

氏名	お やま ゆう こ 小 山 裕 子
学位	博 士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第1179号
学位授与の日付	平成17年 3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Evidence for megalin-mediated proximal tubular uptake of L-FABP, a carrier of potentially nephrotoxic molecules (潜在的腎毒性物質の担体である肝臓型脂肪酸結合蛋白の、メガリンを介した近位尿細管における取り込みの証拠)
論文審査委員	主査 教授 追 手 巍 副査 教授 山 本 格 副査 教授 下 條 文 武

博士論文の要旨

【背景】脂肪酸結合蛋白は脂肪酸の輸送・代謝にかかわる低分子量蛋白である。肝細胞の細胞質に豊富に存在する肝型脂肪酸結合蛋白(liver-type fatty acid binding protein, L-FABP)は、脂肪酸以外にもリン脂質、エイコサノイド、ビリルビン、胆汁酸、ヘムなどの脂溶性物質と結合する。L-FABPは血液中にも存在し、肝障害の患者でその濃度が上昇することが知られている。一方近位尿細管上皮細胞にもL-FABPが存在することが知られているが、その細胞内局在や動態は未だ不明である。L-FABP同様、脂溶性物質のキャリアー蛋白であるビタミンD結合蛋白やレチノール結合蛋白は、いずれも血液中に存在し、糸球体を濾過されて近位尿細管に取り込まれる。その取り込みは、近位尿細管管腔側に発現するエンドサイトーシス受容体メガリンを介しておこなわれることが知られている。本研究の目的は、L-FABPの近位尿細管上皮細胞内の局在を明らかにし、さらにその取り込みにメガリンが関与するか否かを検討することである。

【方法】Sprague-Dawley ラットの腎臓におけるL-FABPの局在を免疫組織化学にて検討した。四塩化炭素を用いた急性肝障害モデルラットの血液中および腎臓におけるL-FABP蛋白あるいは遺伝子の発現を、Immunoblotting、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)を用い検討した。¹²⁵I 標識 L-FABP をラットに静脈内投与し、腎臓、肝臓、心臓の各臓器単位重量あたりに取り込まれた放射能レベルを比較した。さらに、³⁵S 標識 L-FABP をラットに静脈内投与し、腎臓内での取り込みの局在を Bio-Imaging analyzer、histoautoradiography にて検討した。メガリンとL-FABPの直接的な結合を確認するため、分子間相互作用解析法である quartz-crystal microbalance(QCM)を用いて、Ca²⁺存在下・非存在下、およびメガリンのリガンドであるラクトフェリンによる競合阻害条件下において検討した。メガリンを発現するラット卵黄囊上皮由来L2細胞の培養系に、¹²⁵I 標識 L-FABP を添加し、抗メガリン抗体や receptor associated protein (RAP)などメガリンのリガンド結合拮抗物の存在下・非存在下で、L-FABPの細胞への取り込みを検討した。

【結果】免疫電顕にて、L-FABPは近位尿細管上皮細胞のライゾゾームに存在することをみいだした。肝障害モデルラットでは、血液および腎臓におけるL-FABPの蛋白量が増加していたが、RT-PCRによる検討では腎臓での遺伝子発現はごく少量で、かつ対照

に比較してその遺伝子発現の増加は認められず、肝臓から血液中に放出された L-FABP が腎臓に集積することが示唆された。静脈内投与された ^{35}S 標識 L-FABP も腎臓に主に取り込まれ、histoautoradiography では近位尿細管管腔側にその集積が認められた。QCM 法では L-FABP は Ca^{2+} 存在下においてのみメガリンと直接結合し、その結合はラクトフェリンにより阻害された。 ^{125}I 標識 L-FABP の L2 細胞への取り込みは抗メガリン抗体、RAP により阻害された。

【考察】L-FABP は血液中から糸球体を濾過され、エンドサイトーシス機構により腎近位尿細管に取り込まれていることが証明された。L-FABP はメガリンと直接結合し、それを介して細胞内へ取り込まれることが明らかとなった。また、脂肪酸を含む L-FABP のリガンドもメガリンを介して腎臓に取り込まれ代謝される可能性が示唆され、特にそのなかで腎毒性を有するリガンド（脂肪酸、ビリルビン、胆汁酸など）の腎臓への集積は、肝障害に随伴する腎障害発症のメカニズムに寄与している可能性があると考えられた。また L-FABP の腎臓への集積機序は、脂肪酸代謝が亢進するメタボリック症候群や糖尿病に伴う腎障害の発症にも関係する可能性が示唆された。

審査結果の要旨

肝細胞に主に存在し、脂肪酸の輸送・代謝にかかわる肝型脂肪酸結合蛋白 (liver-type fatty acid binding protein, L-FABP) は、腎臓にも存在することが知られている。本研究は、L-FABP の腎臓における細胞内局在を明らかにし、さらにその取り込みについてのメガリンの関与について検討した。

免疫電顕では、L-FABP は近位尿細管上皮細胞のライソゾームに存在した。肝障害モデルラットでは、血液および腎臓における L-FABP の蛋白量が増加していたが、腎臓における L-FABP の mRNA レベルでの発現はごく少量で、増加は認められなかった。静脈内投与された ^{35}S 標識 L-FABP は近位尿細管に集積した。水晶発振子マイクロバランス法による測定で L-FABP はメガリンと直接結合していた。メガリン発現 L2 細胞を用いた細胞モデル実験では、 ^{125}I 標識 L-FABP の取り込みがメガリン拮抗物質により阻害された。*in vivo*、及び *in vitro* の実験から、肝障害時に血中濃度が上昇する L-FABP は腎に集積し、その細胞内取り込みは糸球体を通過後、近位尿細管腔側のメガリンを介した endocytosis により行われる可能性が高いことが判明した。

以上、本研究は腎における L-FABP の代謝機構に新知見を示した点に学位論文としての価値を認める。