

リソソーム損傷応答に着目した、塩分過剰摂取による慢性腎臓病進展を抑制する新規治療法開発

南 聡

大阪大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学講座遺伝学

概要

本研究は、細胞内の恒常性維持に不可欠なオルガネラであるリソソームが受ける損傷に対し、どのような分子機構で修復が行われているのかを解明し、その知見を「塩分過剰摂取による慢性腎臓病(CKD)進展の抑制」に応用することを目指したものである。特に、腎尿細管細胞は高塩分環境におけるリソソームストレスを受けやすく、修復機構の破綻が細胞障害、線維化、CKDの進展につながると考えられている。しかし、損傷リソソームをいかにして細胞が修復・除去しているかについては、十分に解明されていなかった。

本研究では、リソソーム損傷に応答して働く新たな修復機構「マイクロリソファジー(microlysophagy)」に注目し、その分子基盤を明らかにした。マイクロリソファジーは、損傷を受けたリソソーム自身が自らの膜を内包化し、損傷部位を切除・再構築することで修復を果たすプロセスであり、従来のマクロオートファジーとは異なる非定型的な分解経路である。我々はこのプロセスに、AGC キナーゼ STK38 およびオートファジー関連因子 GABARAP ファミリーが中心的に関与していることを明らかにした。具体的には、STK38 は損傷リソソームにカルシウム依存的にリクルートされ、DOK1 というアダプタータンパク質をリン酸化することで、ESCRT 解離因子 VPS4 の局在を促進することが分かった。また、GABARAP ファミリーは ESCRT-I アダプター ALIX と選択的に結合し、ESCRT 複合体の初期構築を担っていることも判明した。

これらの結果は、STK38 と GABARAPs が段階的に連携しながら損傷リソソーム上で ESCRT 複合体を動員し、マイクロリソファジーを駆動する仕組みを形態学的・機能的に裏付けるものである。

さらに、STK38 または GABARAPs を欠損させた細胞では、EGFP-TRPML1 切断アッセイおよび電子顕微鏡観察によりマイクロリソファジー活性が著しく低下し、ILV 形成が阻害された。加えて、これらの欠損は老化関連マーカー(p21/p16, SA-β-Gal)や炎症性サイトカイン(IL-6, IL-1α)の発現増加を引き起こし、マイクロリソファジーが細胞老化の抑制にも寄与することが明らかとなった。線虫を用いた解析においても、同様の因子の機能喪失により寿命短縮が観察され、機構の進化的保存性も示された。

これらの成果は、腎尿細管細胞が塩分負荷によってリソソーム損傷を受けた際、その修復機構が破綻すると細胞老化や CKD 進展を引き起こす可能性を示すものである。今後、STK38 や GABARAP を標的とした治療介入により、リソソーム修復を促進し、腎疾患の発症・進展を抑制する新たな治療戦略が実現することが期待される。

1. 研究目的

リソソームは、加水分解酵素を豊富に含む細胞内小器官であり、不要な細胞内成分や変性タンパク質、損傷オルガネラなどの分解・再利用を担う、細胞内“リサイクルセンター”として中心的な役割を果たしている。リソソ

ーム機能は、細胞の恒常性維持(homeostasis)に不可欠であり、オートファジーやエンドサイトーシスといった経路を介して、栄養・エネルギー代謝の調整にも深く関与している。また、近年の研究により、リソソームは単なる「分解装置」ではなく、細胞内外の環境変化を感知・統

合する“センシングオルガネラ”としての機能を備えており、mTORC1 や TFEB などのシグナル伝達経路の制御点としても機能することが明らかになってきている¹⁾。

このように、リソソームの健全性は細胞機能の維持にとって極めて重要であり、その破綻は細胞死、炎症、老化、発がん、神経変性疾患などさまざまな病態に直結する。特に、加齢や生活習慣病、薬剤性障害、腎疾患、神経変性疾患などでは、リソソームの慢性的損傷とそれに伴う細胞機能の破綻が深く関与していると考えられている²⁾。実際、腎尿細管においては、塩分過剰摂取によるリソソームの損傷が早期の病態進展に関与することが報告されており、リソソームの修復機構を標的とした新たな治療戦略が求められている。

リソソームは内因性あるいは外因性の多様なストレス因子—例えば塩分、結晶、アミロイド、微生物感染、薬剤、活性酸素、脂質毒性など—により容易に損傷を受ける。膜破綻を起こしたリソソームからは、加水分解酵素などが細胞質に漏出し、細胞死を誘導する。これに対して細胞は、損傷リソソームを認識し除去または修復するという多段階的な損傷応答機構を備えているが、その全容はいまだ不明な点が多い。

これまでの研究により、損傷リソソームの処理には、マクロオートファジー(マクロリソファジー)による選択的除去^{3,4)}、TFEB によるリソソーム新生促進⁵⁾、ESCRT 複合体によるリソソーム膜修復⁶⁾など複数の経路が関与することが明らかとなっている。しかし、損傷リソソーム自身がその膜を内包して損傷領域を除去する「マイクロリソファジー(microlisophagy)」という現象の存在も一部で示唆されており、これは ESCRT とオートファジーの境界領域に位置する新たな細胞ストレス応答機構として注目されている。

