

論文の内容の要旨

論文題目 Mint3 mitigates apoptosis of tubular epithelial cells and renal fibrosis after ischemia-reperfusion injury

(Mint3 は虚血再灌流傷害後の尿細管上皮細胞のアポトーシスと腎線維化を軽減する)

氏名 那須 かほり

慢性腎臓病(CKD)は代表的な慢性疾患であり、疾患の不可逆性、透析治療や腎移植を要する end-stage renal disease (ESRD)への進展、多くの合併症などにより患者の生活の質の低下とともに医療経済的負担も世界中で問題になっている。そのため CKD 悪化のメカニズムの解明が必要とされている。

CKD の診断基準には糸球体濾過量(GFR)の低下と尿蛋白の存在が含まれている。GFR の低下は尿細管間質の傷害の程度とよく相関しているといわれており、尿細管間質の傷害は原疾患に関わらず CKD に共通する特徴であり、治療の標的となりうる。その尿細管間質傷害の代表的な組織学的所見として線維化がある。線維化は細胞外基質の過剰な蓄積であり、傷害の修復過程でもあるが、過剰になると機能障害を引き起こす。CKD における線維化は低酸素などの刺激による上皮細胞傷害によって起こると考えられている。上皮細胞傷害は細胞死、代謝異常、免疫反応、上皮間葉転換(EMT)、TGF- β の活性化などを介して線維化を引き起こす。我々はこれらの機序の中で細胞死に着目し研究を進めた。急性腎傷害(AKI)では上皮細胞死の大半はネクローシスであるが、CKD ではアポトーシスが中心となり線維化につながるとされている。この線維化のメカニズムを解明する上で虚血再灌流傷害(IRI)モデルや片側尿管結紮(UUO)モデルといった動物モデルが有用とされている。

腎臓は血流シャントの存在や尿細管上皮細胞の恒常的な再吸収などの機能維持のために多くの酸素を要することなどから低酸素に陥りやすい臓器である。特に CKD においては糸球体硬化や尿細管間質傷害による傍尿細管毛細血管(PTC)の喪失、酸化ストレス、腎性貧血などによる腎臓の慢性的な尿細管間質の低酸素状態が明らかにされている。生体は低酸素に対する防御機構として転写調節因子である hypoxia-inducible factors (HIF)を備えている。HIF の α サブユニットは、通常酸素分圧では prolyl hydroxylase domain-containing proteins (PHD)によって水酸化を受けて速やかに分解され、さらに factor inhibiting HIF-1 (FIH)による水酸化によって転写活性が抑制される。低酸素分圧では PHD や FIH による水酸化が抑制され、HIF- α が活性化し、核内への移行と標的遺伝子の転写活性を介して低酸素への適応反応として血管新生や赤血球生成、嫌気性代謝が促進される。腎臓では尿細管上皮細胞、マクロファージ、周皮細胞における HIF-1 が尿細管間質の線維化に影響するといわれており、特に尿細管上皮細胞における HIF-1 の腎線維化への影響はトランスジェニックマウスや PHD 阻害作用をもつコバルトなどの薬剤を用いて報告されている。

本研究で扱った Mint3 は FIH による HIF の抑制を解除し、HIF を活性化すると報告され

ている分子であり、特にマクロファージにおける機能がこれまでに報告されている。Mint3 欠損マクロファージは LPS 刺激やウイルス感染に対して ATP 産生低下やサイトカイン産生低下といった機能低下を示し、さらに Mint3 は炎症反応において中心的な役割を果たす NF- κ B にも影響すると報告されている。以上を踏まえて腎臓において Mint3 は FIH の抑制と HIF の活性化を介して腎線維化を改善させるという仮説を検証していくこととした。腎傷害における Mint3 の役割を探索するため、Mint3 ノックアウト(KO)マウスを用い、片側虚血再灌流傷害(uIRI)後に腎線維化が起こるモデルを作成した。uIRI1 日後の急性期の虚血再灌流傷害はコントロールである同胞の野生型マウスとの差を認めなかったが、KO マウスでは uIRI 7 日後の線維化の有意な増悪と、PTC の有意な減少、尿細管上皮細胞のアポトーシスの有意な増加を認めた。

既報では Mint3 は主にマクロファージにおいて機能することが報告されていたことから線維化の増悪に対するマクロファージにおける Mint3 の関与を検討するために LysM-Cre マウスと Mint3 flox マウスを用いてマクロファージ特異的な Mint3 KO マウスを作成し、uIRI を施行した。しかしコントロールのマウスと比較し線維化に差を認めなかったことから、上記で認めた線維化の増悪にはマクロファージ以外の細胞の Mint3 が関与しているものと考えられた。免疫組織染色で腎臓における Mint3 の発現を確認したところ Mint3 は尿細管上皮細胞を中心にユビキタスに発現していた。以上より培養近位尿細管上皮細胞株である mouse cortical tubular cell (MCT)を用いて Mint3 を siRNA でノックダウン(KD)する系で Mint3 の機能解析を行っていくこととした。

