

平成 2 6 年 6 月 1 8 日現在

機関番号： 2 2 7 0 1

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2012 ~ 2013

課題番号： 2 4 7 9 0 8 5 3

研究課題名（和文）老化関連遺伝子 p 6 6 S h c の腎障害進展への関与についての検討

研究課題名（英文）Lifespan determinant adaptor protein p66Shc and kidney diseases.

研究代表者

押川 仁（Oshikawa, Jin）

横浜市立大学・医学（系）研究科（研究院）・客員研究員

研究者番号： 5 0 3 8 1 4 7 1

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円、（間接経費） 990,000 円

研究成果の概要（和文）：老化関連遺伝子p66Shcは、ミトコンドリア内の活性酸素種生成を促進することが知られている。本研究では腎臓病進展におけるp66Shcの作用を検討した。まず、尿毒症物質の一つであるインドキシル硫酸で尿細管細胞を刺激したところ、p66Shcが活性化されることが分かった。また、p66Shcが細胞内酸化ストレスを増加させることも確認できた。細胞障害、アポトーシス、老化に関わるp21の活性もp66Shcにより調節されていることが分かった。以上から、インドキシル硫酸による尿細管障害にはp66Shcが関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The adaptor protein p66Shc is a lifespan determinant that integrates metabolic and longevity pathways, and plays a critical role in oxidative stress-mediated aging, cardiovascular diseases. In this study, we investigated the role of p66Shc in kidney diseases. Indoxyl sulfate, one of the uremic toxin, activated p66Shc in the cells derived from proximal convoluted tubule. Furthermore, p66Shc promoted the oxidative stress in proximal convoluted tubule. p21 was regulated by the activities of p66Shc. It was suggested that p66Shc promotes the renal tubular disorder by indoxyl sulfate.

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード： 酸化ストレス ミトコンドリア 細胞老化 尿細管障害

## 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは腎臓を含めた様々な心血管系臓器において病的な、あるいは生理的な役割を持つことが明らかにされてきている。酸化ストレスは活性酸素とその消去系のバランスが崩れた状態を示すが、活性酸素の産生源として、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞において細胞膜上の NADPH oxidase が重要な働きを持つことが報告されている。すなわち NADPH oxidase が VEGF、Angiotensin II などの刺激を受けて活性化されると、スーパーオキシドや過酸化水素などの活性酸素種が産生される。これらの活性酸素種は低濃度であれば、細胞増殖や遊走などの生理的な機能を引き起こすが、高濃度になると細胞のアポトーシスや老化などの機能異常をもたらすことが知られている。腎臓においても同様の機序で酸化ストレスが腎障害を進展させているとの報告がなされているものの、まだ解明すべき点が多い。

酸化ストレス、アポトーシス、老化を調節する蛋白として p66Shc と呼ばれる蛋白が重要な役割を持つことが明らかにされてきている。Shc は MAPK シグナルにおけるアダプター蛋白として知られており、p46Shc, p52Shc, p66Shc の 3 つのアイソフォームを持つ。1999 年に p66shc のノックアウトマウスが通常のマウスよりも 30% 長寿であることが報告 (Migliaccio et al. Nature 402: 309-313, 1999) されて以降、その機序についての研究が複数の研究施設からなされている。その機序として p66shc の CH2 ドメイン 36 番目のセリン (Ser36) リン酸化が酸化ストレスを調節する機能を持つことが分かってきた。リン酸化された p66Shc はミトコンドリアに translocate し、ミトコンドリア内呼吸鎖のチトクローム c から電子を受け取り、ミトコンドリア内に過酸化水素を産生することが報告されている (Giorgio et al. Cell 122: 221-233, 2005)。すなわち、NADPH

oxidase と並ぶ細胞内の主要な活性酸素産生源であるミトコンドリア由来の活性酸素種 (過酸化水素) を制御しているのが p66Shc ということになる。p66Shc ノックアウトマウスは心血管系においても酸化ストレスが減少し、心血管疾患の進展が抑制されることから、p66Shc は心血管疾患において増悪因子であり、治療の標的として認識されるに至っている。

## 2. 研究の目的

そこで本申請の目的は、腎臓の糸球体メサンギウム細胞あるいは近位尿細管細胞における p66Shc の機能を明らかにし、細胞内あるいはミトコンドリアにおける酸化ストレスを介した慢性腎臓病 (CKD) の進展、急性腎障害 (AKI) 発症機序への関与を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) 腎メサンギウム細胞および腎近位尿細管における p66Shc セリン 36 リン酸化

本研究を進めていくうえで最も基礎的な検討となる。細胞として、初代培養メサンギウム細胞あるいはヒト近位尿細管細胞 HK-2 を用い、様々な刺激で p66Shc のセリンリン酸化を検討した。刺激として、Angiotensin II や Aldosterone などの RAS 刺激薬や腎毒性薬剤やインドキシル硫酸などを添加した。VEGF 刺激では血管内皮細胞において 5 分以内に p66Shc セリン 36 リン酸化が観察されたが、報告では刺激後 24 時間以降にリン酸化のピークを持つものもある。したがって、5 分程度から 72 時間程度の幅を持って p66Shc のリン酸化を検討した。p66Shc pSer36 に対する特異的な抗体は Calbiochem からのみ販売されており、これを利用して、ウェスタンブロッティングにより観察した。

