

論文の内容の要旨

論文題目 Tubular mitochondrial dysfunction in cisplatin-induced AKI may be mediated by decreased IFT88 expression with shortening of primary cilia

(シスプラチン誘発性 AKI における尿細管ミトコンドリア機能障害は、一次繊毛の短縮を伴う IFT88 発現の低下に制御されている可能性がある)

氏名 藤井 理恵

1. 背景

プライマリシリア（一次繊毛）は、細胞表面から突出する非運動性の細胞小器官であり、さまざまな細胞に存在する。細胞周期依存的に形成され、増殖休止期に誘導され、増殖中は消失する器官である。細胞膜に局在しており、化学受容体として、また環境変化に伴う力学シグナルを感知するメカノセンサーとして、などさまざまな刺激を感知することで、細胞機能を司っていると考えられている。腎臓においては、プライマリシリアは尿流を感知し、上皮構造の維持に必須である。プライマリシリアとその関連構造物の遺伝子変異により腎嚢胞、肝臓・胆管異常、内臓逆位、多指症、脳梁低形成、認知障害、網膜色素変性症、頭蓋・骨格異常、糖尿病など多岐にわたる異常を生じることが明らかになっており、これら一群の繊毛機能不全疾病を繊毛病（ciliopathy）と呼ぶ。腎疾患を呈する繊毛病としては、常染色体優性および劣性多発性嚢胞腎、ネフロン癆、Joubert syndrome, Bardet-Biedl syndrome などがある。また、移植後の急性尿細管壊死（Acute tubular necrosis; ATN）を来したヒト尿細管、虚血再灌流傷害（ischemia/reperfusion injury; IRI）や尿管閉塞（ureteral obstruction）による急性腎障害（Acute kidney injury; AKI）を呈するマウス尿細管、また酸化ストレス或いは低酸素ストレス下の尿細管細胞におけるプライマリシリアについても、これが動的に変化することが分かってきた。また、強力な抗腫瘍効果を示す抗癌剤であるシスプラチンは腎毒性を示す薬剤であり、静脈内に投与されたシスプラチンが糸球体から濾過された後に近位尿細管へ蓄積し近位尿細管細胞を障害することが示されている。最近の研究では、この AKI の原因となるシスプラチンがマウス尿細管及び、ヒト尿細管細胞 HK-2 においてシリアの脱落或いは短縮を来すことが分かり、AKI とプライマリシリアの関連が示唆されている。

プライマリシリアの構成成分としての繊毛内タンパク質輸送（intraflagellar transport; IFT）装置はプライマリシリア内へ受容体などを運ぶ重要な役割をする、巨大なタンパク質複合体である。IFT 装置は三つのタンパク質複合体（IFT-A 複合体, IFT-B 複合体, BBSome 複合体）と二つのモータータンパク質（キネシン 2 とダイニン 2 複合体）を含み、全部で 40 種類以上のサブユニットによって構成されている。IFT88 は IFT-B 複合体の重要な構成要素の一つであり、シリアタンパクの順行性輸送に関連している。IFT88 の喪失や変異は、シリア形成不全をもたらす、左右非対称の不具合、ヘッジホックシグナルの障害や、腎臓では多発性嚢胞腎を引き起こすことが示されており、IFT88 はプライマリシリアのアッセムブリと維持

に不可欠な分子であると言える。一方, IFT88 はシリアとは独立した役割も報告されている。すなわち, 中心体に存在し, セルサイクルのうち G1-S への進行に関与し, また遊走に必要な分子であることも分かっている。また, IFT88 の局在については, シリアだけでなく, 中心体, 細胞質, ER 膜やそこから放出される小胞など細胞質にも存在することが示されている。また近年, 甲状腺癌の IFT88 の機能喪失 (loss of function; LOF) 細胞において, プライマリシリアが短縮し代謝のリモデリングが起こるが, 特にミトコンドリアの酸化的リン酸化 (oxidative phosphorylation; OxPhos) 能が減弱し, ATP 産性能が低下, 同時に解糖系の活性化が起こることが示された。これらの知見は, IFT88 あるいはプライマリシリアが, 細胞のエネルギー代謝, 特にミトコンドリア機能に必須であることを示唆している。

一方, シスプラチンで誘導される AKI においては, 近位尿細管におけるミトコンドリア障害が関与していることは広く知られた事実である。先述の通りに, シスプラチンにより尿細管のシリアが短縮あるいは脱落したという報告においては, ミトコンドリアを標的とした抗酸化剤である Mito-Tempo 投与により, シスプラチンによるシリア脱落が抑制された。また, ミトコンドリアの抗酸化システムに重要な酵素である IDH2 が欠損した *Idh2*^{-/-}マウスにおいては, シスプラチンによるダメージがより強くでている。

これらの報告から, シスプラチンで誘導される AKI は尿細管細胞において, 特にミトコンドリア機能と IFT88 或いはプライマリシリアの関連が示唆されるが, そのメカニズムとオルガネラの関連については明らかになっていない。これらの関連について検討するため, 本研究では, シスプラチンによる尿細管障害において, シリア構成分子である IFT88 が, ミトコンドリア機能に及ぼす影響について検討した。その結果, シスプラチン障害において, IFT88 の発現低下が, シリア短縮とミトコンドリア機能低下をもたらすことを示した。

これまでに, β 2 刺激薬であるホルモテロールが IRI において, N-アセチルシステインが葉酸による AKI において, 上述の Mito-TEMPO が敗血症や IRI による AKI において, 或いはミトコンドリア呼吸鎖複合体 I 阻害剤であるロテノンがシスプラチンによる AKI において, それぞれミトコンドリア障害を軽減した, という検討がある。このようにミトコンドリア機能障害を軽減することで AKI 治療につなげるという例はこれまでも報告がある。しかし, プライマリシリア或いは IFT88 をコントロールすることで AKI におけるミトコンドリア障害を保護するという例はこれまでに報告がない。シスプラチンによる腎毒性がミトコンドリア障害と関連していることを考慮すると, 尿細管におけるプライマリシリアあるいは IFT88 の発現を制御することで, ミトコンドリア障害を軽減する AKI 治療, 特にシスプラチン腎症への新たな治療戦略となる可能性があると期待される。

2. 方法と結果

2-1. マウスシスプラチン腎症において、腎皮質における IFT88 の発現が低下する.

