

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

日本大学大学院獣医学研究科

今野 忠好

2017

第1章 序論	1
第2章 MDCK 細胞における IL-1 $\beta$ 刺激による細胞間接着タンパクの 局在変化とバリア機能の低下	4
2.1 緒言	5
2.2 材料および方法	6
2.2.1 材料	6
2.2.2 細胞培養	6
2.2.3 IL-1 $\beta$ 刺激	7
2.2.4 免疫組織化学染色	7
2.2.5 経上皮細胞電気抵抗 (TER) 値の測定	8
2.2.6 統計学的解析	8
2.3 結果	8
2.4 考察	9
第3章 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	13
3.1 緒言	14
3.2 材料および方法	14
3.2.1 材料	14
3.2.2 細胞培養	15
3.2.3 IL-1 $\beta$ 刺激	15
3.2.4 Real-time RT-PCR	15
3.2.5 リポカリン 2 濃度測定	16

3.2.6	統計学的解析	16
3.3	結果	17
3.4	考察	18
第4章	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 MAP キナーゼ経路の関与	23
4.1	緒言	24
4.2	材料および方法	25
4.2.1	材料	25
4.2.2	細胞培養	25
4.2.3	IL-1 $\beta$ 刺激	25
4.2.4	Real-time RT-PCR	26
4.2.5	リポカリン 2 濃度測定	26
4.2.6	統計学的解析	27
4.3	結果	27
4.4	考察	28
第5章	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	32
5.1	緒言	33
5.2	材料および方法	33
5.2.1	材料	33
5.2.2	細胞培養	34
5.2.3	IL-1 $\beta$ 刺激	34

5.2.4	免疫組織化学染色	34
5.2.5	経上皮細胞電気抵抗 (TER) 値の測定	35
5.2.6	Real-time RT-PCR	35
5.2.7	統計学的解析	36
5.3	結果	37
5.4	考察	38
第6章 統括		45
謝辞		48
引用文献		49

# 第 1 章

## 序 論

腎障害はイヌやネコに共通してみられる疾患であり、しばしば重篤な症状に至ることが知られている。急性腎障害 (AKI) は急性出血、血管収縮薬、有害物質、敗血症、尿路閉塞などのような様々な障害によって生じる疾病であるが、診断が難しく、診断後短期間に死亡する例も多く、伴侶動物における死亡率が 50-60%という報告もある (Vaden et al., 1997; Worwag & Langstone, 2008; Thoen & Kerl, 2011)。AKI の高死亡率の起因となっているのは、腎臓における障害の進行が早く、さらに、早期の症候の診断法が乏しいことにある。AKI においては、糸球体濾過量 (GFR) の急速な低下を伴うため、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 (Basile et al., 2012)。そのため、血漿中クレアチニン濃度は腎機能診断のマーカーとして測定がなされている (Narayanan & Appleton, 1980; Finco et al., 1995; Braun et al., 2003)。しかし、これらの診断マーカーは感度も低く、さらに、腎障害以外の因子によりその値が変動することから、新たな腎障害診断マーカーが求められている (Edelstein, 2008)。

リポカリン2はリポカリンファミリーの1つであり、別名 neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) と呼ばれる分子量 25 kDa の糖タンパク質である (Xu et al., 1994)。最初は白血球から精製されたが、その後、腎臓を含む様々な臓器での発現が認められている (Kjeldsen et al., 1993; Coland & Borregaard, 1997)。ヒトにおいて、リポカリン2は心臓外科手術、腎臓移植、GFR 低下を伴う慢性心機能障害、敗血症などに関連した AKI を予測するための有効なバイオマーカーの1つと考えられている (Mishra et al., 2005; Wagener et al., 2006; Poniatowski et al., 2009; Shapiro et al., 2010)。

近年、イヌにおいてもリポカリン2が腎障害の診断マーカーとなりうることが示唆されており、AKI 診断マーカーとして臨床的に尿中リポカリン2濃度の測定が行われている (Lee et al., 2012; Cobrin et al., 2013; Segev et al., 2013; Palm et

al., 2016)。そこで、本研究は、イヌ腎臓におけるリポカリン2の発現と機能について明らかにする目的で、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炎症性サイトカインの1つであるインターロイキン1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) による腎臓の炎症モデルを作成し、次の検討を行った。

第2章では、腎尿細管細胞障害のモデル系作成を目的として、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、MDCK細胞におけるIL-1 $\beta$ 刺激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。

第3章では、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、リポカリン2 mRNA発現とリポカリン2タンパク質分泌を指標に検討した。

第4章では、種々の細胞でIL-1 $\beta$ 刺激によりマイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPキナーゼ)経路が活性化されることが報告されていることから、主たるMAPキナーゼ経路であるp38, JNK, MEK/ERKの3経路の阻害剤を用い、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MAPキナーゼ経路の関与を検討した。

第5章では、リポカリン2の機能については今までにも報告がなされているが、不明な点が多いことから、MDCK細胞におけるIL-1 $\beta$ 誘導性の細胞接着部の形態変化と傍輸送機能低下に対するリコンビナントリポカリン2の効果より、IL-1 $\beta$ 誘導性のMDCK細胞障害に対する影響を検討した。

## 第 2 章

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



## 2.1 緒言

急性腎障害 (AKI) は、多臓器不全、血行動態変化、炎症、直接的な尿細管上皮細胞の障害に関連して生じ、治療が遅れることにより、不可逆的な腎障害と腎臓でのネクロシスを誘導し、高い死亡率を示す (Basile et al., 2012)。AKI では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し、それが AKI の重症度や予後に影響を与えると考えられている (Wen et al., 2010; Bonventre & Yang, 2011; Basile et al., 2012; Yang et al., 2014)。

炎症メディエーターは腎尿細管細胞によって合成され、パラクラインやオートクラインによる尿細管機能不全を引き起こす (Sugiura et al., 1999)。IL-1 $\beta$  や IL-18 などのインターロイキンは、AKI の発展や進行に関与している (Kelly et al., 1996; Bulent Gul et al., 2008; Sancho-Martínez et al., 2015)。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、インフラマソームやカスパーゼ 1 の活性化を通して成熟したものになる (Martinon & Tschopp, 2007; Miao et al., 2011)。インフラマソームは、センサー (NOD-like receptor もしくは非 NOD-like receptor)、アダプタータンパク質およびカスパーゼ 1 の3つの成分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、この複合体がピロトーシスや細胞死などの活性化を介在する (Miao et al., 2011; Chang et al., 2014)。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、リソソームの破裂などのいくつかの細胞外や細胞内刺激によって誘導されることが報告されている (Anders & Lech, 2013; Chang et al., 2014; Masood et al., 2015; Hutton et al., 2016)。

MDCK 細胞はイヌ腎尿細管上皮細胞由来の細胞であり、極性を有し、細胞間

接着タンパク質によりバリア機能を有しているため、傍細胞輸送機能の研究に適した細胞である (Irvine et al., 1999)。そこで、本章では、炎症性インターロイキン IL-1 $\beta$  による細胞機能への影響を明らかにする目的で、MDCK 細胞における細胞間接着タンパク質の局在とバリア機能への IL-1 $\beta$  の効果について検討を行った。

## 2.2 材料および方法

### 2.2.1 材料

イヌ recombinant IL-1 $\beta$  は Kingfisher Biotech 社 (Saint Paul, MN) から購入した。抗 ZO-1 マウスモノクローナル抗体 (Clone: ZO-1-1A12), 抗ウサギ IgG 抗体ヤギ Alexa fluor 488-結合型 F(ab')<sub>2</sub> 抗体断片, TO-PRO-3-iodide, および ProLong Gold Antifade Reagent は Life Technologies 社 (Carlsbad, CA) から購入した。抗 E-cadherin ウサギモノクローナル抗体 (Clone: 24E10) は Cell Signaling Technology Japan (Tokyo, Japan) より購入した。培養プレート, フラスコは Thermo Fisher Scientific 社 (St. Waltham, MA) より購入した。

### 2.2.2 細胞培養

MDCK 細胞 (NBL-2) は JCRB 細胞バンク (Osaka, Japan) より購入した。細胞は 5% CO<sub>2</sub>, 37°C の環境で Dulbecco's Modified Eagle's Medium with low glucose (DMEM-LG; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) に 10% の牛胎児血清 (FBS) を添加して培養を行った。培養液は週に 2 回交換した。細胞が 90% コンフルエント状態に達した時点で, 0.25% trypsin-EDTA を用いて培養フラスコから細胞を剥がし, 75-cm<sup>2</sup> culture flask (Thermo Fisher Scientific, Inc., St. Waltham,

MA) に  $5 \times 10^5$  cells /75 cm<sup>2</sup> の濃度で播種した。10 代継代を行った MDCK 細胞をこの後の実験に用いた。

### 2.2.3 IL-1 $\beta$ 刺激

MDCK 細胞は 6-well culture plates (Thermo Fisher Scientific, Inc.) に  $5 \times 10^4$  cells/2 ml culture medium/well または 90-mm dish (Thermo Fisher Scientific, Inc.) に  $5 \times 10^5$  cells/12 ml culture medium になるように播種し、培養した。2% FBS を含む DMEM-LG 培地で 12 時間前処理をした後、イヌ recombinant IL-1 $\beta$  刺激を加えた。

### 2.2.4 免疫組織化学染色

MDCK 細胞を 35-mm glass base dish (Iwaki, Tokyo, Japan) に  $5 \times 10^4$  cells/2 ml 培養液/well になるよう播種し、上記に示すように IL-1 $\beta$  刺激を行った。細胞を 4% paraformaldehyde (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) にて 15 分間固定を行った。固定した細胞は 0.2% Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich 社, St Louis, MO) にて室温で 15 分間処理により可透過性にした。その後、細胞を一次抗体である抗 E-cadherin ウサギ抗体 (500 倍希釈) あるいは抗 ZO-1 マウス抗体 (500 倍希釈) とともに室温で 90 分間インキュベーションした。0.2% polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween-20) を含む PBS にて洗浄後, Alexa fluor® 594-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragments of goat anti-mouse IgG (H+L) (1000 倍希釈), Alexa fluor® 488-conjugated phalloidin (1000 倍希釈) および TO-PRO®-3-iodide (1000 倍希釈) を用いて暗所にて室温で 60 分間反応させた。二次抗体と反応させた後, 0.2% Tween-20 を含む PBS にて洗浄後, 乾燥させ, ProLong® Gold Antifade Reagent で封入した。抗体の非特異的コントロールとして二次抗体のみで処理した細胞を

