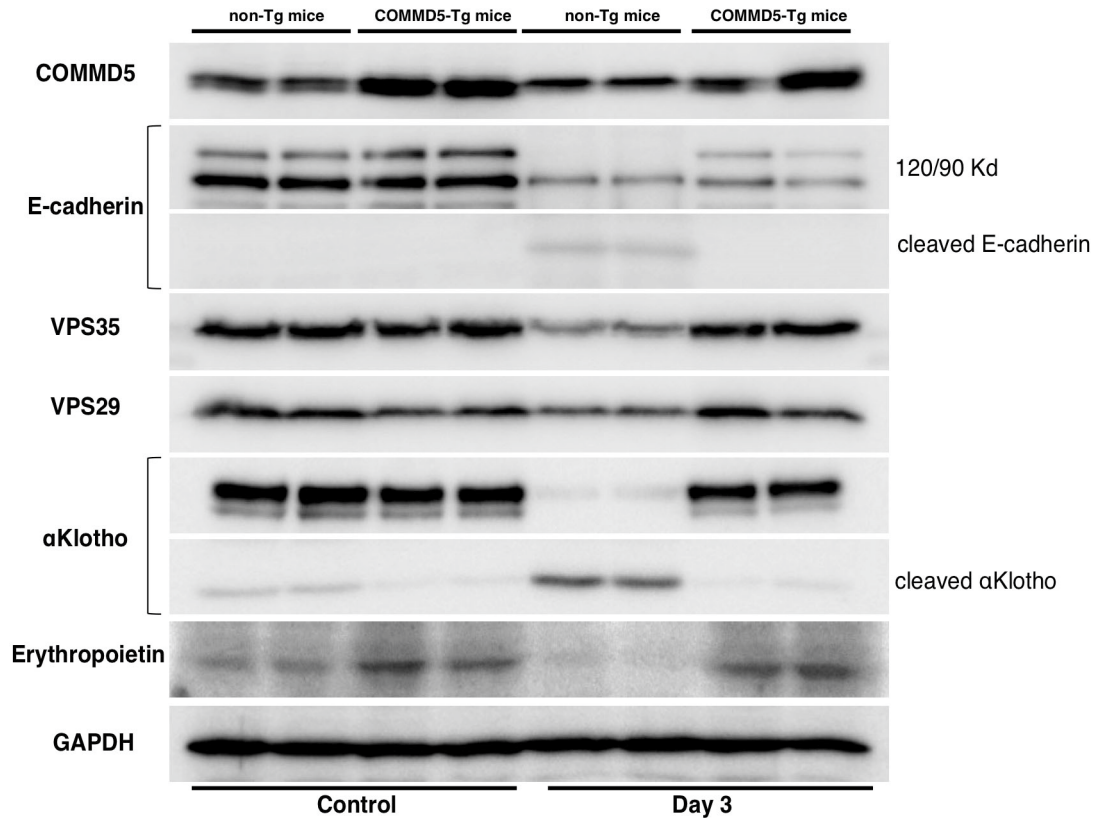


図5 COMMD5-Tgマウスを用いたシスプラチン腎症モデルのWestern blot像。非投与群（Control）と投与3日後（Day 3）において比較した。

比べ発現が低下していたものの、non-Tgマウスに比べ保たれていた。E-cadherinのエンドサイトーシスに関わるVPSsのうち、non-TgマウスではVPS35と29の発現が低下していたが、COMMD5-Tgマウスでは発現が保たれていた。

以上より、近位尿細管におけるCOMMD5は、尿細管が障害を受けた際に、E-cadherinの発現を増強し、腎尿細管上皮バリアを維持することで、間質や遠位尿細管の障害を軽減し、AKIの発症やCKDへの進展を抑制しているのではないかと考えられた。現在、近位尿細管におけるCOMMD5コンディショナルノックアウトマウスの作製を、タモキシフェン誘導性Creを発現するNdr1-CreERT2マウスとCOMMD5 floxedマウスの交配により行っている。今後、近位尿細管のCOMMD5を特異的にノックダウンした際の、腎尿細管上皮バリア及び、遠位尿細管や間質の組織障害について評価する予定である。

#### 4. 考 察

近年、AKI to CKD progressionという考えが提唱され、末期腎不全患者を減らすために、いかにCKDへの進行を食い止めるかということに注目が集まっている。最近、AKIにより障害された近位尿細管の不十分な修復や、脱落に伴う組織内の慢性炎症や低酸素などにより、周辺の繊維芽細胞（エリスロポエチン産生細胞）の形質転換や、間質の線維化といった遠位尿細管を含めた広範囲なネフロン障害を引き起こすことが、AKIがCKDに進展する成因のひとつではないかと報告されている<sup>6)</sup>。しかしながら、AKIからCKDに進展するメカニズムや、腎臓が再生するメカニズムについては未だ不明な点が多い。

