

氏 名	武田 尚子
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第687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25年 9月11日
学位論文題目	Altered unfolded protein response is implicated in the age-related exacerbation of proteinuria-induced proximal tubular cell damage  (加齢に伴う小胞体ストレス応答の異常は尿蛋白による近位尿細管障害の悪化をもたらす)
審査委員	主査 教授 扇田 久和  副査 教授 村上 節  副査 教授 小笠原 一誠

## 論文内容要旨

*整理番号	693	氏名 ふりがな	たけだ なおこ 武田 尚子
学位論文題目	Altered unfolded protein response is implicated in the age-related exacerbation of proteinuria-induced proximal tubular cell damage (加齢に伴う小胞体ストレス応答の異常は尿蛋白による近位尿細管障害の悪化をもたらす)		
<p>【目的】近年高齢者における末期腎不全の増加が問題となっており、新たな治療法の開発が求められている。糸球体疾患の腎予後は、原疾患によらず、糸球体から漏出したアルブミンが尿細管に再吸収される際に生じる尿細管病変に大きく左右される。また、加齢は腎予後の増悪因子であるが、尿細管病変との関連はいまだ明らかではなく、尿細管病変に着目した増悪機構の解明が新たな慢性腎臓病の治療標的の解明につながるものと考えた。最近、細胞内ストレス応答機構の一つである小胞体ストレス応答(unfolded protein response, UPR)が各種疾患の病態と関連していること、加齢状態ではUPRの異常が生じていることが報告されている。しかし尿蛋白に伴う尿細管障害や加齢に伴う腎障害の悪化と UPR との関連は明らかではない。そこで本研究では尿細管の UPR が加齢に伴い変化し、この変化が尿細管障害の悪化に関与するという仮説のもと、マウス、培養近位尿細管細胞、ヒト腎生検組織を用いて検討した。</p> <p>【方法】①加齢が尿蛋白に伴う尿細管障害に与える影響の検討：3ヶ月齢(若齢)および24ヶ月齢(加齢)雄性 C57BL/6 マウスに脂肪酸結合ウシ血清アルブミン(BSA)を腹腔内投与し蛋白尿誘導性尿細管障害モデルを作成した。若齢 BSA 非投与群、若齢 BSA 投与群、加齢 BSA 非投与群、加齢 BSA 投与群の4群について、尿細管障害、アポトーシス、UPR の程度を検討した。尿細管障害は、HE 染色組織標本の組織学的検討による尿細管障害スコア、尿細管障害マーカーNgal の mRNA 発現量の定量により検討した。アポトーシスは、TUNEL 陽性細胞数、Western Blotting 法による切断型カスパーゼ3 の発現量の定量により検討した。UPR は、内因性分子シャペロンであり細胞保護的なUPRであるBiPを免疫組織染色およびWestern Blotting 法で、細胞障害的なUPRであるCHOP、3つの小胞体ストレスセンサー関連分子であるsplicing XBP1、リン酸化PERK、切断型ATF6をWestern Blotting 法で発現量を定量し検討した。</p> <p>②培養マウス近位尿細管細胞を用いた尿蛋白に伴うUPRの役割の検討：培養尿細管細胞に蛋白尿類似の刺激として脂肪酸結合アルブミンを孵置し、UPR、アポトーシスを検討した。さらに、RNA 干渉法を用いたCHOP、BiP、IRE1の発現抑制により、UPRとアポトーシスの関連を検討した</p> <p>③マウスモデルに対する外因性分子シャペロンの補充効果の検討：内因性分子シャペロンの補充が加齢に伴う尿蛋白による尿細管障害の悪化に対する治療となりうるかを検討するため</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)

加齢マウスに外因性分子シャペロンである TUDCA を前投与し、蛋白尿誘導性尿細管障害モデルを作成し、若齢 BSA 投与群、加齢 BSA 投与群、加齢 BSA+TUDCA 投与群の 3 群において、尿細管障害、アポトーシスを検討した。

④若年成人、高齢患者の腎生検組織標本を用いた UPR の状態の検討：蛋白尿 0.1g/gCr 以下の若年成人、蛋白尿 1.0g/gCr 以上の若年成人および高齢患者の 3 群の腎生検組織に BiP の免疫染色を行い、発現量を定量した。