用いた。観察は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-510; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) にて観察した。

### 2.2.5 経上皮細胞電気抵抗 (TER) 値の測定

MDCK 細胞をトランズウェル上に  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> になるように播種し、培養後、単細胞層を介した電気抵抗値を Millicell<sup>®</sup> ERS-2 抵抗値測定システム (Millipore, Billerica, MA) により測定した。細胞を播種しないトランズウェルでの電気抵抗値を差し引くことで経上皮電気抵抗 (TER) 値とした (Kimizuka & Koketsu, 1964)。

### 2.2.6 統計学的解析

データは平均値  $\pm$  標準誤差 (SE) で示した。統計解析は統計解析ソフト StatMateIV (ATMS, Tokyo, Japan) を用いて行った。データは一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を用いて解析し、タイムコースのデータのみ二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を用いて解析した。

## 2.3 結果

虚血や毒物などの刺激により炎症性メディエーターが局所的に産生され、腎障害を誘導する。腎尿細管細胞においては、細胞骨格の統合性の損失や接着分子の局在の崩壊が誘導される (Zang et al., 2014)。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 の局在に対する IL-1 $\beta$  の効果を検討した。

図 2-1 に示すように、E-cadherin と ZO-1 は、IL-1 $\beta$  刺激前の MDCK 細胞にお

いては細胞膜近傍に局在していた。10% FBS を含む培養液で 7 日間培養した時にも E-cadherin と ZO-1 の局在に変化は認められなかった。しかし、2% FBS を含む培養液による培養では、両タンパク質の細胞膜近傍から細胞質側への局在の変化が観察され、さらに IL-1 $\beta$  (50 pM) 刺激を行った細胞では、その ZO-1 と E-cadherin の局在の変化はより明確となった。

腎尿細管細胞において、水や電解質の傍細胞輸送の制御は、バリア機能として極めて重要である (Furuse et al., 2001; Peerapen & Thongboonkerd, 2013)。そこで、次に、TER をモニタリングすることで、MDCK 細胞におけるバリア機能に対する IL-1 $\beta$  の効果を検討した。

図 2-2 に示すように、10% FBS を含む培養液にて培養した MDCK 細胞 (コントロール) においては、0-7 日目まで TER 値は時間依存的に増加した。2% FBS を含む培養液で培養した細胞においては、4 日目以降にコントロールに比較して若干の TER 値の低下が認められた。しかし、2% FBS を含む培養液に IL-1 $\beta$  (50 pM) を加えた培養液で培養された細胞においては、5 日以降に TER 値の有意な減少が認められた。

## 2.4 考察

本章では、MDCK細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の E-cadherin と ZO-1 の局在の崩壊とバリア機能の低下について示した。

上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition: EMT) は上皮細胞が間葉系線維芽様細胞に誘導される生物的過程のことである。EMT は E-cadherin のような主要な上皮細胞タンパク質のダウンレギュレーションによって特徴づけられている (Fan et al., 2001; Kalluri & Neilson, 2003; Kalluri & Weinberg, 2009)。腎臓病

において細胞表面の E-cadherin のダウンレギュレーションが観察され、EMT はAKIの進行や発展において重大な役割を担っていると考えられている (Zeisberg et al., 2008; Thiery et al., 2009; Kriz et al., 2011)。角膜上皮細胞, 中皮細胞, 網膜上皮細胞, 癌細胞のような様々な上皮細胞において, IL-1 $\beta$  は細胞間接着の崩壊や繊維化活性を促進すると報告されている (Kimura et al., 2009; Strippoli et al., 2010; Palenski et al., 2013; Lee et al., 2015)。ラットの腎臓上皮細胞株 (NRK52E 細胞) においては, IL-1 $\beta$  は E-cadherin の発現を減少させると報告されている (Fan et al., 2001)。MDCK細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の E-cadherin と ZO-1 の局在の崩壊とバリア機能の低下は, IL-1 $\beta$  が炎症や EMT を仲介することで AKI の進行に関わることを強く示唆するものである。

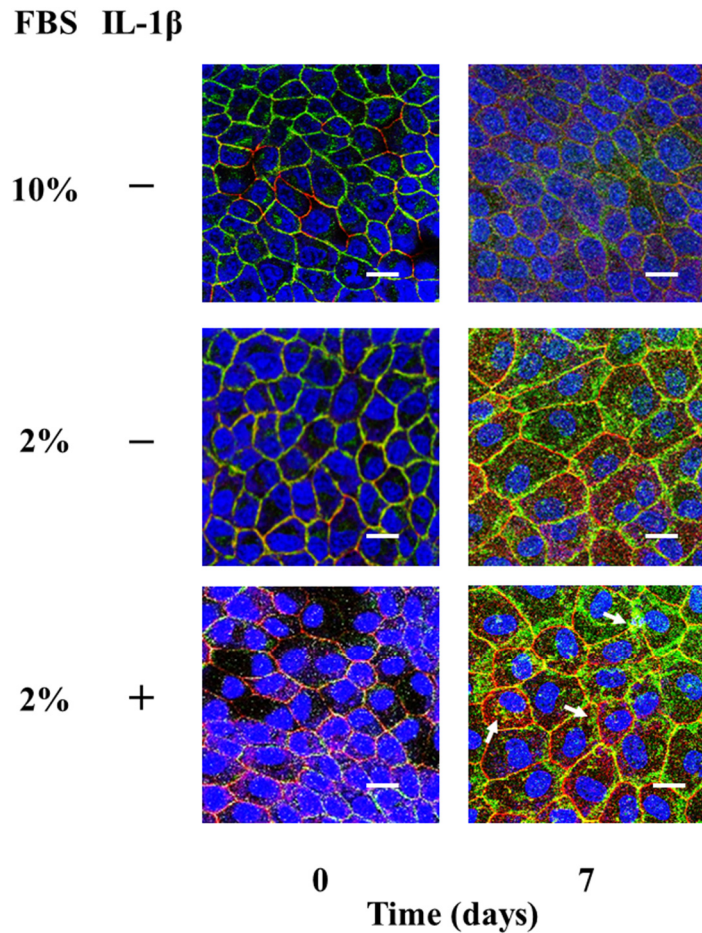


図 2-1 MDCK 細胞における IL-1 $\beta$  による E-cadherin と ZO-1 の局在の変化

MDCK 細胞を 10% FBS, 2% FBS または 2% FBS と IL-1 $\beta$  (50 pM) を含んだ培養液で 0-7 日間培養した。抗 E-cadherin 抗体 (緑) および抗 ZO-1 抗体 (赤) を用いて、それぞれのタンパク質の蛍光染色を行った。同時に核染色 (青) も行った。IL-1 $\beta$  刺激を行った細胞では、細胞膜近傍の E-cadherin と ZO-1 の局在が喪失し斑状の細胞質染色パターンが観察された。

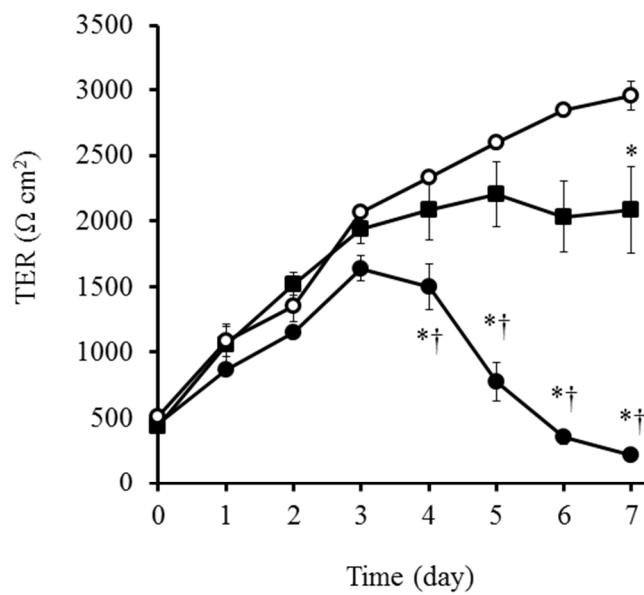


図 2-2 IL-1 $\beta$  刺激による TER 値の低下

MDCK細胞を10% FBS (○), 2% FBS (■) または2% FBSと50 pM IL-1 $\beta$  (●) を含んだ培養液で0-7日間培養した。結果は3例の平均値  $\pm$  標準誤差で示した。  
 \* $P < 0.05$  (10% FBS培養液で培養した細胞との比較), † $P < 0.05$  (IL-1 $\beta$  を含まない2% FBSで培養した細胞との比較)。



### 第3章

## 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

### 3.1 緒言

AKI の早期の診断のためのバイオマーカーに関しては検討がなされてきた。血清クレアチニンとBUN は AKI のバイオマーカーとして利用可能である。しかし、血清クレアチニンとBUN は年齢、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非腎臓因子によっても影響を受けることから、真の腎機能を反映しないこともありうるということが指摘されている (Edelstein, 2008)。そのため、より有用な AKI のバイオマーカーが求められている。

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のタンパク質であり、シデロフォアに高い親和性をもち、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。リポカリン2 は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 (Nielsen et al., 1996; Tong et al., 2005), 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 (Vaidya et al., 2008; Mao et al., 2011; de Geus et al., 2012)。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な点が多く残されている。

第 2 章で炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  が MDCK 細胞における病理学的効果を示したことから、本章においては、腎尿細管細胞のモデルとして MDCK 細胞を用い、IL-1 $\beta$  誘導性のリポカリン2 の発現調節について検討した。

### 3.2 材料および方法

#### 3.2.1 材料

イヌ recombinant IL-1 $\beta$  は Kingfisher Biotech (Saint Paul, MN) から購入した。TRIzol, PrimeScript RT Master Mix と SYBR Premix Ex TaqII は TaKaRa Bio (Shiga,

Japan) から購入した。リポカリン 2 測定キットは BioPorto Diagnostics A/S (Hellerup, Denmark)より購入した。培養プレート, フラスコは Thermo Fisher Scientific (St. Waltham, MA) より購入した。

