

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名 國重 莉奈

慢性腎臓病（CKD）とは、その原因に関わらず3 カ月以上持続する腎障害または腎機能の低下を示す病態の総称である。CKD の初期症状はほとんどないため早期発見が難しく、一度低下した腎機能を改善できる治療薬は存在していない。Calciprotein particle (CPP) とは、リン摂取量の増加や加齢により血中・原尿中のリン濃度が上昇した際に析出するリン酸カルシウムと血清タンパク質（主に、fetuin-A）の凝集体のことである。血中ではコロイド分子として分散している CPP は、食事で摂取したリンとカルシウムを骨へと運ぶ担体として生理的な機能を持つ一方で、老化や生活習慣病、慢性腎臓病とその合併症である血管石灰化の原因物質であることが明らかにされつつある。これまでの CPP 研究は後期 CKD において見られる血中 CPP に集中しており、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞における CPP の細胞障害機構は調べられてきた一方、尿細管において生じた CPP が尿細管上皮細胞に傷害を与える可能性は見過ごされてきた。本研究では、この可能性に着目し、CPP が尿細管上皮細胞に与える「細胞障害機構の解明」を目的としている。

本論文は序論、結果、考察の3つから構成されている。序論では、本論文の緒言として、CKD や CPP、そして本論文で着目したリソソーム・オートファジー系や細胞内コレステロール代謝に関する説明をし、研究目的を明確にしている。

結果では、まず CPP がカベオラ依存的エンドサイトーシスおよびマクロピノサイトーシスにより細胞に取り込まれ、次第に細胞内の後期エンドソーム/リソソーム（LELs）に蓄積していくことを観察している。また、Filipin を用いたコレステロール染色と蛍光顕微鏡画像の定量により、CPP を加えた約6 時間後から細胞膜コレステロールが減少すること、そして同時に LELs においてコレステロールが蓄積することを示している。さらに、細胞膜コレステロールを除去した細胞では膜傷害を受けた際に膜修復が十分に行われないことが知られるが、細胞膜コレステロールの減少が確認された CPP 添加細胞においても同様に、物理的傷害に対して細胞が脆弱化していることが示された。

続いて、CPP の蓄積が見られた LELs における変化を顕微鏡画像の解析により詳細に調べている。その結果、抗 LAMP2 抗体を用いた蛍光抗体法により LELs 小胞の膨張が示され、また、リソソーム pH の指標となる LysoTracker 染色により pH 上昇を示唆する結果が得られている。LELs における pH 上昇に関しては、さらに新規レシオ型 pH 感受性蛍光プローブを用いた pH の絶対定量を行っており、LELs の pH が 5.48 から CPP 添加により 6.44 に上昇することを示した点は高く評価できる。続いて、LELs における pH 上昇を起点とし、TFEB および TFE3 によるリソソームストレス応答が起こることや、至適 pH が酸性であるリソソーム加水分解酵素活性の低下、そしてオートファジーフラックスの阻害が示されている。また、細胞毒性を持つことが知られる多くのナノ粒子はリソソーム膜透過性亢進（LMP）により毒性を発揮するが、CPP において LMP は起こっておらず、それらのナノ粒子とは異なるメカニズムで細胞毒性を引き起こしている可能性を提起している。

生体内において近位尿細管上皮細胞は虚血再灌流障害やシスプラチンをはじめとする腎毒性のある薬剤など様々な傷害にさらされやすく、そういったストレス条件下において、オートフ

ァジーは傷害を受けたタンパク質や細胞内小器官を消化することで細胞を保護する作用がある。CPP 自体は HK-2 細胞に対して僅かな細胞毒性しか有していないことが LDH アッセイや Annexin V/PI によるアポトーシスアッセイ、PI 染色後の顕微鏡画像解析により明らかになったが、CPP により引き起こされたオートファジーフラックス阻害により細胞が酸化ストレスに対して脆弱化している可能性が考えられた。本論文ではこのことを踏まえ、CPP を添加し 12 時間培養した細胞に対して過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を用いた酸化ストレス負荷を行い、CPP 非添加条件と比較してより多くの細胞に細胞死が起こることを示している。

考察では、本論文の結言として一連の成果について総括し、本研究の成果を整理している。CPP は尿細管上皮細胞において細胞膜への物理的ストレスや酸化ストレスに対して細胞を脆弱化することでネフロン数の減少に寄与し、CKD の発症や進展の一因となっている可能性を提起した点は非常に意義深い成果といえる。本研究の成果は、CKD の早期発見・早期介入に大きく寄与するものと期待される。また、CPP が細胞内にエンドサイトーシスされた末、リソソーム・オートファジー系を攪乱することを示した本研究の知見は、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、あるいはマクロファージに対する血中 CPP の毒性メカニズムとも部分的に一致する可能性があり、その点も高く評価できる。

よって本論文は博士（学術）の学位請求論文として合格と認められる。