

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860641

研究課題名(和文) 生理的小胞体ストレス応答から診る腎疾患の病態解明

研究課題名(英文) Physiological function of unfolded protein response in kidney

研究代表者

加藤 裕紀 (Kato, Hironori)

宮崎大学・医学部・その他

研究者番号：40610283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は腎臓における生理的小胞体ストレス応答の役割を明らかにするために、小胞体ストレスセンサータンパク質の活性化に係る分子に着目した。得られた研究成果は、(1)小胞体ストレスセンサータンパク質の活性化に寄与する分子を複数同定した、(2)これらの分子の機能を調整することで、生理的小胞体ストレス応答の破綻の改善が、in vitro、in vivoで細胞傷害・細胞死を緩和した、(3)同定した分子と小胞体ストレスセンサータンパク質は相互作用し、ストレス条件下だとその結合が増強された。このことから、正常な生理的小胞体ストレス応答の誘導の維持は、ストレスから腎細胞の保護に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The unfolded protein response (UPR) implicates in renal diseases. However, recent studies indicated that physiological UPR, which is known as weak signaling pathway, associated to various biological phenomena. Here, this study investigated that activation mechanisms of physiological UPR in kidney and especially focused on regulator and adaptor proteins of ER stress sensors. I found that (1) a novel regulator proteins were identified, (2) down-regulation of regulator proteins was alleviated stress-induced renal injury and apoptosis in both in vitro and in vivo, (3) identified regulator proteins interacted with ER stress sensors, which was substantially enhanced during stress condition. These data suggest a possibility that the proper activation of physiological UPR contribute to cell homeostasis in kidney.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生理的小胞体ストレス応答 腎臓

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞質タンパク質やリン酸脂質構成等の変動に伴った細胞内環境変化により生ずる生理的小胞体ストレス応答(生理的UPR)の役割やその破綻が要因となり生ずる病態生理が様々な組織において注目されている。生理的UPRは全身ユビキタスに生じているが、腎臓で誘導されているその基底レベル(生理的条件下で活性化されているレベル)は高く、腎機能を保持する上で重要な役割を担っていることが予想される。それは、腎臓の本質的な役割に起因する。腎臓は(1)タンパク質代謝物(老廃物)の排出、(2)体液の恒常性の維持、(3)ビタミンDの活性化、レニンおよびエリスロポエチンの産生等の内分泌と代謝調整を担っている。腎臓はこのような生理機能を恒常的に稼働しているため、絶えず様々な負荷がかかり、著しい細胞内環境変化が生じている組織として考えられている。このことから腎臓では、上述の(1)～(3)の機能を保持する上で、細胞内環境を調整するための管理システムが恒常的に働いていることが想定されているが、未だその分子機序は明確にされていない。

2. 研究の目的

腎臓は加齢や種々のストレスに伴い機能低下を呈する組織として知られているが、その発症・進展に関わる分子機構は未だ明らかにされていない。これまで、腎臓病学の分野において小胞体ストレスは病態生理のひとつとされていたが、最近の申請者等の研究成果から、各種腎病変で観察される重度の小胞体ストレスが、生理的UPRの微弱なシグナルの破綻から生じていることが分かり始めてきた。さらに、生理的UPRは炎症性サイトカインに対する不応答性を獲得させることで腎機能の保持に寄与していたが、それは加齢をはじめとするストレスに脆弱なシグナルであることが予想されている。本研究は、生

理的UPRの活性化に関与する分子群を探索することで、腎機能の保持に係る生理的UPRの本質的な役割とその破綻による病態生理を *in vitro*・*in vivo* で明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1)生理的UPRは小胞体ストレスセンサータンパク質により制御されている。そこで小胞体ストレスセンサータンパク質の活性化機序に関与することが考えられる候補分子の gain-of-function 実験を行い、生理的UPRの活性化に寄与する分子をスクリーニングした。

(2)(1)とは逆に loss-of-function 実験を行った。

(3)(1)および(2)のスクリーニングから得られた分子群を腎細胞培養系で過剰発現し、小胞体ストレス、酸化ストレス、重金属ストレスにより誘導される細胞傷害および細胞死を解析した。

(4)(3)とは逆に分子の機能をいくつかの方法で阻害(ノックアウト、阻害剤)し、小胞体ストレス、酸化ストレス、重金属ストレスにより誘導される細胞傷害および細胞死を解析した。

(5)(1)～(4)までに得られた結果から、分子Xに着目した。分子Xの阻害剤をマウスへ投与し、*in vivo* 実験を行い、小胞体ストレス、酸化ストレス、重金属ストレスにより誘導される腎傷害を解析した。

(6)分子Xがどのようにして小胞体ストレスセンサータンパク質の活性化を制御しているのかを明らかにするために、小胞体ストレスセンサータンパク質と分子Xの相互作用

を免疫沈降法によって解析した。

分子 X の具体的な記載は論文作成のため伏せ字とした。

4. 研究成果

(1) 小胞体ストレスセンサータンパク質の活性化に關与する候補分子を腎尿管上皮細胞の培養系に過剰発現した結果、定常状態で小胞体ストレスセンサータンパク質の活性化を誘導する分子を複数同定した。

