

# ポドサイトにおける SIRT1 の新たな役割

—SIRT1 によるポドサイト細胞骨格維持の新しい分子機序—

本西秀太 稲城玲子

東京大学大学院医学系研究科 CKD 病態生理学講座

key words : アクチン細胞骨格, コータクチン, 脱アセチル化, 蛋白尿, ポドサイト特異的 SIRT1 欠損マウス

## 要 旨

糸球体足細胞（ポドサイト）バイオロジーの研究分野で、最近注目されている分子のひとつに Sirtuin1 (SIRT1; silent mating type information regulation 2 homolog) があげられる。SIRT1 はヒストン脱アセチル化酵素で、代表的なエピゲノム調節因子である。つまり SIRT1 はヒストンのアセチル化修飾を抑えてゲノム構造を縮め (DNA のヒストンへの巻きつけを強めて) 転写を OFF にすることで遺伝子発現制御に関わる。われわれはポドサイトにおける SIRT1 の役割を探索する中で、SIRT1 の新しい脱アセチル化標的分子としてコータクチン (cortactin) を見だし、コータクチンが SIRT1 によって適切に脱アセチル化されることでアクチン細胞骨格が機能的に維持されることを明らかにした。この SIRT1-コータクチン-アクチン経路はアクチン細胞骨格維持を介してポドサイト機能恒常性にきわめて重要であるため、その破綻は蛋白尿の原因となることもわかってきた。

## 1 緒 言

糸球体の濾過機能を司るポドサイト (podocytes) の機能恒常性は、腎機能の維持の要である。これまでの多くの研究によって、そのポドサイトの機能維持に寄与する分子群やそれらによる適応応答が明らかにされてきた。われわれもポドサイトが様々なストレス

(酸化ストレス、小胞体ストレスなど) を回避する反応経路を有し、細胞の機能維持に務めることや、それらの均衡が破綻することが蛋白尿の一因となることを報告してきた<sup>1,2)</sup>。特に蛋白尿を伴う腎疾患モデル動物において、過剰な小胞体ストレスシグナル (unfolded protein response; UPR) 活性化がポドサイトの形態や機能に影響を及ぼすことを示してきた<sup>3)</sup>。

近年、腎臓病の病態形成・進展に関わる要因として、腎臓細胞におけるエピゲノム変化が注目されている<sup>4)</sup>。エピゲノムとは DNA 塩基配列に変化を与えず、DNA やヒストンへの化学修飾 (メチル化、アセチル化) が規定する遺伝情報のことで、後天的な環境要因によって生じる遺伝子発現制御機構のひとつである。つまり、腎障害を引き起こすストレス (虚血など) は腎臓細胞のゲノムの構造、あるいは microRNA (20~25 塩基ほどの小さな RNA で mRNA の転写や翻訳を制御する) の発現レベルを変化させる。そうしたエピゲノム変化が細胞の遺伝子発現パターンをダイナミックに変化させ、病態形成・進展に関与することがわかってきた。ゲノムの構造、つまりヒストンと DNA の巻きつきの強さを変化させる因子としてクロマチンのアセチル化酵素や脱アセチル化酵素がよく知られており、それらの発現が病態において変動することや、それを正常化することで病変が改善できる可能性などが示唆され今後の治療戦略として注目されている。

われわれも腎機能恒常性におけるエピゲノムの病態

The effect of SIRT1 on maintenance of actin cytoskeleton of podocytes

Division of Chronic Kidney Disease (CKD) Pathophysiology, The University of Tokyo, Graduate School of Medicine

Shuta Motonishi

Reiko Inagi

生理学的意義を目的に、エピゲノム制御因子のひとつである SIRT1 (ヒストン脱アセチル化酵素で、酵母の長寿遺伝子 Sir2 のヒトホモログ) のポドサイトにおける役割を検討してきた。その結果、予想に反し、SIRT1 がヒストン脱アセチル化を介してエピゲノムを変化させるだけでなく、細胞骨格関連分子のアセチル化レベルを制御し、ポドサイトの機能的形態維持に深く関与するという新たな細胞骨格制御機構を見いだした<sup>5)</sup>。本稿では、そのポドサイトにおける SIRT1 の新たな機能を述べ、SIRT1 によるポドサイト機能恒常性維持の新たな分子メカニズムを総括する。

