

博士(医学) 坂尾 幸 俊

論文題目

Cisplatin induces Sirt1 in association with histone deacetylation and increased Werner syndrome protein in the kidney

(シスプラチンはヒストン脱アセチル化と Werner syndrome protein の増加を伴って腎臓内の Sirt1 を誘導する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

DNA は核蛋白のヒストンに巻きつき、ヌクレオソームを形成している。遺伝子の転写活性は、ヒストンのアセチル化によって促進、脱アセチル化によって抑制されるため、ヒストンのアセチル化は細胞の分化や増殖に重要な働きを果たすことが知られている。癌細胞ではヒストンのアセチル化は低下しており、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase、HDAC) 阻害剤によってアセチル化が増え、抗癌作用が発揮されると報告されている。

シスプラチン (CDDP) は強力な抗癌剤の一つであるが、臨床的には腎毒性が問題となる。実験的には、CDDP は培養した癌細胞においてヒストンのアセチル化を増やす。しかし、正常な腎尿細管細胞のヒストンに対する CDDP の影響は明らかでない。

本研究では、CDDP 腎障害におけるヒストンのアセチル化の意義を明らかにするため、ラット CDDP 誘発急性腎不全 (ARF) モデルを用い、腎内の HDACs およびヒストンのアセチル化を経時的に評価した。今回、各クラスの代表的な HDAC である HDAC3 (クラス I)、HDAC5 (クラス II)、Silent information regulator 2 (Sirt1, class III) を用い、CDDP 投与 14 日後まで腎内の発現を調べ、腎障害との関連を検討した。特に、抗老化蛋白としても知られる Sirt1 に注目し、Sirt1 によって脱アセチル化される p53 および Werner syndrome protein (WRN) の発現を経時的に観察した。さらに、培養 HEK293 細胞を用いて Sirt1 を細胞にトランスフェクションし、CDDP 添加による細胞障害に対する Sirt1 過剰発現の効果を検討した。

[実験方法]

1) CDDP 誘発 ARF モデル

7-8 週齢の雄性 SD ラットに CDDP 5 mg/kg BW を静注し、ARF を作成した。CDDP 投与 6、12 時間後および 1、2、3、5、7、9、14 日後にラットを屠殺し、採血および腎摘出を行った。さらに、ARF の障害度を変えるために、CDDP 7.5 mg/kg BW を静注するモデルも作成した。腎機能は、血清クレアチニン (Cr) 値で評価した。

2) ウェスタン・ブロット法

腎臓の皮質および髄質外層外帯の組織を用い、蛋白抽出を行った。一次抗体には、acetylated histone H3 (AcH3)、HDAC3、HDAC5、Sirt1 を用いた。さらに、Sirt1 の非ヒストン蛋白の基質である acetylated p53、DNA 修復因子である WRN、DNA 修復に関連する proliferating cell

nuclear antigen (PCNA) の蛋白量も測定した。

3) 免疫染色法

腎組織切片に免疫染色を行い、AcH3、Sirt1、WRN、PCNA の発現を組織学的に検討した。

4) HEK293 細胞の CDDP 毒性に対する Sirt1 の作用

継代培養した HEK293 細胞に Sirt1 cDNA(pCMV-Tag2 plasmid)をトランスフェクションして Sirt1 を強発現させ、外因的な CDDP 投与 (500-1000 μ M) に対する HEK293 細胞の viability について MTS アッセイで評価した。

[結果]

CDDP (5 mg/kg BW) 投与により、血清 Cr 値は3日後から有意に上昇し、5日後にピークとなり、14日後にはほぼ正常のレベルまで復した。腎内の Sirt1 は CDDP 投与6時間後より有意に増加し始め、5日後にはピークとなり、その後は14日後まで発現した。CDDP 投与1~14日後における血清 Cr 値と腎内 Sirt1 蛋白量は有意に正相関した($R^2=0.66$, $p<0.01$)。また、CDDP 7.5 mg/kg の大量投与したラットでは、血清 Cr のさらなる上昇とともに Sirt1 が強く誘導された。一方、HDAC3 は CDDP 投与5日後、HDAC5 は2日後より有意に増加し始め、14日後まで増えていた。

