

審査の結果の要旨

氏名 川上 貴久

本研究は、各種腎疾患で傷害の対象となる近位尿細管細胞において、その病態生理の一つである小胞体ストレスと、最近様々な生命現象に関与することが知られているオートファジーという細胞内分解機構との関係を明らかにするため、培養不死化近位尿細管細胞を用いて小胞体ストレスがオートファジーを誘導するか否かの解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 培養細胞は Immortalized Rat Proximal Tubular Cell (IRPTC)を用いた。オートファジー誘導を検出する方法としては、まずオートファジー誘導に関与する Autophagy related gene (Atg) 8 の mammalian homolog 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 16kD の LC3-I と 14kD の LC3-II の 2 つのバンドが得られ、LC3-II がオートファジーに特徴的な細胞内構造物であるオートファゴソームの膜に組み込まれた状態であり、その増加がオートファジーの誘導を示す。IRPTC をオートファジー誘導の代表的条件である飢餓状態(アミノ酸非含有培地)にしたところ、LC3-II の増加を認め、この検出系が有効であることを確認した。小胞体ストレスを惹起する代表的薬剤である tunicamycin, thapsigargin で IRPTC を刺激し、両者とも濃度依存的、時間経過とともに LC3-II の増加を認め、オートファジーの誘導が示唆された。
2. オートファジー誘導を形態学的にも確認するため、電子顕微鏡による観察を行った。IRPTC を飢餓状態にすると IRPTC の細胞内に、細胞質が膜に包まれたオートファゴソームと呼ばれる構造物が増加し、オートファジー誘導が示唆された。tunicamycin, thapsigargin で小胞体ストレスを惹起しても同様にオートファゴソームの増加が観察された。
3. オートファジーの本態は、オートファゴームが形成され、それがリソソームと融合し、オートファゴソームの内部が分解されることにある。これまでの結果から小胞体ストレスでオートファゴソームが増加することが明らかとなったが、それはオートファゴソームの形成増加と分解抑制のいずれの可能性も考えられる。そこでオートファゴソームとリソソームの融合を阻害し、その後の分解も進まなくなる Bafilomycin A1 という薬剤を用いた。始めに IRPTC を Bafilomycin A1 のみで刺激したところ、LC3-II が増加した。これは通常は LC3-II が分解されて減少していること、つまりオートファゴソームが分解されていることを示し、IRPTC のオートファジーが細胞質の分解という本来の機能を果たしていることが分かる。次に、Bafilomycin A1 存在下で小胞体ストレスを誘導する tunicamycin で共刺激したところ、Bafilomycin A1 単独よりもさらに LC3-II が増加した。これは、オートファゴソーム分解阻害下でも小胞体ストレスがオ

4. 小胞体ストレスがオートファジーを誘導する情報伝達経路として MAP キナーゼについて探求した. tunicamycin 刺激により ERK の活性型であるリン酸化 ERK が増加することがウェスタンブロットにより示され, また ERK 経路を抑制する U0126 を用いると, tunicamycin による LC3-II 増加が抑制された. しかし, JNK を抑制する SP600125, p38 を抑制する SB203580, のいずれも tunicamycin による LC3-II の増加を抑制しなかった. 以上より, 小胞体ストレスは ERK 経路を介してオートファジーを誘導することが示された.

以上, 本論文はラット近位尿細管不死化培養細胞 IRPTC において, 小胞体ストレスが ERK 経路を介して機能的なオートファジーを誘導することを明らかにした. 本研究はこれまで未知に等しかった, 尿細管細胞におけるオートファジーの解明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.