

論文の内容の要旨

論文題目 Genome-wide analysis for target genes of mineralocorticoid receptor in renal epithelial cells.

(腎上皮系細胞におけるミネラルコルチコイド受容体標的遺伝子の探索)

氏名 上田 浩平

ミネラルコルチコイド受容体(MR)は核内受容体ファミリーの一種である。MRは遠位ネフロン尿細管上皮細胞に発現し、副腎皮質から分泌されるアルドステロンと結合すると直接の標的遺伝子である *Sgk1* や *ENaC α* の転写発現を促進することで、集合管上皮細胞の尿細管側細胞膜に *ENaC* を発現誘導し、血中へのナトリウム再吸収を促進すること、高血圧の発症に関与することが知られている。しかしながら集合管以外の尿細管上皮細胞における標的遺伝子については不明な点が多い。一方で、糖尿病性腎症などの高血圧・蛋白尿を伴う慢性腎臓病症例においても同薬剤の有用性が示されているが、同症例においては高カリウム血症などの薬剤誘発性合併症の発症率が高いことから、新規薬剤の開発が待望されている。蛋白尿発症に特に重要な糸球体臓側上皮細胞(ポドサイト)傷害におけるMRの役割に関する知見は、MRによる直接の遺伝子転写発現調節を介さないもの、つまり蛋白-蛋白間の相互作用を機序とするものに限られており、特にポドサイトにおけるMRの標的遺伝子は明らかにされていない。

このたび私は未解析の腎上皮系細胞においてMRの新規標的遺伝子とMRのDNA結合プロファイルを明らかにすべく、ヒト由来培養ポドサイト(HPC)とマウス由来培養遠位尿細管上皮細胞(mDCT)を用いて、アルドステロン投与下におけるマイクロアレイ解析と全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)を組み合わせて解析することとした。

まずポドサイトにおけるMRの発現を確かめるべく、鉄製ビーズを心腔内投与したマウスの腎臓から磁性を用いてポドサイトの腎内局在部位である糸球体を単離し、糸球体単離分画においても尿細管上皮に富む残余分画と同様にMRのmRNAを発現する事と、さらにマウス由来培養ポドサイトはMRのmRNAを発現する一方で他の糸球体構成細胞である培養メサンギウム細胞はMRを発現しない事、つまりは古典的なMR発現細胞ではないマウスのポドサイトにおいてもMRのmRNAが発現することをRT-PCR法を用いて証明した。次にマウス由来培養ポドサイトに発現するMR蛋白がアルドステロンによって核内に集積する事を、ウエスタンブロッティング法を用いて証明した。同様にHPCにおいても、MRのmRNAを発現する事、MR蛋白がアルドステロン投与によって核内に集積することを証明した。これらの結果は、古典的なMR発現細胞である尿細管上皮細胞におけるMRの動態に関する知見と一致しており、ポドサイトに内因性にMRが発現することを蛋白レベルで支持するに留まらず、ポドサイトのMRが特異的リガンドに反応して核内集積することはこれが尿細管上皮細胞のMRと同様に転写因子として働く可能性が考えられた。ま

た、mDCT 細胞は MR の発現を欠失していたことから 3xFLAG-hMR をリポフェクション法により強制発現させ、アルドステロン投与によって核内集積することを確認し、以後の実験で用いることとした。

次に、MR に関する ChIP-seq を行うために、内因性に MR を発現するヒト由来培養ポドサイトに対し、入手可能な抗 MR 抗体を用いて MR の免疫沈降を行ったが、ウエスタンブロッティング法によって MR の免疫沈降を確認できる抗体は得られなかった。それゆえレンチウイルスを用いた強制発現系により 3xFLAG-hMR をヒト由来培養ポドサイトに強制発現させ、抗 FLAG 抗体によるクロマチン免疫沈降を行う事とした。その結果、同様に固定された 3xFLAG-hMR 強制発現下 HEK293T 細胞・ヒト由来培養ポドサイト・mDCT 細胞の 3xFLAG-hMR が抗 FLAG 抗体によって免疫沈降されることを確認した。

3xFLAG-hMR を強制発現した mDCT 細胞において、アルドステロン投与 1 時間後に固定した検体を ChIP-seq で解析したところ、マウスゲノム上の 1150 箇所には有意な MR 結合領域が同定された。1150 箇所の MR 結合領域に対する GREAT 解析により、それらの MR 結合領域によって転写が制御されていると推測される候補遺伝子が 1433 種同定された。一方で、3xFLAG-hMR を強制発現した mDCT 細胞においてアルドステロン投与 3 時間後の RNA 検体を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、MR により発現が上昇したと考えられる遺伝子は 186 種類であった。