ヒストンのアセチル化の指標である AcH3 は、CDDP 投与6時間後より減少し始め、5日後には最も減少し、その後は14日後まで徐々に増加した。免疫染色では、尿細管障害が最も強い髄質外層外帯の領域において、AcH3 は最も減少した。

CDDP 投与後、acetylated p53 は6時間より増加したが、24時間後にほぼ消失した。一方、WRN は6時間後より有意に増加し、CDDP 投与14日後まで増えていた。免疫染色では、尿細管の細胞核内に WRN と PCNA が共染色された。

培養実験では、Sirt1 を強発現させた HEK293 細胞において、CDDP 600 μ M による cell viability の低下が有意に抑制された。

[考察]

本研究において、腎尿細管では CDDP 投与6時間の早期から Sirt1 が誘導され、腎機能障害の程度に応じて Sirt1 の発現も増えることが明らかになった。一方、他のクラスである HDAC3 と HDAC5 は、CDDP 投与2日または5日後より増加したことより、これら HDAC は腎障害の成立に関与する可能性は低いと思われた。

今回、腎内 Sirt1 の増加は、①AcH3 の減少、②腎内 WRN の増加、③WRN と PCNA の核内共存、を伴ったことより、CDDP で誘導された Sirt1 は尿細管細胞 (特に髄質外層) のヒストンを脱アセチル化するとともに、WRN 蛋白を誘導し、PCNA とともに傷害した DNA を修復する可能性が示唆された。さらに、培養実験において、Sirt1 の過剰発現によって CDDP の細胞毒性が抑制されたことより、Sirt1 は CDDP 腎障害に対して保護的に作用することが明らかになった。

[結論]

CDDPにより、早期から誘導された腎尿細管の Sirt1 蛋白は、核内のヒストンを不活化して遺伝子転写を抑制するとともに、損傷した DNA を修復し、CDDP による尿細管障害に対して保護的に作用する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

ヒストンは、真核生物のクロマチンを構成する蛋白で、アセチル化が細胞の分化・増殖に重要な働きを果たす。癌細胞ではヒストンのアセチル化は低下し、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤によって抗癌作用が発揮される。一方、シスプラチン (CDDP) は、培養癌細胞のヒストンのアセチル化を増やすが、正常腎尿細管細胞のヒストンに対する影響は明らかではない。

そこで、申請者は、CDDP 腎障害におけるヒストンのアセチル化の意義を明らかにするため、ラット CDDP 誘発急性腎不全 (ARF) モデルを用い、腎内の HDACs (HDAC3, HDAC5, Sirt1) によって脱アセチル化される p53 および WRN 蛋白の発現およびヒストンのアセチル化 (AcH3) を経時的に検討した。

その結果、CDDP 投与 3 日後から Cr 値が有意に上昇し、5 日後にピークを呈し、14 日後に正常レベルに復した。腎尿細管では Sirt1 が CDDP 投与 6 時間から誘導され、腎機能障害と発現増加は有意な相関を示し、一方、HDAC3 と HDAC5 は、投与 2 日または 5 日後より増加した。腎内 Sirt1 の増加は、AcH3 の減少 (尿細管障害の最も強い髄質外層外帯の領域)、腎内 WRN の増加、WRN と PCNA の核内共存を伴っていた。培養実験では、Sirt1 の過剰発現によって CDDP の細胞毒性が抑制された。以上より、Sirt1 は CDDP 腎障害に対して保護的に作用することが示唆された。

審査委員会では、CDDP 投与後の腎内におけるヒストンの影響を明らかにするとともに、Sirt1 の誘導により臨床的に大きな問題となる CDDP の腎障害に対して保護的に作用する可能性を示した点を高く評価した。

以上により、本論文は博士 (医学) の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 大園 誠一郎
副査 峯田 周幸 副査 馬場 聡