### 3.2.2 細胞培養

第 2 章と同様に, MDCK 細胞は 5% CO<sub>2</sub>, 37°C の環境で D-MEM-LG (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) に 10% の牛胎児血清 (FBS) を添加して培養を行った。培養液は週に 2 回交換した。細胞が 90%コンフルエンスに達した際に, 0.25% trypsin-EDTA を用いて培養フラスコから細胞を剥がし, 集めた細胞を  $5 \times 10^5$  cells /75 cm<sup>2</sup> の濃度で培養フラスコに播種した。10 代継代を行った MDCK 細胞を実験に用いた。

### 3.2.3 IL-1 $\beta$ 刺激

MDCK 細胞は 6-well culture plates (Thermo Fisher Scientific, Inc.) に  $5 \times 10^4$  cells/2 ml culture medium/well または 90-mm dish (Thermo Fisher Scientific, Inc.) に  $5 \times 10^5$  cells/12 ml culture medium になるように播種し, 培養した。2% FBS を含む DMEM-LG 培地で 12 時間前処理をした後, イヌ recombinant IL-1 $\beta$  刺激を加えた。

### 3.2.4 Real-time RT-PCR

MDCK 細胞から TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出した。一本鎖相補性 DNA (first-strand cDNA) の合成は, 500 ng の total RNA を用い, PrimeScript RT Master Mix を用いて行った。Real-time RT-PCR は, 2  $\mu$ l の first-strand cDNA を SYBR Premix EX Taq II とイヌリポカリン 2 や house keeping protein である TATA

box binding protein (TBP) に特異的なプライマーを加え、総量 25  $\mu$ l で反応させた。表 3-1 に real-time RT-PCR で用いたプライマーの塩基配列を示す。RNase/DNA が含まれていない水とそれぞれの RNA サンプルを入れたものをコントロールとした。

PCR は Thermal Cycler Dice Real Time System II (TaKaRa Bio) を用いて行った。PCR 反応は、初期変性を 95°C で 30 秒間を 1 回、次いで変性処置を 95°C で 5 秒間行い、アニーリングと伸長を 60°C で 30 秒間 40 回の条件にて行った。プライマーの特異性は融解解離曲線分析と PCR 産物のダイレクトシーケンスを行なって確認した。

データの解析は TP900 DiceRealTime v4.02B を用いて、second derivative 法と comparative cycle threshold ( $\Delta\Delta$ Ct) 法を適用した。同量の cDNA を使用した TBP の増幅を内在性コントロールとし、また、MDCK 細胞 (time : 0) からの cDNA の増幅を較正標準として用いた。

### 3.2.5 リポカリン 2 濃度測定

MDCK 細胞は 6-well culture plates (Thermo Fisher Scientific, Inc.) に  $5 \times 10^4$  cells/2 ml culture medium/well になるように播種し、培養後、上記で示したように IL-1 $\beta$  刺激を行い、培養液を集めた。培養液中のリポカリン 2 濃度は市販の ELISA キットを用いて測定した。

### 3.2.6 統計学的解析

データは平均値  $\pm$  標準誤差 (SE) で示した。統計解析は統計解析ソフト StatMateIV (ATMS, Tokyo, Japan) を用いて行った。データは一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を用いて解析し、タイフコースのデータのみ二元配置分散分

析 (two-way ANOVA) を用いて解析した。

### 3.3 結果

最初に MDCK 細胞におけるリポカリン 2 mRNA 発現に対する IL-1 $\beta$  の効果を real-time PCR によって検討した。MDCK 細胞を 10% FBS, 2% FBS または 2% FBS と IL-1 $\beta$  (50 pM) を含んだ培養液で 0-72 時間培養した。対照とした 10% FBS 培養液にて培養した時にはリポカリン 2 mRNA 発現は若干の上昇しか認められなかったが、2% FBS にて培養した時には、48 時間以降にリポカリン 2 mRNA 発現が促進され、72 時間目では対照と比べて有意に上昇した (図 3-1A)。さらに、2% FBS に IL-1 $\beta$  (50 pM) を含んだ培養液では、リポカリン 2 mRNA 発現は 48-72 時間で時間依存的に有意に上昇した。2% FBS 培養液に 0-100 pM と濃度を変えた IL-1 $\beta$  を加えて 48 時間培養を行った時、MDCK 細胞におけるリポカリン 2 mRNA 発現は、IL-1 $\beta$  の容量に依存して上昇し、50 pM でほぼプラトーに達した (図 3-1B)。

次に、IL-1 $\beta$  による MDCK 細胞からのリポカリン 2 の放出について検討した。リポカリン 2 mRNA 発現の検討と同様に、MDCK 細胞を 10% FBS, 2% FBS または 2% FBS と IL-1 $\beta$  (50 pM) を含んだ培養液で 0-72 時間培養し、培養液中に放出されたリポカリン 2 の濃度を ELISA にて測定した。対照とした 10% FBS 培養液にて培養した時にはリポカリン 2 放出は殆どは認められなかったが、2% FBS にて培養した時には、48 時間以降にリポカリン 2 放出が促進され、72 時間目では対照と比べて有意に上昇した (図 3-2A)。さらに、2% FBS に IL-1 $\beta$  (50 pM) を含んだ培養液では、リポカリン 2 放出は 48-72 時間で時間依存的に有意に上昇した。2% FBS 培養液に 0-100 pM と濃度を変えた IL-1 $\beta$  を加えて 48 時間培養を

行った時、MDCK 細胞からのリポカリン 2 放出は、リポカリン 2 mRNA 発現と同様に、IL-1 $\beta$  の容量に依存して上昇し、50 pM でほぼプラトーに達した (図 3-2B)。

以上の結果は、MDCK 細胞において IL-1 $\beta$  がリポカリン 2 発現を誘導することを示唆している。

### 3.4 考察

血清クレアチニンとBUNはAKIの診断に典型的に用いられている。しかし、血清クレアチニンは性別や年齢、骨格筋量、栄養状態、感染、体積分布や薬物療法などの非腎臓因子にの影響を受けることが知られている (Edelstein et al., 2008)。また、BUNもタンパク質摂取、異化状態、上部消化管出血、体積状態、高容量ステロイド療法などの腎臓機能とは独立した因子による影響を受けることから、AKI の最適な診断ツールではない (Edelstein et al., 2008)。そのため、AKI のための高い感度と特異度を有する臨床適用可能なバイオマーカーが検討されている (Vaidya et al., 2008)。

リポカリン2 発現は腎臓において認められ、遠位尿細管や集合管で局所的に産生されたリポカリン2 は尿中で検出可能である (Vaidya et al., 2008; de Geus et al., 2012)。虚血性もしくはシスプラチン誘発性の腎障害マウスモデルにおいて、尿中にリポカリン2 が検出されることが報告されている (Mishra et al., 2003; Mishra et al., 2004)。また、心臓外科手術後のAKI に関連した尿中リポカリン2 濃度の増加が報告されている (Wagener et al., 2006)。さらに、尿中リポカリン2 の増加は AKI の重症度との相関も報告されている。下痢を伴う溶血性尿毒症症候群の子供たちを対象とした研究では、尿中リポカリン2 はAKI の重症度と透析

の必要性が予測できたと報告されている (Trachtman et al., 2006)。心肺バイパス手術後に AKI に罹患した患者においては、尿中リポカリン2 濃度は、AKI の持続期間や重症度、入院期間、透析の要求量や死亡率と相関したという報告もある (Bennett et al., 2008)。第 2 章では、IL-1 $\beta$  誘導性の形態変化や機能低下が認められたが、本章ではそれに先立ってIL-1 $\beta$  誘導性のリポカリン2 mRNA発現が認められたこと、さらに、それに伴ってリポカリン2 の細胞外への放出が検出されたことから、リポカリン2 が腎機能変化と対応して発現、放出がなされることが示唆された。そのため、AKI 診断のための早期のバイオマーカーになりうることが考えられる。

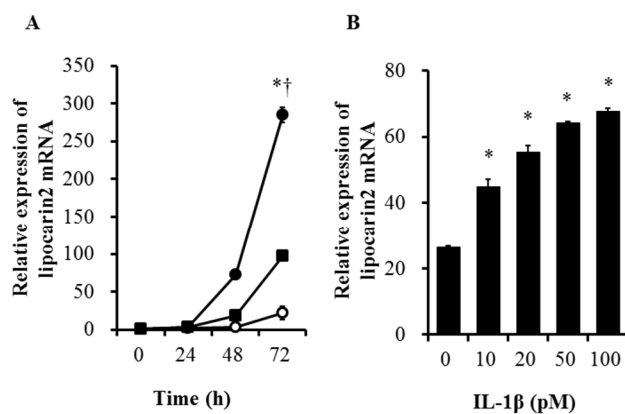


図 3-1 MDCK 細胞における IL-1β 誘導性のリポカリン 2 mRNA 発現

(A) MDCK細胞を10% FBS, 2% FBSまたは2% FBSとIL-1β (50 pM) を含んだ培養液で0-72時間培養した。培養後にtotal RNA を抽出し, real-time PCRにてリポカリン2発現の変化を検討した。(B) MDCK細胞を2% FBSにIL-1β (0-100 pM) を含んだ培養液で48時間培養した。培養後にtotal RNA を抽出し, real-time PCRにてリポカリン2発現の変化を検討した。値は3例の平均値 ± 標準誤差を示す。\* $P < 0.05$  (10% FBS培養液で培養した細胞との比較), † $P < 0.05$  (IL-1β を含まない2% FBSで培養した細胞との比較)。