## 2 糸球体腎炎モデルマウスにおいて、SIRT1 の欠損はポドサイト障害を増悪させる

われわれは SIRT1 のポドサイトにおける働きを *in vivo* にて調べるために、SIRT1<sup>fllox/fllox</sup> マウスとポドサイト特異的発現 Cre (ポドシン Cre) マウスを交配して、ポドサイト特異的 SIRT1 欠損マウス (SIRT1<sup>pod/-</sup> マウス) を作製した。SIRT1 の欠損は単離糸球体を用いたウエスタンブロット (WB) により確認した。無刺激の状態では、SIRT1<sup>pod/-</sup> マウスは生理学的変化を認めず、腎組織病変や腎機能、尿中アルブミン排泄量も野生型と変わらなかった。

そこで、われわれは SIRT1<sup>pod/-</sup> マウスのポドサイトが腎毒性物質に対して脆弱であるか否かを検討するため、抗糸球体基底膜 (GBM) 抗体を含む腎毒性血清 (nephrotoxic serum; NTS) を単回投与し、NTS 糸球体腎炎 (抗 GBM 抗体糸球体腎炎) を惹起したうえで比較検討した。すると、NTS 糸球体腎炎を惹起した

SIRT1<sup>pod/-</sup> マウスでは、投与 7 日後の時点で、半月体形成や係蹄壊死といった障害をきたした糸球体の割合が野生型マウスの約 2 倍に有意に増加し、尿細管内の円柱形成も有意に増加することが示された (図 1)。尿中アルブミン排泄量は野生型に対して SIRT1<sup>pod/-</sup> マウスでは有意に増加 (野生型:  $28.3 \pm 5.5$ , SIRT1<sup>pod/-</sup>:  $93.5 \pm 18.5$  mg/mg Cr,  $P < 0.05$ )、BUN も SIRT1<sup>pod/-</sup> マウスで有意に高値を示し、腎機能が増悪することを見出した (野生型:  $21.6 \pm 0.9$ , SIRT1<sup>pod/-</sup>:  $26.1 \pm 1.0$  mg/dl,  $P < 0.05$ )。ちなみにこれらの変化は、NTS に対する免疫応答の差異にもとづくものではなかった。

さらにわれわれは、単離糸球体を用いた WB 解析および凍結切片を用いた蛍光免疫染色を行い、NTS 糸球体腎炎を惹起した SIRT1<sup>pod/-</sup> マウスでは、ネフリン、WT1、シナプトポジンといったポドサイト特異的な蛋白の発現低下が増悪すること、すなわち、NTS によるポドサイト障害が SIRT1<sup>pod/-</sup> マウスにおいて有意に増悪することを証明した。

## 3 足突起消失やアクチン細胞骨格障害が SIRT1<sup>pod/-</sup> マウスで有意に増悪する

われわれはさらに SIRT1<sup>pod/-</sup> マウスのポドサイト障害を詳細に検討するため、電子顕微鏡観察により形態変化を解析した。NTS 投与 7 日後の時点で、ポドサイト障害を示す所見である足突起の消失は SIRT1<sup>pod/-</sup> マウスにおいて有意に増悪していることが確認された (図 2)。足突起の GBM 上の長さの平均値は、野生型で  $0.3 \mu\text{m}$  程度なのに対し、SIRT1<sup>pod/-</sup> マウスでは  $1.2 \mu\text{m}$  を超えていた。この変化は、アクチン線維の

