

氏 名	宗 村 万里子
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 3 9 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 3 年 3 月 1 0 日
学 位 論 文 題 目	Oleate and eicosapentaenoic acid attenuate palmitate-induced inflammation and apoptosis in renal proximal tubular cell  (オレイン酸とエイコサペンタエン酸は腎臓近位尿細管細胞においてパルミチン酸による炎症およびアポトーシスを抑制する。)
審 査 委 員	主 査 教 授 堀 池 喜 八 郎 副 査 教 授 岡 田 裕 作 副 査 教 授 杉 原 洋 行

## 論文内容要旨

※整理番号	644		そうむら 宗村 まり子
学位論文題目	Oleate and eicosapentaenoic acid attenuate palmitate-induced inflammation and apoptosis in renal proximal tubular cell (オレイン酸とエイコサペンタエン酸は腎臓近位尿細管細胞においてパルミチン酸による炎症およびアポトーシスを抑制する。)		
<p>【目的】腎疾患の予後は、尿細管間質病変の程度に強く相関することが明らかになっている。肥満は腎予後悪化因子の一つとして知られているが、この尿細管間質病変悪化機序は不明である。血清遊離脂肪酸は血液中でアルブミンと結合しているが、蛋白と結合した遊離脂肪酸は、糸球体から濾過されると、近位尿細管細胞にて再吸収され、代謝を受ける。近年、この糸球体漏出蛋白に結合した脂肪酸が、尿細管細胞において炎症やアポトーシスを惹起し、尿細管障害の原因となることが報告された。血清遊離脂肪酸分画は、飽和脂肪酸、一価不飽和脂肪酸ならびに多価不飽和脂肪酸により構成されており、肥満患者では飽和脂肪酸分画の増加が認められる。これらの知見から、肥満患者の腎機能障害に、脂肪酸分画の異常に起因した尿細管間質病変が影響を及ぼすとの仮説に至った。本研究では、この仮説を証明するため、培養近位尿細管細胞を用い、脂肪酸種の違いがもたらす炎症、アポトーシスへの影響およびその分子機構を検討した。</p> <p>【方法】①各種脂肪酸種が培養近位尿細管細胞における炎症、アポトーシスに及ぼす影響の検討：培養近位尿細管細胞に、飽和脂肪酸であるパルミチン酸、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸、多価不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) を孵置し、炎症性サイトカインである MCP-1 の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法により、分泌蛋白量を酵素免疫吸着測定法により定量した。アポトーシスは、Western Blot 法による cleaved PARP ならびに cleaved caspase-3 の蛋白量定量、および Mito-PT apoptosis detection kit を用いて検出した。</p> <p>②各種脂肪酸による培養近位尿細管細胞における炎症、アポトーシス制御における PKC アイソザイムおよび、その下流の分子機構についての検討：各種 PKC 阻害薬およびドミナントネガティブ変異 PKC 過剰発現、恒常的活性型 PKC 過剰発現を用い、飽和脂肪酸による MCP-1 発現およびアポトーシス亢進作用、不飽和脂肪酸による抗炎症、抗アポトーシス作用における PKC アイソザイムの関与を検討した。パルミチン酸刺激による MCP-1 発現増強において、PKC アイソザイムの下流の分子機構を明らかにするため、MAPKs および I<math>\kappa</math>B のリン酸化、NF<math>\kappa</math>B の核移行 (P65) を Western Blot 法にて検討した。パルミチン酸刺激によるアポトーシス誘導において、PKC アイソザイムの下流の分子機構を明らかにするため、Akt および Bad のリン酸化、細胞質内のチトクロム C を Western Blot 法にて検討した。</p> <p>③各種脂肪酸種による培養近位尿細管細胞内 diacylglycerol (DAG) ・トリグリセリド (TG)</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

蓄積の検討: DAGはPKC $\theta$ のアロステリック活性化物質であるが、diacylglycerol acyltransferase 2 (Dgat2)酵素によりTGへ変換されることでPKC $\theta$ 活性化作用は抑制される。そこで、培養尿細管細胞における各種脂肪酸孵置下での細胞内DAGおよびTG蓄積を評価した。DAGはdiacylglycerol kinase法を用い、TGはBODIPY493/503染色を用い評価した。また培養尿細管細胞において、各種脂肪酸種がDgat2遺伝子発現に及ぼす影響を定量的RT-PCR法を用いて検討した。不飽和脂肪酸によるMCP-1発現抑制、アポトーシス抑制効果におけるDgat2の役割を解明する為、RNA干渉を用いDgat2発現を減少させた尿細管細胞におけるMCP-1発現、アポトーシスを検討した。

