

氏 名 岩井 環

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲第777号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項

学 位 授 与 年 月 日 平成29年 3月10日

学 位 論 文 題 目 Stearoyl-CoA Desaturase-1 Protects Cells against
Lipotoxicity-Mediated Apoptosis in Proximal Tubular
Cells

(ステアロイル CoA 不飽和化酵素1は脂肪毒性による細胞死
から近位尿細管細胞を守る)

審 査 委 員 主査 教授 扇田 久和

副査 教授 河内 明宏

副査 教授 依馬 正次

論文内容要旨

※整理番号	785	(ふりがな) 氏名	いわい たまき 岩井 環
学位論文題目	Stearoyl-CoA desaturase-1 protects cells against lipotoxicity-mediated apoptosis in proximal tubular cells (ステアロイル CoA 不飽和化酵素 1 は脂肪毒性による細胞死から近位尿細管細胞を守る)		
<p>【目的】糖尿病性腎症において、尿細管障害の進展は腎予後を規定する重大な因子である。顕性蛋白尿症例では、近位尿細管細胞での蛋白再吸収が過剰になり、尿細管障害が惹起されることで腎不全に至る。糖尿病では糖代謝異常のみならず、血中の総遊離脂肪酸濃度および飽和脂肪酸/不飽和脂肪酸比の上昇などの脂肪酸代謝異常が様々な臓器障害と関連することが報告されている。そこで、糖尿病における近位尿細管細胞での脂肪酸代謝異常が、脂肪毒性に対する細胞の防御機構を脆弱化させ、アポトーシス誘導の一因となるとの仮説を立て、近位尿細管細胞での脂肪酸代謝異常の是正が腎症の治療戦略となる可能性について検証した。</p> <p>【方法】1) 高脂肪食負荷糖尿病マウス腎における脂肪酸代謝酵素の解析:7 週齢雄性 C57BL/6 マウスに 8 週間高脂肪食負荷して作成した 2 型糖尿病マウス腎にて、普通食投与の対照群に比して発現量の変化を来たす脂肪酸代謝酵素 mRNA 発現を real time-PCR を用いて検討した。結果、飽和脂肪酸から一価不飽和脂肪酸への変換酵素であるステアロイル CoA 不飽和化酵素 1(SCD1)、脂肪滴形成に関わる細胞内脂肪滴蛋白(ADRP)の mRNA 発現低下を認めた。更に、Western blot 法ならびに免疫組織染色で、近位尿細管領域で発現低下が認められた SCD1 に着目し、以下の実験を行った。</p> <p>2)① SCD1 過剰発現培養近位尿細管細胞での飽和脂肪酸刺激によるアポトーシスの評価: SCD1 遺伝子を組み込んだ pBABE レトロウイルスベクターを用い、SCD1 過剰発現マウス培養近位尿細管細胞株(mProx)を樹立した。SCD1 過剰発現ならびに対照 mProx に、飽和脂肪酸(パルミチン酸)結合アルブミン、あるいは飽和脂肪酸と一価不飽和脂肪酸(オレイン酸)結合アルブミンとの共孵置による刺激 9 時間後に細胞を回収し、Western blot 法による cleaved Caspase 3 蛋白発現、DNA 断片化を検出する TUNEL 法を用いてアポトーシス検出を行った。</p> <p>② SCD1 発現抑制 mProx での飽和脂肪酸刺激によるアポトーシスの評価: siRNA 干渉により mProx での SCD1 遺伝子発現抑制を行い、飽和脂肪酸刺激または一価不飽和脂肪酸との共孵置刺激を行い、アポトーシスを評価した。</p> <p>3) SCD1 過剰発現 mProx での飽和脂肪酸刺激による小胞体ストレス応答の評価: 飽和脂肪酸刺激からアポトーシスに至る過程に関し小胞体ストレス応答の役割を検討するため、SCD1 過剰発現ならびに対照 mProx において、飽和脂肪酸刺激と一価不飽和脂肪酸との共孵置刺激</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を用いて印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

を行い、Western blot 法により小胞体ストレスマーカーである pPERK/PERK、sXBP1、CHOP 蛋白発現を検討した。

4) **mProx** 細胞内脂肪滴形成の評価:飽和脂肪酸刺激によるアポトーシスと脂肪滴形成との関係を検討するため、SCD1 過剰発現ならびに対照 mProx に、飽和脂肪酸刺激と一価不飽和脂肪酸との共孵置刺激を行い、BODIPY 染色にて脂肪滴形成を評価した。