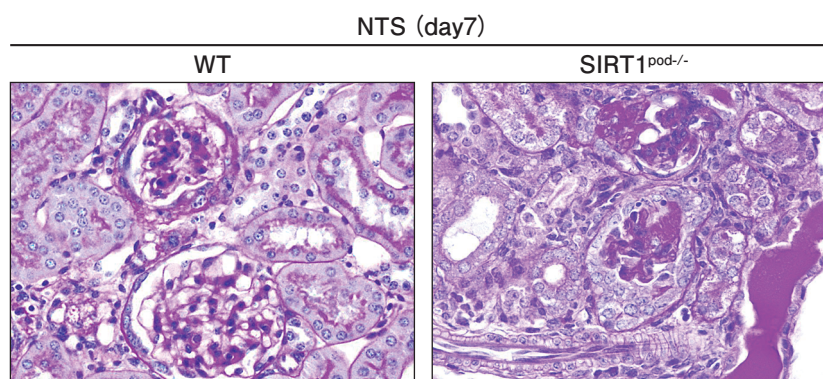


図 1

nephrotoxic serum (NTS) 投与により惹起される糸球体腎炎 (7 日後) は、ポドサイト特異的 SIRT1 欠損マウス (SIRT1<sup>pod/-</sup>) において、野生型マウス (WT) に比し、糸球体障害の増悪 (半月体形成や係蹄壊死) が認められた。それに伴って円柱像も増加した。



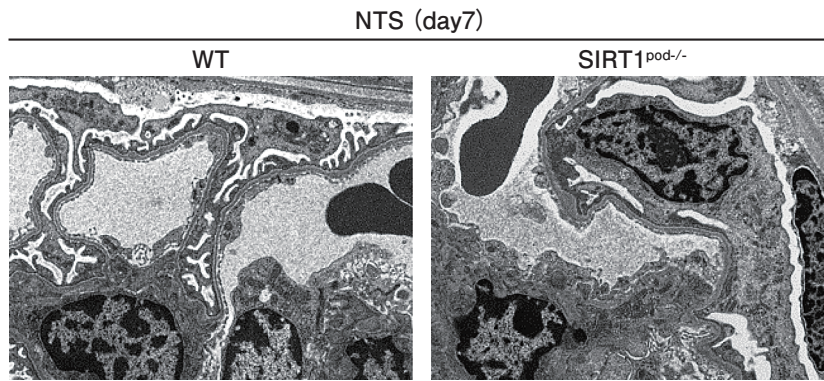


図2

nephrotoxic serum (NTS) 投与により惹起される糸球体腎炎 (7日後) は、ポドサイト特異的 SIRT1 欠損マウス ( $SIRT1^{pod-/-}$ ) において、野生型マウス (WT) に比し、足突起の消失、アクチン線維の集簇の増悪が認められた。

GBM 側への集簇の増悪を伴っており、アクチン細胞骨格障害が増悪していることも示唆された (図2)。なお、NTS による heterologous な障害の時相である投与2日目の時点では、足突起消失やアクチン繊維集簇は同様に増悪し、尿中アルブミン排泄量も、有意差には至らないものの、やはり  $SIRT1^{pod-/-}$  マウスにおいて増加傾向にあることが確認された。

また、ポドサイト表面の電荷を変化させることで、直接的にポドサイト障害を惹起するプロタミン硫酸灌流実験も施行し、このモデルでも同様の所見を確認した。このように、ポドサイトにおける SIRT1 の欠損は、ポドサイトの脆弱性をもたらすことを明らかにした。

#### 4 SIRT1 の活性はポドサイトのアクチン細胞骨格の維持のために必要である

次に、ポドサイトにおける SIRT1 がアクチン線維

の動態に与える影響を解析するため、マウスポドサイトの培養細胞を用いた *in vitro* 実験を施行した。われわれは、NTS 糸球体腎炎がポドサイトに酸化ストレスを惹起することを、ニトロチロシンに対する免疫染色により確認していたので、本研究では培養ポドサイト障害刺激として酸化ストレス ( $H_2O_2$  投与) を選択した。

われわれは、SIRT1 特異的阻害薬である EX527 で細胞を前処理した後に、比較的 low 濃度の  $H_2O_2$  ( $300 \mu M$ ) 刺激を加えると、コントロールとして vehicle であるエタノールで前処理した場合に比べて、明らかにアクチン細胞骨格障害が増悪することを、ファロイジンというアクチン線維を描出するプローブを用いた細胞染色によって明らかにした (図3)。培養ポドサイトのアクチン細胞骨格障害を4段階にわけて半定量解析した結果においても、ノンパラメトリック

