

氏 名	山原 康佑
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第706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26年 3月10日
学位論文題目	Obesity-Mediated Autophagy Insufficiency Exacerbates Proteinuria-induced Tubulointerstitial Lesions (肥満に伴うオートファジーの低下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 堀江 稔 副査 教授 小島 秀人 副査 教授 谷 徹

論文内容要旨

※整理番号	712	氏名	やまはら こうすけ 山原 康佑
学位論文題目	Obesity-Mediated Autophagy Insufficiency Exacerbates Proteinuria-induced Tubulointerstitial Lesions. (肥満に伴うオートファジーの低下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】近年肥満者における末期腎不全患者の増加が問題となっており、肥満者における腎予後改善のために新たな治療法の開発が待たれているが、治療標的は明らかでない。蛋白尿によって誘導される尿細管間質病変の進行により腎機能が低下することが知られるため、この尿細管間質病変の進展機構を明らかにすることが新たな治療標的の解明に繋がると考えた。そこで、我々は肥満者における腎機能低下機構としてオートファジーに着目した。オートファジーとは細胞内の異常蛋白質・オルガネラをリソソームに運搬し排除する細胞内の浄化機構であり、近年、その異常と各種代謝疾患、老化関連疾患との関わりが報告されている。肥満に伴う尿細管間質病変の進展機構にオートファジーが関与するという仮説の下、マウス、培養マウス近位尿細管細胞(以下 mProx)、ヒト腎生検組織を用いて検討した。</p> <p>【方法】①肥満が尿蛋白誘導性尿細管間質病変に与える影響の検討 8週齢雄性 C57/B6 マウスに4週間60%高脂肪食を与えた肥満モデルを作成し、脂肪酸結合ウシ血清由来アルブミン(以下BSA)腹腔内投与による尿細管障害を惹起し、尿細管間質障害を検討した。</p> <p>②肥満がオートファジー活性に与える影響の検討 オートファゴソームを可視化できるように作製した GFP-LC3-TG マウスを用い、通常食マウス群、高脂肪食肥満マウス群を作製し、それぞれに対し BSA 腹腔内投与により尿蛋白誘導性尿細管障害を惹起し、オートファジー活性を検討した。近位尿細管細胞特異的オートファジー欠損マウス(以下 <i>Atg5^{flox/flox}; KAP-Cre⁺</i> マウス)を作製し、BSA 腹腔内投与により尿蛋白誘導性尿細管障害を惹起し、尿細管間質障害を検討した。</p> <p>③近位尿細管細胞におけるオートファジー制御機構の検討 オートファジーを制御する分子機構として栄養感知経路の一種である mTOR に着目した。mProx において mTOR を負に制御する TSC1 への RNA 干渉により mTOR の過剰亢進モデルを作成し、脂肪酸結合アルブミン刺激でオートファジーを惹起し、オートファジー活性を検討した。GFP-LC3-TG マウス通常食群、GFP-LC3-TG マウス高脂肪食肥満群、GFP-LC3-TG マウス高脂肪食肥満群に mTOR 阻害剤ラパマイシンを投与した群を作製し、それぞれに対し BSA 腹腔内投与によるオートファジーを惹起し、mTOR 活性とオートファジー活性の関連性を検討した。</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。

④肥満がヒト近位尿細管細胞のオートファジー活性に与える影響の検討

肥満顕性蛋白尿患者の腎生検検体に免疫染色を行い、mTOR 活性とオートファジー活性の関連性を検討した。

【結果】①高脂肪食肥満マウス+BSA 投与群は通常マウス+BSA 投与群に比し尿細管間質障害がより悪化した。これらの結果より、肥満は尿蛋白による尿細管間質病変進展の増悪因子であることが示唆された。

②BSA 投与によるオートファジー活性は通常群で亢進し、高脂肪食肥満群で亢進しなかった。*Atg5^{flx/flx};KAP-Cre⁺* マウス+BSA 投与群は通常マウス+BSA 投与群に比し尿細管間質障害がより悪化した。これらの結果により、近位尿細管細胞において蛋白尿によって誘導されるオートファジーは細胞保護的作用を持ち、肥満によって抑制されていることが示唆された。

③TSC1 抑制細胞で脂肪酸結合アルブミン刺激によるオートファジーは抑制された。GFP-LC3-TG 高脂肪食肥満マウス+BSA 投与群の近位尿細管細胞で mTOR の活性化を示す pS6 蛋白の発現が亢進し、オートファゴソームの発現が減少した。GFP-LC3-TG 高脂肪食肥満マウス+ラパマイシン+BSA 投与群の近位尿細管細胞で pS6 蛋白の発現が減弱し、オートファゴソームの発現が増加した。これらの結果より、近位尿細管細胞におけるオートファジーを抑制する分子機構として肥満による栄養感知経路 mTOR の異常な活性化が関与することが示唆された。

④肥満顕性蛋白尿患者の近位尿細管細胞で mTOR の活性化を示す pS6 蛋白の発現が増加していた。また、オートファジー活性の低下を示す p62 蛋白の発現部位は pS6 蛋白の発現部位と一致した。これらの結果より、マウスのみならずヒト近位尿細管細胞でも肥満による mTOR の活性化に伴いオートファジーが低下していることが示唆された。

【考察】本来の近位尿細管細胞では、尿蛋白によって誘導されたオートファジーが尿細管障害を抑制していると考えられる。一方、肥満状態では、栄養感知経路 mTOR の活性化によりオートファジーが抑制され、尿細管障害が増悪するものと考えられた。肥満状態であっても、薬剤による mTOR 阻害がオートファジー活性を回復したことから、mTOR の異常な活性化に対する治療が肥満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】肥満によって誘導される mTOR の活性化は、近位尿細管細胞保護的なオートファジー活性を抑制し、尿細管間質病変の悪化をもたらす。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	712	氏名	山原 康佑
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>本研究は、肥満が尿蛋白に伴う尿細管間質病変を悪化させる機構にオートファジーが関与しているか検討したものである。</p> <p>高脂肪食を4週間摂食した肥満マウスに脂肪酸結合ウシ由来アルブミン腹腔内投与による蛋白尿モデルを作成し、肥満が尿蛋白誘導性尿細管間質病変に与える影響を検討した。オートファジー可視化マウス (GFP-LC3TG マウス) を用いて、肥満や尿蛋白による近位尿細管細胞のオートファジーへの影響を検討した。近位尿細管細胞特異的オートファジー欠損マウスを用いて、オートファジーの役割を検討した。マウスとヒトの腎組織に免疫染色を行い、肥満が近位尿細管細胞の栄養感知経路とオートファジーに与える影響について検討した。そして以下の点が明らかになった。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 尿蛋白による尿細管間質病変は肥満によって悪化した。 2) 尿蛋白によって近位尿細管細胞でオートファジーが誘導され、肥満によって抑制された。 3) 尿蛋白誘導性オートファジーは近位尿細管細胞保護的に作用した。 4) マウスおよびヒト近位尿細管細胞において肥満による栄養感知経路 mTORC1 の亢進に伴いオートファジーは抑制されていた。 <p>本論文は肥満によって mTORC1 の活性化が誘導され、近位尿細管細胞保護的なオートファジーを抑制し、尿細管間質病変の悪化をもたらすという新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、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 588 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成26年 / 月 29日)</p>			