【結果】①培養近位尿細管細胞において、パルミチン酸孵置によりMCP-1発現およびアポトーシスが増加し、これらはオレイン酸およびEPAの共孵置により抑制された。一方、Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )およびLipopolysaccharide (LPS)の孵置により増加したMCP-1発現は、EPAの共孵置により抑制され、オレイン酸の共孵置により抑制されなかった。

②培養近位尿細管細胞において、PKC $\theta$ 阻害作用を有するRottlerinはMCP-1の遺伝子発現を抑制し、アポトーシスを抑制した。ドミナントネガティブ変異PKC $\theta$ の過剰発現は、パルミチン酸により誘発されるMCP-1発現増加を抑制した。一方、恒常的活性型PKC $\theta$ の過剰発現によりオレイン酸およびEPAによるMCP-1発現抑制効果は消失した。PKC $\theta$ の下流の分子機構の検討において、パルミチン酸によるMCP-1発現増強にはNF- $\kappa$ B経路の活性化が、アポトーシス亢進にはAkt活性の低下が関与し、これらはオレイン酸、EPAにより抑制された。

③培養近位尿細管細胞において、パルミチン酸孵置下で細胞内DAG蓄積量は増加した。一方、オレイン酸およびEPAの共孵置はパルミチン酸によるDAG蓄積を抑制し、細胞内TG蓄積を増加させた。更に、パルミチン酸孵置下でDgat2遺伝子発現は抑制され、オレイン酸およびEPAの共孵置はこの作用を減弱させた。RNA干渉によるDgat2遺伝子発現減少により、オレイン酸およびEPAによるMCP-1遺伝子発現抑制効果およびアポトーシス抑制効果は減弱した。

【考察】培養近位尿細管細胞において、飽和脂肪酸であるパルミチン酸は、炎症およびアポトーシスを誘発し、不飽和脂肪酸であるオレイン酸およびEPAはこの作用を抑制することが明らかになった。EPAを含む $\omega$ -3不飽和脂肪酸は、直接および間接的なNF- $\kappa$ B経路の抑制、Toll様受容体の機能に関連した細胞膜の微小構造の変化などを介して抗炎症作用を示すことが報告されている。本研究においても、EPAはパルミチン酸だけでなくTNF- $\alpha$ やLPSによる炎症に対しても抗炎症作用を示した。一方、オレイン酸はパルミチン酸による炎症に対してのみ抗炎症作用を有し、NF- $\kappa$ Bの直接抑制効果や細胞膜への微小構造への影響は示唆されなかった。両者の抗炎症・抗アポトーシス効果の共通した機序として、飽和脂肪酸による細胞内DAG蓄積を介したPKC $\theta$ 活性を不飽和脂肪酸が抑制することが明らかになった。本研究により、血清脂肪酸種の違いが尿細管細胞障害の程度に影響を与えうることが明らかとなった。また、その制御機構としてPKC $\theta$ の重要性が示された。これらの結果から、血清脂肪酸分画の是正を目的とした薬物療法および食事療法が、腎尿細管間質病変の進展抑制を標的とした新しい治療戦略となる可能性が示唆された。

【結語】培養近位尿細管細胞において、オレイン酸およびEPAは、PKC $\theta$ 活性の抑制を介し、パルミチン酸刺激によるMCP-1発現およびアポトーシスを抑制した。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	644	氏名	宗村 万里子
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>糸球体漏出タンパク質に結合した脂肪酸は、尿細管細胞において炎症やアポトーシスを惹起し、尿細管障害の原因となる。一方、肥満は末期腎不全の危険因子の一つであり、肥満患者の血清において飽和脂肪酸の増加のような脂肪酸分画の異常が認められる。</p> <p>そこで申請者は、血清脂肪酸分画の異常が肥満に関連した尿細管間質病変の悪化や腎機能障害の進展に関与するのではないかと考え、培養近位尿細管細胞に対する脂肪酸刺激効果の脂肪酸種による違いおよびその効果の分子機構を解析した。</p> <p>その結果、パルミチン酸（飽和脂肪酸）は炎症性サイトカインである monocyte chemoattractant protein-1 の発現とアポトーシスを誘導し、不飽和脂肪酸であるオレイン酸とエイコサペンタエン酸はこの作用を抑制することを見いだした。さらに、これら脂肪酸の作用には、タンパク質キナーゼ C のイソ酵素 <math>\theta</math> を介するシグナル伝達系が関与することを明らかにした。</p> <p>この研究成果は、尿細管間質病変の治療として、血清脂肪酸分画を是正する薬物や食事療法が有効である可能性を示し、臨床応用が期待される。よって本論文は博士（医学）の学位論文に値する。</p> <p>なお申請者は最終試験（論文内容とそれに関連した試問）に合格した。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 525字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 23 年 1 月 27 日)</p>			