

My Selection

Podocyte GSK3 Is an Evolutionarily Conserved Critical Regulator of Kidney Function.

Hurcombe JA, et al. Nat Commun. 2019; 10: 403¹⁾.Visual Abstractへ

はじめに

本稿では、ポドサイト障害に関する基礎研究論文として、Hurcombe らの報告を紹介する¹⁾。この報告は、以下を示した点において注目に値する。

- ①ポドサイトの発生、成熟課程において GSK-3 が必須であり、定常状態では GSK-3 の 2 つのアイソフォーム (GSK-3 α , GSK-3 β) が相補的に働く。
- ② GSK-3 は、ポドサイトの終末分化細胞としての性質を維持し、細胞分裂周期への再突入、分裂期不全による細胞死への進展を抑制している。
- ③ GSK-3 によるポドサイト保護効果は、Hippo 経路を介しており、Wnt- β -カテニン経路に依存しない。

背景

ポドサイトは、糸球体の構成細胞として最外層に位置し、足突起の規則的な噛み合わせ構造と、その間に濾過障壁 (スリット膜) を構築することで、血清タンパクの漏出を防いでいる。ポドサイトが障害されると、足突起の噛み合わせ構造の消失と濾過障壁崩壊により蛋白尿が生じ、慢性腎臓病 (CKD) が進展する。また、ポドサイトは終末分化細胞であるため、ポドサイト障害による糸球体基底膜からのポドサイトの脱落は、糸球体硬化から CKD の進行に至る。CKD が進行すると生命維持のため腎代替療が必要になり、CKD 自体も脳梗塞、心筋梗塞、心不全、下肢虚血などの心血管病を介した死亡リスクの増加に寄与している。ポドサイト障害のメカニズム解明は、CKD の成因と新規治療法を開発していく上で極めて重要であり、ポドサイト障害を軽減・改善することができれば、CKD の進展を抑制し、腎代替療法が必要となる末期腎不全へ陥る患者数を減少させ、心血管病の発症を抑制し、生活の質、生命予後を改善させることにつながる。

グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 (glycogen synthase kinase-3: GSK-3) は、グリコーゲン合成阻害に関連するセリン・スレオニンリン酸化酵素として同定された。その後、GSK-3 は全ての真核生物で進化的に保存されていることが明らかになり、糖代謝のみならず、炎症、悪性腫瘍、腎障害、心肥大・線維化、骨代謝、神経疾患など様々な病態生理との関連が示されてきた²⁻⁴⁾。GSK-3 は、その多機能性がゆえに、阻害薬や活性化薬が様々な疾患の治療ターゲットとして注目され、基礎・臨床研究においてそ

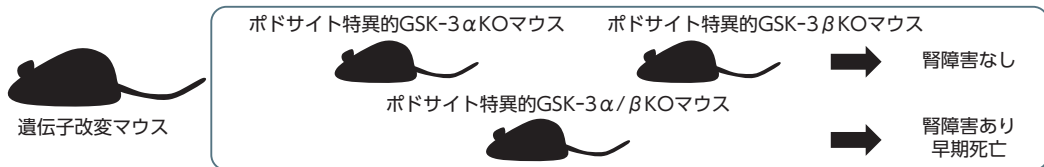
進化的に保存されているポドサイトのGSK3は、腎機能の重要な制御因子である

基礎研究

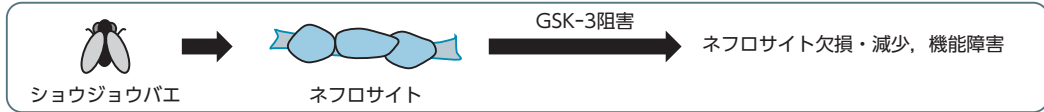
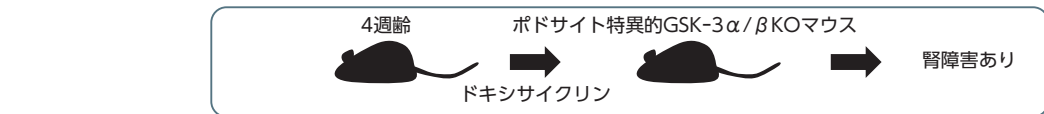
“ 要旨

GSK-3はポドサイトの分化・成熟、恒常性の維持に重要であり、Hippo経路を介して、細胞分裂周期への再移行から分裂期不全を経てアポトーシスに至る過程を抑制している。