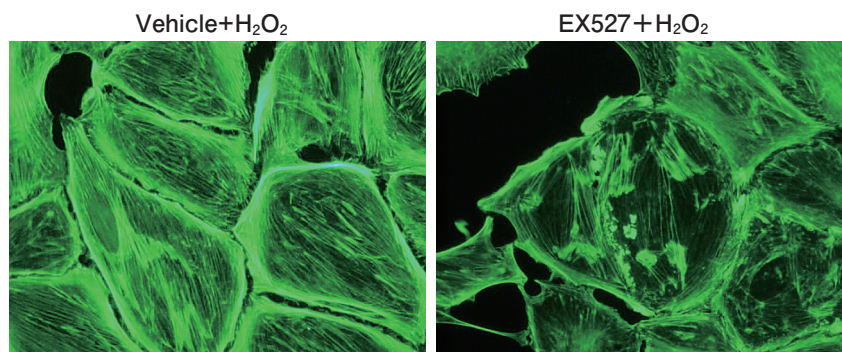


図3

マウス培養ポドサイトは SIRT1 阻害薬 EX527 ( $100 \mu M$ ) の前処理により、酸化ストレス ( $H_2O_2$ ,  $300 \mu M$ ) によって惹起されるアクチン細胞骨格障害が顕在化した。アクチン細胞骨格障害程度は、アクチン線維はファロイジン染色にて評価した。Vehicle, エタノール (溶媒)

な統計解析により、この変化が有意であることが確認された。また、他の SIRT1 阻害であるカンピノール、ニコチンアミドを用いた場合も同様の所見を確認し、薬剤による細胞毒性ではなく、確かに SIRT1 の活性阻害がアクチン細胞骨格障害の増悪をもたらすことを示した。

一方で、SIRT1 の活性を亢進させるレスベラトロールを前処理すると、高濃度の  $H_2O_2$  (700  $\mu M$ ) によって引き起こされるアクチン細胞骨格障害が抑制されることも明らかにした。さらに、 $H_2O_2$  の代わりに前項の *in vivo* の実験でも用いたポドサイト障害を引き起こすプロタミン硫酸を添加することで生じる細胞骨格障害が、EX527 の前処理によって障害が増悪することも確認された。

以上のように、ポドサイトにおける SIRT1 がアクチン細胞骨格を制御し、細胞機能維持に働くことが *in vitro* 実験においても明らかにされた。

## 5 SIRT1 の活性阻害はポドサイトの運動性を低下させる

次にわれわれは培養マウスポドサイトを用いて、細胞機能評価のひとつとして、運動性を評価するスクラッチアッセイを施行した。前述の SIRT1 阻害薬 (EX527, カンピノール, ニコチンアミド) にて前処理した場合、細胞をスクラッチした領域に遊走するポドサイトの個数は、vehicle で前処理した対照群に比べて有意に減少することが示された。ポドサイトの運動性 (遊走性) には、アクチン細胞骨格の適切な再構成が必要であることから、SIRT1 がアクチン細胞骨格の動態に関与していること、ひいてはポドサイトのスリット膜恒常性に寄与している可能性が示唆された。

## 6 SIRT1 はポドサイトの核内においてコータクチンを脱アセチル化する

さらに SIRT1 がアクチン細胞骨格を制御するメカニズムを解析するため、われわれは *in vitro* の実験を進めた。ここで、SIRT1 の脱アセチル化標的分子として、アクチン線維の重合、安定化の働きを持つコータクチンに着目した<sup>6-9)</sup>。コータクチンは一部の癌細胞などにおいて、SIRT1 の脱アセチル化を受け、活動性が制御されることが報告されていたため<sup>10)</sup>、ポドサイトにおける両者の関係性を解析した。

培養マウスポドサイトに SIRT1 阻害薬である EX527 やカンピノールを投与すると、用量依存性にアセチル化コータクチンが増加し、SIRT1 活性化薬であるレスベラトロールは逆にアセチル化コータクチンを減少させる、つまり、コータクチンの脱アセチル化レベルを上昇させることを、WB 解析にて見出した。