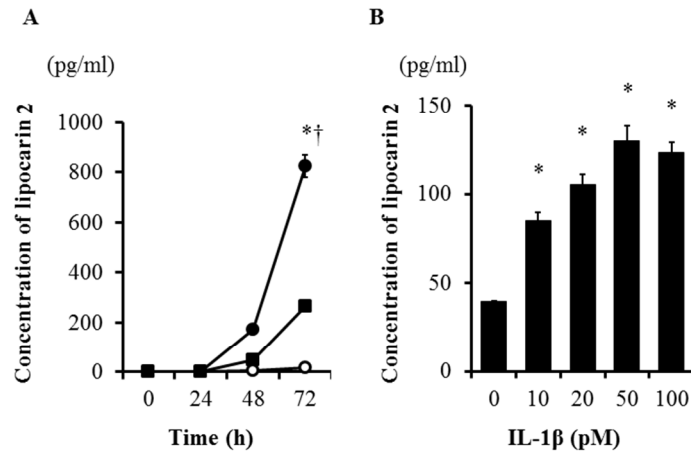


図 3-2 MDCK 細胞における IL-1 $\beta$  誘導性のリポカリン 2 放出

(A) MDCK細胞を10% FBS, 2% FBSまたは2% FBSとIL-1 $\beta$  (50 pM) を含んだ培養液で0-72時間培養した。培養後に培養液中に放出されたリポカリン2をELISAにて測定した。(B) MDCK細胞を2% FBSにIL-1 $\beta$  (0-100 pM) を含んだ培養液で 48時間培養した。培養後に培養液中に放出されたリポカリン2をELISAにて測定した。値は3例の平均値  $\pm$  標準誤差を示す。\* $P < 0.05$  (10% FBS培養液で培養した細胞との比較), † $P < 0.05$  (IL-1 $\beta$  を含まない2% FBSで培養した細胞との比較)。

**表 3-1 Real-time RT-PCR で使用したプライマー**

Gene	Gene bank ID	Primer sequences	Size (bps)	position
<i>Lipocarin2</i>	XM_857229.2	F: 5'-CACCTCCACCCTACTCAGGAATG-3' R: 5'-GAATGTCGCCCAGGCTGAA-3'	95	290~384
<i>TBP</i>	XM_863452	F: 5'-ACTGTTGGTGGGTCAGCACAAG-3' R: 5'-ATGGTGTGTACGGGAGCCAAG-3'	124	472~654

## 第 4 章

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

MAP キナーゼ経路の関与

#### 4.1 緒言

マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAP キナーゼ) は細胞の増殖, 分化, ストレス応答など様々な細胞機能に関与するセリン・スレオニンキナーゼであり, 炎症にも関与する (Kyriakis & Avruch, 2001; Kaminska, 2005)。MAP キナーゼ経路としては, 主として細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK), p38 MAP キナーゼ, c-Jun-N 末端キナーゼ (JNK) の 3 経路の検討が進められており, さらに, ERK の活性化には MAP キナーゼ-ERK キナーゼ (MEK) を介すると考えられている (Kyriakis & Avruch, 2001; Kaminska, 2005)。

Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) は炎症, 細胞死, 細胞分化・増殖など種々の細胞機能制御に関わる転写因子の一つであり, RelA (p65), RelB, cRel, p50 および p52 といった Rel ファミリータンパク質がホモあるいはヘテロの二量体で構成されている (Lawrence, 2009; Hayden & Ghosh, 2012)。NF- $\kappa$ B の活性は主として I $\kappa$ B のような阻害タンパク質との相互作用によって調節されており, 阻害タンパク質と複合体を形成しているときは不活性型の NF- $\kappa$ B として細胞質に存在する。I $\kappa$ B のリン酸化により NF- $\kappa$ B 二量体が I $\kappa$ B から遊離すると NF- $\kappa$ B が活性化され, 遊離した NF- $\kappa$ B 二量体が核に移行し, プロモーター領域に結合することで炎症や免疫に関連する遺伝子発現に関与すると考えられている (Hayden & Ghosh, 2012)。

種々の細胞において, IL-1 $\beta$  刺激は MAP キナーゼ経路や NF- $\kappa$ B を活性化し, 炎症反応に関わるタンパク質の発現に関与することが報告されている。ヒト糸球体間質細胞においても, IL-1 $\beta$  が MAP キナーゼおよび NF- $\kappa$ B 経路を活性化すると報告されている (Mao et al., 2011)。本章においては, IL-1 $\beta$  誘導性のリポカリン 2 発現における MAP キナーゼ経路やと NF- $\kappa$ B 活性化の関与を, 阻害剤を用いて検討した。

## 4.2 材料および方法

### 4.2.1 材料

イヌ recombinant IL-1 $\beta$ は Kingfisher Biotech 社 (Saint Paul, MN) から購入した。MAP キナーゼ阻害剤である FR180204, SB239063, SP600125 および U0126 と, I $\kappa$ B kinase 阻害剤である BAY11-7082 および TPCA-1 は Sigma-Aldrich 社 (St Louis, MO) から購入した。リポカリン 2 測定キットは BioPorto Diagnostics A/S (Hellerup, Denmark)より購入した。培養プレート, フラスコは Thermo Fisher Scientific 社 (St. Waltham, MA)より購入した。

### 4.2.2 細胞培養

前章の記載と同様に, MDCK 細胞は 5% CO<sub>2</sub>, 37°C の環境で D-MEM-LG (Wako Pure Chemical Industries 社, Osaka, Japan)に 10% の牛胎児血清 (FBS) を添加して培養を行った。培養液は週に 2 回交換した。細胞が 90% コンフルエンスに達した際に, 0.25% trypsin-EDTA を用いて培養フラスコから細胞を剥がし, 集めた細胞を  $5 \times 10^5$  個/75 cm<sup>2</sup> の濃度で培養フラスコに播種した。10 代継代を行った MDCK 細胞を実験に用いた。

### 4.2.3 IL-1 $\beta$ 刺激

MDCK 細胞は 6-well culture plates (Thermo Fisher Scientific, Inc.) に  $5 \times 10^4$  cells/2 ml culture medium/well または 90-mm dish (Thermo Fisher Scientific, Inc.) に  $5 \times 10^5$  cells/12 ml culture medium になるように播種し, 培養した。2% FBS を含む DMEM-LG 培地で 12 時間前処理をした後, イヌ recombinant IL-1 $\beta$  刺激を加

えた。阻害剤の検討においては、それぞれの阻害剤の存在下で 1 時間細胞を前処理した後に IL-1 $\beta$  で刺激を行った。

#### 4.2.4 Real-time RT-PCR

第 3 章に記載したごとく、MDCK 細胞から TRIzol 試薬を用いて total RNAs を抽出した。一本鎖相補性 DNA (first-strand cDNA) の合成は、500 ng の total RNA を用い、PrimeScript RT Master Mix を用いて行った。Real-time RT-PCR は、2  $\mu$ l の first-strand cDNA を SYBR Premix EX Taq II とイヌリポカリン 2 や house keeping protein である TATA box binding protein (TBP) に特異的なプライマーを加え、総量 25  $\mu$ l で反応させた。RNase/DNA が含まれていない水とそれぞれの RNA サンプルを入れたものをコントロールとした。

PCR は Thermal Cycler Dice Real Time System II (TaKaRa Bio 社) を用いて行った。PCR 反応は、初期変性を 95°C で 30 秒間を 1 回、次いで変性処置を 95°C で 5 秒間行い、アニーリングと伸長を 60°C で 30 秒間 40 回の条件にて行った。プライマーの特異性は融解解離曲線分析と PCR 産物のダイレクトシーケンスを行なって確認した。

データの解析は TP900 DiceRealTime v4.02B を用いて、second derivative 法と comparative cycle threshold ( $\Delta\Delta Ct$ ) 法を適用した。同量の cDNA を使用した TBP の増幅を内在性コントロールとし、また、MDCK 細胞 (time : 0) からの cDNA の増幅を較正標準として用いた。

#### 4.2.5 リポカリン 2 濃度測定

MDCK 細胞は 6-well culture plates (Thermo Fisher Scientific, Inc.) に  $5 \times 10^4$

cells/2 ml culture medium/well になるように播種し，培養後，上記で示したように IL-1 $\beta$  刺激を行い，培養液を集めた。培養液中のリポカリン 2 濃度は市販の ELISA キットを用いて測定した。

#### 4.2.6 統計学的解析

データは平均値  $\pm$  標準誤差 (SE) で示した。統計解析は StatMateIV (統計解析ソフト) を用いて行った。データは一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を用いて解析した。

### 4.3 結果

第 3 章で明らかとなったように MDCK 細胞においては IL-1 $\beta$  刺激がリポカリン 2 mRNA 発現を促進することから，IL-1 $\beta$  誘導性のリポカリン 2 mRNA 発現に対する MAPK キナーゼの主要な 3 つの経路である MEK/ERK1/2, p38 MAP キナーゼ, JNK の阻害剤の効果を検討した。ERK1/2 の阻害剤である FR180204 (25  $\mu$ M) および p38 MAP キナーゼの阻害剤である SB239063 (20  $\mu$ M) で 1 時間前処理を行った MDCK 細胞を IL-1 $\beta$  (50 pM) で 48 時間刺激をすると，阻害剤処理をしていない細胞で認められた IL-1 $\beta$  誘導性のリポカリン 2 mRNA 発現は有意に抑制された (図 4-1)。一方，JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) あるいは MEK 阻害剤 U0126 (20  $\mu$ M) で前処理した細胞においては，IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 mRNA 発現はに対する有意な抑制は認められなかった。

次に IL-1 $\beta$  誘導性のリポカリン 2 mRNA 発現に対する NF- $\kappa$ B 経路の関与を検討した。NF- $\kappa$ B の活性化には I $\kappa$ B のリン酸化による I $\kappa$ B が NF- $\kappa$ B 二量体から遊離が必要である (Hayden and Ghosh, 2012)。そのリン酸化制御には I $\kappa$ B キナーゼ

$\alpha/\beta$  (IKK $\alpha/\beta$ ) が関わることから、IL-1 $\beta$  誘導性のリポカリン 2 mRNA 発現に対する IKK $\alpha/\beta$  阻害剤である BAY-117082 (10  $\mu$ M) と IKK $\beta$  阻害剤 TPCA-1 (10  $\mu$ M) の効果を検討した。阻害剤で 1 時間前処理をした後、MDCK 細胞を IL-1 $\beta$  で 48 時間刺激をした。しかしながら、どちらの阻害剤も IL-1 $\beta$  誘導性のリポカリン 2 mRNA 発現に対する効果は示さなかった。

