

氏 名	小 山 哲 朗
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 4 6 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 2 3 年 9 月 1 4 日
学 位 論 文 題 目	SIRT3 Attenuates Palmitate-induced ROS Production and Inflammation in Proximal Tubular Cells (抗 老 化 分 子 SIRT3 は 近 位 尿 細 管 細 胞 に お い て 飽 和 脂 肪 酸 に よ る MCP-1 発 現 を 抑 制 す る)
審 査 委 員	主 査 教 授 堀 池 喜 八 郎 副 査 教 授 遠 山 育 夫 副 査 教 授 山 田 尚 登

論文内容要旨

※整理番号	651	(ふりがな) 氏名	こやま てつろう 小山 哲朗
学位論文題目	SIRT3 Attenuates Palmitate-induced ROS Production and Inflammation in Proximal Tubular Cells 抗老化分子 SIRT3 は近位尿細管細胞において飽和脂肪酸による活性酸素種 (ROS) 産生および炎症を抑制する		
<p>【目的】 蛋白尿による尿細管間質病変の一因として、糸球体から濾過されたアルブミン結合脂肪酸の近位尿細管細胞への過剰負荷により活性酸素種 (ROS) 蓄積および炎症が惹起されることが報告されている。また、様々な生物種においてカロリー制限による抗炎症効果が報告されている。我々が着目した SIRT3 はカロリー制限により活性化される抗老化分子として同定された sirtuin family の一つであり、腎に多く発現し、ミトコンドリアに局在することが確認されているが、腎尿細管間質病変の分子機構に関与するかは不明である。今回、我々は SIRT3 に着目し、飽和脂肪酸による ROS 蓄積および炎症反応に対して SIRT3 が及ぼす影響を、培養マウス近位尿細管細胞を用いて検討した。</p> <p>【方法】 1) 7 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに対し、0.3g/30g の脂肪酸結合ウシ血清アルブミンあるいは同量の PBS の腹腔内投与を 11 日間行い、負荷終了後腎組織所見の検討を行った。SIRT3 発現量を定量的 RT-PCR 法ならびに Western Blot 法にて行い、炎症の指標として、F4/80 を免疫組織染色にて、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の発現量を定量的 RT-PCR 法にて行なった。酸化ストレスに対する検討を 4-hydroxynonenal (4-HNE) の免疫組織染色にて行なった。2) 培養マウス近位尿細管(mProx)細胞に飽和脂肪酸(パルミチン酸)による刺激を行い、MCP-1 の mRNA および培養上清中蛋白質量、ならびに H₂DCFDA を用いて活性酸素種 (ROS) を定量し検討した。また、ROS の下流にある MAPK-NFκB 経路の活性化を検討するため、各種 MAPK (ERK、p38、JNK) リン酸化および IκB 分解を Western Blot 法で確認した。さらに、各種 MAPK 阻害剤を用いて MCP-1 の mRNA を定量的 RT-PCR 法により定量し、MCP-1 発現がどの MAPK に依存するかを評価した。3) Retrovirus vector を用い野生型 SIRT3 および Dominant-negative SIRT3 [SIRT3(N87A)] 過剰発現 mProx 細胞を作成し、パルミチン酸による MCP-1 の mRNA および培養上清中蛋白質量ならびに ROS 蓄積に対する SIRT3 の効果を検討した。4) パルミチン酸による MAPK-NFκB 経路の活性化に対する SIRT3 の効果を検討するため、野生型 SIRT3 および SIRT3(N87A) 過剰発現 mProx 細胞における、MAPK リン酸化および IκB 分解を Western Blot 法で確認した。また、MCP-1 promoter 領域を含む luciferase vector (変異のない vector、NFκB 結合部位に変異を有する vector) および NFκB 結合配列を持つ luciferase vector を用いて reporter assay を行った。5) パルミチン酸による ROS 蓄</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。

積を SIRT3 が軽減する分子機構を検討するため、野生型 SIRT3 および SIRT3(N87A) 過剰発現 mProx 細胞における抗酸化遺伝子 MnSOD の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法によって、また、ミトコンドリアでの脂肪酸代謝能を oxygen consumption rate (OCR) 測定によって評価した。6) SIRT3 を RNA 干渉にて knock down し MCP-1 および MnSOD の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法にて、細胞内 ROS 定量を H₂DCFDA にて行った。また、ミトコンドリアでの脂肪酸代謝能の変化を OCR 測定にて検討した。

