

## 論文の内容の要旨

氏名：今野 忠好

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題目：イヌ腎尿細管細胞におけるインターロイキン 1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 発現と機能

急性腎障害（AKI）は、突然に腎臓の機能、特に糸球体濾過率（GFR）が低下し、尿毒症性毒素のため、体液の水分と電解質のバランスが維持できなくなった状態である。急性出血、血管収縮薬、有害物質、敗血症、尿路閉塞など様々な障害が原因となる。AKI は、多臓器不全、血行動態の変化、炎症、直接的な尿細管上皮細胞の障害に関連して生じ、GFR の急速な減少の結果、クレアチニンや血中尿素窒素（BUN）などの窒素性老廃物の蓄積が生じる。AKI では腎単位の構造的な損傷と腎尿細管細胞における細胞死が観察され、損傷した細胞は炎症性メディエーターを放出する。

インターロイキン 1 $\beta$ （IL-1 $\beta$ ）を含む炎症性サイトカインは炎症性メディエーターの 1 つであり AKI の進行に関与している。IL-1 $\beta$  は炎症部位に浸潤した好中球やマクロファージなどの血球系ばかりでなく腎尿細管細胞でも合成され、局所で尿細管機能不全を引き起こす。IL-1 $\beta$  は最初に不活性化型の前駆体 pro-IL-1 $\beta$  として合成され、プロセッシングを受け活性化する。インフラマソームは、センサータンパク質、アダプタータンパク質、カスパーゼ 1 によって構成される細胞質ゾル中のタンパク質複合体であり、カスパーゼ 1 は IL-1 $\beta$  のプロセッシングに関わっている。腎尿細管細胞において、インフラマソーム介在性のカスパーゼ 1 の活性化と IL-1 $\beta$  の産生は虚血再灌流障害や ATP、低浸透圧ストレス、尿酸結石、ミトコンドリア機能不全、リソソーム障害などのいくつかの細胞外および細胞内刺激によって誘導されることが知られている。

急性腎障害を含む腎障害の患畜においては、最初は無症状のため、診断や進行状況の判断が難しく、致死率も高い。そのため、腎機能障害を早期に診断できるバイオマーカーの開発が望まれている。現在、早期の AKI の診断に血清クレアチニンと BUN が有用とされているが、そのレベルが年齢、性別、筋肉量、栄養状態、感染症、体液の分布用量や薬物などの腎臓以外の要因によっても影響を受けることから、腎機能を完全には反映していないと考えられる。

リポカリン 2（neutrophil gelatinase-associated lipocalin）は、リポカリンファミリーに属する 25 kDa のタンパク質であり、シデロフォアに高い親和性を持ち、鉄のキレートや運搬を行い、感染における好中球の機能に関与している。近年、炎症性疾患において様々な上皮細胞で発現が促進されるタンパク質と考えられており、AKI においては有用なバイオマーカーとして考えられている。しかしながら、腎臓尿細管上皮細胞におけるリポカリン 2 の発現調節と機能はいまだ不明である。本研究では、イヌ腎尿細管上皮細胞由来の MDCK 細胞を用い、腎尿細管細胞における IL-1 $\beta$  誘導性のリポカリン 2 の発現と機能について検討した。

### 1. MDCK 細胞における IL-1 $\beta$ 刺激による細胞間接着タンパク質の局在変化とバリア機能の低下

腎尿細管細胞は、細胞間接着部を移動する傍輸送経路を介して、電解質、マクロ分子、水などの輸送を制御している。虚血や毒物などの刺激に続いて局所的に産生される炎症性メディエーターは、腎尿細管細胞においては、細胞骨格や接着分子の局在の崩壊を誘導し、機能低下をもたらすことが考

えられている。本研究では、タイト結合の裏打ちタンパク質 ZO-1 と接着結合タンパク質 E-cadherin の局在を指標に、IL-1 $\beta$  による細胞間接着部の形態的变化を、また、経上皮細胞抵抗 (TER) 値の変化を指標に、IL-1 $\beta$  による細胞間接着部の機能変化を検討した。