同様に、野生型および SIRT1<sup>pod/-</sup> マウスの単離糸球体を用いた WB でも、ポドサイトの SIRT1 欠損で糸球体内コータクチンのアセチル化レベルが増加していることを明らかにした。また、コータクチン、SIRT1 の細胞染色を行ったところ、両者は核内で局在が一致することがわかり、コータクチンと SIRT1 の相互作用が核内で生じていることが示唆された。SIRT1 とコータクチンの相互作用は、免疫沈降法によっても確認した。

## 7 SIRT1 はポドサイトにおけるコータクチンとアクチンの相互作用を制御している

ついでわれわれは細胞染色法により、マウス培養ポドサイトにおけるコータクチンの細胞内局在と、アクチン線維の動態を観察した。定常状態では、コータクチンは核内および細胞質に存在し、細胞質では線維状に染色され、一部がアクチン線維上に存在していた。一方で、EX527 前処理の上で酸化ストレスを加えると、細胞質内のコータクチンはアクチン線維と解離して核内に集積する傾向がみられ、この変化がアクチン細胞骨格を誘導している可能性が考えられた (図 4)。同様の変化は、SIRT1 に対する siRNA を用いた SIRT1 ノックダウン細胞においても認められ、逆に SIRT1 活性化薬であるレスベラトロールの前処理は、酸化ストレス投与下におけるコータクチンとアクチン線維の解離を抑制することが認められた。さらに、コータクチンのノックダウンでは、酸化ストレス刺激なしでも、単独でアクチン細胞骨格障害を引き起こすことが見出され、コータクチンの存在がアクチン細胞骨格の維持に不可欠であることが示された。

興味深いことに、アセチル化コータクチンの細胞染色で細胞内局在解析を行ったところ、アセチル化コータクチンはアクチン細胞骨格障害の有無によらず常に核内にのみ限局して存在し、これは SIRT1 の細胞内局在とほぼ一致していた。アセチル化コータクチンの核内局在は、PBS または NTS を投与した野生型、



