

第4回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

YIA 受賞講演

多発性嚢胞腎の病態形成における ミトコンドリア機能異常の関与

Mitochondrial abnormalities facilitate cyst formation in autosomal dominant polycystic kidney disease

石本 遊

Yu ISHIMOTO

はじめに

常染色体優性多発性嚢胞腎 (autosomal dominant polycystic kidney disease : ADPKD) は、両側の腎臓に多数の嚢胞が進行性に発生・増大する、最も頻度の高い遺伝性腎疾患で、60歳までに半数が末期腎不全に至り、わが国では原疾患不明を除いて透析導入原疾患の第4位、透析患者の約3.6%を占める。2014年に、バソプレシン V₂ 受容体拮抗薬であるトルバプタンが保険適用となったが、適用は両側腎容積が750 mL以上かつ腎容積増大速度が概ね5%/年以上のCKDステージ1~4に限定されているほか、多尿や薬剤性肝障害などの副作用により継続が困難となる症例も多く、更なる治療法の開発が望まれている。

ADPKDは病態生理学的に固形癌と類似していることが近年報告されており¹⁾、固形癌ではミトコンドリア機能異常が、細胞増殖など癌細胞に特徴的な表現型に寄与することが知られている²⁾。このほか、*Pkd1* ノックアウトキメラマウスを用いた研究では、*Pkd1*^{-/-}の嚢胞上皮細胞が周囲の正常尿管細胞のアポトーシスを引き起こすことが報告されており³⁾、アポトーシスはミトコンドリアとの関連が深いことから、われわれはADPKD嚢胞上皮細胞におけるミトコンドリア機能に着目して本研究を行った。

ADPKD モデル動物におけるミトコンドリア異常

初めに、ADPKDモデル動物である Ksp-Cre *Pkd1*^{flax/flax} マウス (*Pkd1* KO) の腎組織を透過型電子顕微鏡で観察したところ、*Pkd1* KO の嚢胞上皮細胞ではミトコンドリアが腫大し、クリステ構造が不明瞭となるなど、対照群のものと比較し明らかな形態異常が認められた (図1)。加えて、*Pkd1* KO 腎組織では対照群のものと比較して、ミトコンドリア機能の surrogate marker であるミトコンドリア DNA (mtDNA) コピー数、ならびにミトコンドリア生合成の主要制御因子である peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α (PGC-1 α) 発現量が低下することが確認され、免疫組織化学染色により PGC-1 α の発現低下は嚢胞上皮において顕著となること、また同部では酸化ストレスマーカーである 8-OHdG や 4-HNE の発現が亢進していることが確認された。また、類似の結果は、他の ADPKD モデル動物である Han : SPRD-Cy ラットにおいても確認された。

ヒト ADPKD 嚢胞上皮細胞におけるミトコンドリア 関連シグナル異常

次に、ADPKDモデル動物で得られた結果を確認するため、*Pkd1* に変異を持つADPKD患者由来の嚢胞上皮細胞株を用いてさらに詳細な検討を行った。その結果、ADPKD嚢胞上皮細胞株では *in vivo* での結果と同様に、正常ヒト尿管細胞と比較して mtDNA コピー数ならびに PGC-1 α 発現量の低下が認められたほか、MitoTracker による染色でミ



正常マウス

*Pkd1*ノックアウトマウス

図1 *Pkd1* ノックアウトマウス嚢胞上皮細胞におけるミトコンドリア形態異常

*：嚢胞腔

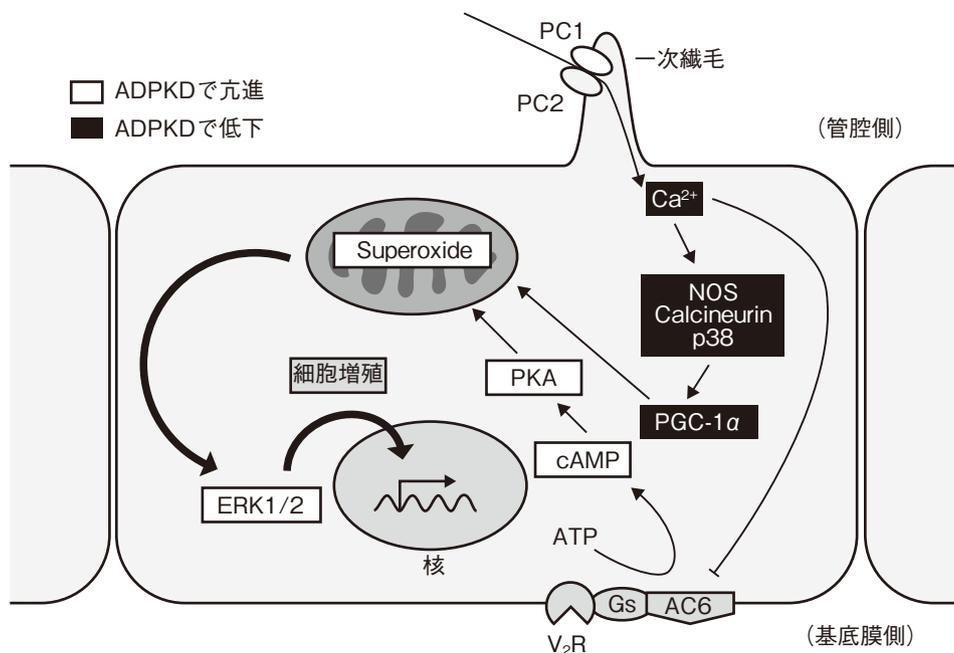


図2 *Pkd1* 変異を介したミトコンドリア関連シグナル

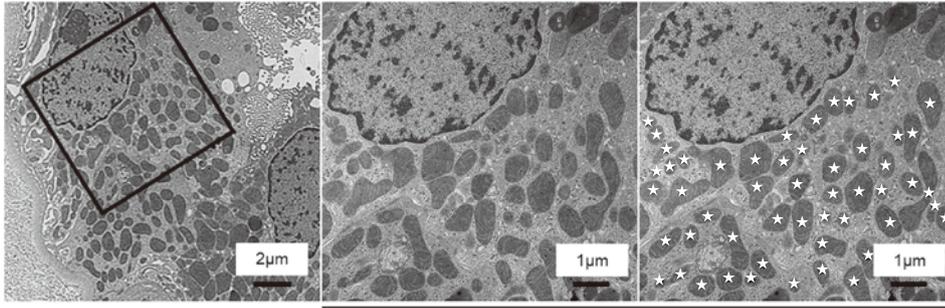
PC1：ポリシスチン 1, PC2：ポリシスチン 2, NOS：一酸化窒素合成酵素, PGC-1 α ：PPAR- γ co-activator-1 α , AC6：アデニル酸シクラーゼ 6, Gs：刺激性 G 蛋白, V₂R：バソプレシン V₂ 受容体, ATP：アデノシン三リン酸, cAMP：環状アデノシンリン酸, PKA：プロテインキナーゼ A, ADPKD：常染色体優性多発性嚢胞腎

トコンドリアの断片化が、MitoSOX による染色でミトコンドリア由来のスーパーオキシド産生亢進が確認された。また、mtDNA 配列を調べると、嚢胞上皮細胞株では蛋白機能に影響を及ぼすような遺伝子変異が mtDNA に蓄積していることも確認された。

このような異常をきたす原因として、*Pkd1* がコードする polycystin 1 (PC1) が一次繊毛における Ca²⁺ チャネルとして働くとされることから、細胞内 Ca²⁺ 濃度に関連して

PGC-1 α 発現制御にかかわる因子について検索を行ったところ、ADPKD 嚢胞上皮細胞株では細胞内 Ca²⁺ 濃度の低下に伴い、PGC-1 α 発現を upregulate する p38 MAPK, Calcineurin, Nitric oxide synthase の活性が低下していることが確認された。これらの結果から、嚢胞上皮細胞株では PC1 機能低下による細胞内 Ca²⁺ 濃度低下に伴い、制御因子の活性低下を介して PGC-1 α 発現量が下がることで、ミトコンドリア機能に影響を及ぼす可能性が考えられた。

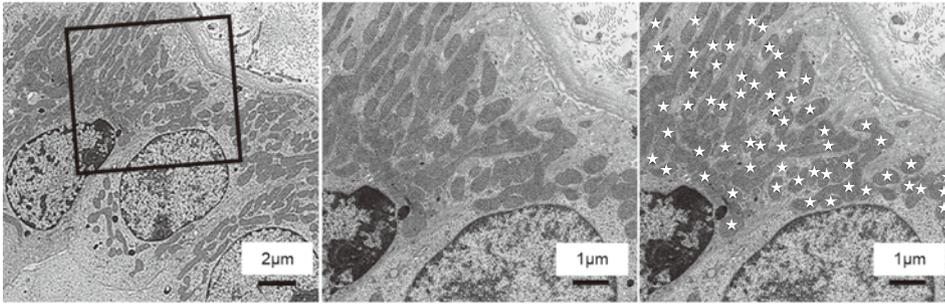
正常近位尿細管



弱拡大

強拡大

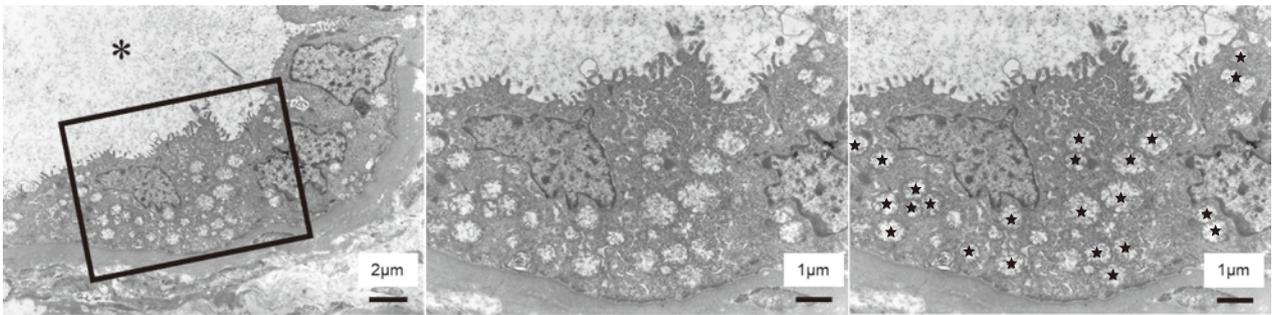
正常集合管



弱拡大

強拡大

ADPKD嚢胞上皮



弱拡大

強拡大

図3 ADPKD患者腎嚢胞上皮細胞におけるミトコンドリア形態異常

*: 嚢胞腔, ☆: 正常ミトコンドリア, ★: 異常ミトコンドリア

しかし、細胞外フラックスアナライザーを用いて、実際にミトコンドリアにおける酸素消費量を評価すると、予想に反し、嚢胞上皮細胞株で基礎呼吸の亢進と予備呼吸能の低下が確認された。この原因として、細胞内 Ca^{2+} 濃度低下に伴う cyclic AMP (cAMP) の増加を介して、嚢胞上皮細胞で活性が亢進することが知られる protein kinase A (PKA) が、ミトコンドリア呼吸鎖複合体活性を上げることが報告されていることから⁴⁾、PKA の阻害剤である H-89 を用いてミトコンドリアの酸素消費量の変化を調べたところ、嚢胞上皮細胞株では有意に基礎呼吸量が低下したことから、嚢

胞上皮細胞株では PKA の活性亢進により呼吸鎖複合体活性が上がり、酸素消費量が増える機序が存在することが確認された。

以上の結果から、細胞内 Ca^{2+} 濃度の低下は、PGC-1 α 発現量を低下させる一方で、PKA 活性化を介してミトコンドリアでの酸素消費量を亢進させるため、ミトコンドリアにストレスがかかりミトコンドリアでのスーパーオキシド産生を亢進させている可能性が考えられた。

ミトコンドリア特異的作用薬による嚢胞上皮細胞への影響

癌細胞においては、ミトコンドリアでのスーパーオキシド産生増加が、Extracellular Signal-regulated kinase (ERK) を活性化させ、細胞増殖に寄与することが報告されており、ミトコンドリア特異的に作用する抗酸化薬である MitoQ を嚢胞上皮細胞株に投与し、表現型への影響を調べたところ、予想通り、ミトコンドリアでのスーパーオキシドの産生は減少し、それに伴い ERK 活性が低下して細胞増殖が抑制されることが確認された。このことから、ミトコンドリア機能異常に伴うスーパーオキシドの産生増加は、少なくとも嚢胞上皮細胞の細胞増殖に寄与しているものと考えられた(図 2)。

ADPKD 患者腎組織におけるミトコンドリア

モデル動物や培養細胞を用いた基礎研究に加え、実際に ADPKD 患者腎組織においてもミトコンドリア機能異常を示唆する所見が認められるか否かを確認するため、北海道大学病院、順天堂大学病院、京都大学病院、虎の門病院との多施設共同研究を行い ADPKD 患者腎組織を収集・解析したところ、正常腎組織と比較して患者腎組織の嚢胞上皮細胞では、ミトコンドリアが腫大し、クリステは構造が不明瞭となるなど、明らかな形態異常が認められた(図 3)。これら ADPKD 患者腎組織で認められたミトコンドリアの形態異常は、大腸癌細胞などで認められるものと類似しており⁵⁾、基礎研究で得られた結果と同様に、ADPKD 患者の腎嚢胞上皮細胞においても、ミトコンドリア機能異常が存在し、病態形成に関与していることを強く示唆する結果であった。

おわりに

本研究結果は、ADPKD の病態形成にミトコンドリア機能異常が関与する可能性を示しており、ミトコンドリアを標的とした治療が ADPKD の新たな治療戦略となる可能性を示唆するものである。ADPKD の病態形成におけるミトコンドリアの重要性については、最近注目されてきており⁶⁾、一次繊毛を介した刺激が PC1 の C 末端分解産物

量を変化させ、PC1 の C 末端分解産物がミトコンドリアへ移行してミトコンドリアの機能制御にかかわることも報告されるなど⁷⁾、今後、さらに研究が進み治療法の開発につながることを期待される。

謝 辞

最後に、本研究を支えてくださった南学正臣先生、稲城玲子先生をはじめとして、研究室のメンバーならびに本研究にご協力くださった、北海道大学 西尾妙織先生、藤田保健衛生大学 長尾静子先生、釘田雅則先生、吉原大輔先生、日本医科大学 清水 章先生、京都大学 長船健二先生、笠松朋子先生、順天堂大学 堀江重郎先生、河野春奈先生、虎の門病院 乳原善文先生、星野純一先生に心より御礼申し上げます。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Seeger-Nukpezah T, Geynisman DM, Nikonova AS, Benzing T, Golemis EA. The hallmarks of cancer : relevance to the pathogenesis of polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2015 ; 11 (9) : 515-534.
2. Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer : initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer* 2014 ; 14 (11) : 709-721.
3. Nishio S, Hatano M, Nagata M, Horie S, Koike T, Tokuhisa T, et al. Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation. *J Clin Invest* 2005 ; 115 (4) : 910-918.
4. Acin-Perez R, Salazar E, Brosel S, Yang H, Schon EA, Manfredi G. Modulation of mitochondrial protein phosphorylation by soluble adenylyl cyclase ameliorates cytochrome oxidase defects. *EMBO Mol Med* 2009 ; 1 (8-9) : 392-406.
5. Satoh K, Yachida S, Sugimoto M, Oshima M, Nakagawa T, Akamoto S, et al. Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017 ; 114 (37) : E7697-E7706.
6. Padovano V, Podrini C, Boletta A, Caplan MJ. Metabolism and mitochondria in polycystic kidney disease research and therapy. *Nat Rev Nephrol*. 2018. doi : 10.1038/s41581-018-0051-1. [Epub ahead of print]
7. Lin CC, Kurashige M, Liu Y, Terabayashi T, Ishimoto Y, Wang T, et al. A cleavage product of Polycystin-1 is a mitochondrial matrix protein that affects mitochondria morphology and function when heterologously expressed. *Sci Rep* 2018 ; 8 (1) : 2743.