本研究では、このマイクロリソファジー機構に着目し、特に次の4点を明らかにすることを目的とした:

1. リソソーム損傷に伴うマイクロリソファジーの分子機構を明らかにすること。
2. STK38 という AGC キナーゼが、損傷リソソームにリクルートされ、ESCRT の解離因子である VPS4 を制御するかどうかを検証すること。

3. ATG8 ファミリーの中でも GABARAP 群が、ESCRT 複合体のリクルートおよびマイクロリソファジーの起点形成に関与するかを明確にすること。

4. この修復機構の破綻が細胞老化や加齢による機能低下に与える影響を、細胞レベルおよび個体レベルで検証すること。

これらの目的を達成することにより、リソソーム損傷修復という細胞ストレス応答の中核的な仕組みを新たな視点から再定義するとともに、塩分過剰摂取による慢性腎臓病進展をはじめとした慢性疾患に対する分子病態の理解を深めることが期待される。さらに、リソソーム修復を標的とする新規創薬戦略の構築に向けた基盤を提供することで、本研究は基礎医学と臨床応用をつなぐ重要な橋渡しとなることを目指すものである。

2. 研究方法

2.1 リソソーム損傷モデルの構築と可視化手法

本研究では、リソソーム損傷応答を高感度かつ再現性良く評価するために、ヒト上皮由来の HeLa 細胞および乳腺由来の MCF10A 細胞を用いた。これらの細胞はトランスフェクション効率が高く、遺伝子改変や蛍光タンパク質の発現系が安定して構築可能であり、オートファジー・リソソーム研究において汎用性の高いモデル系である。

リソソーム損傷の誘導には、膜透過性のジペプチドエステルであり、リソソーム内で加水分解されて界面活性様物質となる L-leucyl-L-leucine methyl ester (LLOMe) を用いた⁷⁾。また、リソソームの pH 勾配を破壊する nigericin や、弱塩基性により酸性環境を中和する NH₄Cl も併用し、損傷の強度と性質を段階的に調整した。

損傷の可視化には、リソソーム膜破綻時に露出した糖鎖に結合する Galectin-3 に GFP を融合させた GFP-Gal3 を用い、損傷リソソームの出現頻度およびサイズを共焦点顕微鏡で定量した。さらに、オルガネラ共局在解析や定量画像解析により、時間経過および薬剤濃度依存的な損傷パターンを解析した。

2.2 ミクロリソファジー活性の評価系の確立

マイクロリソファジーは、リソソーム膜の一部が内包化され、ILV (intraluminal vesicle) を形成することで損傷部分を除去する経路であると考えられている。この過程の定量はこれまで困難であったため、EGFP-TRPML1 融合タンパク質を

発現させた細胞を構築し、膜切断による EGFP の遊離量を指標とするウェスタンブロット法を確立した。

TRPML1 はリソソーム膜貫通型のカルシウムチャンネルであり、ミクロリソファジーにおける膜内包化の過程で切断されることが示されている。EGFP の遊離量は、ミクロリソファジー活性と良好に相関することが実験により検証された⁸⁾。

加えて、ILV 形成の実体を確認するため、TEM (transmission electron microscopy) による超微構造観察を行い、形態学的に膜内包構造の形成頻度を定量した。また、CLEM (correlative light and electron microscopy) 法を併用し、蛍光画像と電子顕微鏡画像の対応づけを行った。

2.3 STK38 および ATG8 ファミリーの機能解析

STK38 および ATG8 ファミリー (特に GABARAP 群) の機能を詳細に解析するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて安定的なノックアウト細胞を作製し、siRNA による一過的ノックダウンと比較した。STK38 については、野生型 (WT) に加え、キナーゼ活性欠損型 (K118R)、リン酸化不能型 (T74A, S281A, T444A)、ドメイン欠失型 (ΔN , ΔC) など複数の構造変異体を用いて再構成実験を行った。これにより、リソソーム局在に関与するドメインや、ESCRT 因子との相互作用に必要な構造を網羅的に解析した。

2.4 タンパク質間相互作用およびリン酸化解析

STK38 の下流シグナルを明らかにするため、TMT (Tandem Mass Tag) による定量的リン酸化プロテオミクスを実施した。STK38 ノックダウン細胞および対照細胞に LLOMe を処理し、差次的なリン酸化変動を解析することで、STK38 依存的な標的候補を同定した。

その中でも DOK1 (Docking protein 1) の S269 残基が LLOMe 刺激により有意にリン酸化されていたことに着目し、PRM (parallel reaction monitoring) によってこの部位のリン酸化状態を定量的に検出した。

さらに、共免疫沈降法 (co-IP) により、STK38-DOK1-VPS4、ならびに GABARAP-ALIX 間の複合体形成を確認し、機能的な相互作用を裏付けた。