以上の結果より、MDCK 細胞におけるリポカリン 2 発現には ERK1/2 と p38 MAP キナーゼ経路が関与することが考えられたことから、ERK1/2 と p38 MAP キナーゼの阻害剤の IL-1 $\beta$  誘導性のリポカリン 2 タンパク質分泌に対する効果について検討した。図 4-2 に示すように、阻害剤非存在下で前処理した細胞を 48 時間 IL-1 $\beta$  刺激 (50 pM) を加えることによりリポカリン 2 の放出が認められるが、ERK1/2 阻害剤の FR180204 (25  $\mu$ M) および p38 MAP キナーゼ阻害剤の SB239063 (20  $\mu$ M) で 1 時間前処理を行った細胞においては、IL-1 $\beta$  のリポカリン 2 タンパク質放出に対する効果は有意に阻害された。

これらの結果より、MDCK 細胞における IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 発現には MAP キナーゼの ERK1/2 と p38 MAP キナーゼ経路が関わることを強く示唆された。

#### 4.4 考察

IL-1 $\beta$  誘導性のリポカリン 2 発現には NF- $\kappa$ B や MAP キナーゼ経路を介することが報告されている。ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 (A549 細胞) においては、NF- $\kappa$ B の補助因子である I- $\kappa$ B- $\zeta$  の誘導が IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 発現には必要であると考えられている (Cowland et al., 2006)。ヒト糸球体間質細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性の ERK の活性化が IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 発現に関与することが示唆さ



れている (Mao et al., 2011)。本章では MDCK 細胞における IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 発現には ERK1/2 および p38 MAP キナーゼ経路が関わることを明らかにした。一方, NF- $\kappa$ B の関与が認められないこと, また, MEK の関与が認められないことも示唆した。一般に, MEK/ERK1/2 経路と知られているように ERK1/2 の活性化には MEK の活性化が関わること (Kyriakis & Avruch, 2001; Kaminska, 2005) や, MAP キナーゼの下流には NF- $\kappa$ B が転写調節因子として機能し様々なタンパク質発現に関わるとされていること (Lawrence, 2009; Hayden and Ghosh, 2012) から, 本研究結果は, MDCK 細胞における IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 発現には, 今までと異なる MAP キナーゼ経路の調節や転写調節因子の検討が必要と思われる。

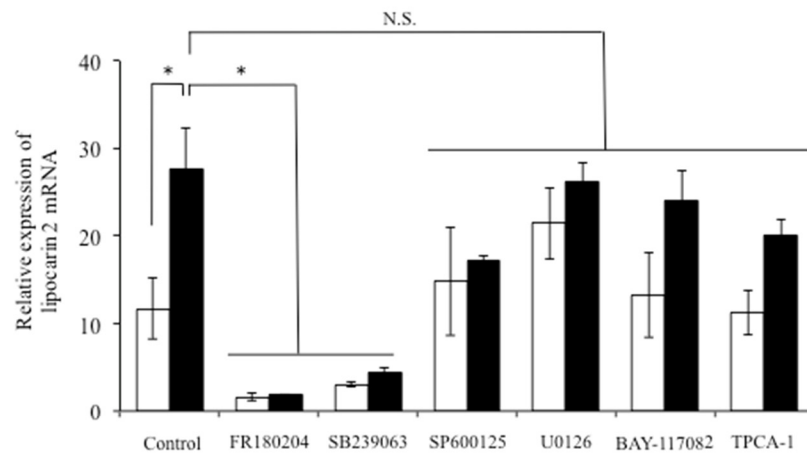


図 4-1 IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 mRNA 発現に対する MAP キナーゼおよび NF- $\kappa$ B 阻害剤の効果

MDCK 細胞を ERK1/2 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M), p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20  $\mu$ M), JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M), MEK 阻害剤 U0126 (20  $\mu$ M), IKK $\alpha$ / $\beta$  阻害剤 BAY117082 (10  $\mu$ M), IKK $\beta$  阻害剤 TPCA-1 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処置を行った後に, IL-1 $\beta$  (50 pM) 存在下 (■) および非存在下 (□) で 48 時間培養を行い, real-time PCR にてリポカリン 2 mRNA 発現を検討した。結果は 3 つの独立した実験からの平均値  $\pm$  標準誤差を示している。\* $P$ <0.05

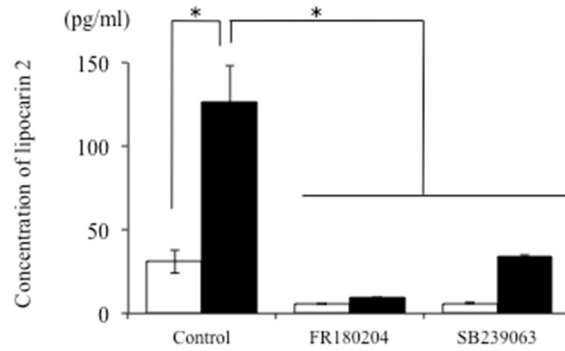


図 4-2 ERK1/2 および p38 MAP キナーゼ阻害剤による IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 タンパク質放出の阻害

MDCK 細胞を ERK1/2 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M) および p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20  $\mu$ M) で 1 時間前処置を行った後に、IL-1 $\beta$  (50 pM) 存在下 (■) および非存在下 (□) で 48 時間培養を行い、培養液中に放出されたリポカリン 2 を ELISA にて測定した。結果は 3 つの独立した実験からの平均値  $\pm$  標準誤差を示している。\* $P$ <0.05

## 第 5 章

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

## 5.1 緒言

虫垂炎や憩室炎といった炎症を伴う消化器系疾患時に、リポカリン 2 発現が促進されることは報告されていた (Nielsen et al., 1996)。また、ヒトの結腸直腸がん、肺がんや膵臓がんにおいて、リポカリン 2 発現が上昇することも報告されていた (Nielsen et al., 1996; Stoesz et al., 1998; Furutani et al., 1998)。その後、Ras 形質転換マウスの乳がん細胞において、リポカリン 2 はがん細胞の侵襲性や転移を減少させ (Hanai et al., 2005)、また、ヒト肺癌がん細胞において実験的な薬剤誘発性細胞死に対して、リポカリン 2 の過剰発現がそれを減少させることから (Tong et al., 2005)、リポカリン 2 は細胞保護機能を有するタンパク質であると考えられている。

腎臓においては、リポカリン 2 がバイオマーカーであることに加えて (Wagener et al., 2006; Vaidya et al., 2008)、急性虚血性腎障害に対する保護作用を有し、虚血再灌流障害による AKI 後の高窒素血症を緩和することが報告されている (Mishra et al., 2004; Mori & Nakao, 2007)。また、ラット腎臓尿細管細胞においては、リポカリン 2 は細胞増殖を促進しアポトーシスを減少すると報告されている (Zang et al., 2014)。そこで本章においては、MDCK 細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の細胞障害に対するリポカリン 2 の保護作用について検討した。

## 5.2 材料および方法

### 5.2.1 材料

イヌ recombinant IL-1 $\beta$  およびリポカリン 2 は Kingfisher Biotech 社 (Saint Paul, MN) から購入した。第 2 章と同様に、抗 ZO-1 マウスモノクローナル抗体 (Clone: ZO-1-1A12)、抗ウサギ IgG 抗体ヤギ Alexa fluor 488-結合型 F (ab')<sub>2</sub> 抗体断片、TO-PRO-3-iodide および ProLong Gold Antifade Reagent は Life Technologies 社

(Carlsbad, CA) から購入した。抗 E-cadherin ウサギモノクローナル抗体 (Clone: 24E10) も同様に Cell Signaling Technology Japan (Tokyo, Japan) より購入した。培養プレート, フラスコは Thermo Fisher Scientific 社 (St. Waltham, MA) より購入した。

### 5.2.2 細胞培養

前章までと同様に, MDCK 細胞 を 5% CO<sub>2</sub>, 37°C の環境で Dulbecco's Modified Eagle's Medium with low glucose (D-MEM-LG; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) に 10% の牛胎児血清 (FBS) を添加して培養を行った。培養液は週に 2 回交換した。細胞が 90% コンフルエント状態に達した時点で, 0.25% trypsin-EDTA を用いて培養フラスコから細胞を剥がし, 75-cm<sup>2</sup> culture flask (Thermo Fisher Scientific, Inc., St. Waltham, MA) に  $5 \times 10^5$  cells / 75 cm<sup>2</sup> の濃度で培養フラスコに播種した。10 代継代を行った MDCK 細胞をこの後の実験に用いた。

### 5.2.3 IL-1 $\beta$ 刺激

MDCK 細胞は 6-well culture plates (Thermo Fisher Scientific, Inc.) に  $5 \times 10^4$  cells/2 ml culture medium/well または 90-mm dish (Thermo Fisher Scientific, Inc.) に  $5 \times 10^5$  cells/12 ml culture medium になるように播種し, 培養した。2% FBS を含む DMEM-LG 培地で 12 時間前処理をした後, イヌ recombinant IL-1 $\beta$  刺激を加えた。

### 5.2.4 免疫組織化学染色

第 2 章に記載したように, MDCK 細胞を 35-mm glass base dish (Iwaki, Tokyo, Japan) に  $5 \times 10^4$  cells/2 ml 培養液/well になるよう播種し, 上記に示すように IL-

1 $\beta$  刺激を行った。細胞を 4% paraformaldehyde (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) にて 15 分間固定を行った。固定した細胞は 0.2% Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich Inc. St Louis, MO) にて室温で 15 分間処理により可透過性にした。その後、細胞を一次抗体である抗 E-cadherin ウサギ抗体 (500 倍希釈) あるいは抗 ZO-1 マウス抗体 (500 倍希釈) とともに室温で 90 分間インキュベーションした。0.2% polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween-20) を含む PBS にて洗浄後, Alexa fluor® 594-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragments of goat anti-mouse IgG (H+L) (1000 倍希釈), Alexa fluor® 488-conjugated phalloidin (1000 倍希釈, and TO-PRO®-3-iodide (1000 倍希釈) を用いて暗所にて室温で 60 分間反応させた。二次抗体と反応させた後, 0.2% Tween-20 を含む PBS にて洗浄後, 乾燥させ, ProLong® Gold Antifade Reagent で封入した。抗体の非特異的コントロールとして, 二次抗体のみで処理した細胞を用いた。観察は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-510; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) にて観察した。