両解析において同定された MR の標的遺伝子候補は、25 種類が同定された。それらについて定量的 RT-PCR 法と、ChIP-seq 解析で各遺伝子近傍に同定された MR 結合 DNA 領域を ChIP-qPCR 法で検証したところ、5 種類の遺伝子 Sgk1, Fkbp5, Tns1, Ras112, Tsc22d3 が MR 標的遺伝子として確認された。一方、MR 活性化を伴う腎疾患動物モデルにおいて、標的遺伝子として報告のある Ctgf, Serpine1 (PAI-1) については、DNA 近傍領域における MR 結合は ChIP-seq と ChIP-qPCR 法によって確認されたものの、今回の実験条件において mRNA の発現上昇を認められなかった。

HPC についても同様の解析を行い、MR に関する ChIP-seq により同定された 4709 箇所の MR 結合領域近傍の 4451 遺伝子、マイクロアレイ解析により同定された MR 表的候補遺伝子 385 遺伝子の双方に共通した 102 遺伝子のうち、MR 標的遺伝子として Fgd4, Lipg, Rassf4 を同定した。

MR の DNA 結合プロファイルを明らかにすべく、MR の ChIP-seq 解析結果について HOMER により解析したところ、mDCT と HPC の双方において MR を含むステロイド受容体の共通結合配列である MRE/GRE の他に AP-1 結合配列が MRE 近傍に存在すること、さらに既報の他のステロイド受容体の ChIP-seq 解析結果と、私の MR に関する ChIP-seq 解析結果を比較したところ、DNA 結合配列を共有するにも関わらず実際の結合領域の一致は各ステロイド受容体結合配列のうち、mDCT と HPC のそれぞれで高々 1.9 %、4.2 % に留まることが明らかになった。

これらの結果と、今回の実験条件で実際に遺伝子転写を調節されていたのは両細胞において候補数に比べ少数であったことを考えると、リガンドによって活性化された MR の DNA 塩基配列上への結合は標的遺伝子転写発現に対する十分条件ではなく必要条件と考えられた。病的状態

における MR 標的遺伝子とその発現を決定付ける他の転写因子についての研究が重要と考えられる。

mDCT 細胞において MR の標的遺伝子として本研究で同定された 5 種類の遺伝子のうち、Sgk1 は他の細胞種におけるよく知られた MR 標的遺伝子であるが、mDCT 細胞もしくは遠位尿細管上皮細胞では WNK4 や Nedd4-2 の修飾を介して主要なナトリウム再吸収チャネルであるサイアザイド感受性 $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ 共輸送体 (NCC) の細胞膜での発現量を調節するという知見に富むものの、mDCT 細胞もしくは遠位尿細管上皮細胞におけるアルドステロン-MR 系による Sgk1 の発現量調節や MR の DNA 結合領域を同定したのは本研究が初である。Fkbp5 は HSP90 と共役しステロイド受容体を細胞質に留める役割を果たす蛋白質であるが、これまで mpkCCDc14 細胞や小腸上皮細胞において MR の標的遺伝子として報告されている。その役割から、Fkbp5 は mDCT 細胞においてアルドステロン-MR 系のネガティブフィードバック機構の一端を担っていると推測される。Tns1 は F-actin と結合し細胞間接着や細胞移動に寄与するリン酸化蛋白質であるが、Tns1 ノックアウトマウスでは近位尿細管の極性喪失や周囲の嚢胞形成が観察され腎不全に至ることから、アルドステロン-MR 系が mDCT 細胞の細胞骨格形成を通じ生理的な役割を果たしている可能性が示唆された。Ras112 は Ras ファミリー蛋白の一種でその構造から小分子 GTP 結合活性をもつことが予想されているが、その具体的な機能については全く知られていない。Tsc22d3 (Gilz) は腎集合管上皮細胞における MR 標的遺伝子として既に知られており、Extracellular regulated MAP kinase (ERK) のリン酸化を介した ENaC の細胞膜での発現量調節に関与している。ところが生体内の遠位尿細管上皮細胞における ENaC の細胞膜での発現量調節はアルドステロンによって調節されていないという報告があり、遠位尿細管上皮細胞における Gilz の役割は未だ不明確である。

HPC における MR 標的遺伝子のうち Fgd4 は GTPase 活性調節に関わる Rho GTPase guanine nucleotide exchange factor (GEF) であった。RhoA や Rac1 などの GTPase ファミリー蛋白の活性均衡の異常が足突起形成異常を介して蛋白尿発症につながるということが知られており、MR 活性化による蛋白尿発症機序に寄与することが推測される。

今回、私は mDCT 細胞における新規 MR 標的遺伝子として Sgk1、Fkbp5、Tns1、Ras112、Tsc22d3、HPC における新規 MR 標的遺伝子として Fgd4、Lipg、Rassf4 を、それぞれの細胞におけるゲノム全体の MR 結合プロファイルとともに同定した。これらの成果は高血圧や蛋白尿を伴う腎臓病の発症機序における MR の役割に関して更なる知見の獲得に寄与し、MR 拮抗薬の有害事象を回避できる腎臓病治療・創薬につながるものと考えられる。