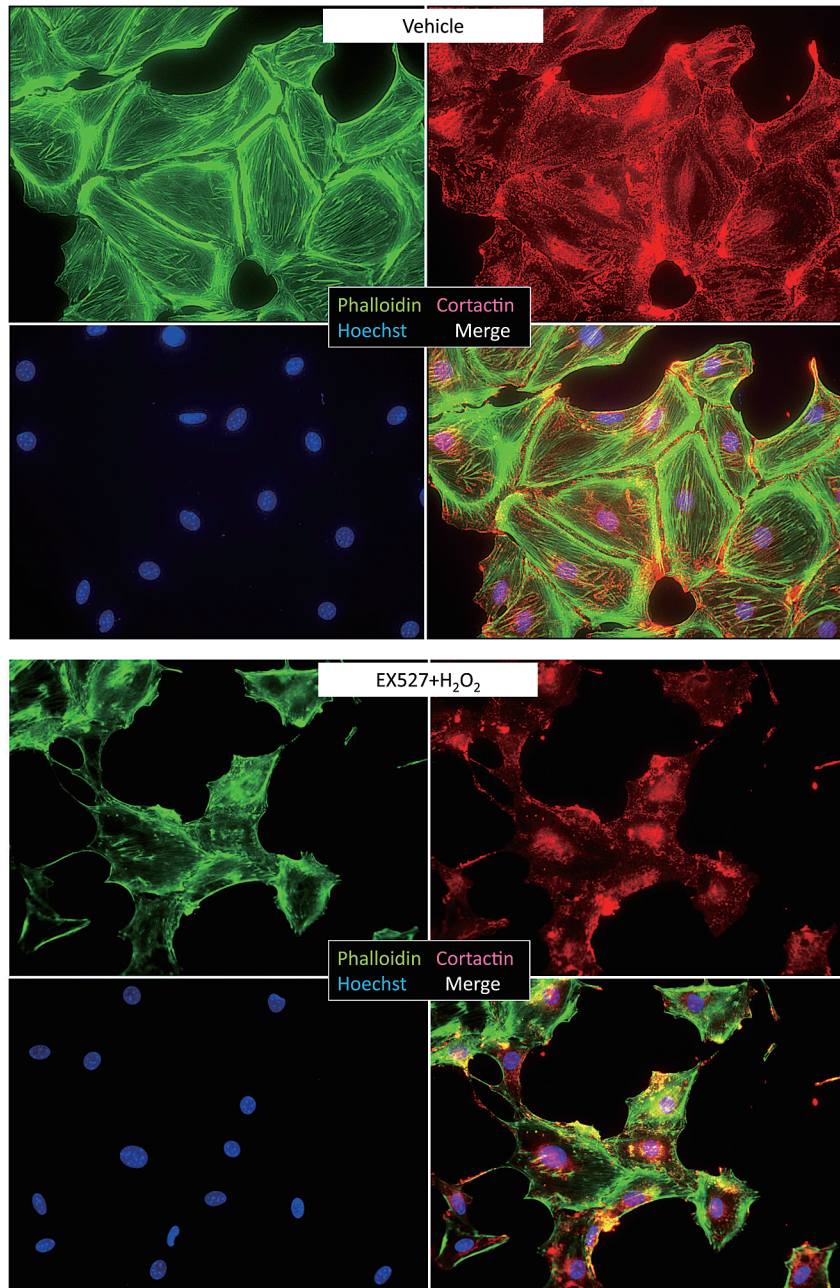


図4

定常状態のマウス培養ポドサイトでは、コータクチンは核と細胞質に存在し、細胞質では線状の分布を示して一部がアクチン線維と共局在した（上段：Vehicle, エタノール添加）。一方、SIRT1 阻害下では、コータクチンは核に集積傾向を示し、細胞質ではコータクチンとアクチンは解離して、アクチン細胞骨格の脆弱性を来した（下段：100  $\mu$ M EX527 前処理後に 300  $\mu$ M  $H_2O_2$  刺激）。アクチン線維と核はそれぞれファロイジン染色とヘキスト 33258 染色にて、コータクチンは抗マウスコータクチン抗体を用いた蛍光抗体法にて評価した。

SIRT1<sup>pod/-</sup> マウスの免疫組織化学でも確認され、in vivo との一貫性を示した。

#### 8 SIRT1 は核内でコータクチンを脱アセチル化し、コータクチンの細胞内局在を変化させる

上記の結果を総合的に考えると、SIRT1 の脱アセチ

ル化活性によりコータクチンの細胞内局在を変化させることが想定された。そこでわれわれは、マウス培養ポドサイトの核抽出蛋白、細胞質抽出蛋白を用いた WB 解析を施行した。

EX527 により SIRT1 活性を阻害すると、核内のコータクチンは上昇するのに対し、細胞質では減少するこ

とが示された。アセチル化コータクチンに関しては、細胞染色の結果と同様で、核抽出成分においてのみ、発現が確認され、EX527 によって上昇していた。これは、単離系球体を用いた WB 解析でも同様で、SIRT1<sup>pod-/-</sup> マウスにおいては、核内コータクチンが野生型より有意に高値で、細胞質では有意に低値であった。逆に、レスベラトロール処理により SIRT1 の脱アセチル化作用を活性化させると、コータクチンは核内で減少、細胞質で増加するという反対の変化が観察された。以上のことから、SIRT1 の脱アセチル化活性により、アセチル化コータクチンが核内で脱アセチル化されると、脱アセチル化コータクチンが細胞質に局在を変えることが示された。

最後に、核外輸送阻害剤であるレプトマイシン B を用いてコータクチンを核内に蓄積させると、細胞質内のコータクチンの減少とともに、アクチン細胞骨格障害が誘導されることを示し、確かに細胞質におけるコータクチンがアクチン細胞骨格の維持に必要であることを確認した。

