

論文の内容の要旨

SIRT1 maintains podocyte homeostasis via regulation of actin fiber formation

(SIRT1 はアクチン線維形成の制御を介して糸球体足細胞の恒常性を維持する)

本西秀太

糸球体は腎臓における濾過装置であり、血液を濾過して尿を産生する最初の段階を担っている。濾過装置の本体は、糸球体毛細血管の血管内皮細胞、糸球体基底膜 (Glomerular basement membrane: GBM)、スリット膜の3層からなる。このうちスリット膜は、糸球体足細胞 (以下、単に足細胞とする) の突起 (一次突起) からさらに分岐した突起構造である足突起が規則的に配列し、その間隙に形成される特殊な細胞間構造である。近年、スリット膜の詳細な分子構造が明らかにされ、スリット膜構成因子の変異や欠損がネフローゼ症候群の原因となることが発見された。実際、臨床的に頻度の高いネフローゼ症候群の病型 (微小変化型ネフローゼ症候群、巣状分節性糸球体硬化症、糖尿病性腎症など) においても、足細胞障害が病態の中心となっていることが知られており、足細胞障害の機序の解明は、糸球体障害の病態理解、新規治療戦略を考える上でもきわめて重要である。

SIRT は、酵母の寿命延長作用に関する分子として発見された Sir2 (silent information regulator 2) の哺乳類におけるホモログであり、少なくとも SIRT1~7 までの7種類の分子の存在が知られている。このうち、SIRT1 は、カロリー制限による生存期間延長効果と関連する分子として注目され、最もよく研究されている。SIRT1 は NAD⁺依存性脱アセチル酵素であり、その作用の多くは、対象分子の脱アセチル化により発揮される。最近の研究により SIRT1 は代謝、炎症、ストレス応答などの多様な生理的現象に関与することが明らかにされてきており、臨床的にも糖尿病、神経変性疾患、心血管疾患、悪性腫瘍などの病態に関連することがわかってきている。腎臓領域においても、糖尿病性腎症などとの関連が報告されており、主として腎保護の方向に SIRT1 が働くことが示されつつある。これまでに、近位尿細管細胞やメサンギウム細胞などにおける SIRT1 の細胞保護効果について報告がなされているが、足細胞の SIRT1 の機能に関してはほとんど報告がなく、その分子機構は明らかにされていない。そこで我々は、足細胞における SIRT1 の細胞保護効果とその分子機序を解明することを目的として、研究を行った。

まず、Sirt1^{flox/flox} マウスと podocin-Cre マウスを交配させて足細胞 (podocyte) 特異的 Sirt1 欠損 (SIRT1^{pod^{-/-}}) マウスを作製し、足細胞の形態や機能について野生型マウスと比較検討を行った。無刺激条件下では生理学的パラメーター、腎機能、組織所見のいずれにおいても著変は見られなかった。そこで、疾患誘導刺激に対する脆弱性を評価するために、

ヒトにおいても急速進行性糸球体腎炎の一因として知られている、抗糸球体基底膜 (GBM) 抗体を投与し、糸球体障害を誘導した。その結果、投与 7 日後の SIRT1^{pod^{-/-}}マウスにおける血液尿素窒素 (BUN)、アルブミン尿は、野生型に比して有意な上昇を認め、腎機能障害、糸球体障害が増悪することを見出した。組織学的には、PAS 染色標本で各個体の糸球体を 100 個カウントし、半月体形成などの糸球体障害の割合を算出したところ、SIRT1^{pod^{-/-}}マウスにおいて障害糸球体の割合が有意に高く、生化学検査に一致して増悪傾向となることが確認された。次に、足細胞機能障害をより直接的に評価するため、疾患誘導を行ったマウスから糸球体を単離し、足細胞に特異的に発現するスリット膜関連分子の変化を観察した。単離糸球体サンプルを溶解して得た抽出液を用いてウェスタンブロット (WB) 解析を行うと、SIRT1^{pod^{-/-}}マウスでは野生型と比較して、足細胞特異的分子であるネフリン、シナプトポジン、WT-1 の発現が有意に低下していることが見出された。また、疾患惹起をしたマウスから摘出した腎臓から凍結切片を作製し、蛍光染色において上記分子の発現を観察すると、SIRT1^{pod^{-/-}}マウスにおける発現低下が野生型より強く認められ、足細胞障害の増悪が示唆された。さらに、電子顕微鏡により足細胞の詳細な形態変化を観察したところ、足細胞障害時の特徴的所見である足突起の消失が、SIRT1^{pod^{-/-}}マウスにおいて野生型よりも重篤化していた。また、糸球体基底膜近傍へのアクチン線維の集簇が増加しており、アクチン細胞骨格の攪乱・崩壊 (derangement) が増悪していることが示唆された。このように、足細胞における SIRT1 の欠損は、足突起の消失とアクチン細胞骨格の障害を伴う足細胞障害を惹起し、糸球体障害刺激に対する脆弱性を引き起こすことを見出した。すなわち、足細胞における SIRT1 は、足細胞の正常な構造、機能を維持するのに重要な役割を果たしていると考えられた。