【結果】1) PBS 投与群と比べ脂肪酸結合アルブミン投与群において、尿細管間質への F4/80 陽性炎症細胞浸潤および 4-HNE 蓄積を認めた。また、SIRT3 発現量の有意な減少、MCP-1 発現量の有意な増加を認め、両者の発現の間に有意な負の相関を認めた。2) パルミチン酸刺激により、培養 mProx 細胞における MCP-1 mRNA 量、培養上清中蛋白量および細胞内 ROS の増加を認めた。パルミチン酸刺激により、ERK、p38、JNK のいずれもリン酸化が起こり、I κ B 分解が起こることを確認した。SP600125 (JNK 阻害剤) ではパルミチン酸による MCP-1 発現は抑制されず、SB203580 (p38 阻害剤) および PD98059 (ERK 阻害剤) により MCP-1 発現が有意に抑制された。3) パルミチン酸刺激による MCP-1 の mRNA 発現、培養上清中蛋白分泌ならびに ROS 蓄積が、コントロール細胞に比して野生型 SIRT3 過剰発現 mProx 細胞においていずれも有意に減少し、一方、SIRT3(N87A) 過剰発現培養 mProx 細胞においていずれも有意に増強した。4) パルミチン酸刺激による MAPK リン酸化、I κ B 分解が、野生型 SIRT3 過剰発現にていずれも有意に減少し、一方、SIRT3(N87A) 過剰発現にていずれも有意に増強した。変異のない MCP-1 promoter 領域を含む luciferase vector を用いた reporter assay では、パルミチン酸刺激で luciferase 活性が増強し、NF κ B 結合部位の変異によりその増強は部分的に抑制された。SIRT3 過剰発現により、パルミチン酸刺激下での luciferase 活性は変異のない luciferase vector で有意に抑制され、NF κ B 結合部位に変異を有する vector ではその抑制効果は消失した。NF κ B 結合配列を持つ luciferase vector を用いた reporter assay では、パルミチン酸刺激で luciferase 活性が増強し、SIRT3 過剰発現により luciferase 活性が有意に抑制された。5) コントロール細胞に比し、OCR は SIRT3(N87A) 過剰発現細胞において有意な変化を認めなかったが、野生型 SIRT3 過剰発現細胞において有意に増加した。また、SIRT3 過剰発現により、パルミチン酸による ROS が減少していたにも関わらず MnSOD の mRNA 量は減少せず、SIRT3(N87A) 過剰発現により MnSOD の mRNA 量が有意に減少した。6) RNA 干渉により Sirt3 を knock down すると、パルミチン酸刺激による ROS 蓄積および MCP-1 発現量増加を有意に認め、さらに MnSOD 発現量および OCR の有意な減少を認めた。

【考察】本研究により、培養 mProx 細胞においてパルミチン酸刺激は ROS 蓄積を惹起し、その下流の MAPK-NF κ B 経路活性化を介し MCP-1 発現を増加させ、さらに、SIRT3 が ROS 蓄積および MAPK-NF κ B 経路抑制を介して MCP-1 発現を抑制する事が示された。SIRT3 が ROS 蓄積を抑制する機序として、ミトコンドリアの脂肪酸代謝許容量増加によるパルミチン酸蓄積抑制、ならびに抗酸化遺伝子発現増加による酸化ストレス軽減という 2 つの機序が存在することが示唆された。以上より Sirt3 がカロリー制限による抗炎症作用の制御分子であり、Sirt3 活性低下の病態形成への関与、ならびに、Sirt3 活性化による近位尿細管細胞における抗炎症効果を標的とした腎疾患の新たな治療戦略の可能性が示唆された。

【結語】抗老化分子 Sirt3 は培養近位尿細管細胞において飽和脂肪酸 (パルミチン酸) による ROS 蓄積および MCP-1 発現を抑制した。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	651	氏名	小山哲朗
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 1.1 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>慢性腎臓病進行の一原因に、近位尿細管細胞への脂肪酸の負荷による活性酸素の蓄積および炎症の惹起がある。一方、カロリー制限は抗炎症効果を示し、またカロリー制限によって SIRT3 (抗老化分子、sirtuin 3) が活性化され、活性酸素の蓄積が抑制される。</p> <p>そこで申請者は培養マウス近位尿細管細胞を用いて、飽和脂肪酸 (パルミチン酸) によって引き起こされる近位尿細管細胞での活性酸素の産生や炎症に対して、SIRT3 が及ぼす影響を解析した。</p> <p>その結果、パルミチン酸刺激は活性酸素の産生を惹起し、その下流の MAPK-NFκB 経路の活性化を介して MCP-1 (炎症性サイトカイン、monocyte chemoattractant protein-1) の発現を増加させるが、SIRT3 はこの活性酸素の産生を抑制し、さらに SIRT3 は MAPK-NFκB 経路を抑制して MCP-1 の発現を抑制する、ことを見いだした。</p> <p>この研究成果は、SIRT3 がエネルギー代謝の制限で誘起される抗炎症状態の制御分子であることと、慢性腎臓病の病態形成に SIRT3 (活性の低下) が関与することを示し、さらに近位尿細管細胞の炎症の治療として SIRT3 の活性化が有効であることを示唆するものであり、臨床応用が期待される。よって本論文は博士 (医学) の学位論文に値するものと認められる。</p> <p>なお申請者は最終試験 (論文内容とそれに関連した試問) に合格した。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 592 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 23 年 9 月 6 日)</p>			