

論文審査の結果の要旨

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 β 誘導性リポカリン 2 発現と機能

審査委員： （主査） 教授 杉 谷 博 士
 （副査） 教授 渋 谷 久
 教授 中 山 智 宏
 教授 森 友 忠 昭

急性腎障害 (AKI) 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。

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 のタンパク質である。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、近年、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。

本研究は、イヌ腎尿細管上皮細胞由来の MDCK 細胞を用い、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とされる炎症性サイトカインインターロイキン 1 β (IL-1 β) 刺激により腎尿細管細胞において誘導されるリポカリン 2 の発現と機能について検討したものである。

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。そこで、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 β による細胞間接着部の形態観察を行うと、対照とした 10% ウシ胎児血清 (FBS) 培養条件下の MDCK 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が、2% FBS 培養条件下で IL-1 β 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。また、経上皮細胞抵抗 (TER) 値の変化を指標に、IL-1 β による細胞間接着部の機能変化を検討すると、対照細胞において TER 値は時間依存的に増加したが、2% FBS 培養条件下で IL-1 β 刺激を加えた細胞では培養 5 日以降に TER 値は有意に減少した。これらのことから、IL-1 β 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った。

そこで、本実験系を腎尿細管細胞障害のモデル系として、IL-1 β 刺激によるリポカリン 2 発現について検討した。MDCK 細胞の 10% FBS 培養条件下では有意なリポカリン 2 タンパク質の分泌は認められなかったが、2% FBS と IL-1 β 培養条件下では培養 24~72 時間で有意な分泌が認められ、用量依存性も認められた。次に、MDCK 細胞における IL-1 β によるリポカリン 2 mRNA 発現を検討すると、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 と IL-1 β 培養条件下では有意な発現上昇が認められ、用量依存性も認められた。IL-1 β 誘導性のリポカリン 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。

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) は、炎症性サイトカインを含む様々な刺激によって活性化されるリン酸化酵素であり、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、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。一方、NF- κ 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。そこで、MAPK 経路や NF- κ B 経路の MDCK 細胞における IL-1 β によるリポカリン2発現への関与について阻害剤を用いて検討した。IL-1 β 誘導性リポカリン2 mRNA 発現は ERK1/2 及び p38 阻害薬の前処理では、有意に抑制され、JNK 阻害剤あるいは MEK 阻害剤の前処理では、部分的な抑制が認められた。しかし、NF- κ B 阻害薬の前処理は、IL-1 β 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、IL-1 β 誘導性リポカリン2タンパク分泌は ERK1/2 および p38 阻害剤で有意に抑制された。以上の結果から、IL-1 β 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 や、MAPK と共役するとされる NF- κ 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- κ B 以外の調節因子が関わることを考えられた。

続いて、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 β 誘導性の MDCK 細胞障害に対する影響を検討した。前述のように、2% FBS 培養条件下で IL-1 β 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。リポカリン2で処理した細胞では、IL-1 β 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。また、2% FBS 培養条件下での IL-1 β 誘導性 TER 値の減少も、re-リポカリン2処理で抑制された。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。MDCK 細胞における IL-1 β 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 β 誘導性 IL-8 mRNA 発現には影響しなかった。一方で、リポカリン2受容体として報告されている SLC22A17 の MDCK 細胞における発現を検討したところ、SLC22A17 mRNA の発現が認められた。このことから、re-リポカリン2の効果は、IL-1 β の受容を阻害することに起因するものではなく、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。

以上の結果より、イヌ腎尿細管細胞において、炎症性サイトカイン IL-1 β は細胞機能障害を引き起こすが、それに先立って、MAPK の 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は腎尿細管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。

本論文は、リポカリン2がイヌにおける 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を示唆したものであり、獣医療に大きく貢献すると考えられる。

よって本論文は、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 29 年 7 月 27 日