

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 松尾 浩司
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 691 号
学位授与の日付 平成 28 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 Increased Proinflammatory Cytokine Production and Decreased Cholesterol Efflux Due to Downregulation of ABCG1 in Macrophages Exposed to Indoxyl Sulfate.
(インドキシル硫酸はマクロファージの炎症反応を促進し、ABCG1 を減少させることにより脂質引き抜き能を低下させる)

論文審査委員 主査 教授 河内 裕
副査 教授 成田 一衛
副査 教授 矢尾板 永信

博士論文の要旨

【背景】慢性腎臓病患者において心血管疾患は主要死因であり、心血管イベントは糸球体ろ過率の低下に伴い増加する。特に透析患者は非腎臓病患者と比較して心血管病による死亡が 5 倍以上多い。慢性腎臓病における心血管疾患の増加は、古典的な危険因子のみでは十分に説明できず、腎臓病固有のリスク因子が想定されている。その一つとして蛋白結合性尿毒素物質の蓄積が挙げられ、その代表的な物質であるインドキシル硫酸 (以下 IS) は、慢性腎臓病患者の心血管死との関連が報告され、腎障害マウスの動脈硬化病変内に IS の蓄積が認められる。以上より IS が直接的に動脈硬化病変内の細胞に作用することが示唆されるが、その詳細な機序については検討されていない。炎症反応や、マクロファージの泡沫細胞化は動脈硬化を促進する要因であり、本研究では IS のマクロファージへの直接的な影響を検討した。

【方法】ヒト単球性白血病細胞株である THP-1 細胞を、ホルボール 12-ミリストート 13-アセタートによりマクロファージに分化させた。THP-1 細胞と 0-5mM の IS を 24 時間反応させた後、MTS 試験により細胞障害性を評価した。THP-1 マクロファージに 0-1 mM の IS を反応させ、培養上清中の IL-1 β および TNF- α の産生量を ELISA で、またこれらのサイトカインの mRNA 量を RTqPCR により評価した。活性酸素種の産生量を ROS/RNS Detection Kit を用いて蛍光顕微鏡で検出した。ウエスタンブロットで ATP-binding cassette transporter (ABC) A1、ABCG1、Scavenger receptor class B member 1 (SRB1)、IL-1 β 、カスパーゼ 1 の蛋白量を検討した。マクロファージによるコレステロールの取り込みの評価のため、アセチル化 LDL コレステロールと反応させ洗浄後に乾燥、2-プロパノールにて細胞内脂質を抽出し、脂質量を測定した。同時に細胞蛋白量を測定し、細胞内脂質量と蛋白量の積を求めることにより細胞内脂質量を補正した。コレステロール引き抜きの評価は、マクロファージとアセチル化 LDL コレステロールを反応させた後に HDL コレステロールと 24 時間反応させた。アセチル化 LDL コレステロール反応後と HDL コレステロール反応後の細胞内脂質量をそれぞれ求め、その差からコレステロール引き抜き量を求め、評価した。さらにマクロファージの炎症反応やコレステロール引き抜きを調節する LXR アゴニスト (T0901317) を、IS とともに THP-1 マ

クロファージに反応させ、サイトカイン産生とコレステロール引き抜きについて評価した。

【結果】 MTS 試験において IS は 2.5 mM 以上で THP1 マクロファージを傷害したが、1 mM 以下では細胞障害性はなかった。1 mM 以下の IS は炎症性サイトカインである IL-1 β と TNF- α の産生を容量依存性に促進した (IL-1 β , IS 1.0 mM: 101.8 \pm 21.8 pg/mL vs. 0 mM: 7.0 \pm 0.3 pg/mL, TNF- α , IS 1.0 mM: 96.6 \pm 11.0 pg/mL vs. 0 mM: 15.1 \pm 3.1 pg/mL)。IL-1 β では mRNA の発現も容量依存性に促進された。TNF- α についても増加傾向であった。IS は、マクロファージの活性酸素種の産生を有意に亢進させ、カスパーゼ 1 の発現を抑制した。マクロファージの脂質代謝については、IS は THP-1 マクロファージのアセチル化 LDL コレステロールの取り込みには影響しなかったが、HDL コレステロールによる THP-1 マクロファージのコレステロール引き抜きを有意に減少させた (IS 0.5 mM: 30.3% \pm 7.3% vs. 0 mM: 43.5% \pm 1.6%)。コレステロール引き抜きに関連するコレステロールトランスポーターの発現量については、IS が ABCG1 の発現量を有意に低下させたが、ABCA1 および SRB1 には影響しなかった。T0901317 は IS による IL-1 β と TNF- α の産生を抑制し、コレステロール引き抜き能を改善させた。

【考察】 本研究で、蛋白結合性尿毒素物質の IS は直接的にマクロファージに作用し、炎症反応を促進しコレステロール代謝の増悪を引き起こすことを明らかにした。また、これらの反応は、LXR アゴニストにより抑制された。これらの結果から、インドキシル硫酸がマクロファージの機能障害を起こすことを介して、慢性腎臓病患者における動脈硬化病変の増悪が引き起こされることが示唆された。

審査結果の要旨

慢性腎臓病における動脈硬化病変の促進の機序として、尿毒素物質の関与が考えられている。マクロファージの泡沫細胞化や炎症反応は、動脈硬化を促進する要因であり、申請者は代表的な尿毒素物質であるインドキシル硫酸 (IS) のマクロファージへの直接的な影響を検討した。

THP-1 細胞をマクロファージに分化させ、IS による細胞障害、炎症反応、脂質代謝について評価し、これらの反応における LXR アゴニスト (T0901317) の効果を評価した。高濃度の IS は細胞障害を起こし、1 mM 以下の IS は IL-1 β と TNF- α の産生を容量依存性に促進し、活性酸素種の産生も有意に亢進させた。IS は、コレステロールトランスポーターである ABCG1 の発現量を有意に低下させ、HDL コレステロールによるコレステロール引き抜きを有意に減少させた。T0901317 は、IS の IL-1 β と TNF- α の産生を抑制し、コレステロール引き抜き能を改善させた。

したがって、IS は直接的にマクロファージに作用し、炎症反応を促進しコレステロール代謝の増悪を引き起こすことが明らかとなり、これらの反応は、LXR アゴニストにより改善した。以上より本論文は、尿毒素物質である IS がマクロファージの機能障害を惹起することが、慢性腎臓病における動脈硬化病変の機序の一つであることを示した点で、学位論文の価値があると判断した。