

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 D-serine, a novel uremic toxin, induces senescence in human renal tubular cells via derangement of serine metabolism

(D-セリンは、アミノ酸代謝経路を介して尿細管老化を亢進させる新規尿毒素である)

氏名 岡田啓

殆どのアミノ酸にはL-アミノ酸、D-アミノ酸という光学異性体が存在するが、血中ではD-アミノ酸濃度は非常に低く保たれている。D-アミノ酸の血中濃度を低く維持する機序としては、腎臓でのD-アミノ酸の排泄が最も重要と考えられている。従って、慢性腎臓病（CKD）患者において、D-アミノ酸の血中濃度・尿中濃度共に上昇することが報告されている。一方、D-アミノ酸の機能に関しては、長らく不明であり生体には使用されないと考えられてきたが、近年D-アミノ酸とL-アミノ酸を区別する技術が開発されて以降、D-アミノ酸の機能が徐々に明らかになってきた。アミノ酸の一つのセリンに関しては、例えば、中枢神経においてはD-セリンが神経伝達物質として作用することが知られている。その一方、腎臓との関わりは、はっきりしていなかった。2016年に、科学誌に血中D-セリン濃度またはD/L-セリン比高値が腎予後増悪因子と報告された。しかしながら、D-セリンが人間の腎臓に対して毒性を持つか、CKD進行に影響しうるかは明らかになってない。

CKD進行、すなわち腎臓という臓器の予後を規定する因子として最も重要なのが尿細管を含む尿細管間質の線維化と考えられている。尿細管間質の線維化は、慢性低酸素状態を惹起し腎臓病の **final common pathway** と当科の南学らが提唱している。特に、尿細管間質の線維化に関しては、障害に弱い近位尿細管の障害が重要とされている。近位尿細管に障害が加わった時、近位尿細管上皮細胞はアポトーシスに至るものもあれば、細胞周期停止に留まるものもある。後者において、細胞老化に関連した炎症性サイトカイン・ケモカインを分泌する表現型である **SASP** が現在注目されている。SASPは、IL-8やIL-6などを分泌することにより、周囲に炎症細胞浸潤を促したり周囲の線維化を促進したり、CKD進行に重要と考えられるようになった。本論文では先に述べたD-セリンが、腎臓病の予後に重要な部位である尿細管に対してどのような影響を及ぼすか、そしてその機序を解明するために実験を行った。

まず、腎臓の近位尿細管上皮細胞のヒトの細胞株であるHK-2と、初代培養細胞であるNHRECを用いてL-セリンまたはD-セリンを添加して実験を行った。L-セリン・D-セリンの負荷濃度を変化させてHK-2で実験を行ったところ、48時間後でL-セリンでは非負荷群と変化がなかったものの、濃度

10 mM 以上の D-セリンで細胞増殖障害を有意に認めた。この細胞増殖障害は、MUSE という器械を用い細胞数カウントと MTS アッセイの両者で確認され、また NHREC でも同様の変化を認めた。非特異的な反応でないことを確認するコントロールとして、CKD 患者で血中濃度が上昇する他の D-アミノ酸である D-プロリン、D-アラニンでも同様の実験を行ったが、細胞増殖障害は認めなかった。

次に、この細胞増殖障害の病態を解明するために、アポトーシスの存在の有無を調べた。先ほど述べた MUSE という機械を使い、アネキシン V 染色陽性細胞とカスパーゼ 3/7 活性陽性細胞の割合を調べた。20 mM の D-セリンに 48 時間曝露されていた HK-2 は、有意に両者のアッセイでアポトーシス細胞の増加を認めた。遺伝子発現レベルでのアポトーシス関連遺伝子の変化を調べたところ、HK-2 でも NHREC でも、アポトーシス促進遺伝子である BAX、PUMA の発現増加を認めた。また、NHREC では、アポトーシス抑制遺伝子である BCL-2 の発現低下を認め、ミトコンドリア由来のアポトーシスが亢進していることを確認した

D-セリン負荷後に、特に 24 時間後から 48 時間後にかけて細胞数増加を認めなかったこと、アポトーシスだけで細胞増殖障害をすべて説明するには、相対的減少が 50%程度であったことから説明出来ないと考え、細胞周期を PI (propidium iodide) 染色で確認した。その結果、D-セリン負荷群で、L-セリン負荷群とコントロール群では認めなかった G2/M 期での細胞周期停止が有意に増加していた。この現象は、近年細胞周期停止を示すマーカーとして報告されている pH3 (phospho-histone H3) 染色でも D-セリン負荷にて陽性細胞割合増加し確認出来た。細胞周期停止に寄与する p21 の発現も、遺伝子レベルでも蛋白レベルでも上昇を確認し、細胞周期停止の進行を裏付けるデータと考えられた。