この現象の背景となる分子メカニズムを解明するため、培養マウス足細胞を用いてさらなる実験を行った。酸化ストレスマーカーであるニトロチロシンの免疫染色にて、抗 GBM 抗体投与により足細胞に酸化ストレスが惹起されることが確認されたため、抗 GBM 抗体を模した細胞障害誘導剤として過酸化水素 (H₂O₂) を用いることとした。アクチン線維を検出する蛍光ファロイジンを使用して細胞染色を行い、SIRT1 の特異的阻害剤である EX527 によるアクチン線維の変化を観察した。EX527 により培養細胞を前処理して SIRT1 の活性を阻害すると、H₂O₂ によるアクチン線維の攪乱、断裂の著明な増悪が認められた。この変化は、他の SIRT1 阻害薬である cambinol、ニコチンアミドでも再現され、単なる薬剤毒性ではないことを確認した。逆に、SIRT1 の活性剤であるレスベラトロールで前処理した場合には、高濃度の H₂O₂ によるアクチン細胞骨格の崩壊の抑制効果が観察された。また、スクラッチアッセイにより細胞の運動性を調べたところ、SIRT1 阻害剤により足細胞の運動性が有意に抑制されることを見出し、細胞の運動に必要なとされる適切なアクチン線維の再構成、維持が、SIRT1 の阻害により抑制されることを発見した。これらの結果より、SIRT1 の活性がアクチン細胞骨格の維持に必要であることを証明した。

次に、悪性腫瘍においてアクチン線維の重合や安定化にはたらくことが知られているコ

ータクチンが、アセチル化により不活化されるという最近の報告に着目し、糸球体足細胞でのコータクチンのアセチル化状態を調べることにした。培養足細胞を用いた WB 解析を行ったところ、SIRT1 阻害剤によりコータクチンのアセチル化レベルが増加し、逆に SIRT1 活性剤でアセチル化が減少することを見出した。また、SIRT1^{pod⁺}マウスの単離糸球体を WB で解析すると、野生型に比してアセチル化コータクチンの割合が増加していることを発見し、細胞実験と一致する結果が得られた。培養細胞サンプルを用いた免疫沈降法により、SIRT1 とコータクチンが確かに結合していることも確認され、脱アセチル化酵素である SIRT1 が、足細胞内でコータクチンを直接脱アセチル化していることを示した。さらに、細胞染色によりこれらの分子の局在を検討したところ、コータクチンは核と細胞質に存在し、細胞質では部分的にアクチン線維と共存、あるいはアクチン線維に沿って存在することが観察され、アクチン線維にコータクチンが作用していることが示唆された。SIRT1 活性阻害下で酸化ストレスを与えアクチン細胞骨格が崩壊すると、コータクチンは核内に集積傾向を認め、細胞質におけるアクチンに沿ったコータクチンの線状の局在も同時に消失した。一方、アセチル化コータクチンと SIRT1 は核内にはほぼ限局して存在しており、細胞障害刺激でも明らかな変化は認められなかった。これらの結果から、核内でアセチル化コータクチンが SIRT1 により脱アセチル化されること、また、アセチル化コータクチンは核内に存在するためアクチン線維に作用できないが、脱アセチル化されると細胞質へ移動し、アクチン線維の安定化作用を発揮するようになることが予測された。そこで、培養細胞の核抽出、細胞質抽出サンプルを WB で解析したところ、核内ではアセチル化コータクチンは確かに SIRT1 阻害剤により増加するのに対し、細胞質にはほとんど存在が認められなかった。一方、コータクチン全体としては、SIRT1 阻害剤を投与すると核内では増加するのに対し、細胞質では逆に低下することがわかった。これらの結果は、上記の細胞染色の結果と合致しており、SIRT1 による脱アセチル化作用がコータクチンの核外輸送に働いているという仮説に合致する結果であった。

以上のように、足細胞における SIRT1 は、核内でアセチル化コータクチンを脱アセチル化し、コータクチンの核外輸送を促進することで、アクチン細胞骨格を制御し、足細胞の恒常性を保持していると結論した。