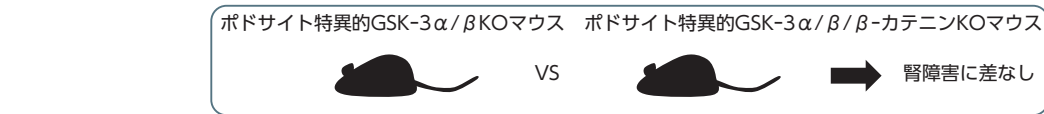
■ GSK-3はポドサイトの発生、成熟に必須である



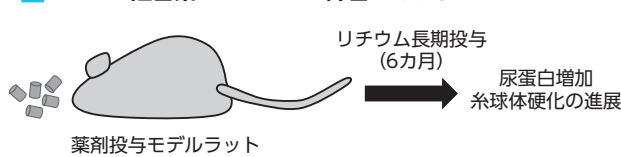
■ GSK-3は成熟後ポドサイトの恒常性維持に必須である



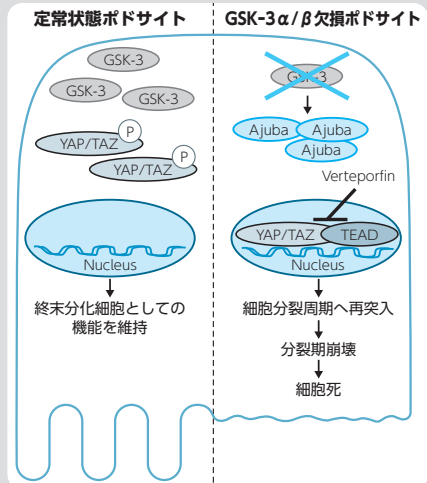
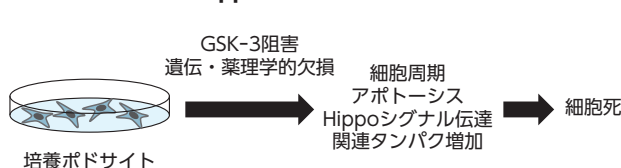
■ Wnt-β-カテニン経路はGSK-3欠損によるポドサイト障害に関与しない



■ GSK-3阻害薬はポドサイト障害をきたす



■ GSK-3欠損はHippoシグナル経路を介して細胞死をきたす



の有効性が検証されている⁵⁻⁸⁾。GSK-3は、線虫やショウジョウバエでは1つの遺伝子にコードされている一方、哺乳類ではGSK-3 α とGSK-3 β の2つのアイソフォームとして存在し、異なる染色体上の異なる遺伝子にコードされている。これらのアイソフォームは、85%の構造的相同性を持ち、キナーゼ活性をコードする領域では98%もの相同性を有しているが、生物学的機能は異なり、完全に重複しているわけではない。例えば、GSK-3 β ノックアウト (KO) マウスは胎生致死だが⁹⁾、GSK-3 α KO マウスは生存できる。一方で、GSK-3 α は、老化やオートファジーとの関連が示されているのは興味深い¹⁰⁾。GSK-3が関連しているシグナル伝達系としては、Wnt- β -カテニン経路、Hedgehog 経路などがあり、その中でも Wnt- β -カテニン経路は、ポドサイトの病態生理との関連が報告されている^{11, 12)}。GSK-3は、恒常的に活性化されており、インスリン、増殖刺激、サイトカインなどによりリン酸化され不活性化されるという特徴を持ち、また β -カテニンなどのGSK-3の基質をリン酸化することによって細胞内局在や機能を変化させ、様々な生理機能を調整している。

近年、ポドサイトにおけるGSK-3の阻害が、様々な実験的腎障害の治療に有効であることが報告されている。特に、GSK-3 β のポドサイトにおける欠損による腎保護効果の報告は多く、GSK-3 β がポドサイト障害のメカニズムに関与することも示されている^{13, 14)}。しかしながら、GSK-3阻害薬を用いた研究においては、アイソフォーム特異的なGSK-3阻害薬が存在しないこと、抗炎症作用のようにGSK-3阻害の他病態への影響が否定できないことから¹⁵⁾、その薬効がGSK-3 α 、GSK-3 β のどちらに起因しているのか、もしくはその両方なのか、さらにはポドサイト以外の細胞、臓器機能への影響によるものなのか、という疑問が残り、ポドサイトの病態生理にGSK-3がどのように関わっているかは十分に解明されたとは言えない。また、臨床で最も一般的に使用されているGSK-3阻害薬の炭酸リチウムは、長期投与により一部の患者に糸球体硬化症や腎機能低下を引き起こす可能性があることが報告されている^{16, 17)}。GSK-3のポドサイト障害における役割を明らかにすることは、①GSK-3に関連したCKDの進行を抑制する薬剤の創出、②実臨床ですでに使用されているGSK-3関連薬剤の適正使用に重要と考えられ、その一助となる報告を本稿にて解説する。