次に、D-セリンにより、細胞が老化、さらには SASP という表現型を伴っているかどうかを調べた。まず、老化関連遺伝子である、p16 も遺伝子発現レベルで D-セリン負荷で上昇していることを確認した。次に、老化マーカーである  $\gamma$ -H2AX 染色、SA- $\beta$  GAL (senescence-associated beta-galactosidase) 染色を行い、それぞれ HK-2、NHREC で陽性細胞割合増加を認め、老化の進行を確認した。次に、SASP の代表的なマーカーである IL-6 と IL-8 の遺伝子発現レベルの上昇を HK-2 と NHREC で確認でき、また培地中に分泌される蛋白としても、IL-6 と IL-8 の上昇を認めた。よって、D-セリン負荷にて尿細管細胞が SASP の表現型を取ることを確認した。

アミノ酸添加による変化であり、細胞周期変化などを認めたため、アミノ酸欠乏シグナルである GCN2 の変化を観察したところ、GCN2 がリン酸化され活性化されていた。また、GCN2 は活性化すると eIF2 $\alpha$  キナーゼとして作用することがわかっているため、その下流である ATF4 や CHOP の発現を調べたところ、D-セリン負荷により、有意に発現が上昇していた。GCN2 がこの障害に関与していることを確かめるために、siRNA を使って knockdown を行ったところ、siGCN2 をトランスフェクションした細胞は、D-セリン負荷による ATF-4、IL-6、IL-8 の発現上昇の抑制を認め、D-セリンによる GCN2 の活性化が尿細管細胞の毒性発現に重要であることを証明した。GCN2-ATF4-CHOP の反応は、統合的ストレス応答 (integrated stress response: ISR) と呼ばれており、eIF2 $\alpha$  活性化を介した反応である。ISR を起こす eIF2 $\alpha$  キナーゼとして他に、PKR、PERK、HRI が知られているが、可

能性として PERK が活性化している可能性も否定できなかったため、小胞体ストレスの活性化を PERK、ATF6 の活性化を評価したところ、活性化されておらず、D-セリンによる ISR 惹起の機序としては GCN2 と考えられた。ISR の下流にあるアポトーシスと細胞周期停止を誘導する CHOP の knockdown にて、D-セリンによる細胞増殖障害が改善したことを確認し、CHOP が細胞増殖障害に重要な役割を果たしていることを確認した。

GCN2 は近年、アミノ酸欠乏シグナルとして、注目されている分子である。GCN2 活性化により、ATF4 活性化を介してグルコースからの解糖系の中間産物 3PG を経て L-セリン合成系の亢進が知られている。グルコースから L-セリン合成に至る経路の酵素の遺伝子発現を調べたところ、解糖系・L-セリン合成系に重要な酵素である、ヘキソキナーゼ (HK) をはじめとする 3-PG までに至るための酵素、PHGDH、PSAT1

といった 3PG から L-セリン合成に関係する酵素の発現上昇を、D-セリン添加後で認めた。L-serine 合成の原料となるグルコース濃度変化を見たところ、D-セリン負荷群で、グルコース消費の有意な増加を認めた。また、ATF4 が影響していることを確認するために、siATF4 にて knockdown して D-セリン負荷刺激をかけたところ、PHGDH、PSAT1 の D-セリンによる発現上昇は抑制された。

L-セリン合成反応が促進していることから、L-セリン添加により D-セリンによる尿細管細胞増殖障害がどう変化するかを次に観察した。その結果、他の L-アミノ酸では全く影響がなかったが、L-セリンだとわずか 1 mM という濃度で D-セリンによる尿細管細胞増殖障害をキャンセル出来た。また、p21 や CHOP、IL-8 といった D-セリン負荷によって誘導された遺伝子発現上昇も、L-セリン添加にてキャンセルされた。そこで、L-セリンと D-セリンの関係もより明確に明らかにするために、L-セリン不含有培地を作製し、通常培地と D-セリンによる毒性の出現の濃度比較をした。通常培地では、D-セリンが 10 mM 以上でしか毒性発現しなかったのに対し、L-セリン不含有培地では D-セリンが 1 mM から毒性を示した。また、培地中の D/L-セリン比を変化させて D-セリン 20 mM での毒性を評価したところ、D/L-セリン比が上昇するにつれて D-セリンの毒性は増強されていった。以上から、D-セリンの毒性は、L-セリンとの相対的な量の差によって変化することが証明された。

この研究のまとめとしては、腎機能低下にて血中・尿中 D-セリン濃度が上昇し、D/L-セリン比が上昇する。それにより GCN2 と p21 が活性化され、細胞周期停止、SASP、アポトーシスの形態を尿細管細胞が取り、これらにより CKD 進行に関わる。CKD 進行すれば、さらに血中・尿中 D-セリン濃度が上昇するというモデルである。

以上のように、近位尿細管細胞における D-セリンは、細胞老化を進行させる新たな尿毒素であると結論された。