

審査の結果の要旨

氏名 岡田 啓

本研究はヒトの腎臓において腎機能低下または加齢により血中・尿中濃度が上昇するD-セリンと、慢性腎臓病（CKD）進行との関係を明らかにするため、ヒト近位尿細管上皮細胞（培養株HK-2、初代培養細胞NHREC）にD-セリンを負荷し、その影響の分析と共に現象の機序の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. HK-2とNHRECに、培地中にD-セリンを濃度10 mM以上で負荷したところ、細胞増殖障害が生じることが示された。この細胞増殖障害は、細胞生存判別試薬を用いた細胞数カウントとMTSアッセイの両方で確認され、またNHRECでも同様の変化を認めた。非特異的な反応でないことを確認するコントロールとして、CKD患者でD-セリンと同様に血中濃度が上昇する他のD-アミノ酸であるD-プロリン・D-アラニンでも同様の実験を行ったが、細胞増殖障害は認めなかった。
2. D-セリンによる尿細管細胞増殖障害の背景の1つの原因として、BAXとPUMAの遺伝子発現上昇を認め、ミトコンドリア依存性のアポトーシス誘導シグナルが関係していると考えられた。表現型としても、実際アネキシンV染色陽性細胞、カスパーゼ3/7活性陽性細胞の増加を確認し、アポトーシス陽性細胞の増加を確認した。また、D-セリン負荷で細胞周期停止に関わるp16とp21の発現も亢進し、PI染色でG2/M期細胞周期停止を確認した。D-セリン負荷により増加している老化の表現型を、 γ -H2AX染色とSA- β G染色にて確認した。また、D-セリン負荷で、IL-6とIL-8の発現上昇、分泌上昇を認めた。これにより、近年注目されているSASPと呼ばれる表現型を取り周囲の細胞への炎症波及を起こすと考えられた。同時に、線維化マーカーも発現亢進を確認し、細胞自体の線維化にもD-セリンが関与していると考えられた。
3. D-セリンによる尿細管障害は、アミノ酸欠乏シグナルであるGCN2を介した統合的ストレス応答によるものと、p21の活性化であることを、蛋白発現レベルで確認した。実際に、L-セリン欠乏反応が代償的に遺伝子発現レベルで亢進し、他のL-アミノ酸でなくL-セリンを添加すると、D-セリンによる尿細管細胞増殖障害はキャンセルされた。よって、細胞がL-セリン欠乏反応を惹起していると考えられた。また、培地中のD/L-セリン比を変化させることで、D-セリンによる尿細管障害の程度が変化することを確認した。

以上、CKD患者で血中に増加するD-セリンを、ヒト近位尿細管上皮細胞に負荷した際の細胞の反応を分析し、D-セリンが細胞周期停止と尿細管老化を促進し、CKD進行をさせうる新たな機序の存在を明らかにした。D-アミノ酸の新たな機能の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。