(2) 腎尿管上皮細胞の培養系で siRNA および shRNA を用いて候補分子の発現を抑制した結果、小胞体ストレスを惹起した際に誘導される小胞体ストレスセンサータンパク質の活性化を抑制する分子を複数同定した。

(3) (1) および (2) で同定した分子群を過剰発現した腎尿管上皮細胞の培養系に小胞体ストレス、酸化ストレス、重金属ストレスを暴露し、細胞傷害および細胞死の評価マーカーをウエスタンブロット解析、細胞染色解析を行った結果、分子 X の過剰発現が細胞傷害および細胞死を増悪させることが明らかになった。

(4) 分子 X を CRISPR/Cas9 によるゲノム編集でノックアウトした培養細胞および阻害剤を用いて解析を行った結果、分子 X の機能を低下させることで、小胞体ストレス、酸化ストレス、重金属ストレスにより誘導される細胞傷害および細胞死を緩和することを明らかにした。

(5) あらかじめマウスへ分子 X の阻害剤を腹腔内投与した上で、腎臓へ小胞体ストレス、酸化ストレス、重金属ストレスによる腎尿管上皮細胞の傷害を引き起こした結果、*in vivo* 実験においても分子 X の機能を阻害する

ことで細胞傷害および細胞死が著しく緩和することを明らかにした。

(6) 小胞体ストレスセンサータンパク質と分子 X の相互作用を免疫蛍光染色および免疫沈降法を用いて解析した結果、これらのタンパク質が相互作用することが明らかになった。これらの相互作用は、小胞体ストレスの惹起により増強するが、定常状態においても誘導されていることが明らかになった (図 1)。

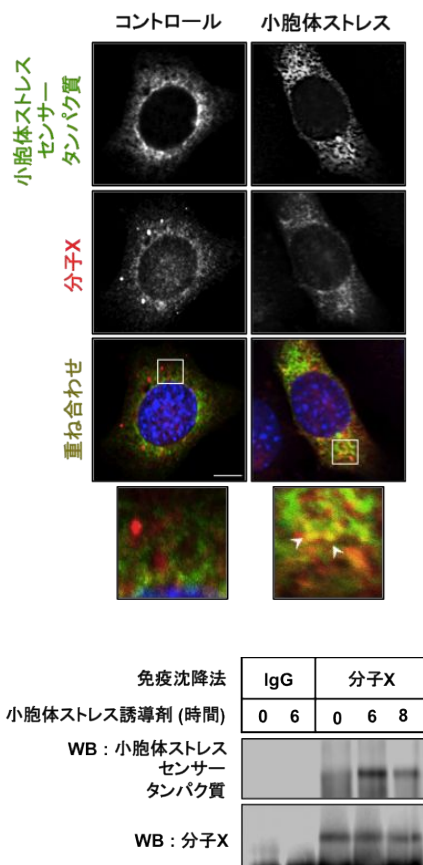


図 1 : 小胞体ストレスセンサータンパク質と分子 X の免疫蛍光染色と免疫沈降法による解析

以上の結果から、分子 X が小胞体ストレスセンサータンパク質に結合することで、定常状態から生理的 UPR を誘導していることが考えられる。今後は、*in vivo* で老化に伴う腎機能障害において分子 X と小胞体ストレスセンサータンパク質の結合による生理的 UPR の

役割を明らかにすることで、腎機能の保持に係る生理的UPRの本質的な役割とその破綻による病態生理を *in vitro*・*in vivo* で明らかにしたい。

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2件)

Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Takami Y, Fitriah PS, Kato H, Honda A, Hatta T, Natsume T, Sato T, Kai H, Ichijo H, and Nishitoh H: Preemptive quality control protects the ER from protein overload via the proximity of ERAD components and SRP. *Cell Rep.*, 13:944-956, 2016. 査読あり

Kato H, Nishitoh H. Stress responses from the endoplasmic reticulum in cancer. *Front Oncol.* (Review article) 5:93 eCollection, 2015. 査読あり

[学会発表](計1件)

加藤裕紀、西頭英起、小胞体ストレス受容体タンパク質はミトコンドリア機能障害時に統合的ストレス応答の発動に関与する、第38回日本分子生物学学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会(2015年12月1日~4日)、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

[図書](計1件)

加藤裕紀、西頭英起. 小胞体から配信されるストレスシグナリング. 実験医学増刊号. 知る・見る・活かす! **シグナリング研究2015 シグナル伝達の要素発見から時空間ダイナミクスへ.** Vol.33 No.10. P99-105. 2015年6月.

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 裕紀 (KATO HIRONORI)
宮崎大学・医学部・特別研究員
研究者番号: 40610283

(2)研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし