

Title	Autophagy Guards Against Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury
Author(s)	高橋, 篤史
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59757">https://hdl.handle.net/11094/59757</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

[84]

氏名	高橋 篤 史
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 25910 号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学位論文名	Autophagy Guards Against Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. (オートファジーはシスプラチンによる急性腎障害を防御する)
論文審査委員	(主査) 教授 薬木 宏実 (副査) 教授 熊ノ郷 淳 教授 野々村 祝夫

## 論文内容の要旨

## 〔目的(Purpose)〕

オートファジーは、細胞内において、蛋白質やオルガネラなどを二重膜で囲い込み、リソソームに運んで分解する作用である。細胞内においては恒常性維持に関わり、飢餓やストレス下においては亢進することによって細胞保護的に機能している。近年、オートファジーが様々な病態に関連しているとの報告がなされているが、腎疾患におけるオートファジーの働きについての報告は数少ない。そこで、今回我々は、薬剤による急性腎障害の中でも代表的なシスプラチンによる急性腎障害において、オートファジーの働きについて解析した。

## 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

まず、オートファジーの活性化により増加するLC3をGFPで標識したGFP-LC3マウスにシスプラチン(15mg/kg)を投与したところ、投与後約6時間から近位尿細管においてGFP-LC3のdotが出現し、投与3日目をピークとして増加したことから、シスプラチン投与によるオートファジーの誘導が確認された。

次に、オートファジーに必須の遺伝子であるAtg5のfloxマウスと近位尿細管にのみ発現するKAP(Kidney androgen specific protein)のプロモーター下にCre recombinaseを発現するKAP-Creマウスの交配によって、近位尿細管特異的Atg5ノックアウトマウス(以下、KOマウス)を作成した。8週齢:雄のKOマウスならびに対照マウスとしてAtg5のfloxマウスを使用し、シスプラチン(15mg/kg)ならびにvehicle(生食)を腹腔内単回投与して3日後に腎障害について評価した。なお、n数についてはシスプラチン投与群:n=7(匹)ずつ、vehicle投薬群:n=4(匹)ずつとした。

PAS染色については、組織傷害の範囲に応じて半定量的にスコア化して評価したところ、vehicle投薬群では有意差がなかったが、シスプラチン投与群では、KOマウスにおいて有意に組織傷害が悪化していた。また、腎機能の評価として血漿中の尿素窒素およびクレアチニンを測定したところ、vehicle投薬群では有意差は見られなかったが、シスプラチン投与群では、KOマウスにおいて有意に腎機能が悪化していた。

シスプラチン腎症における重要な進展機序であるDNA損傷について、 $\gamma$ -H2AXの免疫染色を用いて評価したところ、シスプラチン投与群では、KOマウスにおいて有意に $\gamma$ -H2AX陽性細胞数が多く、DNA損傷が悪化していると考えられた。また、p53の免疫染色、TUNEL染色を施行したところ、シスプラチン投与群では、KOマウスにおいて、p53およびTUNEL陽性細胞数が有意に増加しており、KOマウスにおいて、DNA損傷からp53が活性化されてアポトーシスに至る経路が亢進していると考えられた。

次に、3週齢のKOマウスから単離した近位尿細管細胞(以下、Atg5(-)近位尿細管細胞)と、Atg5(-)細胞にAtg5を遺伝子導入しrevertantを樹立した。両者をシスプラチン存在下に培養し(50 $\mu$ M、24時間)、MitoSOXRedを用いてミトコンドリアでのROS産生を評価したところ、Atg5(-)近位尿細管細胞においては、Atg5(+)近位尿細管細胞と比べて、ミトコンドリアにおけるROS産生が有意に多かったことから、シスプラチン腎症におけるミトコンドリアでのROS産生をオートファジー(マイトファジー)が抑制している可能性が考えられた。

最後に中枢神経や肝臓においてオートファジー不全下で蓄積し傷害を起こすと報告されている蛋白凝集塊について、ユビキチンならびにp62の免疫染色を用いて評価したところ、KOマウスにおいて、対照マウスと比べてシスプラチン投与後の蛋白凝集塊の蓄積が有意に多いという結果が得られ、蛋白凝集塊の蓄積が組織傷害の悪化につながっている可能性が考えられた。

## 〔総括(Conclusion)〕

オートファジーは、DNA損傷、ミトコンドリアにおけるROS産生、蛋白凝集塊の蓄積を抑制することによって、シスプラチンによる急性腎障害を防御すると考えられた。今後、オートファジーを亢進させることによって、シスプラチンによる急性腎障害を軽減できる可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨

蛋白質やオルガネラなどの分解により、細胞内の恒常性維持に関わっているオートファジーと様々な疾患・病態との関連が報告されているが、腎疾患におけるオートファジーの役割についての報告は数少ない。

本論文は、シスプラチン腎症モデルを用いて、近位尿細管特異的Atg5ノックアウトマウス(Atg5:オートファジーに必須の遺伝子、以下、KOマウス)において、組織傷害や腎機能が悪化すること、その機序として、「DNA損傷、p53活性化、アポトーシスの増悪」、「蛋白凝集塊の蓄積」、また、KOマウスから単離してきたAtg5欠損近位尿細管細胞において、「ミトコンドリアにおけるROS産生の増加、および細胞死の増加」を示している。

これらの結果より、オートファジーがシスプラチン腎症による急性腎障害において防御的に機能することを証明しており、内容の新規性や臨床応用への可能性などから、学位論文に値すると思われる。