論文の概説

本研究では、ポドサイト特異的遺伝子欠損マウス、ポドサイト障害動物モデル、ショウジョウバエのネフロサイト、培養不死化ポドサイトを用いて、ポドサイトにおけるGSK-3の重要性を、遺伝学的・薬理的アプローチで検討している。具体的な動物モデルとしては、ポドサイト特異的GSK-3 α KO、GSK-3 β KO、GSK-3 α/β KO、GSK-3 $\alpha/\beta/\beta$ -カテニン KO マウス、薬剤誘発性ポドサイト特異的GSK-3 α/β KO マウス、GSK-3阻害薬 (リチウム) 投与ラットモデルを用いている。以下に結果を示す。

■ GSK-3はポドサイト / ネフロサイトの発生、成熟に必須である

ポドサイト特異的GSK-3 α/β KO マウスは胎生致死には至らなかったが、産後より急速に腎障害が進行し、アルブミン尿、糸球体硬化を呈し、産後10~16日で全ての個体が死亡した。一方で、ポドサイト特異的GSK-3 α 、GSK-3 β KO マウスは野生型と比べて生存率に差はなかった。また、ショウジョウバエのネフロサイトでGSK-3をノックダウンすると、ネフロサイトの完全欠損をきたした。これらより、GSK-3はポドサイトの発生、成熟段階で重要な因子であることが示唆された。

■ GSK-3 は成熟後のポドサイト / ネフロサイトの恒常性維持に必須である

薬剤誘発性ポドサイト特異的 GSK-3 α/β KO マウスを用いて、ポドサイト成熟後（4 週齢）に後天的に GSK-3 を欠損させた。ポドサイト特異的 KO 後、アルブミン尿、メサングウム細胞の増殖、半月体形成、糸球体硬化、全節性硬化、ポドサイト数の減少など、様々な糸球体障害を認めた。成熟したネフロサイトにおける GSK-3 のノックダウンは、ネフロサイト数の減少、ポドサイト関連タンパクの局在異常をきたした。以上より、成熟したポドサイトの機能維持に GSK-3 が必須であることが示唆された。

■ 薬剤による GSK-3 阻害はポドサイト / ネフロサイトを障害する

ラットにリチウムを長期間（6 カ月）投与し、GSK-3 α 、GSK-3 β が阻害されること、その下流シグナルである β -カテニンが糸球体に蓄積していることを示し、蛋白尿、糸球体硬化の増悪を認めた。ネフロサイトでは、細胞の肥大、ポドサイト関連タンパクの局在異常、エンドサイトーシスの機能異常をきたした。以上により、薬剤による GSK-3 阻害にてポドサイト / ネフロサイトの機能障害をきたすことが示された。

■ Wnt- β -カテニン経路は GSK-3 欠損によるポドサイト障害に関与しない

既報にもあるように、GSK-3 阻害による β -カテニンの蓄積が、腎障害の主要な原因であると想定されたが、GSK-3 $\alpha/\beta/\beta$ -カテニン KO マウスでは生命予後や腎障害の改善が得られなかった。さらに、GSK-3 α/β を KO したポドサイトに、 β -カテニン阻害薬や、他の GSK-3 シグナル経路（Notch, Hedgehog）の阻害薬を投与したが、ポドサイトの生存率改善は得られなかった。これらの結果は、ポドサイトにおける GSK-3 阻害の病態が、 β -カテニンに依存しないことを示唆している。

■ ポドサイトにおける GSK-3 欠損は分裂期不全による細胞死をきたす

培養不死化ポドサイトでは、GSK-3 α/β KO 誘導 7 日目に細胞死の増加を認めた。GSK-3 α/β KO ポドサイトでは、細胞周期や有糸分裂に関連するタンパク（pHistone 3, Cyclin B1, pCdk1）の増加を認め、画像解析でも細胞分裂周期への再突入や有糸分裂への誘導がみられ、アポトーシス関連のタンパクの増加も認めた。これらの結果は、GSK-3 の阻害により、ポドサイトが細胞分裂周期へ再突入し、分裂期不全による細胞死へ至ることを示唆し、動物モデルにおける腎臓の画像所見もそれを支持した。