マウスシスプラチン腎症は、C57B6 (7-8 週齢, 雄) マウスにシスプラチン 25 mg/kg の腹腔内投与により作成した. マウスは 72 時間後に安楽死させ, 血液及び腎組織を回収した. 血漿の尿素窒素及びクレアチニン上昇を確認し, 腎皮質でのミトコンドリア生合成におけるマスターレギュレータとされる peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (Pgc1 α) の発現低下を認めたが, これらは既報に矛盾しない所見であった. また Ift88 の遺伝子発現低下ならびに IFT88 タンパク発現低下もみられた. IFT88 タンパクのウェスタンブロッティングのシグナル強度と血漿尿素窒素との相関を調べると, 有意に負の相関がみられた.

2-2. ヒト近位尿細管上皮細胞株 RPTEC/TERT1 にシスプラチンを添加するとシリアが短縮し, IFT88 の発現が低下する.

in vitro の実験では, 高密度の培養でプライマリシリアを維持するヒト近位尿細管上皮細胞である RPTEC/TERT1 細胞を用いた. RPTEC/TERT1 細胞を 20 μ M 濃度のシスプラチンで 6 well プレート上で 2 日間刺激すると, IFT88 の遺伝子及びタンパク発現が有意に低下した. またシリアマーカーとして広く用いられている Acetylated α -Tubulin (Ac α -Tubulin) の染色によりシリア長を測定すると, 5 割程度まで短縮していた.

2-3. IFT88-knockdown (IFT88-KD) 細胞ではシリアが短縮する.

上記結果 (マウスシスプラチン腎症において, 腎皮質における IFT88 の発現が低下, また RPTEC/TERT1 にシスプラチンを添加するとシリアが短縮し, IFT88 の発現が低下したこと) から, シスプラチン障害は IFT88 の機能変化と関連しているのではないかと考えた. シスプラチンの障害と IFT88 の関連を検討するため, IFT88-KD 細胞を作成した. シスプラチン障害においてミトコンドリア機能の低下が知られていることから, 続いて, IFT88-KD 細胞のミトコンドリア機能への影響を検討した. IFT88-KD 細胞は siRNA の手法を用い, 6 well プレート上で 50 nM の siRNA を添加後 6 日間培養し作成し, KD 効率を確認した. 2 種類の siIFT88 を用いて IFT88 の KD を試みたところ, siControl 導入細胞に比較して 2 種類の siIFT88 導入細胞ともに遺伝子レベルで 8 割以上の KD を確認した. タンパクレベルでは 1 割程度まで IFT88 の発現低下がみられた. シリア長は Ac α -Tubulin の染色で測定し, 2 種類の siIFT88 導入細胞ともに 5 割程度まで短縮した.

2-4. シスプラチン障害では RPTEC/TERT1 細胞にミトコンドリア障害ならびに脂肪酸酸化 (fatty acid oxidation; FAO) の活性低下が起こり, IFT88-KD 細胞でも同様の障害が認められる.

シスプラチン障害では, 近位尿細管細胞におけるミトコンドリア障害が広く知られているが, 本研究でも, Flux Analyzer を用いた検討により, ミトコンドリア機能を調べた. RPTEC/TERT1 細胞は XF 96 プレート上でシスプラチン 20 μ M 濃度で 2 日間刺激し, ミトコンドリアの Oxygen consumption rate (OCR) を測定した. IFT88-KD 細胞については, 6 well プレート上で siRNA 導入後 6 日間培養にて IFT88-KD 細胞を作成した後, XF 96 プレートに再播種し, その 1 日後に OCR を測定した. シスプラチン刺激細胞, 2 種類の siIFT88-KD 細胞両者において OCR の低下が認められた. 続いて FAO 活性を測定したところ, シスプラチン刺激細胞及び IFT-88 細胞において, 同様に FAO 活性の低下を認めた. さらに FAO 関連遺伝子の発現レベルを測定したところ, PGC 1 α を含むこれらの遺伝子は, シスプラチン刺激細胞及び IFT88-KD 細胞において有意に発現低下していた.

3. 結語

上記結果より, シスプラチンで惹起される尿細管障害において, IFT88 の発現低下はプライマリシリアを短縮し, ミトコンドリア障害ならびに FAO 活性低下に関与すると推察される. 本研究の結果は, シスプラチン誘発性 AKI における尿細管ミトコンドリア機能障害は, 少なくとも一部は, プライマリシリアの短縮を伴う IFT88 発現の低下によって媒介されていることを示唆している. すなわち, シスプラチン誘発性 AKI における尿細管のミトコンドリア障害の一部は IFT88 発現の変化を介して起こる可能性がある. さらに, シスプラチンによる腎毒性がミトコンドリア障害と関連していることを考慮すると, 尿細管におけるプライマリシリア或いは IFT88 の発現を制御することで, ミトコンドリア障害を軽減する AKI 治療の新たな治療戦略となる可能性が示唆される.