

一次繊毛を基軸とした小器官相互作用の病因論解明

東京大学大学院医学系研究科 CKD 病態生理学講座

稲城 玲子

【背景】

一次繊毛(primary cilia)は多くの細胞が持つアンテナのように細胞表面から突出したオルガネラである。近年、尿細管細胞の一次繊毛を介した細胞内シグナルの分子機序と尿細管障害(細胞死、炎症、線維化)における病因論が明らかになってきた。一方、小胞体やミトコンドリアなどのオルガネラの機能不全(オルガネラストレス)や、それによって生じるオルガネラ間相互作用 (organelle cross talk, organelle contact site)の低下が広汎な疾患の病因論として注目されている。申請者はこれまでに腎臓病における小胞体ストレスの病態生理学的意義、さらに小胞体ストレスを介した小胞体-ミトコンドリア間相互作用の低下が尿細管障害を増悪させることなどを明らかにしてきた。(1, 2) 一次繊毛に関してもミトコンドリアと相互作用し、その破綻が尿細管嚢胞形成促進に繋がることを報告してきたが(3)、尿細管炎症・線維化などの表現型との関連性は不明である。

【目標と作業仮説】

本研究では“一次繊毛は他のオルガネラと相互作用し、尿細管細胞機能恒常性に寄与している”という作業仮説の検証、それに基づく革新的尿細管細胞障害メカニズムの解明を目指し、腎臓病(一次繊毛遺伝子疾患を原疾患とするものは除く)における尿細管細胞の炎症や線維化と一次繊毛構造・機能の関連性を、オルガネラ間相互作用に焦点を絞り解析する。

具体的に以下の実験を遂行した。

- 1) 急性尿細管障害モデルマウスにおける一次繊毛の伸長の変化、及び一次繊毛構成分子の発現変動
- 2) ヒト近位尿細管細胞株を用いた上記in vivo研究成果の検証
- 3) 一次繊毛障害におけるミトコンドリア機能変動、尿細管細胞における一次繊毛-ミトコンドリア間相互作用の病態学意義

【研究手法・材料】

急性尿細管障害モデルマウス(シスプラチン誘導急性腎不全モデル)や標的の一次繊毛構成分子をsiRNA (siIFT88#1, siIFT88#2)を用いて遺伝子発現knock downさせたヒト尿細管上皮細胞株(RPTEC/TERT1)を用いて、1)一次繊毛の形態変動(アセチル化 α tubulinを用いたIF)、2)一次繊毛構成分子の発現変動(WB, real-time qPCR)、3)一次繊毛-オルガネラ間の機能変化(ミトコンドリア脂質代謝、細胞外フラックスアナライザーを用いたミトコンドリア酸素消費速度)を解析した。

【結果と考察】

1. 急性尿細管障害モデルマウス(シスプラチン腎症)における尿細管障害は一次繊毛障害を伴う

尿細管障害時に一次繊毛の形態・機能がいかに変化するかを検討するため、シスプラチン誘導急性腎

不全モデルマウスにおける一次繊毛の形態変化や一次繊毛構成分子群の発現変動を検討した。

その結果、シスプラチン誘導急性腎不全モデルマウスでは一次繊毛が短縮することが確認され、既存の報告(4)と一致していた。さらにこれまで我々が得たシスプラチン誘導急性腎不全モデルマウス由来腎臓のtranscriptomicsのデータから、一次繊毛構成分子群の発現変動のなかでも一次繊毛のアセンブリの維持に不可欠で繊毛内輸送を媒介する因子であるIFT88 (Intraflagellar Transport 88)の発現が著しく低下していることが明らかとなった(図1上段)。

また、腎臓におけるIFT88発現レベルはシスプラチン障害による腎機能低下レベルと相関していた。

2. シスプラチン障害による一次繊毛構成分子IFT88の発現低下は近位尿細管上皮細胞の一次繊毛短縮を引き起こす

上記のin vivoで認められた現象を、ヒト近位尿細管細胞株を用いて検証した。ヒト近位尿細管細胞株にシスプラチンで障害を与えると、一次繊毛の長さが短縮し、IFT88発現レベルも有意に低下することが明らかとなった(図1下段)。