今回我々は、近位尿細管におけるCOMMD5がE-cadherinの発現を亢進させ、細胞間接着構造を増強し、尿細管上皮バリアを強固することで、間質や遠位尿細管の障害を軽減している可能性を見出した。また、遠位尿細管が保護されることにより、遠位尿細管由来の腎保護因子が分泌され、近位尿細管と遠位尿細管の相互作用によりAKIの進展が抑制されて

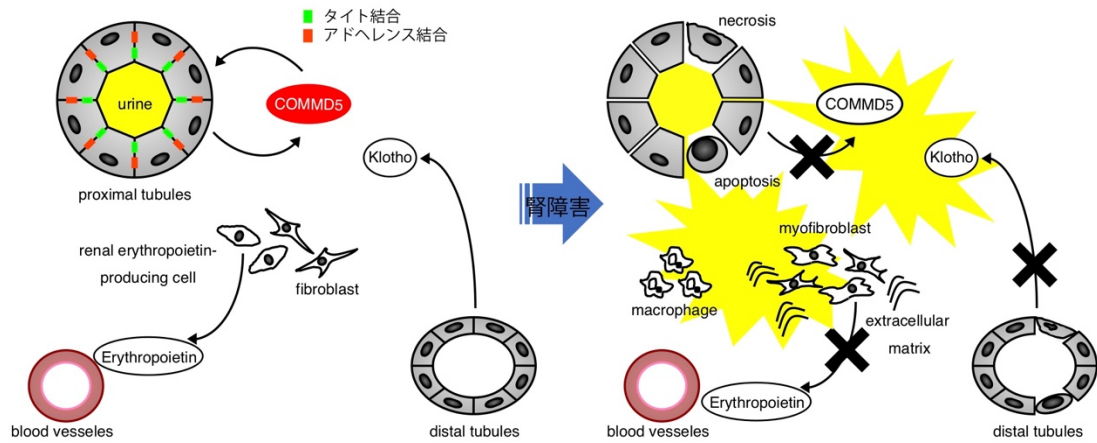


図6 COMMD5による腎保護メカニズム。COMMD5がアドヘレンス結合を強固にし、尿細管上皮バリアを維持することで、腎尿細管の障害を軽減しており、過度な障害によるCOMMD5の低下が、間質の線維芽細胞の形質転換や遠位尿細管の障害を引き起こし、CKDへの移行につながると考えられる。

いる可能性も示唆された(図6)。そして、細胞レベルでは、E-cadherinの発現増強による強固なアドヘレンス結合とタイト結合により、細胞刺激時のミトコンドリア障害が軽減され、過剰なオートファジーが抑制されることで、細胞の生存率が改善していると考えられた。このようなCOMMD5による腎尿細管バリアの維持が、腎障害の進展を予防しているのではないかと考えられ、今後新たな腎臓病の治療ターゲットとして臨床へ応用されることが期待される。

#### 謝辞

本研究の共同研究者は日本大学医学部 内科学系総合診療学分野の池田迅先生、野底茉衣子先生、日本大学医学部 総合医学研究所 医学研究支援部門 地家豊治氏、八戸学院大学健康医療学部 人間健康学科の遠藤守人教授、佐々木研究所附属 杏雲堂病院の相馬正義先生である。また本研究は、日本大学学術研究助成金[総合研究](No. 総18-013)、JSPS KAKENHI Grant Number JP18K08226を受けて行われた。

#### 文献

- 1) Solban, N., *et al.* HCaRG, a novel calcium-regulated gene coding for a nuclear protein, is potentially involved in the regulation of cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 32234-32243.
- 2) Matsuda, H., *et al.* HCaRG accelerates tubular repair after ischemic kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2011; 22: 2077-2089.
- 3) Matsuda, H. *et al.* HCaRG/COMMD5 inhibits ErbB receptor-driven renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017; 8: 69559-69576.
- 4) 松田裕之, 舩廣善和. 新規腎保護因子HCaRG/COMMD5を標的とした腎臓病及び腎癌の治療法の開発. *日本大学医学部総合医学研究所紀要* 2019; 7: 5-12.
- 5) Campion, C. G. *et al.* COMMD5/HCaRG Hooks Endosomes on Cytoskeleton and Coordinates EGFR Trafficking. *Cell Rep.* 2018; 24: 670-684.
- 6) Takaori K. *et al.* Severity and Frequency of Proximal Tubule Injury Determines Renal Prognosis. *J Am Soc Nephrol.* 2016; 27: 2393-2406.