In vivo で Mint3 KO により傷害腎の PTC の減少を認めたが、HIF 下流遺伝子で代表的な血管新生因子である VEGF の発現は低酸素刺激した MCT で増加したものの、Mint3 KD による減少は認められなかった。一方で vivo と同様、MCT における Mint3 KD により低酸素による MCT のアポトーシスは増悪した。また予想に反し、FIH の siRNA による KD は Mint3 KD のアポトーシス増加を抑制せず、FIH はこの機序では Mint3 に関与しない可能性が考えられた。さらに MCT においては Mint3 KD と FIH KD とも代表的な HIF 下流遺伝子の mRNA の発現には影響しなかった。以上より尿細管上皮細胞における Mint3 の機能には FIH/HIF は関与していない可能性が示唆された。

さらに MCT における Mint3 KD による低酸素下でのアポトーシス増加のメカニズムを in vitro の系で解明していくこととした。FIH は初め HIF-1 の転写活性を抑制する因子として報告されたが、その後、他の蛋白のアンキリンリピートドメイン(ARD)も水酸化することが報告された。FIH により水酸化されることが報告されている代表的な ARD 含有蛋白には NF- κ B inhibitor α (I κ B α)、NF- κ B p105、Notch-1、MYPT1 などがある。さらに Mint3 欠損マクロファージでは核内における NF- κ B p65 の発現と細胞質におけるリン酸化 I κ B α (pI κ B α)の発現が低下することが報告されている。以上を踏まえて抗アポトーシス作用を有する NF- κ B と Mint3 の関係に着目した。NF- κ B は炎症反応において中心的な役割を果たし、p50、p52、p65 (RelA)、RelB、c-Rel を構成因子とする 2 量体が転写制御作用を

示す転写因子である。NF- κ B は通常状態では阻害因子である I κ B と結合することで細胞質にとどまりその機能を抑制されているが、種々の刺激により I κ B キナーゼ(IKK)が活性化されると I κ B がリン酸化されユビキチン化を受け分解される。それにより細胞質内の NF- κ B は核内に移行し、標的遺伝子の転写活性を調節する。特に p105 と p100 をそれぞれ前駆蛋白とする p50 と p52 は転写活性ドメインを持たないことから、転写活性に対し抑制的に働くと報告されている。さらに NF- κ B は抗アポトーシス遺伝子の発現を促すことで抗アポトーシス作用を示すことが報告されている。この NF- κ B の抗アポトーシス作用に着目した。MCT において Mint3 KD では NF- κ B 下流遺伝子である CCL2、CXCL2、IL-6 の mRNA レベルでの発現の低下を認めた。これに一致して抑制性の NF- κ B p50 の mRNA、核内の蛋白レベルでの発現増加を認めた。一方で NF- κ B p65 や pI κ B α については有意な発現の変化は認められなかった。さらに Mint3 KD により NF- κ B 下流の抗アポトーシス分子である TRAF1、BIRC3、GADD45 β 、TNFAIP3 の発現低下を認めた。

以上より本研究では Mint3 は uIRI による尿細管上皮細胞のアポトーシスと腎線維化を軽減することが示された。In vitro で尿細管上皮細胞における Mint3 KD は転写活性ドメインを持たない抑制性の NF- κ B p50 の有意な発現上昇を引き起こした。この抑制性 NF- κ B p50 の発現上昇が NF- κ B 下流の抗アポトーシス遺伝子の発現を抑制し、アポトーシスの増加を引き起こしたことが腎線維化の増悪につながった可能性があると考えられた。

本研究の新規性としては尿細管上皮細胞における Mint3 の機能に着目した点、さらにその上で in vitro で尿細管上皮細胞における Mint3 と NF- κ B p50 の関係を明らかにし、NF- κ B の抗アポトーシス作用に着目した点があげられる。

本研究の限界点としては尿細管上皮細胞については in vitro のノックダウンの実験のみを行い、尿細管上皮細胞特異的 Mint3 ノックアウトマウスを用いての実験は未施行である点、またアポトーシスについての FIH の関与の否定と NF- κ B p50 の関与については in vivo で検証が行われていない点があげられる。さらに Mint3 による NF- κ B p50 の発現への影響の詳細なメカニズムも未解明であることから、今後さらなる実験が必要と考えられる。

本研究では尿細管上皮細胞における Mint3 の機能について報告した。腎臓分野においてこれまで Mint3 に関わる報告はなく、さらには上皮細胞における Mint3 の機能についても初めての報告である。本研究で尿細管上皮細胞における Mint3 は腎線維化に関与することが明らかになり、さらなる研究で Mint3 は CKD に対する新たな治療につながる可能性が示唆された。