

〔課程一 2〕

審査の結果の要旨

氏名 篠原明成

本研究は、マクロファージと近位尿細管におけるエネルギー代謝の変化が腎虚血再灌流障害に及ぼす影響を解明するため、解糖系を抑制する 2-デオキシグルコース (2DG) を用い、mRNA の発現量や病理所見などを解析したもので、下記の結果を得ている。

1. マウス片腎虚血再灌流モデルでは、障害腎における IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 の発現量が有意に上昇した。虚血時間が 15 分と 20 分の場合は、IL-1 β 、TNF- α の発現量が術後 7 日目でピークに達するのに対し、27 分では、術後 14 日目まで上昇し続けた。IL-6 は、虚血時間が 15 分と 20 分の場合は術後 1 日目、27 分では術後 7 日目であった。

2. 虚血時間 20 分の片腎虚血再灌流モデルで、2 g/kg の 2DG を虚血 3 時間前に投与し、その後も 1 日 1 回投与した群では、vehicle 群に比し、術後 7 日目の IL-1 β の発現量が低下し、病理所見でも尿細管壊死が軽減する傾向が見られた。

3. マウス腹腔由来のマクロファージである RAW264.7 細胞を用い、100 ng/ml の LPS でマクロファージを刺激することにより、2DG の効果を検討した結果、LPS 投与 3 時間前に 5 mM の 2DG で処置した群では、vehicle 群に比し、IL-1 β の発現量を有意に抑制した。以上の結果から、2DG がマクロファージの解糖系を抑制することで、IL-1 β の発現量を抑制し、片腎虚血再灌流障害が軽減したと考えられた。

4. 虚血時間 30 分の両腎虚血再灌流モデルで、2 g/kg の 2DG を虚血 3 時間前に投与した群と、vehicle 群では、血清クレアチニン値がピークとなる術後 1 日目で腎障害に有意差はなく、障害腎のサイトカインの発現量も 2 群間で差はなかった。

5. 虚血前の近位尿細管のエネルギー変化を確認するため、2 g/kg の 2DG を投与した群と vehicle 群で、3 時間後の腎皮質における AMPK とオートファジーの活性化をウエスタンブロットにて解析したが、2 群間で有意差はなかった。

6. 虚血時間 30 分の両腎虚血再灌流モデルで、500 mg/kg の 2DG を虚血 24 時間前に投与した群では、vehicle 群に比し、血清クレアチニン値が有意に低下し、尿細管壊死も軽減した。一方、障害腎における IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、CCL-2 の発現量は 2 群間で有意差はなく、炎症性サイトカインとは独立した結果と考えられた。

7. 虚血前の近位尿細管のエネルギー変化を確認するため、500 mg/kg の 2DG を投与した群と vehicle 群で、24 時間後の腎皮質における AMPK とオートファジーの活性化をウエスタンブロットにて解析したところ、2DG 群で AMPK の活性は抑制された。

8. 24 時間後の腎臓における解糖系やグルコース輸送に関与する遺伝子発現は、2DG 群と vehicle 群で有意差はなかった。脂肪酸酸化に関与する酵素の遺伝子発現は、PPAR α 、Acox、Cpt いずれも 2DG 群で有意に上昇した。アミノ酸分解に関与する酵素の遺伝子発現

は、Sds のみ 2DG 群で上昇した。食事摂取量や血清グルコース、中性脂肪の値には有意差なかったが、遊離脂肪酸は 2DG 群で有意に上昇した。2DG が多臓器の解糖系を抑制することで、ホルモン感受性リパーゼが活性化され、脂肪細胞からの脂肪酸放出を促し、脂肪酸酸化を主なエネルギー経路とする近位尿細管細胞での ATP 産生が亢進したのではないかと考えられた。

9. 24 時間後の腎臓におけるペントースリン酸回路に関与する遺伝子発現は、G6pd、Tkt いずれも 2DG 群で有意に上昇した。また、ペントースリン酸回路は NADPH の主な産生経路であり、NADPH は酸化型グルタチオンを還元型グルタチオンに変換して、酸化ストレスに対して耐性を得るが、抗酸化ストレス物質である Gpx1、Gpx4 の発現量も有意に上昇した。

10. ヒト近位尿細管細胞である HK-2 細胞を、5 mM の 2DG で 6 時間処理したところ、vehicle 群と比し、Gpx1、Gpx4 の発現量は有意に上昇した。さらに、4 mM の過酸化水素刺激で 4 時間後の細胞死を比較したところ、2DG 群で細胞死は有意に抑制された。

以上、本論文はマクロファージに加えて、近位尿細管細胞への 2DG の作用と、虚血再灌流障害に対する効果を明らかにした。本研究は、未知の部分が多い、近位尿細管細胞におけるエネルギー代謝と急性腎障害への影響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。