このことから、シスプラチンによる近位尿細管細胞障害は、一次繊毛構成分子IFT88の発現低下を伴う一次繊毛短縮を伴っていることが、in vitroにおいても確認された。

3. IFT88の発現低下による一次繊毛障害はミトコンドリア機能を低下させる

我々はこれまでに、尿細管において一次繊毛の機能障害がミトコンドリアのROS(活性酸素)産生を促し、細胞機能障害(細胞増殖シグナル破綻)を招く事を報告してきた(3)。そこで、近位尿細管におけるIFT88の発現低下による一次繊毛障害がミトコンドリア機能に何らかの影響を及ぼすか、IFT88のオルガネラ間相互作用(一次繊毛-ミトコンドリア間コミュニケーション)に及ぼす影響を検討した。

その結果、siRNAを用いてIFT88発現を低下させたヒト近位尿細管細胞株(RPTEC/TERT1)においてはミトコンドリア機能、酸素消費速度が有意に低下すること、さらにミトコンドリア脂質β酸化

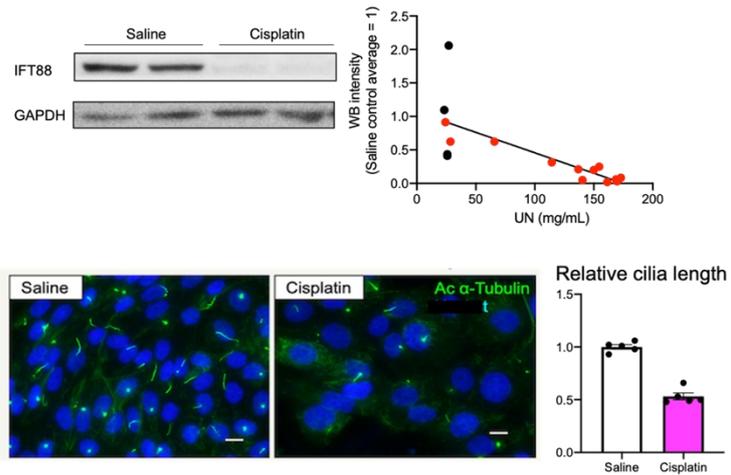


図1. シスプラチン障害尿細管では一次繊毛障害(構成分子発現異常・短縮)が生じる。

上段: シスプラチン障害による腎機能障害(UN:尿素窒素)に相関して、IFT88の発現は低下する。(●、シスプラチン腎症マウス、●未処置マウス)
下段: 培養近位尿細管細胞に発現する一次繊毛(Ac α-tubulin;アセチル化α-tubulin)はシスプラチン処理によって短縮する。

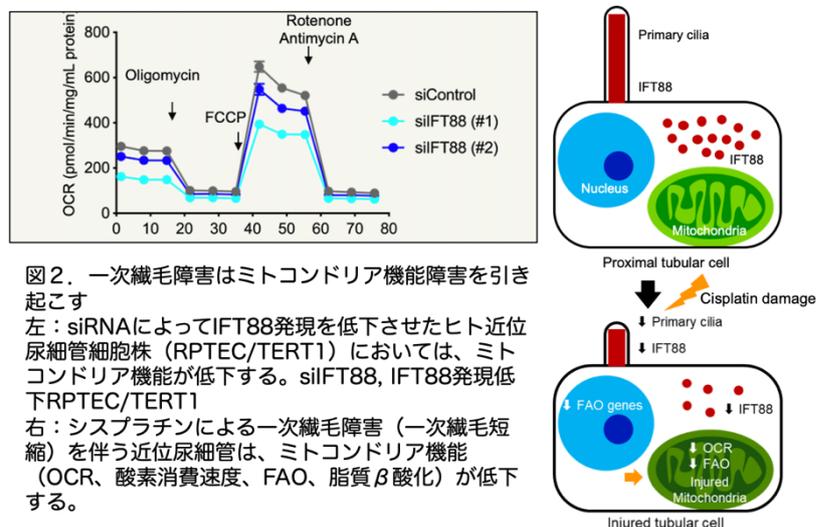


図2. 一次繊毛障害はミトコンドリア機能障害を引き起こす

左: siRNAによってIFT88発現を低下させたヒト近位尿細管細胞株(RPTEC/TERT1)においては、ミトコンドリア機能が低下する。siIFT88, IFT88発現低下RPTEC/TERT1