【結果】①若齢 BSA 投与群では、若齢 BSA 非投与群に比し軽度の尿細管障害を認めるとともに、BiP の発現亢進、CHOP の軽度発現上昇を認めた。また、加齢 BSA 非投与群でも、若齢 BSA 投与群と同様に、若齢 BSA 非投与群に比し軽度の尿細管障害を認めるとともに、BiP の発現亢進、CHOP の軽度発現上昇を認めた。一方、加齢 BSA 投与群では、他群に比し著明な尿細管障害、アポトーシスを認め、加齢は尿蛋白による尿細管障害の増悪因子であると考えられた。さらに、加齢 BSA 投与群では、加齢群、若齢 BSA 投与群で認められた BiP の発現亢進が消失しており、CHOP の有意な発現増加を認めた。これら UPR の発現変化の分子機構を検討するため、小胞体ストレスの 3 つのセンサー経路、IRE1-XBP1 経路、PERK 経路、ATF6 経路について検討したところ、BiP の発現は splicing XBP1 と関連性を有し、CHOP の発現はリン酸化 PERK、切断型 ATF6 と関連性を有した。

②培養尿細管細胞において、脂肪酸結合アルブミンはアポトーシスとともに UPR を惹起した。脂肪酸結合アルブミンによるアポトーシスは細胞保護的 UPR である BiP の発現抑制により増強し、細胞障害的 UPR である CHOP の発現抑制により減弱した。次に BiP 発現と関連性を有した IRE1-XBP1 経路を抑制したところ、IRE1 抑制細胞では脂肪酸結合アルブミンによる BiP の発現が抑制されており、脂肪酸結合アルブミンによるアポトーシスが増強した。さらに、BiP、IRE1 の発現が抑制された状態でも、分子シャペロン TUDCA の附置は脂肪酸結合アルブミンによるアポトーシスを改善しえた。

③加齢 BSA+TUDCA 投与群は、加齢 BSA 投与群に比し、尿細管障害、アポトーシスの有意な改善を認めた。TUDCA の補充は、BiP の発現誘導が低下している加齢マウスにおいても尿蛋白に伴う尿細管障害を改善しえた。

④近位尿細管における BiP の発現は、蛋白尿 0.1g/gCr 以下の若年成人では認められず、蛋白尿 1g/gCr 以上の若年成人では強い発現を認めた。一方、蛋白尿 1g/gCr 以上の高齢患者では若年成人で認めた BiP の発現増強が消失していた。

【考察】若齢の尿細管では、尿蛋白によって UPR が惹起され、誘導された分子シャペロンが尿細管障害を抑制していると考えられる。一方、加齢状態では、適応反応としての UPR が惹起されており、加齢による障害が抑制されているが、この状態でさらに尿蛋白が加わることで、細胞障害性の UPR が惹起され、尿細管障害が増悪するものと考えられた。加齢という、ストレス誘導性の分子シャペロンの発現増強が障害された状態であっても、外因性の分子シャペロンの補充が尿細管障害を改善しえたことから、分子シャペロンの補充が高齢者における尿蛋白に伴う尿細管障害に対する新たな治療になりうる可能性が示唆された。

【結論】加齢に伴う小胞体ストレス応答の異常は、尿蛋白による近位尿細管障害の悪化と関連する。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	693	氏名	武田 尚子
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>加齢は腎予後の増悪因子であるが、尿細管病変との関連は明らかでない。本研究では、尿細管における小胞体ストレス応答に着目し、尿細管障害や加齢に伴う腎障害の悪化と小胞体ストレス応答との関連について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 脂肪酸結合ウシ血清アルブミンをマウス腹腔内に投与して、タンパク尿誘導性尿細管障害モデルを作製し解析したところ、加齢マウスでは、若齢マウスと比較して著明な尿細管障害を認め、細胞保護的な小胞体ストレス応答は減弱し、細胞障害的な小胞体ストレス応答が亢進していた。その分子機構として、IRE1-XBP1 経路、PERK 経路、ATF6 経路が関与していた。また、分子シャペロンであるタウロウルソデオキシコール酸を前投与することで加齢マウスの尿細管障害は有意に改善された。</li> <li>2) 上記経路の関与については、培養尿細管細胞を用いても詳細に検討、確認した。</li> <li>3) ヒト腎生検サンプルを用いた解析では、若年成人の腎機能低下患者において細胞保護的な小胞体ストレス応答は増強していたものの、高齢の腎機能低下患者においてはその様な応答反応は消失していた。</li> </ol> <p>以上より、本論文は加齢による小胞体ストレス応答の異常が尿細管障害を促進するという新しい知見を示し、その分子機構を解明したものである。さらに、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 596 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 25 年 9 月 2 日)</p>			