

審査の結果の要旨

氏名 本西秀太

本研究は糸球体足細胞におけるSIRT1の機能とその作用機構を明らかにするため、遺伝子改変マウスおよび培養足細胞を用いて分子機序の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 糸球体足細胞に発現するSIRT1の機能を解析するため、糸球体足細胞特異的Sirt1ノックアウト (KO) マウスを作製した。このマウスは無刺激状態では14週齢までの解析において野生型と明らかな変化を認めなかった。そこで、抗GBM抗体腎炎を惹起すると、野生型に比して、腎機能の悪化、アルブミン尿の増加、糸球体障害率の有意な増加を示すことを見出した。
2. 単離糸球体を用いたウエスタンブロット解析や蛍光免疫染色により足細胞特異的分子の発現を解析したところ、いずれもKOマウスで発現低下が重症化しており、足細胞障害そのものがSIRT1の欠損により明らかに増悪することが示された。電子顕微鏡観察においては、疾患惹起したKOマウスにおいて足突起消失が野生型に比して明らかに増悪するとともに、アクチン細胞骨格障害を示唆するアクチンの集簇所見が悪化することが示された。この結果をもとに、アクチン細胞骨格障害に注目し、培養細胞を用いた解析を継続した。
3. SIRT1特異的阻害薬、活性化薬を培養足細胞に投与し、ファロイジンによるアクチン線維の細胞染色を行ったところ、抗GBM抗体刺激を模した酸化ストレス刺激によるアクチン細胞骨格障害が、SIRT1阻害で増悪し、逆にSIRT1活性化により抑制されることが示された。また、スクラッチ・アッセイにより細胞運動性を観察したところ、SIRT1阻害薬の前処理により有意な運動性の低下が認められ、アクチン細胞骨格の維持、形成、再構成にSIRT1の脱アセチル化活性が必要であることが示された。
4. さらに、SIRT1がアクチン線維に作用するためのエフェクター分子として、コータクチンに着目し、SIRT1が足細胞内においてコータクチンを脱アセチル化することを明らかにした。細胞染色や免疫沈降検査、ウエスタンブロット解析により、SIRT1は核内においてアセチル化コータクチンを脱アセチル化することを示した。動物実験で用いたKOマウスにおいても、単離糸球体のウエスタンブロット解析にて確かにコータクチンのアセチル化レベルが増加しており、培養細胞の結果と一致していた。
5. SIRT1とコータクチンの局在を調べたところ、コータクチンは細胞質でアクチン線維に一致して、または、アクチン線維に沿うように存在すると同時に、核内にも分布が認められた。一方で、アセチル化コータクチンは核内に限局し、SIRT1の局在と一致していた。SIRT1阻害薬と酸化ストレスによる細胞骨格障害時には、細胞質のコータクチンは分布が乱

れてアクチン線維と解離し、核内に集積する傾向が認められた。さらに、細胞質分画、核分画サンプルを用いたウエスタンブロット解析により、SIRT1の阻害によってコアタクチンの細胞質成分が減少し、核内成分が増加することが示された。したがって、SIRT1は核内のアセチル化コアタクチンを脱アセチル化し、コアタクチンの核外輸送を促進することで、アクチン細胞骨格の維持に働くと考えられた。

以上、本論文は糸球体足細胞特異的Sirt1ノックアウトマウスの病態について明らかにするとともに、糸球体足細胞においてSIRT1が細胞保護に寄与する分子生物学的解析を行い、コアタクチンの脱アセチル化、核外輸送を介してアクチン細胞骨格の維持、保護に寄与するという革新的なメカニズムを明らかにした。本研究は糸球体足細胞障害、そして糸球体障害の病態生理の解明と、新たな治療法の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。