対照とした 10% ウシ胎児血清 (FBS) 培養条件下の細胞においては、ZO-1 と E-cadherin は細胞膜上に共局在していた。一方、2% FBS 培養条件下の細胞では変化は見られなかったが、そこに IL-1 $\beta$  を加えて培養すると、ZO-1 と E-cadherin の細胞膜局在は喪失し、局在が細胞質に変化した。

MDCK 細胞をトランズウェルにて培養し経時的に TER 値を計測したところ、対照細胞において TER 値は時間依存的に増加したが、2% FBS 培養条件下の細胞ではわずかな TER 値の減少が認められ、そこに IL-1 $\beta$  刺激を加えた細胞では 5 日以降に TER 値は有意に減少した。

以上より、IL-1 $\beta$  は MDCK 細胞において細胞接着部の形態変化と傍輸送機能低下を惹起することが明らかとなり、本実験系が腎尿細管細胞障害のモデル系として有用であると考えられた。

## 2. MDCK 細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性リポカリン 2 mRNA 発現とタンパク質分泌

MDCK 細胞において IL-1 $\beta$  が細胞障害性を惹起することから、IL-1 $\beta$  刺激がリポカリン 2 発現に関わるか否かを検討した。

MDCK 細胞を 10% FBS, 2% FBS または 2% FBS と IL-1 $\beta$  の条件下で 0~72 時間培養し、培養上清中に分泌されたリポカリン 2 濃度を ELISA にて測定した。10% FBS 培養条件下では有意なリポカリン 2 の分泌は認められなかったが、2% FBS 培養条件下では経時的にわずかな上昇が認められ、2% FBS と IL-1 $\beta$  培養条件下では有意な分泌が認められた。0~100 pM の IL-1 $\beta$  で 48 時間刺激した細胞では、IL-1 $\beta$  の用量依存的にリポカリン 2 の分泌濃度が上昇した。

続いて MDCK 細胞における IL-1 $\beta$  によるリポカリン 2 mRNA 発現をリアルタイム PCR により検討すると、リポカリン 2 タンパク質分泌と同様に、10% FBS 培養条件下では有意な上昇は認められず、2% FBS 培養条件下では経時的にわずかな上昇が認められ、2% FBS と IL-1 $\beta$  培養条件下では有意な発現上昇が認められた。0~100 pM の IL-1 $\beta$  で 48 時間刺激した細胞では、IL-1 $\beta$  の用量依存的にリポカリン 2 mRNA 発現が上昇した。

IL-1 $\beta$  によるリポカリン 2 mRNA 発現とタンパク質分泌の経時的変化は、細胞間接着部の形態の変化や TER 値の増加の時間変化と比較すると、先立って誘導されることが示されたことから、リポカリン 2 は腎障害の早期診断に有用なバイオマーカーであると考えられた。

## 3. MDCK 細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性リポカリン 2 発現に対する MAPK 経路の関与

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) は、炎症性サイトカインや外的ストレス等の様々な刺激によって活性化されるセリン/スレオニンキナーゼであり、リン酸化を介した核への情報伝達経路として機能している。主として p38, JNK, MEK/ERK 経路の 3 つの MAPK 経路が種々の刺激に応じて活性化し、生理学的・病理学的応答を引き起こす。一方、NF- $\kappa$ B は転写調節因子の 1 つであり、急性炎症反応に関わることが知られている。IL-1 $\beta$  はヒト糸球体間質細胞を含む様々な細胞において、MAPK 経路や NF- $\kappa$ B を活性化し、炎症反応に関わることが報告されている。本章では、MAPK 経路や NF- $\kappa$ B シグナリング経路の MDCK 細胞における IL-1 $\beta$  によるリポカリン 2 発現への関与について検討を行った。

