

論文の内容の要旨

論文題目 : Endoplasmic Reticulum Stress Induces Autophagy
in Cultured Immortalized Renal Proximal Tubular Cells

小胞体ストレスは培養不死化近位尿細管細胞で
オートファジーを誘導する

指導教員 : 藤田敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科 医学博士課程 内科学専攻
平成 16 年 4 月入学

氏名 : 川上 貴久

オートファジーとは、酵母から哺乳類までの真核生物細胞で認められる、細胞内の自己分解機構である。これは、マクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーの 3 種に分類される。特に、マクロオートファジー（以下、特に断りが無い限りオートファジーと記載）は、この 10 数年で関与する分子が同定されたこともあり、最近様々な知見が急速に蓄積してきており、注目されている。オートファジーは、細胞内で 2 重膜が細胞質（細胞内小器官を含むこともある）を包み込み（これをオートファゴソームと呼ぶ）、それがリソソームと融合し、中身が分解される機構である。オートファジーは本来、飢餓状態などで細胞構成成分を自ら分解し、その分解産物を必要な同化にリサイクルする機構であるが、その役割は代謝にとどまらず、細胞死、発生、感染防御、神経変性など様々な現象で重要な役割を果たしていることが最近になり解明されてきた。

しかし、腎臓のオートファジーに関しては、糸球体上皮細胞のマクロオートファジーについて 1 報、尿細管上皮細胞のシャペロン介在性オートファジーについて数報の報告があるのみで、種々の腎疾患の病態生理で中心となる尿細管についてのマクロオートファジーの報告は皆無である。そこで我々は、尿細管細胞のオートファジーについて研究することとした。

さらに、腎疾患の病態生理の中から、尿細管細胞の小胞体ストレスに注目した。小胞体は、ペプチドのフォールディング、糖鎖修飾、酸化環境でのジスルフィド結合形成などのタンパクの翻訳後修飾、カルシウムイオンを介する細胞内情報伝達などの生理機能を持つ細胞内小器官であり、また、正常な機能・内部環境維持のためには、多くのエネルギーを必要とする。よって、糖鎖修飾の阻害、カルシウム蓄積の障害、酸化ストレス、低酸素、ブドウ糖欠乏などが小胞体ストレスを惹起する。これらはいずれも小胞体内のミスフォールディング蛋白を増加させる結果となり、**Unfolded Protein Response (UPR)**と呼ばれる真核細胞に共通する反応が起こる。これにより、蛋白のフォールディングに必要なシャペロン分子の誘導などの適応反応を生じるが、ストレスがその適応反応を上回ると細胞傷害さらには細胞死の転帰をとる。

尿細管細胞の小胞体ストレスは、急性腎不全、慢性腎臓病の進行、腎毒性物質による腎傷害などに関与することが分かっている。しかし、尿細管細胞における小胞体ストレスとオートファジーの関係については明らかでない。最近、酵母や哺乳類細胞で、小胞体ストレスによってオートファジーが誘導されると、数報の報告があった。

そこで我々は、ラット近位尿細管不死化培養細胞 (**Immortalized Rat Proximal Tubular Cell: IRPTC**) を用い、小胞体ストレスが近位尿細管細胞でオートファジーを誘導するという仮説を立て、検証した。

まず、オートファジーを検出する方法として、我々は特異的な分子マーカーである **LC3** のウェスタンブロットを用いた。このウェスタンブロットでは **LC3-I (16kD)**、**LC3-II (14kD)** の2バンドが観察され、後者はオートファゴソーム膜に組み込まれる。よって **LC3-II** の量がオートファゴソーム数、ひいてはオートファジーの指標となる。

この方法により、オートファジーの代表的刺激である飢餓状態で **IRPTC** にオートファジーが誘導されることを確認した上で、小胞体ストレスを与える代表的化合物である **tunicamycin (TM)** と **thapsigargin (TG)** で刺激したところ、**IRPTC** にオートファジーが誘導されることが示された。これは電顕により形態学的にもオートファゴソームの増加として確認された。

しかし、**LC3-II** の増加はオートファゴソームの増加を示すものの、新たな生成増加と分解抑制のいずれの可能性も考えられ、前者のみが真のオートファジー活性化と言える。その点を検証するため、オートファゴソームとリソソームの融合を阻害することでオートファゴソームの分解を抑制する作用を有する **bafilomycin A1** を用いた。この薬剤の単独刺激で、**LC3-II** の増加を認めた。これは、**IRPTC** のオートファゴソームが通常分解されていることを示しており、オートファジーが分解という本来の機能を果たしていることが明らかとなった。次に、**IRPTC** を **bafilomycin A1** の存在下で **TM** により刺激すると、十分な分解抑制下でも **LC3-II** の増加を認め、よって **TM** によるオートファゴソームの増加は分解抑制ではなく、新たな生成の増加によることが示された。

最後に、小胞体ストレスがオートファジーを誘導する機構について探索した。**MAP** キナ

一ゼには3つの経路があることが知られている。ERK, JNK, p38である。このうち、ERKの上流のMEK 1/2の阻害薬であるU0126を用いて、ERKの関与を調べた。TMでERKの活性化型であるリン酸化ERKがウェスタンブロットにて増加することが分かり、U0126はTMによるLC3-IIの増加とリン酸化ERKの増加をほぼ完全に抑制した。つまり、小胞体ストレスによるオートファジー誘導にはERKが必要であることが示された。しかし、JNKの阻害薬であるSP600125, p38阻害薬であるSB203580のいずれもTMによるLC3-IIの増加を抑制せず、JNKとp38はオートファジー誘導に関与していないことが示された。

これらの知見から、近位尿細管細胞において、小胞体ストレスはMAPキナーゼであるERKを介して、機能的なオートファジーを誘導することが解明された。