右: シスプラチンによる一次繊毛障害(一次繊毛短縮)を伴う近位尿細管は、ミトコンドリア機能(OCR、酸素消費速度、FAO、脂質β酸化)が低下する。

が低下することが示された（図2）。

以上の事から、シスプラチンによる急性の近位尿細管障害においては、一次繊毛構成分子IFT88の発現低下を伴った繊毛の短縮が生じ、それがミトコンドリアの機能低下（酸素消費速度低下、脂質β酸化低下）を引き起こし、尿細管細胞障害を惹起させることが明らかにした。この成果によって、一次繊毛はミトコンドリア機能維持に働いて、一次繊毛—ミトコンドリア間相互作用を介して尿細管細胞恒常性を担っていることが示唆された。

【総括】

本研究によって、尿細管障害モデルマウス（シスプラチン誘導急性腎不全）において、尿細管障害は一次繊毛の短縮や消失を伴うことを確認し、一次繊毛の形態学的、機能的変化が尿細管上皮細胞の恒常性に何らかの関連性を有することが明らかにされた。

一次繊毛の短縮や消失といった尿細管上皮細胞の変化がいかなる病態生理学的意義を呈するかを解明するなかで、尿細管障害時の一次繊毛構成分子群の発現変動を網羅的に解析したところ、1) 一次繊毛のアセンブリとその維持に不可欠で繊毛内輸送を媒介する因子であるIFT88 (Intraflagellar Transport 88)の発現が尿細管障害時（シスプラチンによる障害誘導時）に著明に低下し、2) 近位尿細管細胞におけるIFT88 siRNAによるIFT88 knock downは一次繊毛の短縮を引き起こす事などを明らかにした。さらに興味深いことに、IFT88発現を低下させた近位尿細管細胞の表現型として、ミトコンドリア機能低下（ミトコンドリアストレス）、特に脂質代謝の低下が見いだされた。このことから一次繊毛はミトコンドリアと機能的に繋がっており、その相互作用が近位尿細管細胞の恒常性維持に重要である事が判明した。

従来、遺伝性腎臓病（嚢胞腎）の要因として注目されてきた一次繊毛研究の新しい展開として、本研究では申請者が構築してきたオルガネラストレス、オルガネラ間相互作用に関する研究基盤を有機的に統合させ、学内・学外の医工連携（microfluid を再現したkidney on a chipを用いた尿細管細胞形態・機能解析など）による共同研究も取り入れることで、これまでになく独創的な成果が期待される。

【引用文献】

1. Hasegawa S, Inagi R. Organelle Stress and Crosstalk in Kidney Disease. *Kidney360*. 2020;1(10):1157-1164. doi: 10.34067/KID.0002442020.
2. Inoue T, Maekawa H, Inagi R. Organelle crosstalk in the kidney. *Kidney Int*. 2019;95(6):1318-1325. doi: 10.1016/j.kint.2018.11.035.
3. Ishimoto Y, Inagi R, Yoshihara D, Kugita M, Nagao S, Shimizu A, Takeda N, Wake M, Honda K, Zhou J, Nangaku M. Mitochondrial Abnormality Facilitates Cyst Formation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Mol Cell Biol*. 2017;37(24):e00337-17. doi: 10.1128/MCB.00337-17.
4. Kong MJ, Bak SH, Han KH, Kim JI, Park JW, Park KM. Fragmentation of kidney epithelial cell primary cilia occurs by cisplatin and these cilia fragments are excreted into the urine. *Redox Biol*. 2019 Jan;20:38-45. doi:10.1016/j.redox.2018.09.017.

【謝辞】

貴財団からの本研究へのご支援は、当科の研究活動の活性化を促すのみならず、コロナ禍の当科研究者の研究に対するモチベーションの向上に繋がりました。

重ねて2年間のご支援に心から感謝申し上げます。