### 5.2.5 経上皮細胞電気抵抗 (TER) 値の測定

TER 値の測定も第 2 章に記載した方法と同様に行った。すなわち, TERMDCK 細胞をトランズウェル上に  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> になるように播種し, 培養後, 単細胞層を介した電気抵抗値を Millicell® ERS-2 抵抗値測定システム (Millipore, Billerica, MA) により測定した。細胞を播種しないトランズウェルでの電気抵抗値を差し引くことで経上皮電気抵抗値 (TER 値) とした。

### 5.2.6 Real-time RT-PCR

MDCK 細胞から TRIzol 試薬を用いて total RNAs を抽出した。一本鎖相補性 DNA (first-strand cDNA) の合成は, 500 ng の total RNA を用い, PrimeScript RT

Master Mix を用いて行った。Real-time RT-PCR は、2  $\mu$ l の first-strand cDNA を SYBR Premix EX Taq II と IL-8, SLC22A17 や house keeping protein である TATA box binding protein (TBP) に特異的なプライマーを加え、総量 25  $\mu$ l で反応させた。real-time RT-PCR で用いた TBP のプライマーの塩基配列は第3章の表 3-1 に、また、IL-8 および SLC22A17 のプライマーの塩基配列を表 5-1 に示す。RNase/DNA が含まれていない水とそれぞれの RNA サンプルを入れたものをコントロールとした。

PCR は Thermal Cycler Dice Real Time System II (TaKaRa Bio 社)を用いて行った。PCR 反応は、初期変性を 95°C で 30 秒間を 1 回、次いで変性処置を 95°C で 5 秒間行い、アニーリングと伸長を 60°C で 30 秒間 40 回の条件にて行った。プライマーの特異性は融解解離曲線分析と PCR 産物のダイレクトシーケンスを行なって確認した。

データの解析は TP900 DiceRealTime v4.02B を用いて、second derivative 法と comparative cycle threshold ( $\Delta\Delta$ Ct) 法を適用した。同量の cDNA を使用した TBP の増幅を内在性コントロールとし、また、MDCK 細胞 (time : 0) からの cDNA の増幅を較正標準として用いた。

### 5.2.7 統計学的解析

データは平均値  $\pm$  標準誤差 (SE) で示した。統計解析は統計解析ソフト StatMateIV (ATMS, Tokyo, Japan) を用いて行った。データは一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を用いて解析し、タイフコースのデータのみ二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を用いて解析した。



### 5.3 結果

第2章で示したように、2% FBS を含む培養液により MDCK 細胞を7日間培養すると、対照 (10% FBS 培養) では細胞膜近傍に局在していた ZO-1 と E-cadherin は、細胞質側への局在の変化が観察され、さらに IL-1 $\beta$  (50 pM) 刺激を行った細胞では、その ZO-1 と E-cadherin の局在の変化はより明確となった。その 2% FBS を含む培養液およびそれに IL-1 $\beta$  を加えて誘導される ZO-1 と E-cadherin の局在の変化に対する recombinant リポカリン 2 の効果を検討したところ、培養液にリポカリン 2 が存在する場合は 2% FBS を含む培養液やそれに加えられた IL-1 $\beta$  の効果は認められず、E-cadherin と ZO-1 局在は対照と同様に細胞膜近傍に局在したままであった。

次に TER 値における recombinant リポカリン 2 の効果について検討した。2% FBS を含む培養液により MDCK 細胞を7日間培養すると、対照 (10% FBS 培養) と比較して TER 値は減少し、IL-1 $\beta$  (50 pM) 刺激を行うと TER 値はさらに低下した。その 2% FBS を含む培養液およびそれに IL-1 $\beta$  を加えて誘導される TER 値の減少に対する recombinant リポカリン 2 の効果を検討したところ、培養液にリポカリン 2 が存在する場合は 2% FBS を含む培養液で培養されたときの TER 値に変化は認められなかったが、そこに加えられた IL-1 $\beta$  の効果は認められず、IL-1 $\beta$  非添加時の TER 値のままであった。

これらの結果から、リポカリン 2 が接着結合およびタイト結合タンパク質の局在を保護することで腎尿細管細胞の機能を維持することが示唆された。

リポカリン 2 は炎症性サイトカインのダウンレギュレーションを介して腎細胞の再生を誘導することが報告されている (Vinuesa et al., 2008) ことから、IL-1 $\beta$  誘導性の炎症性マーカー IL-8 mRNA 発現に対する recombinant リポカリン 2

の効果について検討した。MDCK 細胞を IL-1 $\beta$  (50 pM)で 12 時間刺激をすると IL-8 mRNA 発現が有意に上昇した。培養液に recombinant リポカリン 2 を添加して IL-1 $\beta$  刺激を行ったが、リポカリン 2 の効果は認められなかった。

ラット腎尿細管細胞においては、リポカリン 2 受容体 SLC22A17 が発現し、その活性化がアポトーシス因子の調節を介してアポトーシスを減少させることが報告されている (Zang et al., 2014)。また、リポカリン 2 は抗酸化酵素の発現を誘導し、活性酸素種から細胞を保護することが報告されているが、それには SLC22A17 の活性化を介していると考えられている (Bahmani et al., 2010)。そこで、MDCK 細胞におけるリポカリン 2 受容体 SLC22A17 の mRNA 発現を検討した。培養による有意な変化は認められなかったが、SLC22A17 mRNA の発現が確認された。

#### 5.4 考察

リポカリン 2 は腎機能の保護作用を有することが示唆されている (Mishra et al., 2004; Mori & Nakao, 2007; Zang et al., 2014)。本章では、細胞外に添加されたリポカリン 2 が MDCK 細胞において、IL-1 $\beta$  による細胞接着タンパク質やバリア機能の崩壊を優位に減弱させることを示した。この結果はリポカリン 2 が腎障害に対する保護機能を持つという仮説を支持するものである。

Ras 形質転換細胞において、リポカリン 2 は Ras/Raf/MEK/ERK シグナリング経路に拮抗するという報告がある (Hnai et al., 2005)。また、AKI モデルマウスにおいては、リポカリン 2 は炎症性サイトカインのダウンレギュレーションを介して腎細胞の再生を誘導することも報告されている (Vinuesa et al., 2008)。IL-1 $\beta$  はイヌ皮膚線維芽細胞において、MAP キナーゼの活性化を経て炎症マーカーを

誘導すると報告されている (Tsuchiya et al., 2015)。そこで、MDCK 細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 mRNA 発現に対する外来性のリポカリン 2 の影響を検討したが、リポカリン 2 は IL-1 $\beta$  の機能には影響を与えなかった。このことは、MAP キナーゼ活性化や炎症性サイトカインの産生を阻害することでリポカリン 2 が腎保護機能を引き起こしているという可能性は低いことを意味している。一方、ラット腎尿細管細胞においては、リポカリン 2 受容体 SLC22A17 の活性化が、アポトーシス因子である Bcl-2, Bax, Fas, FasL の調節を介してアポトーシスを減少させることが知られている (Zang et al., 2014)。リポカリン 2 は heme oxygenase (HO) や superoxide dismutase などの抗酸化酵素の発現を SLC22A17 の活性化を介して誘導し、活性酸素種から細胞を保護すると報告された (Bahmani et al., 2010)。MDCK 細胞においてもリポカリン 2 受容体 SLC22A17 mRNA 発現が認められたことから、MDCK 細胞におけるリポカリン 2 の効果は SLC22A17 の活性化を介して保護作用に関わっていることが考えられる。

リポカリン 2 が細胞外マトリクスを破壊する matrix metalloprotease-9 と結合することが報告されている (Yan et al., 2001)。また、グリセロールによって誘発したマウスの AKI モデルにおいて、リポカリン 2 は HO-1 発現を誘導し、尿細管薄膜における再上皮化を刺激したことが報告されている (Korrapati et al., 2012)。MDCK 細胞におけるリポカリン 2 の細胞保護作用にこれらの因子が関わるかどうかは現在今後の検討が必要である。

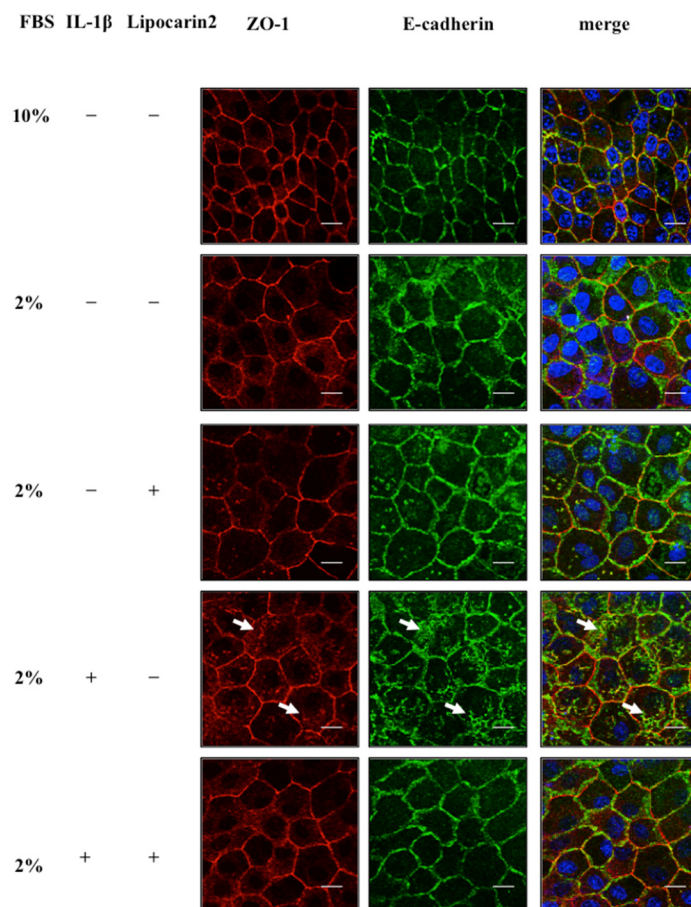


図 5-1 MDCK 細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 E-cadherin および ZO-1 の局在変化に対する recombinant リポカリン 2 の効果

recombinant リポカリン 2 (50 ng/ml) の存在下および非存在下で MDCK 細胞を 10% FBS, 2% FBS または 2% FBS と IL-1 $\beta$  (50 pM) を含んだ培養液で 7 日間培養した。抗 E-cadherin 抗体 (緑) および抗 ZO-1 抗体 (赤) を用いて、それぞれのタンパク質の蛍光染色を行った。IL-1 $\beta$  刺激細胞では細胞膜近傍の E-cadherin と ZO-1 の局在が喪失し斑状の細胞質染色パターンが観察された (矢印) が、recombinant リポカリン 2 の存在下では認められなかった。青は核染色。

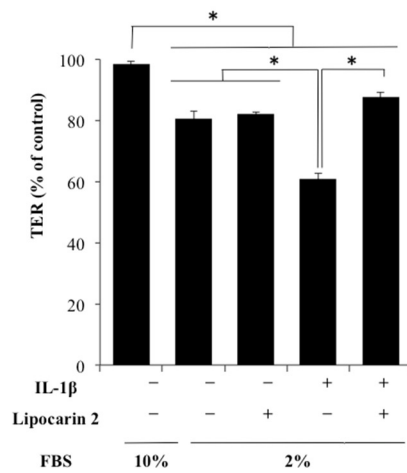


図 5-2 MDCK 細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 TER 値低下に対する recombinant リポカリン 2 の効果

recombinant リポカリン 2 (50 ng/ml) の存在下および非存在下で MDCK 細胞を 10% FBS, 2% FBS または 2% FBS と IL-1 $\beta$  (50 pM) を含んだ培養液で 7 日間培養した。結果は 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差で示した。\* $P < 0.05$

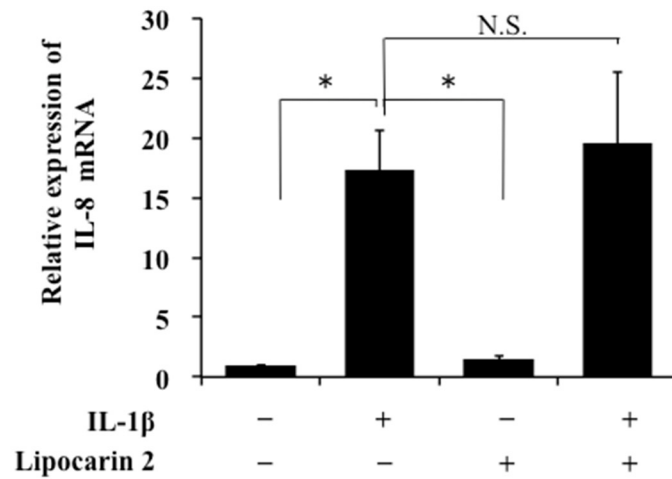


図5-3 MDCK細胞におけるIL-1β誘導性IL-8 mRNA発現に対するrecombinantリポカリン2の効果

2% FBS を含んだ培養液で MDCK 細胞を培養した。recombinant リポカリン 2 (50 ng/ml) の存在下および非存在下で IL-1β (50 pM) 刺激を 12 時間加えた細胞と加えない細胞から total RNA を抽出し，real-time PCR にて IL-8 mRNA 発現を検討した。結果は 3 例の平均値 ± 標準誤差で示した。\* $P < 0.05$

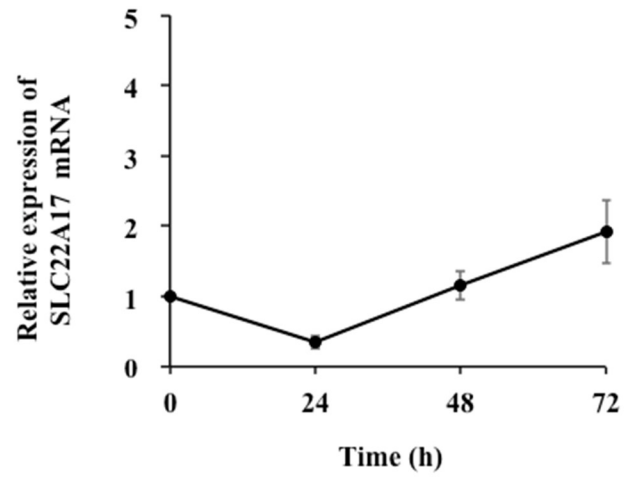


図 5-4 MDCK 細胞におけるリポカリン 2 受容体 SLC22A17 mRNA 発現

2% FBS を含んだ培養液で MDCK 細胞を 0–72 時間培養し, total RNA を抽出し, real-time PCR にて SLC22A17 mRNA 発現を検討した。結果は 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

**表 5-1 Real-time RT-PCR で使用したプライマー**

Gene	Gene bank ID	Primer sequences	Size (bps)	position
<i>IL-8</i>	NM_001003200.1	F: 5'- CTTCCAAGCTGGCTGTTGCTC -3' R: 5'- TGGGCCACTGTCAATCACTCTC -3'	173	11~183
<i>SLC22A17</i>	XM_005623906.1	F: 5'- GCATCCTGCTACTCTCGATGACC -3' R: 5'- AGCCTCGTTCAGATAATCCCACA -3'	80	1139~1218



## 第6章

### 総括

本研究は、イヌ腎尿細管細胞のモデルとして MDCK 細胞を用い、炎症性サイトカインの 1 種であるインターロイキン 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 刺激による腎尿細管細胞機能変化と、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急性相タンパク質であると考えられているリポカリン 2 の発現との関連を検討し、さらに、その発現に関わる細胞内シグナルと、放出されたリポカリン 2 の機能について検討し、次の結果を得た。

第 2 章では、IL-1 $\beta$  刺激を行った MDCK 細胞において、細胞膜近傍に局在する ZO-1 タイト結合タンパク質と密着結合タンパク質 E-cadherin が細胞質に局在が変化することを、免疫組織学的手法にて認めた。また、IL-1 $\beta$  で刺激をした MDCK 細胞では、傍細胞輸送経路機能を反映する経上皮細胞抵抗値 (TER 値) が有意に減少することも認めた。MDCK 細胞を IL-1 $\beta$  刺激することで形態変化と機能低下が引き起こされたことから、本実験系がイヌ腎尿細管細胞障害のモデル系として有用であることを示した。

第 3 章では、IL-1 $\beta$  で刺激をした MDCK 細胞において、リポカリン 2 の mRNA 発現が時間依存的および用量依存的に促進されることを real-time PCR にて認めた。また、MDCK 細胞において、IL-1 $\beta$  刺激は時間依存的および用量依的にリポカリン 2 の放出を促進することも、培養液中のリポカリン 2 濃度を ELISA で測定することで認めた。IL-1 $\beta$  誘導性のリポカリン 2 mRNA 発現もタンパク質放出も、第 2 章で示された MDCK 細胞の形態および機能変化よりも速やかに誘導されることを示した。

第 4 章においては、種々の細胞で IL-1 $\beta$  刺激により転写因子 Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) や MAP キナーゼ経路が活性化されることが報告されていることから、MDCK 細胞における IL-1 $\beta$  誘導性のリポカリン 2 mRNA 発現およびタンパク質放出に対する NF- $\kappa$ B や MAP キナーゼ経路の関与について阻害剤を用いて

検討した。MAP キナーゼ経路には主として細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) 経路, p38 MAP キナーゼ経路, c-Jun-N 末端キナーゼ (JNK) 経路の 3 種類が知られている。また, ERK の上流には MAP キナーゼ-ERK キナーゼ (MEK) が存在し ERK の活性調節を行うことが知られている。MDCK 細胞においては, 阻害剤を用いた検討により, ERK および p38 MAP キナーゼが IL-1 $\beta$  誘導性のリポカリン 2 発現と放出に関与することを認めた。

第 5 章においては, 放出されたリポカリン 2 の機能について recombinant リポカリン 2 を用いて検討した。第 2 章で示された MDCK 細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の E-cadherin と ZO-1 の局在変化は recombinant リポカリン 2 で処理した細胞では抑制され, また, IL-1 $\beta$  誘導性の TER 値の減少も抑制された。これらの結果からリポカリン 2 はタイト結合および密着結合タンパク質の局在を維持し, 腎尿細管細胞の機能を保護することを示唆した。

MDCK 細胞において, recombinant リポカリン 2 は IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 の mRNA 発現には影響しないこと, また, リポカリン 2 受容体である SLC22A17 の mRNA 発現が認められたことから, リポカリン 2 は SLC22A17 を介して, IL-1 $\beta$  とは異なる細胞内シグナル伝達経路を活性化している可能性を示唆した。

以上の結果より, 腎尿細管細胞において IL-1 $\beta$  誘導性に形態変化と機能低下が引き起こされるが, それに先立ってリポカリン 2 の発現が誘導されることから, リポカリン 2 がイヌ腎機能障害の早期診断マーカーになりうることを示唆された。また, IL-1 $\beta$  誘導性リポカリン 2 発現に ERK および p38 MAP キナーゼ経路が関わること, さらに, リポカリン 2 が腎尿細管細胞を保護する機能を有することが明らかとなった。本研究結果から, リポカリン 2 が急性腎障害などの早期診断への貢献, また, 治療に用いられることも期待される。

## 謝辞

本研究を纏めるにあたり、終始ご指導を賜りました日本大学大学院獣医学研究科の杉谷 博士教授に深謝いたしますとともに、ご助言を賜りました同研究科の渋谷 久教授、中山 智宏教授、森友 忠昭教授に謹んで感謝をいたします。また、本研究の実施にあたり様々な点でご指導を賜りました日本大学生物資源科学部獣医学科の中野 令先生並びに間宮 遼先生に心より感謝をいたします。さらに、本研究に際し様々なご助言とご協力を賜りました日本大学生物資源科学部獣医学科の岡林 堅先生、成田 貴則先生並びに獣医生化学研究室の諸氏にお礼を申し上げます。そして、常に大学院生としての生活を理解し、応援をしてくれた妻と家族と今野動物病院のスタッフに心より感謝をいたします。

## 引用文献

- Anders HJ, Lech M. NOD-like and Toll-like receptors or inflammasomes contribute to kidney disease in a canonical and a non-canonical manner. *Kidney Int.* 2013; 84: 225-228.
- Bahmani P, Halabian R, Rouhbakhsh M, Roushandeh AM, Masroori N, Ebrahimi M, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin induces the expression of heme oxygenase-1 and superoxide dismutase 1, 2. *Cell Stress Chaperones* 2010; 15: 395-403.
- Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol.* 2012; 2: 1303-1353.
- Bennett M, Dent CL, Ma Q, Dastrala S, Grenier F, Workman R, Syed H, Ali S, Barasch J, Devarajan P. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3: 665-673.
- Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2011; 121: 4210-4221.
- Braun JP, Lefebvre HP, Watson AD. Creatinine in the dog: a review. *Vet Clin Pathol.* 2003; 32: 162-179.

