

論文の内容の要旨

論文題目 INO80 inhibits apoptosis in renal tubular cells

(INO80 は腎尿細管細胞でアポトーシスを抑制する)

氏名 三浦 理加

低酸素は慢性腎臓病 (CKD) の進行に深く関わっており、様々な因子による Pathway が解明されつつある。近年、翻訳後修飾であるエピジェネティックな因子による遺伝子の発現制御にも注目が集まっており、過去の Genome Wide Association Study の報告で CKD の進行と関連のある SNP を持つ遺伝子の一つとして同定された INO80 というクロマチンリモデリング因子の腎臓における役割に着目した。

INO80 は 15 のサブユニットからなる複合体を形成し ATP 依存性に、ヌクレオソームの除去やポジショニングの変換、ヌクレオソーム内のヒストンバリエーションの交換、ヒストン修飾の変換など、ヌクレオソームレベルでのクロマチン構造変換をきたすことで、転写、複製、修復、組み換えなどの様々な DNA 反応を制御していることが報告されている。以前、三村らは尿細管細胞株を低酸素状態で 24 時間培養しマイクロアレイを行った。その結果、INO80 が低酸素条件下で発現が低下していることを見出した。本研究では INO80 の低酸素下での腎臓での機能を明らかにすることを目的とした。

まず近位尿細管細胞株 (HK-2 細胞) を用いて、INO80 の発現についてリアルタイム定量 PCR, ウェスタンブロット, 免疫組織化学を用いて評価したところ、低酸素刺激を与えた HK-2 細胞において INO80 は mRNA レベル, タンパクレベルともに発現が低下することが確認された。

CKD では腎尿細管間質が低酸素状態となっており、低酸素が尿細管間質の線維化を促進することが知られている。そこで障害腎モデルラットを用いて、尿細管間質細胞における INO80 の発現について評価した。障害腎モデルラットとして 6 分の 5 腎摘ラットと Unilateral Ureteral Obstruction (UUO) ラットを用いた。6 分の 5 腎摘ラットでは INO80 の免疫組織化学における核での発現が sham と比較すると一様に減少していた。UUO ラットでは INO80 の核での発現には尿細管ごとの差がみられた。UUO モデルは水腎症による腎障害が急速かつ高度に生じたモデルであり、炎症細胞からのサイトカイン放出や酸化ストレスなど様々な現象が腎組織内で急激に生じていることから INO80 の発現にも影響したものと考えられた。

低酸素下では低酸素誘導因子 (Hypoxia-inducible factor: HIF) が低酸素応答の要として、エリスロポエチン (Erythropoietin: EPO) や血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) などの各種遺伝子の発現を制御しており、低酸素状態の CKD の腎臓においても中心的役割を担っていることが知られているが、低酸素下で発現が減少する INO80 の制御にも HIF が関わっているかどうかを検討した。非低酸素下で HIF-1

の安定化作用を持つ塩化コバルトを添加した HK-2 細胞を用いた実験ではコバルト添加により INO80 の発現は低下しなかった。この結果より HIF-1 の活性上昇は INO80 の発現量を低下させないことが判明した。また siRNA を用いて HIF-1 をノックダウンした HK-2 細胞に低酸素刺激を与えたところ、HIF-1 非存在化でも INO80 の発現量は低下した。さらに INO80 のプロモーターで低酸素応答性配列 (Hypoxic response element: HRE) を含む領域をクローニングしたベクターをトランスフェクションした HK-2 細胞によるルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったが、低酸素下でルシフェラーゼの活性は低下しなかった。また HIF-1 過剰発現ベクターを同時にトランスフェクションして、同様にルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、ルシフェラーゼの活性を測定したが、HIF-1 過剰発現ベクターをトランスフェクションしても活性に変化は認めなかった。以上の実験結果から INO80 は低酸素下で HIF-1 に非依存性に機能していることが明らかになった。

