

氏名	かせだ りょうへい 俵田 亮平
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第221号
学位授与の日付	平成20年3月24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	Megalyn-mediated endocytosis of cystatin C in proximal tubule cells (近位尿細管細胞におけるシスタチンCのメガリンを介したエンドサイトーシス)
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

目的：

慢性腎臓病 (Chronic kidney disease, CKD)は、最終的に末期腎不全に至るだけでなく、心血管系疾患のリスクも高く、重要な医学的問題である。糸球体濾過量 (Glomerular filtration rate, GFR)は CKD の診断に有用であるが、GFR を予測する簡便な方法として血清クレアチニン値の測定 (およびその値を用いた GFR 推算式) が広く用いられている。しかし血清クレアチニン値は筋肉量に影響され、軽度から中等度の GFR の低下を正確に検出することは困難である。

内因性のシステイン蛋白分解酵素阻害作用を有する血清シスタチンCは、上記の血清クレアチニンの弱点を克服し、GFRをより正確に推測するマーカーであるという評価が高まっている。

シスタチンCは120残基のアミノ酸から成る13kDaの分泌蛋白である。シスタチンC遺伝子は全ての有核細胞に発現し、全身における蛋白合成量はほぼ一定である。分子量が小さく、かつ塩基性蛋白であることから、99%以上が糸球体で濾過され、近位尿細管細胞 (PTC)にて再吸収され分解される。しかし、これまでシスタチンCのPTCによる再吸収・代謝の分子機構については明らかにされていなかった。

メガリンは600kDaの巨大なLDLレセプターファミリーに属する糖タンパクであり、PTCの管腔側膜に豊富に発現し、糸球体濾過蛋白の再吸収に関わっている。メガリンは、clathrin-coated pitsに存在し、リガンドをエンドサイトーシスによって細胞内に取り込み、それらをライソゾームへ運搬した後、自身は細胞表面に戻る。メガリンのリガンドとしてこれまでいくつかの蛋白が同定されているが、メガリンがPTCでシスタチンCの再吸収・代謝に関わっているかは不明であった。

そこで本研究は、メガリンがシスタチンCの再吸収・代謝に関わる受容体であるかについて検討した。

方法：

まず、精製されたラットメガリンとシスタチンCとの結合を水晶発振子マイクロバランス法 (Quartz-crystal microbalance) を用いて検証した。

次に、シスタチンCの細胞内取り込みと分解に関わるメガリンの役割を調べるため、メガリンを発現しPTCと類似した形質をもつラット卵黄嚢由来L2細胞を用いて実験を行った。受容体介在型エンドサイトーシスやライソゾームの酵素活性を阻害するクロロキンの阻害効果を解析し、ポリクローナル抗メガリン抗体IgGやメガリンのリガンド蛋白であるreceptor associated protein (RAP)のGST融合蛋白(GST-RAP)を用いて評価した。

さらに生体においてシスタチンCのPTCでの取り込みにメガリンが関与しているか調べるため、Cre/Loxシステムにより作製された腎特異的メガリンノックアウトマウスを用いて実験を行った。このマウスにおいてはメガリンを発現するPTC数は対照マウスの10-50%に減少している。そこでこのマウスの腹腔内にCy5標識シスタチンCを投与し、1時間後に生理食塩水で全身還流し腎を摘出した。その腎の切片にAlexa Fluor 488標識2次抗体を用いてメガリンの免疫染色を施した後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

結果：

水晶発振子マイクロバランス法による解析で、シスタチンCは他のメガリンリガンドと同様にカルシウム依存性にメガリンと結合することが示された。また、高い親和性をもつメガリンのリガンドであるラクトフェリンを用いてあらかじめメガリンのリガンド結合部位を飽和させておくと、シスタチンCとメガリンの結合は完全に抑制された。さらにこの実験において、シスタチンCとメガリンの最大結合量 (Bmax)と平衡解離定数 (Kd)は、それぞれ $1.28 \pm 0.49 \times 10^2 \text{ Hz}$ と $0.15 \pm 0.05 \mu\text{mol/l}$ (平均 \pm SD, $n = 7$)と計測された。このKd値は、メガリンと結合する他の低分子蛋白リガンドの場合と同等であった。

ラット卵黄嚢由来L2細胞を用いた実験において、クロロキンは ^{125}I 標識シスタチンCの細胞内分解を有意に阻害し、非特異的IgGやGSTなどの陰性コントロールと比較して、抗メガリン抗体やGST-RAPは ^{125}I 標識シスタチンCの細胞内分解を有意に抑制した。

腎特異的メガリンノックアウトマウスによる実験では、糸球体から濾過されたCy5標識シスタチンCはメガリンを発現したPTCに特異的に取り込まれ、メガリンがノックアウトされたPTCには取り込まれないことが明らかになった。

考察：

1)水晶発振子マイクロバランス法 (Quartz-crystal microbalance)を用いて、シスタチンCが精製されたラットメガリンに直接結合する 2)メガリンを発現するPTC類似培養細胞においてシスタチンCがメガリンを介して細胞内に取り込まれ代謝される 3)腎特異的メガリンノックアウトマウスにおいてメガリンの発現が欠損したPTCでシスタチンCの取り込みが抑制され、メガリンはPTCでのシスタチンCの取り込みに関わると考えられた。

まとめ：

本研究はメガリンがPTCにおいてシスタチンCのエンドサイトーシス受容体であることを明らかにした。この知見はシスタチンCの腎での分解に関わる分子機構のさらなる解明とGFRマーカーとしてシスタチンCの確立において有用であると考えられる。

(論文審査の要旨)

血清シスタチン C は、血清クレアチニンの弱点を克服し、GFR をより正確に推測するマーカーであると考えられている。腎糸球体では、99%以上が濾過され、近位尿細管細胞 (PTC) にて再吸収され分解されている。しかしながら、再吸収・代謝の詳細な分子機構については明らかではない。メガリンは、PTC の管腔側膜に豊富に発現し、糸球体濾過蛋白の再吸収に関わっている。

本研究では、メガリンが PTC でのシスタチン C の再吸収・代謝に関わる受容体であるかについて検討した。その結果、1) 水晶発振子マイクロバランス法を用いてシスタチン C がメガリンに直接結合すること、2) メガリンを発現し PTC と類似した形質をもつラット卵黄嚢由来 L2 細胞を用いて、シスタチン C がメガリンを介して細胞内に取り込まれ代謝されること、3) 腎特異的メガリンノックアウトマウスにおいてメガリンの発現が欠損した PTC でシスタチン C の取り込みが抑制されることが示され、メガリンがシスタチン C の再吸収・代謝に関わるエンドサイトーシス受容体であることを明らかにした。

以上、シスタチン C の腎での分解に関わる分子機構、特にメガリンの役割を明らかにした点に、本研究の学位論文としての価値を認める。