2.5 オートファジー関連因子欠損細胞を用いた分子依存性の解析

ミクロリソファジーに関与するオートファジー関連因子の範囲を明らかにするため、ATG3, ATG5, ATG7, ATG13, ATG16L1, FIP200 といったオートファジーコア因子の欠損細胞に加え、LC3 TKO および GABARAP TKO 細胞を用

いた⁹⁾。これらの細胞では、EGFP-TRPML1 切断アッセイおよび ESCRT 構成因子の局在解析により、各因子のミクロリソファジーへの寄与度を定量的に評価した。

特に ATG16L1 と GABARAP 群が ESCRT のリクルートに必須であることが示され、マクロオートファジーとは異なる分子構成によるミクロリソファジーの存在が示唆された。

2.6 老化モデルによる生理的意義の検証

STK38 および GABARAPs が細胞老化に与える影響を検証するため、ドキシソルビシン (DXR) 処理によるヒト RPE1 細胞の老化誘導モデルを使用した。老化マーカーとして、細胞周期停止に関与する p21 および p16 の発現、炎症性 SASP 因子 (IL-6, IL-1 α) の mRNA 量、SA- β -Gal 染色陽性細胞数を測定し、老化表現型の進行を評価した。

さらに、GFP-Gal3 陽性構造の蓄積度合いと老化指標との相関も解析し、リソソーム損傷修復機構の破綻が老化促進に直結する可能性を検討した。

2.7 線虫を用いた *in vivo* 老化評価

ミクロリソファジーが個体寿命に与える影響を明らかにするため、線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いた *in vivo* 評価を行った。STK38 ホモログ *sax-1* および ATG8 ホモログ *lgg-1*, *lgg-2* に対する RNAi ノックダウンを行い、成虫 7 日目における GFP-Gal3 ドット数 (損傷リソソーム蓄積) を定量した。また、寿命解析として Kaplan-Meier 法による生存曲線を作成し、遺伝子機能の抑制が加齢および寿命に与える影響を統計的に評価した。

3. 研究結果

3.1 STK38 はリソソーム損傷応答に必須の因子である

まず、リソソーム損傷後に特異的に活性化される分子の探索として、AGC キナーゼファミリーの一員である STK38 に注目した。LLOMe 処理後、STK38 はリソソーム膜上に特異的にリクルートされることが免疫染色により確認された (図 1)。またその局在はカルシウムキレート剤により消失することから、局在はカルシウム依存的であることが示唆された。さらに、STK38 の C 末端領域を欠損した変異体ではリソソーム局在が消失し、この領域が膜局在に必須であることが明らかとなった。加えて、STK38 のキナーゼ活性部位である T444 のリン酸化¹⁰⁾は LLOMe 処理により上昇しており、損傷刺激に応答して活性化されることが示された。

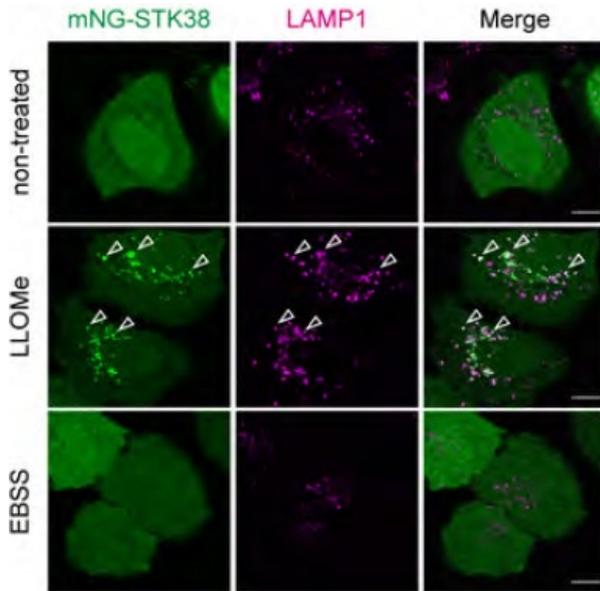


図 1. STK38 は損傷リソソームへリクルートされる
LLOMe 処理により損傷を受けたリソソームと STK38 とが共局在している。これにより、STK38 が損傷リソソームを感知し、選択的に局在化することが示唆される。

3. 2 STK38 は ESCRT の解離因子 VPS4 のリクルートに関与する

ESCRT 複合体は、膜損傷の局所的な修復に関与するが、その構成要素のリクルートおよび解離には厳密な制御が必要である。STK38 をノックダウンまたはノックアウトした細胞では、CHMP4B および ALIX などの ESCRT 構成因子のリソソーム局在は維持される一方で、最終解離を担う VPS4¹¹⁾ の局在が著しく低下した(図 2)。このことから、STK38 は VPS4 のリソソーム局在を促進し、ESCRT-III の解離ステップを制御していると考えられる。

3. 3 STK38 はマクロオートファジーとは独立に機能する

オートファジーとの関係性を明らかにするために、FIP200, ATG7, ATG14, ATG9, STX17 といったマクロオートファジー関連因子を欠損した細胞株を用いて STK38 の局在を検討した。その結果、これらの因子が欠損していても STK38 は損傷リソソームへリクルートされることが確認され、STK38 は従来型のマクロオートファジーとは独立した経路で機能することが示された。これは、STK38 が非定型的なマイクロリソファジー機構に関与している可能性を支持するものである。

