

	はま ひとみ
氏 名	濱 ひとみ
学 位	博 士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第22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 Indicating that Renal Tubular Metabolism of Leptin Is Mediated by Megalin But Not by the Leptin Receptors (レプチンの腎尿細管での代謝がレプチン受容体ではなくメガリンを介して行われることを示す証拠)
論文審査委員	主査 教授 山 本 格 副査 教授 下 條 文 武 副査 教授 追 手 巍

博士論文の要旨

背景・目的: 肥満関連遺伝子産物レプチンは、脂肪細胞から産生され、視床下部に作用し、食欲抑制・代謝亢進を促す。また近年、レプチンはその他の臓器にも働き、様々な生理作用を有することが知られてきた。レプチンは糸球体で濾過され腎で代謝されることが知られているが、その詳細は不明である。腎不全患者では、血液中に蓄積し、栄養障害に関連する可能性が知られており、一種の尿毒素蛋白としても認識されている。また、レプチン受容体(LEP-R)は腎にも発現しているが、その詳細な局在やレプチンの代謝における役割については不明である。一方メガリンは、近位尿細管上皮細胞の管腔側に高発現し、エンドサイトーシス受容体として多くのリガンドと結合し、その取り込み・代謝に関与することが知られている。本研究において私は、腎におけるレプチンの代謝機序ならびにそれにかかわるメガリンの役割と LEP-R の腎内局在について検討した。

方法: 1. ラットレプチンを ^{125}I 標識した後、ラットに静注し、腎での取り込み部位を組織オートラジオグラフィにて検討した。2. リガンドプロット法および水晶発振子マイクロバランス法を用いて、メガリンとレプチンの直接の結合性を検討した。3. メガリン発現性ラット L2 細胞を培養した後、 ^{125}I 標識レプチンを添加し、その取り込み・代謝が、ポリクローナル抗メガリン抗体、およびメガリンのリガンド結合を阻害する receptor-associated protein(RAP)(GST 融合蛋白として作製)などによって抑制されるか検討した。4. 異なるエピトープを認識する2種類の抗 LEP-R 抗体を用いて、ラット腎における LEP-R の発現を免疫組織化学的に検討した。

結果: 1. 組織オートラジオグラフィにおいて、 ^{125}I 標識レプチンは皮質尿細管に取り込まれることが明らかになった。引き続き、抗メガリン抗体にて免疫組織化学を行ったところ、レプチンの取り込みはメガリンの発現する近位曲尿細管上皮細胞の管腔側に限局しており、糸球体や他の尿細管セグメントでの取り込みは認められなかった。2. リガンドプロット法および水晶発振子マイクロバランス法にて、メガリンはレプチンと Ca^{2+} 依存性に直接結合することが判明した。3. L2 細胞における ^{125}I 標識レプチンの取り込み・代謝は非標識レプチンによって有意に抑制され、特異的経路の存在が示唆された。また、クロロキンの添加によっても抑制されることから、その機序はレセプター関連エンドサイトーシスによるものであると考えられた。さらにその取り込み・代謝は、抗メガリン抗体および GST-RAP の添加によっても有意に抑制された。4. 免疫組織化学の結果、LEP-R の発現は、皮質では遠位尿細管上皮細胞が陽性であったが、糸球体、近位曲尿細管上皮細胞は陰性であった。皮髄境界部では、近位直尿細管上皮細胞が陽性であった。髄質では、集合管、ヘンループが陽性であったが、血管束は陰性であった。

考察: レプチンは糸球体で濾過され近位曲尿細管上皮細胞の管腔側から取り込まれる。その取り込みにはメガリンによるエンドサイトーシス機能が関与することが示された。LEP-R の発現は、近位直尿細管、ヘンレループ、遠位尿細管、集合管に認められた。従って、糸球体を濾過したレプチンの近位曲尿細管取り込みにおけるLEP-Rの関与は否定的であった。私たちの研究グループでは、メガリン発現細胞の移植による尿毒素蛋白の代謝モデルを開発しているが、そのようなシステムによって、一種の尿毒素蛋白であるレプチンの代謝も期待できると考えられた。

結語: レプチンは糸球体で濾過され、近位曲尿細管上皮細胞の管腔側から取り込まれる。そのプロセスにはLEP-Rではなくメガリンが関与する。

審査結果の要旨

肥満関連遺伝子産物レプチンは、糸球体濾過後、腎で代謝されることが知られている。本研究は、エンドサイトーシス受容体メガリンがレプチンの代謝機序に関与するか検討したものである。ラットに¹²⁵I-レプチンを静注し、組織オートラジオグラフィで検討するとレプチンは皮質尿細管に取り込まれ、抗メガリン抗体による免疫組織化学で、その取り込みはメガリンの発現する近位曲尿細管上皮細胞管腔側に限局していることが示された。リガンドブロット法及び水晶発振子マイクロバランス法にて、メガリンはレプチンとCa²⁺依存性に直接結合することが示された。メガリン発現陽性ラット L2 細胞における¹²⁵I-レプチンの取り込み・代謝は、非標識レプチン、抗メガリン抗体、メガリンのリガンド結合を阻害する receptor-associated protein の添加により有意に抑制された。免疫組織化学では、ラット腎におけるレプチン受容体は、遠位、近位直尿細管、集合管、ヘンレループの上皮細胞で陽性であった。

以上、本研究は、レプチンが糸球体で濾過され、近位曲尿細管上皮細胞管腔側からメガリンによるエンドサイトーシスにより取り込まれることなどを明らかにした点に、学位論文としての価値を認める。