MAPK および NF- $\kappa$ B 阻害剤を用いて、リアルタイム PCR による IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 mRNA 発現を指標に検討を行ったところ、ERK1/2 阻害薬である FR180204 (25  $\mu$ M) や p38 阻害薬である SB239063 (20  $\mu$ M) で 1 時間前処理を行った細胞において、IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 mRNA 発現は有意に抑制された。一方で、JNK 阻害剤である SP600125 (10  $\mu$ M) あるいは MEK 阻害剤である U0126 (20  $\mu$ M) の前処理では、IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 mRNA 発現は部分的な抑制が認められた。しかし、NF- $\kappa$ B 経路を活性化する酵素 I $\kappa$ B キナーゼ阻害薬である BAY-117082 (10  $\mu$ M) や TPCA-1 (10  $\mu$ M) 全処理は、IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 mRNA 発現に影響を与えなかった。さらに、ERK1/2 および p38 阻害剤の IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 タンパク分泌に対する影響について検討したところ、ERK1/2 および p38 阻害剤の前処理細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 タンパク質分泌が有意に抑制された。

以上の結果から、IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 の mRNA 発現とタンパク分泌には主として ERK1/2 と p38 経路が、また、JNK 経路が補助的に関与していることが示唆された。一方、ERK1/2 の上流でその活性調節に関わるとされる MEK の阻害剤や、MAPK と共役するとされる NF- $\kappa$ B の阻害剤の効果が認められなかったことから、ERK1/2 には異なる調節因子の存在が、転写調節には NF- $\kappa$ B 以外の調節因子が関わるということが考えられる。

#### 4. MDCK 細胞における IL-1 $\beta$ による上皮細胞機能低下に対するリポカリン 2 の効果

リポカリン 2 の機能については既に報告がなされているが、不明な点が多い。そこで、MDCK 細胞において IL-1 $\beta$  は細胞接着部の形態変化と傍輸送機能低下を惹起することから、リコンビナントリポカリン 2 (re-リポカリン 2) を用いて、IL-1 $\beta$  誘導性の MDCK 細胞障害に対する影響を検討した。

第 1 章で示したように、2% FBS 培養条件下で IL-1 $\beta$  刺激を行うと細胞膜上に共局在していた ZO-1 と E-cadherin の細胞膜上の局在は喪失し、細胞質に局在が変化した。しかし、100 ng/ml re-リポカリン 2 で処理した細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性の E-cadherin と ZO-1 の局在変化は認められず、対照と同様の細胞膜上の局在が維持された。ついで、TER 値を指標に、MDCK 細胞の機能に対するリポカリン 2 の効果を検討したところ、2% FBS 培養条件下で IL-1 $\beta$  刺激を行うと TER 値の有意な減少が見られたが、re-リポカリン 2 で処理した細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性の TER 値減少は抑制された。

これらの結果から、リポカリン 2 は細胞間接着関連タンパク質の局在を維持し、腎尿細管細胞の傍細胞輸送機能を保護する作用を有することが示唆された。

IL-1 $\beta$  は IL-1 受容体を介して細胞内のシグナル伝達を活性化し、IL-8 やシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) の発現を誘導し、炎症の発生に関与する。そこで、MDCK 細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 mRNA 発現に対する re-リポカリン 2 の効果を検討したところ、re-リポカリン 2 処理は IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 mRNA 発現には影響しなかった。このことは、re-リポカリン 2 の効果は、IL-1 $\beta$  の受容を阻害することに起因するものではないことを示唆している。一方で、SLC22A17 がリポカリン 2 受容体として報告されている。そこで、MDCK 細胞における SLC22A17 の mRNA 発現をリアルタイム PCR にて検討したところ、SLC22A17 mRNA の発現が認められた。

以上より、MDCK 細胞において、リポカリン 2 は受容体である SLC22A17 を介して作用することが考えられた。

## 結論

本研究から、MDCK 細胞において、IL-1 $\beta$  は細胞機能障害を引き起こすが、それに先立って、MAPK である p38 や ERK1/2 経路を活性化し、リポカリン 2 の発現とタンパク質の分泌が誘導されること、また、分泌されたリポカリン 2 は MDCK 細胞の形態と機能を保護する作用を有することが明らかとなった。以上のことから、リポカリン 2 は AKI の早期バイオマーカーになりうることと、新しい治療標的となりうることの可能性が示唆された。