3. 4. STK38 は DOK1 をリン酸化し、VPS4 のリクルートを制御する

STK38 の下流分子を明らかにするために、TMT ベースのリン酸化プロテオミクスを行った結果、損傷依存的にリン酸化されるタンパク質として DOK1 が同定された。特に S269 部位が STK38 依存的にリン酸化されることが PRM 法により確認され、DOK1 が STK38 の直接標的であることが示された。DOK1 S269A 変異体を用いた解析では、VPS4 のリソソーム局在が回復せず、DOK1 のリン酸化が VPS4 の局在制御に不可欠であることが明らかとなった。また、共免疫沈降実験により、STK38-DOK1-VPS4 が複合体を形成していることも確認された。

3. 5. GABARAP ファミリーは ESCRT 複合体の初期組み立てに必須である

次に、ESCRT の初期段階である CHMP4B, ALIX, VPS4 のリクルートに ATG8 ファミリーがどのように関与するかを検証した。その結果、ATG7, ATG3, ATG16L1 などのリピド化関連因子の欠損により、各因子の局在が大きく抑制された。特に、GABARAP トリプルノックアウト細胞では、ESCRT 因子のリクルートが著しく低下した。共免疫沈降法により、GABARAPs が ESCRT-I アダプターである ALIX と選択的に結合することが確認され、GABARAPs が ESCRT の足場として機能することが示唆された。

3. 6. GABARAPs はマイクロリソファジーを介して損傷リソソームの修復に関与する

GABARAP 群のマイクロリソファジーにおける直接的な役割を明らかにするため、EGFP-TRPML1 切断アッセイを行ったところ、GABARAP ノックダウン細胞では EGFP 遊離が著しく低下し、マイクロリソファジー活性が抑制されていた。さらに、TEM 観察により、ILV 形成の頻度が明らかに低下していた(図 3)。これらの結果から、GABARAPs は ESCRT を介して損傷領域の内包と切断を誘導するマイクロリソファジー機構において必須であることが明確となった。

3. 7. STK38 および GABARAPs は細胞老化と寿命制御に関与する

ヒト RPE1 細胞を用いたドキシソルピシン誘導性老化モデルにおいて、STK38 または GABARAP をノックダウンすると、老化指標である p21, p16 の発現が上昇し、炎症性サイトカイン(IL-6, IL-1 α)の mRNA 量が増加した。SA- β -Gal 染