(2) p66Shc ノックダウンによる細胞内シグナルおよび酸化ストレスの変化

p66Shc のノックダウンには siRNA を用いた。他のアイソフォームをノックダウンしないよう、p66Shc にのみ存在する CH2 ドメイン内の配列から siRNA を作製し、これを用いた。p66Shc siRNA あるいは control siRNA を transfect した細胞を用い、下流シグナルの活性を検討した。

細胞のアポトーシスや老化に関する蛋白として、Akt や FOXO3 のリン酸化を確認した。また酸化ストレス消去系である MnSOD も p66Shc によりその発現が調節されており、その変化を確認した。p53 や Bax, p21 などのアポトーシス関連蛋白の発現も観察した。次に、酸化ストレスの変化を観察した。酸化ストレスは、DCF-DA による染色で検出した。p66Shc siRNA 処理した細胞では酸化ストレスが減少していることが予想されるが、これにより腎の細胞における活性酸素産生が p66Shc を介していることを示すことができると考えられる。

### (3) p66Shc ノックダウンによる細胞のアポトーシス、老化の検討

p66Shc を介した活性酸素が、アポトーシスや細胞の老化にどのように関与しているかを調べた。アポトーシスは TUNNEL 法や caspase 活性の測定により評価した。細胞の senescence (老化) は、老化した細胞だけ特異的に検出する SA- $\beta$ -Gal staining により評価した。これらの実験は siRNA 処理した細胞で行った。

## 4. 研究成果

HK-2 細胞に対し、各種刺激を行い、p66Shc-Ser36 のリン酸化を確認した。Aldosterone, Angiotensin では、刺激はほとんどかからずシグナルも安定しなかったが、インドキシル硫酸(IS)では明確に Ser36 リン酸化が起こった。4mM のインドキシル硫酸刺激にて 6 時間目よりリン酸化を認め、24

時間 ~ 72 時間まで持続し、48 時間にピークを認めた (図 1)。

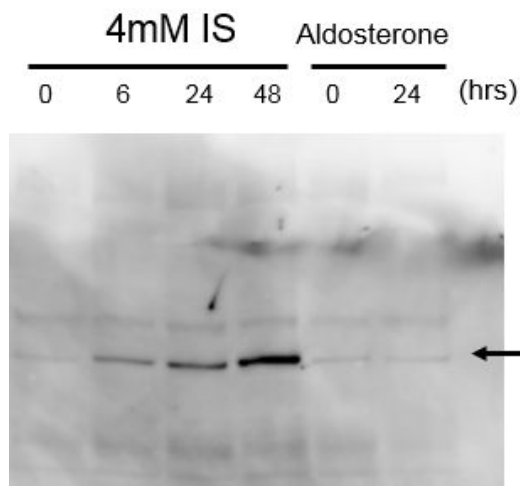


図 1. インドキシル硫酸 (IS) または Aldosterone 刺激後の p66Shc-Ser36 リン酸化

p66Shc-Ser36 リン酸化に伴う下流シグナルの変化を確認したが、Akt のリン酸化、p21 の発現量の増加が著明であり、これらをターゲットとして実験をすすめることにした。p66Shc に対する siRNA を用い、p66Shc がノックダウンされた HK-2 細胞を用いて検討したところ、Akt のリン酸化は p66Shc ノックダウンしても変化はみられなかったが、p21 の発現量が p66Shc ノックダウンにより減少しており、p21 を介した細胞障害、アポトーシス、細胞老化を p66Shc が促進させていることを示唆する所見であった。細胞内酸化ストレス状態を検討するために、DCF-DA による染色を行ったところ、p66Shc siRNA で p66Shc をノックダウンした HK-2 細胞では、DCF-DA のシグナルが減弱し、またインドキシル硫酸 (IS) による DFC-DA シグナルの増強が著明に抑制された (図 2)。この結果から、インドキシル硫酸による酸化ストレスは p66Shc を介していることが明らかになったといえる。

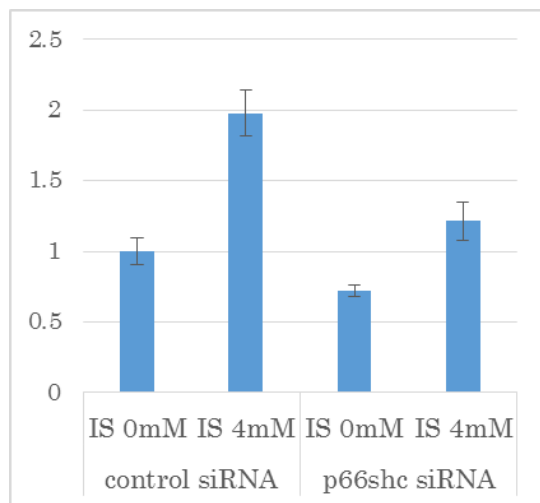


図2 control または p66Shc siRNA 処理した HK-2 細胞におけるインドキシル硫酸(IS)刺激後の DFC-DA 蛍光強度の比較

以上の結果から、p66Shc は近位尿細管障害の過程において、ミトコンドリアからの活性酸素種の産生増加、p21 の活性化を介して、細胞毒性を惹起しているものと考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

Oshikawa J, Kim SJ, Furuta E, Caliceti C, Chen GF, McKinney RD, Kuhr F, Levitan I, Fukai T, Ushio-Fukai M: Novel role of p66Shc in ROS-dependent VEGF signaling and angiogenesis in endothelial cells. ***Am J Physiol Heart Circ Physiol*** 302: H724-C732, 2012. ( 査読有 )  
DOI: 10.1152/ajpheart.00739.2011

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

押川 仁 ( OSHIKAWA, Jin )

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号 : 5 0 3 8 1 4 7 1