以上の結果をまとめると、ポドサイトにおいて SIRT1 は核内でアセチル化コータクチンを脱アセチル化し、脱アセチル化されたコータクチンが細胞質に移動して、アクチン細胞骨格を維持するという一連の相互作用が、ポドサイトの酸化ストレスなどの障害刺激に対する抵抗性をもたらしていることが明らかにされた。したがって、SIRT1 の欠損ないし阻害の状態では、核内のアセチル化コータクチンが脱アセチル化されず、細胞質内のコータクチンが減少するため、アクチン細胞骨格が脆弱な状態となり、酸化ストレスなどの障害刺激により容易に細胞骨格障害をきたし、足突起の消失やスリット膜障害、ひいては蛋白尿の出現、糸球体腎炎の増悪につながることになる。

## 9 結語

腎臓病とエピゲノムの病態生理学的関連性を明らかにするための研究を進める中で、特にエピゲノム制御因子としてよく研究されるヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 のポドサイトにおける機能の解析が世界的に注目され研究が進められてきた。推測通り、ポドサイトに発現する SIRT1 もヒストンのアセチル化レベルを制御することでポドサイト機能に重要な遺伝子群の発現を制御すること、つまりポドサイトのエピゲノム制

御に SIRT1 は必須であることがわかってきた。特筆すべきことに、われわれはそれら成果とは異なり、ポドサイトに発現する SIRT1 がアクチン細胞骨格の重合・安定性に寄与する補助因子 (cortactin) のアセチル化レベルを制御し、SIRT1-cortactin-actin (F-actin) という新しい経路がスリット膜維持、ひいてはポドサイト機能恒常性に重要であることを見いだした。SIRT1 は長寿遺伝子としてもよく知られており、ポドサイトの加齢による表現型にも関連性を有する可能性が考えられる。

## 謝辞

本研究は、平成 24~26 年度日本透析医会公募研究助成による貴重なご支援のもと遂行いたしました。日本透析医会関係各位の皆様には深くお礼申し上げます。その成果の一部は、アメリカ腎臓学会誌である *Journal of American Society of Nephrology* に掲載予定であり、本稿ではその論文の一部を抜粋、要約いたしました。

また本研究は、東京大学大学院医学系研究科腎臓・内分泌内科の南学正臣教授、同大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科の門脇孝教授、窪田直人准教授、富山大学医学部第一内科の戸邊一之教授との共同研究であり、多くの貴重なご助言・ご助力を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。

## 文献

- 1) Inagi R, Ishimoto Y, Nangaku M : Proteostasis in endoplasmic reticulum—new mechanisms in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 10; 369-378, 2014.
- 2) Inagi R : Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney injury. *Curr Opin Pharmacol*, 10; 156-165, 2010.
- 3) Inagi R, Nangaku M, Onogi H, et al. : Involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in podocyte injury induced by excessive protein accumulation. *Kidney Int*, 68; 2639-2650, 2005.
- 4) Mimura I, Kanki Y, Kodama T, et al. : Revolution of nephrology research by deep sequencing: ChIP-seq and RNA-seq. *Kidney Int*, 85; 31-38, 2014.
- 5) Motonishi S, Nangaku M, Wada T, et al. : Sirtuin1 Maintains Actin Cytoskeleton by Deacetylation of Cortactin in Injured Podocytes. *J Am Soc Nephrol*, 2015. [Epub ahead of print]
- 6) Wu H, Parsons JT : Cortactin, an 80/85-Kilodalton. *J Cell Biol*, 120; 1417-1426, 1993.
- 7) Buday L, Downward J : Roles of cortactin in tumor patho-



- genesis. *Biochim Biophys Acta*, 1775; 263-273, 2007.
- 8) Rothschild BL, Shim AH, Ammer AG, et al. : Cortactin over-expression regulates actin-related protein 2/3 complex activity, motility, and invasion in carcinomas with chromosome 11q13 amplification. *Cancer Res*, 66; 8017-8025, 2006.
- 9) Weaver AM : Cortactin and tumor invasiveness. *Cancer Lett*, 265; 157-166, 2008.
- 10) Kaluza D, Kroll J, Gesierich S, et al. : Class IIb HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin. *EMBO J*, 30; 4142-4156, 2011.