色陽性細胞の割合も増加し、老化表現型が増強されたことが示された。また、GFP-Gal3 による損傷リソソームの蓄積も顕著に増加していた。

線虫モデルにおいても、*sax-1* (STK38 ホモログ) や *lgg-1* (GABARAP ホモログ) の RNAi により損傷リソソームが蓄

積し、寿命の短縮が観察された。これにより、STK38 と GABARAPs は細胞老化および個体の寿命制御において重要な因子であることが示された。

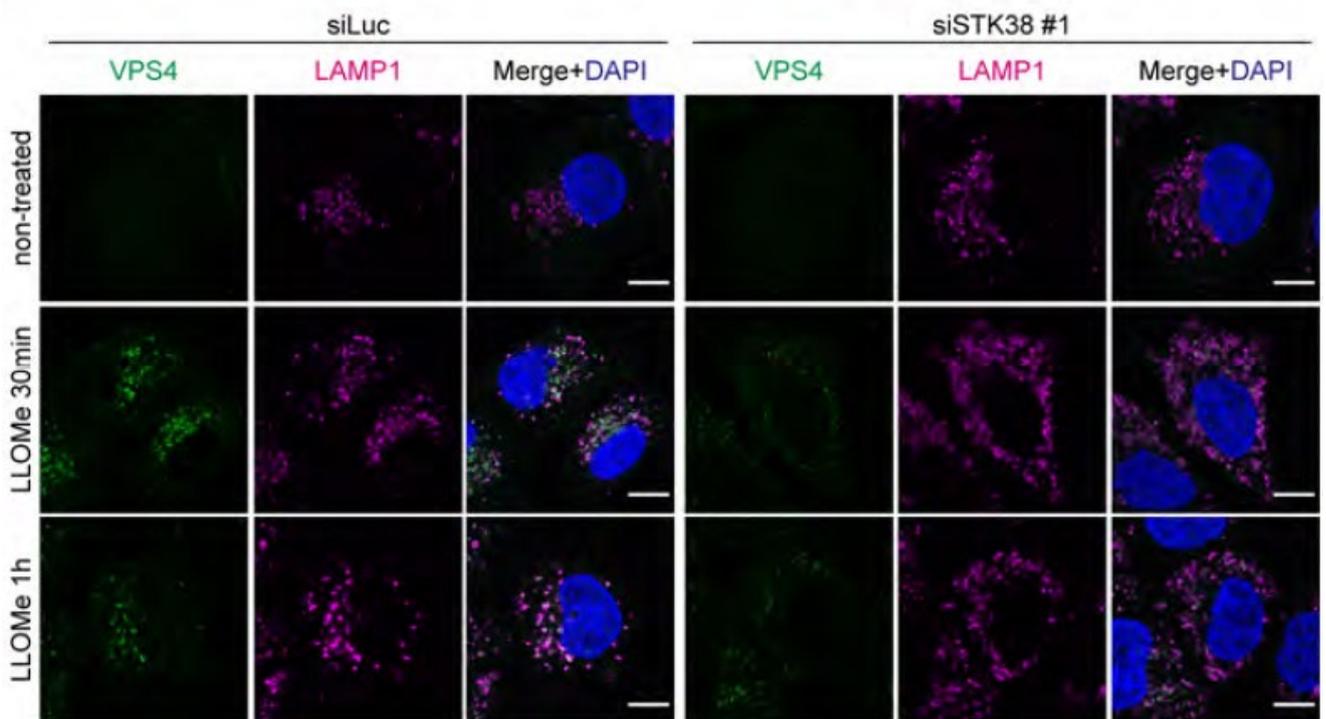


図2. STK38 は損傷リソソームへの VPS4 リクルートに重要

STK38 をノックダウンまたはノックアウトすると、VPS4 のリソソーム局在が有意に減少し、STK38 が ESCRT 解離段階における VPS4 の動員に重要であることが示された。

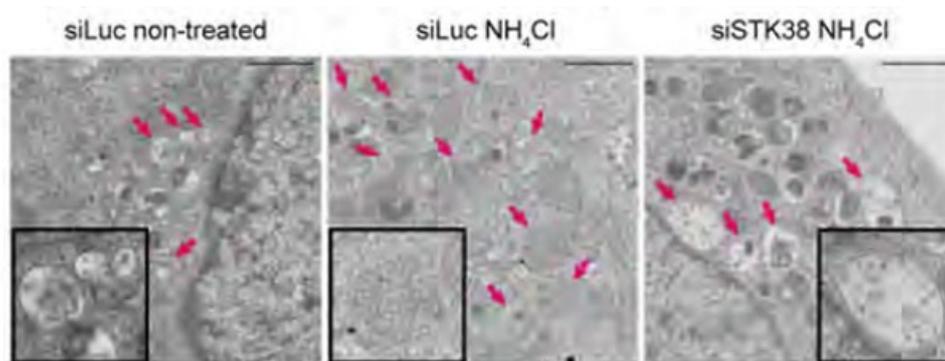


図3. Stk38 依存性のマイクロソファジーが ILV 構造を形成する

電子顕微鏡像により、STK38 依存的に損傷リソソーム内に ILV (膜内小胞) が形成されることが確認された。STK38 をノックダウンすると ILV の形成数が有意に減少し、STK38 がマイクロソファジーにおいて形態学的に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

4. 考察

本研究では、損傷リソソームの修復機構として機能するマイクロファジーの一種である「マイクロリソファジー (microlysophagy)」が、ESCRT 機構と密接に連携し、STK38 および GABARAP ファミリーによって段階的に制御されることを明らかにした。さらに、このプロセスが細胞および個体レベルでの老化制御に寄与していることを示した点で、細胞恒常性維持機構および加齢研究に新たな知見を加えるものである。

4.1 STK38 の新規機能とその意義

STK38 はこれまで、Hippo 経路や細胞周期制御、細胞死などに関与するキナーゼとして知られていたが、本研究では、リソソーム損傷後の ESCRT 解離過程において必須であることが初めて示された。特に、STK38 は DOK1 の S269 をリン酸化することにより、VPS4 のリソソームへのリクルートを可能にし、ESCRT-III 複合体の解離と膜再構築を誘導する。この知見は、STK38 が細胞内の損傷応答シグナルを翻訳し、ESCRT 機構を局所的かつ段階的に制御する「リン酸化中継因子」として機能していることを意味する。

また、STK38 が LLOMe 誘導性リソソーム損傷に特異的に反応し、飢餓などの他のストレス条件では活性化されない点も注目に値する。これにより、STK38 は損傷特異的な応答経路の中核として機能する可能性が高い。従来のオートファジー研究では、STK38 の役割は主にマクロオートファジーにおける Beclin1 の調節などが報告されていたが、本研究はその機能がより広範かつ選択的であることを示した。

4.2 GABARAP ファミリーによる ESCRT 構築の起点機構

一方、ATG8 ファミリー中の GABARAP サブファミリーは、リソソーム膜上で非定型的に脂質化され、ALIX と相互作用することにより ESCRT-III の前駆段階である ESCRT-I/ALIX の局在を誘導することが示された。特筆すべきは、LC3 サブファミリーではこの機能を十分に代替できず、GABARAP 群に特異的な役割がある点である。これは、GABARAPs がマイクロリソファジーにおける選択的なプラットフォーム分子として、損傷リソソーム上の ESCRT 組み立てを空間的・時間的に制御している可能性を示唆する。