5) **ADRP 過剰発現 mProx** での飽和脂肪酸刺激によるアポトーシスおよび小胞体ストレス応答の評価:脂肪滴形成が飽和脂肪酸刺激によるアポトーシス誘導に対して保護的に関与する可能性を検討するため、レトロウイルスを用いて *ADRP* 遺伝子過剰発現 mProx 細胞株を樹立し、飽和脂肪酸刺激によるアポトーシス誘導と小胞体ストレスを評価した。

【結果】1) 糖尿病モデルマウス腎では、SCD1 の mRNA 発現が有意に低下し、近位尿細管領域での蛋白発現の低下を認めた。

2)① 対照 mProx では飽和脂肪酸刺激によりアポトーシスが誘導されたが、一価不飽和脂肪酸との共孵置ならびに SCD1 過剰発現 mProx では、飽和脂肪酸刺激によるアポトーシス誘導が抑制された。

② SCD1 発現抑制 mProx では、飽和脂肪酸刺激によるアポトーシス誘導が増悪し、一価不飽和脂肪酸との共孵置によりアポトーシス誘導が抑制された。

3) SCD1 過剰発現 mProx では、対照 mProx よりも飽和脂肪酸刺激による小胞体ストレス応答が抑制された。

4) 対照 mProx において、飽和脂肪酸刺激では脂肪滴が形成されず、一価不飽和脂肪酸との共孵置により脂肪滴形成が認められた。一方、SCD1 過剰発現 mProx では飽和脂肪酸刺激下で脂肪滴形成が認められた。

5) **ADRP 過剰発現 mProx** では、飽和脂肪酸による小胞体ストレス応答ならびにアポトーシスが抑制された。

【考察】糖尿病マウス腎で発現低下を認めた脂肪酸代謝酵素 SCD1 は、近位尿細管細胞での発現抑制により飽和脂肪酸によるアポトーシスを強く誘導した。このことから、SCD1 発現低下が糖尿病近位尿細管の脂肪毒性に対する脆弱性に関与する可能性が示唆された。一方、SCD1 過剰発現は、飽和脂肪酸刺激による小胞体ストレス応答やアポトーシス誘導を抑制した。脂肪滴形成を伴ったことから、不飽和脂肪酸の存在が飽和脂肪酸から中性脂肪への合成を促したことが推測され、脂肪滴形成に関わる *ADRP* 過剰発現実験では脂肪毒性に対する脂肪滴形成の細胞保護作用が確認された。以上より、腎臓の SCD1 発現是正が顕性蛋白尿期における腎保護に向けた治療戦略となりうる可能性が考えられる。この仮説を検証するには、腎臓特異的に SCD1 過剰発現あるいは発現抑制を行った動物実験での検討が必要である。

【結語】糖尿病近位尿細管では脂肪酸代謝酵素 SCD1 の低下を認め、飽和脂肪酸による脂肪毒性およびアポトーシスと関連する。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	785	氏名	岩井 環
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>糖尿病性腎症における尿細管障害のメカニズムを明らかにするため、近位尿細管細胞での脂肪酸代謝異常と、この異常による細胞の防御機構の脆弱化、特に、アポトーシス誘導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"> 1) 糖尿病モデルマウス腎では、ステアロイル CoA 不飽和化酵素 1 (SCD1) および脂肪滴関連蛋白 (ADRP) の発現が低下した。 2) SCD1 過剰発現近位尿細管細胞株では、対照株と比較して、飽和脂肪酸刺激によるアポトーシス誘導が抑制された。 3) SCD1 発現抑制近位尿細管細胞株では、飽和脂肪酸刺激によるアポトーシス誘導が増加したが、一価不飽和脂肪酸を加えることでアポトーシス誘導は抑制された。 4) SCD1 過剰発現近位尿細管細胞株では、飽和脂肪酸刺激による小胞体ストレス応答が抑制された。 5) SCD1 過剰発現近位尿細管細胞株では、飽和脂肪酸刺激により細胞内脂肪滴形成が促進した。 6) ADRP 過剰発現近位尿細管細胞株では、飽和脂肪酸刺激によるアポトーシス誘導および小胞体ストレス応答が抑制された。 <p>以上より、本論文は糖尿病における腎臓、特に、近位尿細管での脂肪酸代謝障害に関する新しい知見を示し、この代謝障害が腎障害を惹起する要因を分子レベルで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 587 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 29 年 1 月 23 日)</p>			