■ GSK-3 欠損によるポドサイト障害には Hippo シグナル経路が関与する

プロテオミクス解析では、Hippo シグナル伝達経路の重要タンパクである Ajuba が同定された。Hippo シグナル伝達経路は YAP/TAZ をリン酸化することで核内移行を抑制しており、Ajuba は YAP/TAZ のリン酸化を阻害することで Hippo 伝達系を抑制する。ポドサイトにおける GSK-3 の阻害により Ajuba の発現が増加し、YAP/TAZ の核内移行が促進されること、Cyclin B1 の発現が増加することが示され、同様の結果を動物モデルでも確認した。YAP/TAZ の核内移行は、GSK-3 $\alpha/\beta/\beta$ -カテニン KO マウスでもみられ、YAP/TAZ の核内移行や GSK-3 α/β KO によるポドサイト障害は、Wnt- β カテニン経路には依存しないことが示された。YAP/TAZ のシグナル伝達阻害薬であるベルテポルフィン（Verteporfin）を投与すると、GSK-3 阻害下におけるポドサイトの生存率が改善し、Cyclin B1 の蓄積も緩和された。ネフロサイトでも、GSK-3 阻害による効果をベルテポルフィンは緩和した。

論文の解説

本報告により、ポドサイトの発生、分化過程、定常状態の維持に GSK-3 が必須であることが示された。つまり、生理的状态において、GSK-3 阻害はポドサイトに有害であることが示唆された。これは、GSK-3 阻害薬であるリチウムの長期投与が、腎機能低下のリスクとなりうるという臨床からの報告からも示唆される¹⁷⁾。一方で、アドリアマイシン腎症のようなネフローゼを引き起こした病的な状態において、GSK-3 阻害薬、特に GSK-3 β の阻害は、ポドサイトの保護に有効であることが示されている。興味深いことに、Hippo 経路の下流にある YAP は、ポドサイト構成タンパクで細胞死に寄与する dendrin に結合、阻害することで、ポドサイト障害を抑制することが示されてる^{18,19)}。GSK-3 が様々なポドサイト構成タンパクの機能に影響を与えている可能性はあり、今後も検証が必要である。

実臨床において、GSK-3 阻害薬をどのような腎疾患に使用するべきかという問題は残っている。GSK-3 の活性化が、心肥大や心筋の線維化を抑制するという報告もあることから⁷⁾、心疾患において GSK-3 の位置づけが定まっていないとはいえ²⁰⁾、例えば、高血圧性心臓病と腎硬化症を合併した症例で、GSK-3 を阻害することは予後の改善に結びつくか、というのは議論の分かれるところである。GSK-3 のポドサイトにおける役割は、未だ十分に解明されておらず、今後も検証が必要であることは間違いないが、腎臓以外の臓器での検証にも注視していく必要がある。

本論文において、ポドサイトの機能維持に GSK-3 α 、GSK-3 β が相補的に働くことが示されたのは興味深い。GSK-3 の 2 つのアイソフォームへの分離は、進化の過程で他方のアイソフォームを補完するために獲得したものかもしれない。しかし、例えば心筋細胞のように、2 つのアイソフォームの機能が相補的でない場合もあり²¹⁾、細胞、機能ごとに GSK-3 の役割が異なることがわかっている。将来的にアイソフォーム特異的阻害剤が作成された場合には、病態により腎機能低下のリスクを回避しながら使用できる可能性はあるが、他臓器への影響には常に留意する必要がある。

さらに、GSK-3 のポドサイトにおける役割が、Wnt- β -カテニン経路非依存的であった点も興味深い。GSK-3 は、Wnt- β -カテニン経路の調整で中心的な役割を果たし、GSK-3 の阻害は β -カテニンの蓄積を介してこの経路を活性化させる。既報でも β -カテニンはポドサイト障害に関連していることが示されており¹¹⁾、本論文における GSK-3 KO モデルにてもその関与が疑われたが、予想に反しその影響は否定的で、Hippo 経路の関与が示された。ただし、Hippo 経路と Wnt- β -カテニン経路の相互作用も示されており²²⁾、今後、ポドサイトにおける GSK-3 の役割を検証するにあたり、様々な下流シグナルについて網羅的に検証する必要がある。

GSK-3 の阻害、活性化ともに、治療ターゲットとしては魅力的である。しかし、ある病態には GSK-3 阻害が有効だが、他の病態には有害である可能性も高いところに注意が必要である。今後は、ポドサイトにおける GSK-3 の 2 つのアイソフォームそれぞれの役割を解明してだけでなく、その下流のシグナルについても各臓器、各細胞、各病態についても検討を続けることが、ポドサイトの障害メカニズムの解明のみならず、他臓器への影響も考慮した CKD 進行予防の創薬につながると思われる。

ポドサイト障害モデルにおける GSK-3 α の役割についての報告²³⁾ を、関連論文として提示し本稿を終えたい。