また、GABARAPs による ESCRT 組み立ての起点化は、これまであまり注目されてこなかった ATG8 非定型脂質化の生理的意義に新たな役割を与えるものであり、LC3 関連ファゴサイトーシス(LAP)やエクソソーム分泌など、他の非定型オートファジー経路との共通性・分岐点を考察するうえでも重要な観点である¹³⁾。

4.3 ミクロリソファジーは損傷リソソームを迅速かつ効率的に修復する

本研究は、ESCRT によるリソソーム膜修復とマイクロファジーとの間に機能的連携があること、すなわち ESCRT による膜内包と切断がマイクロリソファジーの一環であることを明示した。マイクロリソファジーは、従来のマクロオートファジーとは異なり、二重膜構造を必要とせず、リソソーム自身が膜を内包することによって損傷部位を切除・除去する。このため、損傷が軽微で迅速な対応が必要な場合に特に有効な機構であると考えられる。

また、TEM および CLEM による解析により、リソソーム内での ILV 形成がマイクロリソファジーの形態的基盤であることが実証され、STK38 や GABARAPs がこの形成過程に機能的に関与することが明確となった。

4.4 リソソーム損傷と老化制御との新たな接点

加齢や細胞老化とリソソーム機能の低下との関連性は以前から報告されていたが、損傷リソソームの修復障害が老化を直接的に引き起こす因果関係については不明であった。本研究では、STK38 または GABARAPs を欠損した細胞において、p21/p16 の発現増加、SASP 因子の誘導、SA-β-Gal 活性の上昇が確認され、損傷リソソームの蓄積が老化の誘因となることを示唆した。

さらに、*C. elegans* においても、STK38 ホモログ (*sax-1*) および GABARAP ホモログ (*lgg-1*) の欠損により、老化個体におけるリソソーム損傷の蓄積および寿命の短縮が観察され、これらの機構が進化的に保存されていることが明らかとなった。したがって、マイクロリソファジーは老化制御の鍵を握る新たな細胞内恒常性機構であり、老化関連疾患の予防・治療に向けた標的経路となり得る。

4.5 ミクロリソファジー研究の今後の展望

本研究の成果は、オートファジー、ESCRT、老化研究という複数の研究分野にまたがる基盤的知見を提供するものである。特に、STK38-DOK1-VPS4 軸と GABARAP-ALIX-ESCRT-I 軸という二つの分子経路が、マイクロリソファ

ジの「開始」と「完了」をそれぞれ司る構造的・機能的基盤として統合された点は、細胞内のストレス応答ネットワークの精緻さを象徴する成果である(図4)。

今後は、これらの知見をさらに臓器レベルや疾患モデルへと展開し、神経変性疾患、腎疾患、炎症性疾患など

における病態制御に応用する研究が求められる。また、STK38 や GABARAP の活性制御を介した分子介入が、老化や組織再生を制御する新たな戦略として発展する可能性がある。

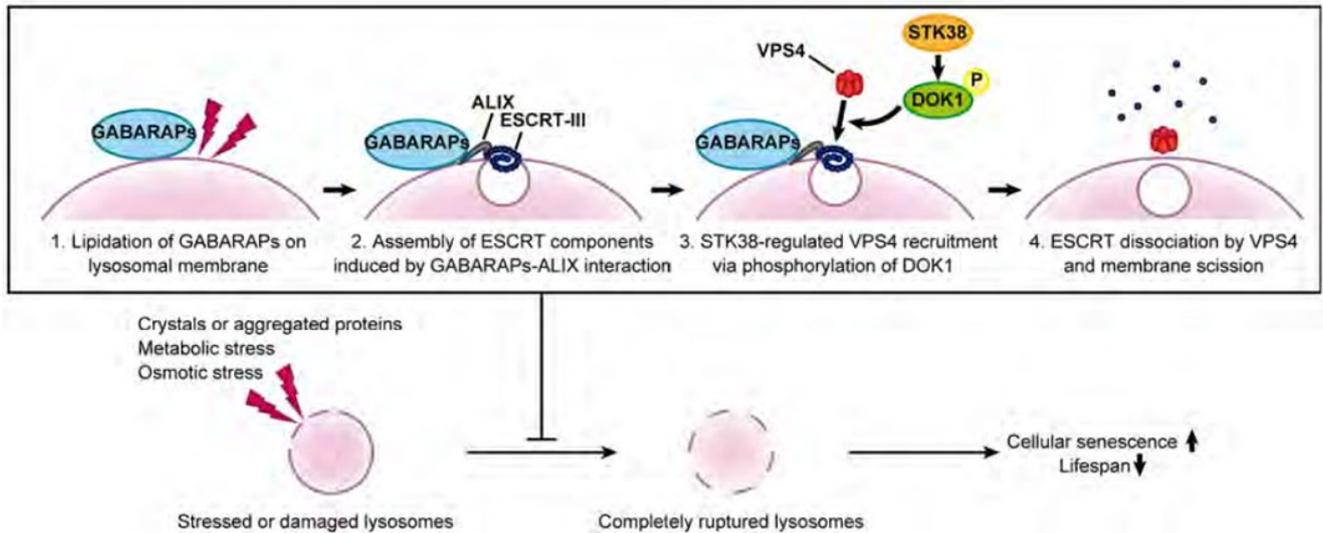


図4. STK38 と GABARAP はマイクロリソファジーを介してリソソーム修復と老化抑制に寄与する

本研究の主要な知見を統合したモデル図。損傷リソソームからのカルシウム流出によりSTK38が局在・活性化され、DOK1のリン酸化を介してESCRT解離因子VPS4を動員する。同時にGABARAPがALIXと連携してESCRTの初期の組み立てを担いILV形成を促進する。これらの協調的作用によりマイクロリソファジーが成立し、リソソームの修復と老化の抑制が実現される。

5. 今後の課題

従来リソソーム機能不全と細胞老化との密接な関連が知られていたが¹⁴⁾、本研究により、STK38 および GABARAPs を中心とするマイクロリソファジー機構が、損傷リソソームの修復および老化抑制に重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかし、本研究で明らかにされた知見は、今後の更なる検討と発展が求められる出発点でもあり、以下のような課題が残されている。

5.1 GABARAPs の非定型的脂質化誘導機構の解明

本研究では、GABARAPs の非定型的脂質化がESCRT複合体の初期組み立てに必要であることを示したが、リソソーム損傷時においてこの脂質化がどのように誘導されるかは未解明である。これには、リソソーム膜の張力変化、カルシウムイオンの流出、pH変化などが関与する可能性がある。ATG16L1に加え、TECPR1やATG16L2

などの非定型的脂質化を担う新規E3様因子の寄与についても検討が必要である。

5.2 DOK1によるVPS4リクルートの詳細な分子メカニズム

STK38がDOK1をリン酸化することでVPS4のリソソーム局在を促進することが示されたが、DOK1がどのような分子機構でVPS4をリソソームへ導くかは未だ不明である。DOK1がVPS4の直接的な足場タンパク質として機能するのか、それとも他の補助因子との複合体形成を介して間接的に制御しているのかを明らかにする必要がある。構造解析やドメインマッピングを通じた詳細な相互作用の解明が求められる。

5.3 他のマイクロリソファジー制御因子の探索

本研究ではSTK38とGABARAPsを中心に解析を行ったが、マイクロリソファジー全体を制御する全貌は未だ明らかではない。特に、ESCRTの膜切断活性や、リソソーム膜の変形・収縮を担う可能性のある他の調節因子(例: Rab

GTPases, 膜曲率センサータンパク質, アクチン関連因子など)の関与も考えられる。網羅的スクリーニングによって新たな制御因子を同定することが今後の重要な課題である。

5.4 マクロオートファジーとの機能的クロストークの解明

マイクロソファジーはマクロオートファジーとは異なる経路であることが示されたが, 実際の細胞内ではこれら両者が同時並行的に働いている可能性がある。特に, リソソーム損傷の程度や種類によって, マクロとマイクロの使い分けがあるのか, またそれらが協調・競合するのかといった点については今後詳細な解析が必要である。これにより, オートファジー系全体における損傷応答の包括的理解が進むと期待される。

5.5 疾患モデルを用いた *in vivo* 機能の検証

本研究では線虫を用いた寿命解析により, STK38 および GABARAPs の *in vivo* での老化抑制機能が示唆された。しかし, 哺乳類における臓器特異的な機能や, 神経変性疾患・腎疾患・炎症性疾患との関連については未解明である。今後はマウスモデルなどを用いた臓器特異的ノックアウトによる解析や, 病態モデルを用いた機能評価が求められる。特に加齢関連疾患に対するマイクロソファジーの関与を明確にすることで, 創薬標的としての可能性が開かれる。

以上のように, マイクロソファジーに関する本研究の知見は革新的であるが, その生理的・病理的意義の全容解明にはさらなる研究が必要である。今後の課題を一つひとつ解決することにより, リソソーム恒常性維持と老化制御の新たなパラダイムを構築できると考えられる。

5.6 マイクロソファジーを標的とした塩分過剰摂取による慢性腎臓病進展抑制への応用

本研究で明らかとなった STK38 および GABARAPs を介したマイクロソファジー経路は, 損傷リソソームの迅速な修復を通じて細胞の恒常性を維持し, 老化や細胞死を防ぐ新たな仕組みとして注目される。とりわけ, 腎尿細管上皮細胞は塩分過剰をはじめとした慢性的ストレスによりリソソーム損傷を受けやすく, その修復不全が細胞障害・間質線維化・CKD 進展を引き起こすことが知られている。

したがって, 本研究で示された STK38-DOK1-VPS4 軸および GABARAP-ALIX-ESCRT 軸を介したマイクロソファジー制御機構は, 塩分過剰摂取によって誘発されるリソソーム傷害を緩和し, 腎細胞の障害を抑制するための有望

な治療標的となる可能性がある。今後, 腎特異的モデルを用いた機能解析を通じて, マイクロソファジーが CKD 病態の制御に果たす役割を明確にし, この経路を標的とする新規治療法開発につなげることが期待される。

6. 文献

1. Ballabio A, Bonifacino JS. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21: 101–118, 2020.
2. Wang X, Zhang X, Dong X, Samie M, Li X, Cheng X, Goschka A, Shen D, Zhou Y, Harlow J et al. TPC proteins are phosphoinositide-activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes. *Cell* 151: 372–383, 2018.
3. Chauhan S, Kumar S, Jain A, Ponpuak M, Mudd MH, Kimura T, Choi SW, Peters R, Mandell MA, Bruun JA et al. TRIMs and Galectins globally cooperate and TRIM16 and Galectin-3 co-direct autophagy in endomembrane damage homeostasis. *Dev Cell* 39: 13–27, 2016.
4. Maejima I, Takahashi A, Omori H, Kimura T, Takabatake Y, Saitoh T, Yamamoto A, Hamasaki M, Noda T, Isaka Y et al. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J* 32: 2336–2347, 2013.
5. Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325: 473–477, 2009.
6. Radulovic M, Schink KO, Wenzel EM, Nähse V, Bongiovanni A, Lafont F, Stenmark H. ESCRT-mediated lysosome repair precedes lysophagy and promotes cell survival. *EMBO J* 37: e99753, 2018.
7. Uchimoto T, Odake S, Ueno T, Kitoh K, Tadano K, Yamashita T. A novel lysosomotropic agent, L-leucyl-L-leucine methyl ester, induces apoptosis of macrophages via a lysosomal rupture-dependent pathway. *Immunology* 98: 175–182, 1999.
8. Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G et al. Lysosomal proteolysis and autophagy require

- presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141: 1146–1158, 2020.
9. Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem* 79: 701–732. 2010.
 10. Tamaskovic R, Bichsel SJ, Hemmings BA. NDR family of AGC kinases--essential regulators of the cell cycle and morphogenesis. *FEBS Lett* 546: 73–80, 2003.
 11. Vietri M, Radulovic M, Stenmark H. The many functions of ESCRTs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21: 25–42, 2020.
 12. Brummer T, Larance M, Herrera Abreu MT, Timpson P, Emmerich CH, Drew K, Wiede F, Grewal T, Pearson RB, Tiganis T et al. Phosphorylation-dependent interaction between STK38 and DOK1 coordinates the lysosomal response to membrane damage. *Mol Cell Biol* 30: 2206–2219, 2010.
 13. Boyle KB, Hawkins RE, Alan JK, Timpson P, Schofield CJ, Parkes D, Green DR. TECPR1 is an ATG8 E3-like ligase involved in noncanonical lipidation. *Nat Cell Biol* 25: 73–84, 2023.
 14. Johmura Y, Yamanaka T, Omori S, Wang TW, Sugiura Y, Matsumoto M, Suzuki N, Yamashita S, Kimura A, Nagao K et al. Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders. *Science* 371: 265–270, 2021.

Development of a Novel Therapeutic Strategy to Prevent the Progression of Chronic Kidney Disease Induced by High Salt Intake via Lysosomal Damage Response

Satoshi Minami

Department of Genetics, Graduate School of Medicine, Osaka University

Summary

Lysosomes are essential organelles for cellular homeostasis, responsible for the degradation and recycling of intracellular components. In renal tubular epithelial cells, salt overload and metabolic stress can induce lysosomal damage, leading to the leakage of hydrolytic enzymes, activation of inflammatory and senescence pathways, and ultimately the progression of chronic kidney disease (CKD).

While canonical lysosomal quality control mechanisms—such as macroautophagy, TFEB-dependent biogenesis, and ESCRT-mediated membrane repair—are well-characterized, little is known about more rapid and selective repair pathways. This study focused on a novel process called microlysophagy, in which damaged portions of the lysosomal membrane are internalized via intraluminal vesicle (ILV) formation.

We identified the AGC kinase STK38 and autophagy-related protein GABARAP as essential regulators of microlysophagy. STK38 was found to localize to damaged lysosomes in a calcium-dependent manner and phosphorylate the adaptor DOK1, which is necessary for recruiting the ESCRT disassembly factor VPS4. Independently, GABARAPs were shown to interact with ALIX, a key ESCRT-I adaptor, facilitating the assembly of the ESCRT machinery.

Loss-of-function studies revealed that depletion of STK38 or GABARAPs impairs microlysophagy, as evidenced by reduced EGFP-TRPML1 cleavage and diminished ILV formation in electron microscopy. These defects led to increased cellular senescence markers and lysosomal damage accumulation in human cells, and reduced lifespan in *C. elegans* models.

Collectively, these findings define a new lysosomal repair axis—STK38–DOK1–VPS4 and GABARAP–ALIX–ESCRT—which acts independently of canonical autophagy pathways. This mechanism protects cells from lysosomal damage and delays the onset of senescence.

Importantly, in the context of high-salt conditions that exacerbate CKD, promoting microlysophagy may serve as a novel therapeutic strategy to maintain lysosomal integrity in renal tubular cells. Future studies will explore whether targeting this pathway can prevent kidney injury and disease progression under salt stress.