Bulent Gul CB, Gullulu M, Oral B, Aydinlar A, Oz O, Budak F, Yilmaz Y, Yurtkuran M.

Urinary IL-18: a marker of contrast-induced nephropathy following percutaneous coronary intervention? *Clin Biochem.* 2008; 41: 544-547.

Chang A, Ko K, Clark MR. The emerging role of the inflammasome in kidney diseases.

*Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014; 23: 204-210.

Cobrin AR, Blois SL, Kruth SA, Abrams-Ogg AC, Dewey C. Biomarkers in the

assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat. *J Small Anim Pract.* 2013; 54: 647-655.

Coland JB, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of

the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 1997; 45: 17-23.

Cowland JB, Muta T, Borregaard N. IL-1 $\beta$ -specific up-regulation of neutrophil

gelatinase-associated lipocalin is controlled by I $\kappa$ B- $\zeta$ . *J Immunol.* 2006; 176: 5559-5566.

de Geus HR, Betjes MG, Bakker J. Biomarkers for the prediction of acute kidney injury:

a narrative review on current status and future challenges. *Clin Kidney J.* 2012; 5: 102-108.

Edelstein CL. Biomarkers of acute kidney injury. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2008;15: 222-

234.

Fan JM, Huang XR, Ng YY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY. Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factor- $\beta$ 1-dependent mechanism in vitro. *Am J Kidney Dis.* 2001; 37: 820-831.

Finco DR, Brown SA, Vaden SL, Ferguson DC. Relationship between plasma creatinine concentration and glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 1995; 18: 418-421.

Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol.* 2001; 153: 263-272.

Furutani M, Arii S, Mizumoto M, Kato M, Imamura M. Identification of a neutrophil gelatinase-associated lipocalin mRNA in human pancreatic cancers using a modified signal sequence trap method. *Cancer Lett.* 1998; 122: 209-214.

Hanai J, Mammoto T, Seth P, Mori K, Karumanchi SA, Barasch J, Sukhatme VP. Lipocalin 2 diminishes invasiveness and metastasis of Ras-transformed cells. *J Biol Chem.* 2005; 280: 13641-13647.

Hayden MS, Ghosh S. NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and

outstanding questions. *Genes Dev.* 2012; 26: 203-234.

Hutton HL, Ooi JD, Holdsworth SR, Kitching AR. The NLRP3 inflammasome in kidney disease and autoimmunity. *Nephrology (Carlton)*. 2016; 21: 736-744.

Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, Grove JR. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J Pharm Sci.* 1999; 88: 28-33.

Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003; 112: 1776-1784.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009; 119:1420-1428.

Kaminska B. MAPK signaling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy-from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1754: 253-262.

Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest.* 1996; 97: 1056-1063.

Kimizuka H, Koketsu K. Ion transport through cell membrane. *J Theor Biol.* 1964; 6:



290-305.

Kimura K, Teranishi S, Nishida T. Interleukin-1 $\beta$ -induced disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50: 597-603.

Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem.* 1993; 326:10425-10432.

Korrapati MC, Shaner BE, Schnellmann RG. Recovery from glycerol-induced acute kidney injury is accelerated by suramin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012; 341: 126-136.

Kriz W, Kaissling B, Le Hir M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J Clin Invest.* 2011; 121: 468-474.

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 2001; 81: 807-869.

Lawrence T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspect Biol.* 2009; 1: a001651.

Lee CH, Chang JS, Syu SH, Wong TS, Chan JY, Tang YC, Yang ZP, Yang WC, Chen CT, Lu SC, Tang PH, Yang TC, Chu PY, Hsiao JR, Liu KJ. IL-1 $\beta$  promotes malignant transformation and tumor aggressiveness in oral cancer. *J Cell Physiol.* 2015; 230: 875-884.

Lee YJ, Hu YY, Lin YS, Chang CT, Lin FY, Wong ML, Kuo-Hsuan H, Hsu WL. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute canine kidney injury. *BMC Vet Res.* 2012; 8: 248.

Mao S, Jiang T, Shang G, Wu Z, Zhang N. Increased expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin receptor by interleukin-1 $\beta$  in human mesangial cells via MAPK/ERK activation. *Int J Mol Med.* 2011; 27: 555-560.

Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ.* 2007; 14: 10-22.

Masood H, Che R, Zhang A, Inflammasomes in the Pathophysiology of Kidney Diseases, *Kidney Dis.* 2015; 1: 187-193.

Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev.* 2011; 243: 206-214.

Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated

lipocain (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005; 365: 1231-1238.

Mishra J, Ma Q, Kelly C, Mitsnefes M, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21: 856-863.

Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol.* 2004; 24: 307-315.

Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Yang J, Mitsnefes M, Barasch J, Devarajan P. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15: 3073-3082.

Mori K, Nakao K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int.* 2007; 71: 967-970.

Narayanan S, Appleton HD. Creatinine: a review. *Clin Chem.* 1980; 26: 1119-1126.

Nielsen BS, Borregaard N, Bundgaard JR, Timshel S, Sehested M, Kjeldsen L. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. *Gut* 1996; 38: 414-420.

- Palenski TL, Sorenson CM, Sheibani N. Inflammatory cytokine-specific alterations in retinal endothelial cell function. *Microvasc Res.* 2013; 89: 57-69.
- Palm CA, Segev G, Cowgill LD, LeRoy BE, Kowalkowski KL, Kanakubo K, Westropp JL. Urinary Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin as a Marker for Identification of Acute Kidney Injury and Recovery in Dogs with Gentamicin-induced Nephrotoxicity. *J Vet Intern Med.* 2016; 30: 200-205.
- Poniatowski B, Malyszko J, Bachorzewska-Gajewska H, Malyszko JS, Dobrzycki S. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in patients with chronic heart failure and coronary artery disease. *Kidney Blood Press Res.* 2009; 32: 77-80.
- Peerapen P, Thongboonkerd V. p38 MAPK mediates calcium oxalate crystal-induced tight junction disruption in distal renal tubular epithelial cells. *Sci Rep.* 2013; 3: 1041.
- Sancho-Martínez SM, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. Pathophysiological role of different tubular epithelial cell death modes in acute kidney injury. *Clin Kidney J.* 2015; 8: 548-559.
- Segev G, Palm C, LeRoy B, Cowgill LD, Westropp JL. Evaluation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of kidney injury in dogs. *J Vet Intern Med.* 2013; 27: 1362-1367.

Shapiro NI, Trzeciak S, Hollander JE, Birkhahn R, Otero R, Osborn TM, Moretti E, Nguyen HB, Gunnerson K, Milzman D, Gaieski DF, Goyal M, Cairns CB, Kupfer K, Lee SW, Rivers EP. The diagnostic accuracy of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the prediction of acute kidney injury in emergency department patients with suspect sepsis. *Ann Emerg Med.* 2010; 56: 52-59.

Stoesz SP, Friedl A, Haag JD, Lindstrom MJ, Clark GM, Gould MN. Heterogenous expression of the lipocalin NGAL in primary breast cancers. *Int J Cancer* 1998; 79: 565-572.

Strippoli R, Benedicto I, Foronda M, Perez-Lozano ML, Sánchez-Perales S, López-Cabrera M, Del Pozo MÁ. p38 maintains E-cadherin expression by modulating TAK1-NF- $\kappa$ B during epithelial-to-mesenchymal transition. *J Cell Sci.* 2010; 123: 4321-4331.

Sugiura T, Wada A, Moriyama T, Horio M, Ueda N, Imai E, Hori M. Probucol suppresses ICAM-1 expression in rat mesangial cells: possible role of IL-1. *Kidney Int Suppl.* 1999; 71: S167-S170.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871-890.

Thoen ME, Kerl ME. Characterization of acute kidney injury in hospitalized dogs and evaluation of a veterinary acute kidney injury staging system. *J Vet Emerg Crit Care*

2011; 21: 648-657.

Tong Z, Wu X, Ovcharenko D, Zhu J, Chen CS, Kehrer JP. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a survival factor. *Biochem J.* 2005; 391: 441-448.

Trachtman H, Christen E, Cnaan A, Patrick J, Mai V, Mishra J, Jain A, Bullington N, Devarajan P, Investigators of the HUS-SYNSORB Pk Multicenter Clinical Trial. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in D+HUS: a novel marker of renal injury. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21: 989-994.

Vaden SL, Levine J, Breitschwerdt EB. A retrospective case – control of acute renal failure in 99 dogs. *J Vet Intern Med.* 1997; 11: 58-64.

Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008; 48: 463-493.

Vinuesa E, Sola A, Jung M, Alfaro V, Hotter G. Lipocalin-2-induced renal regeneration depends on cytokines. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 295: F1554-F1562.

Wagener G, Jan M, Kim M, Mori K, Barasch JM, Sladen RN, Lee HT. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiol.* 2006; 105:485-491.

Wen X, Murugan R, Peng Z, Kellum JA. Pathophysiology of acute kidney injury: a new

perspective. *Contrib Nephrol.* 2010; 165: 39-45.

Worwag S, Langstone CE. Acute intrinsic renal failure in cats: 32 cases (1997-2004). *J Am Vet Med Assoc.* 2008; 232: 728-732.

Xu SY, Carlson M, Engström A, Garcia R, Peterson CG, Venge P. Purification and characterization of a human neutrophil lipocalin (HNL) from the secondary granules of human neutrophils, *Scan J Clin Lab Invest.* 1994; 54: 365-376.

Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem.* 2001; 276: 37258-37265.

Yang JR, Yao FH, Zhang JG, Ji ZY, Li KL, Zhan J, Tong YN, Lin LR, He YN. Ischemia-reperfusion induces renal tubule pyroptosis via the CHOP-caspase-11 pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014; 306: F75-F84.

Zang X, Zheng F, Hong HJ, Jiang Y, Song Y, Xia Y. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin protects renal tubular epithelial cells in hypoxia-reperfusion by reducing apoptosis. *Int Urol Nephrol.* 2014; 46: 1673-1679.

Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol.* 2008;

19: 2282-2287.