次に INO80 の尿細管細胞における機能を明らかにするために、siRNA を用いて INO80 をノックダウンした HK-2 細胞を用いてアポトーシスアッセイを行った。カスパーゼアッセイではコントロール群と比較して INO80 をノックダウンした群で、正常酸素分圧下、低酸素下の両方でカスパーゼ活性が有意に上昇した。また MTS アッセイでは INO80 をノックダウンした群のバイアビリティーが正常酸素分圧下、低酸素下の両方の条件下で有意に低下した。また Annexin v と 7-AAD を用いたフローサイトメトリーで INO80 のノックダウンにより Annexin v 陽性細胞が増加するという傾向が得られたことから、INO80 のノックダウンで尿細管細胞のアポトーシスが促進する、つまり INO80 は尿細管細胞においてはアポトーシスに対して細胞保護的に働くことが判明した。

次に INO80 をノックダウンした HK-2 細胞を用いてアポトーシス関連遺伝子の発現量についてリアルタイム定量 PCR で評価した。癌抑制遺伝子 p53 はアポトーシスを活性化し、アポトーシスの中心的役割を担う遺伝子である。また転写因子 E2F1 もまた p53 依存性または非依存性の経路を介してアポトーシスを誘導する遺伝子として知られている。p53 や E2F1 とこれらの標的遺伝子を中心に解析を行ったところ、p53 と E2F1 は INO80 のノックダウンで有意に発現が上昇することが判明した。また p53 と E2F1 の双方の下流遺伝子である NOXA の発現が上昇した。NOXA は pro-apoptosis 遺伝子であり、アポトーシスを促進させる働きを持つことから、p53 と E2F1 を介し NOXA の発現を上昇させる経路への INO80 の関与が示唆された。そこで p53, E2F1, NOXA のプロモーター領域のヒストン修飾の変化について Chromatin immunoprecipitation (ChIP) を行い検討した。INO80 をノックダウンした HK-2 細胞を用いて転写活性化のマーカーである H3K4me4 抗体で ChIP-qPCR を行ったところ、E2F1 と NOXA のプロモーター領域の H3K4me3 が増加することが確認された。つまり INO80 の発現が低下すると、E2F1 を介した NOXA 遺伝子の転写が活性化し、アポトーシスが促進することが明らかとなった。

続いて、INO80 が制御する下流遺伝子群について、さらなる同定を試みた。INO80 をノックダウンした HK-2 細胞から抽出した mRNA を用いて RNA-seq により網羅的に遺伝子

解析を行った。その結果、INO80 の発現低下により、同様に 32 の発現低下する遺伝子群と 3 つの発現上昇する遺伝子群を同定した。それらの遺伝子群がどのような特徴を持っているか Gene Ontology 解析で評価したところ STAT3 のチロシンリン酸化に関与するものが多く含まれていることが判明した。STAT3 は転写因子であり、リン酸化を受けて活性化した STAT3 は標的遺伝子である anti-apoptosis 遺伝子の発現を上昇させてアポトーシスを抑制する働きを持つことが知られている。INO80 が STAT3 のリン酸化へ及ぼす影響についてウエスタンブロットで確認したところ、INO80 のノックダウンで STAT3 のリン酸化が抑制されることが判明した。また INO80 のノックダウンにより、STAT3 の活性化シグナル因子である IL-6 の mRNA が発現低下することから、STAT3 を介したアポトーシス経路では IL-6 のシグナル低下による STAT3 のリン酸化の抑制が関与していることが示唆された。

以上より腎尿細管細胞の INO80 の低下は E2F1 を介した NOXA の転写活性化や STAT3 のリン酸化抑制によるアポトーシスを促進することが明らかとなった。これらの結果は INO80 遺伝子変異に伴う機能不全が、腎尿細管細胞死に寄与している可能性を示すものである。本研究では CKD の進行を促進する要因として INO80 の機能不全による腎尿細管細胞のアポトーシスの促進という新たな経路を見出した。INO80 によるエピジェネティックな遺伝子発現の調節機序を明らかにすることは、CKD の新しい治療標的となりうると思われる。