

## 学位論文審査結果の要旨

氏 名	表 作為
審 査 委 員	主査 大澤 春彦 副査 松浦 文三 副査 青戸 守 副査 伊賀瀬 道也 副査 加納 誠

### 論 文 名

オステオポンチン欠損はアポリポタンパク質 E 欠損マウスにおける高コレステロール血症の腎障害を軽減する  
審査結果の要旨

【背景・目的】高コレステロール血症は、慢性腎臓病(CKD)進展の危険因子の1つである。著明な高コレステロール血症を来すアポリポタンパク E ノックアウト( $apoE^{-/-}$ )マウスにおける腎病変として、脂質糸球体内沈着、メサンギウム領域拡大、及び細胞外マトリックス増加などが認められる。動脈硬化巣における foam cell 形成には、細胞膜に存在するスカベンジャー受容体の一つであるレクチン様酸化低密度リポタンパク質受容体 1(LOX-1)による酸化低密度リポタンパク質(OX-LDL)の細胞内への取り込みが関与する。しかしながら、腎糸球体における foam cell の形成機序は不明である。一方、オステオポンチン(OPN)は、非コラーゲン性の分泌糖タンパク質で、糸球体腎炎、閉塞性尿路疾患、および尿細管間質性疾患などの腎障害進展に関与する。そこで、本研究では、高コレステロール血症によって誘発される腎機能障害における OPN の役割を解明した。

【方法】本研究では、 $apoE^{-/-}$ ノックアウトマウスおよび  $apoE^{-/-}/OPN^{-/-}$ ダブルノックアウトマウスを使用した。8週齢の各マウスを正常食(ND)もしくは高コレステロール食(HD)で4週間飼育した。腎臓を摘出し、メサンギウム領域のマトリックス増加を過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色で、脂肪沈着をオイルレッド O 染色で評価した。線維化を抗タイプ IV コラーゲン抗体、マクロファ

ージ浸潤を抗 F4/80 抗体を用いた免疫組織学で解析した。単離糸球体における LOX-1 を含むスカベンジャー受容体、ならびに TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインの mRNA を RT-PCR で定量した。メサングウム細胞は、ふるい法により 8 週齢の C57BL / 6 マウスから単離し、20% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 中で培養した。リコンビナント OPN、ERK リン酸化阻害薬(PD 98059)の LOX-1 遺伝子発現への効果を RT-PCR 及びウェスタンブロットングにより解析した。

### 【結果】

4 週間の HD 下で、apoE<sup>-/-</sup>マウスと apoE<sup>-/-</sup>/OPN<sup>-/-</sup>マウスの間に、血清総コレステロール、LDL コレステロールに差はなかった。オイルレッド O 染色により、apoE<sup>-/-</sup> HD マウスでは糸球体に foam cell 形成が認められた。この形成は、apoE<sup>-/-</sup>/OPN<sup>-/-</sup>HD マウスでは、抑制されていた。F4/80 染色では、糸球体に F4/80 陽性細胞は認められず、foam cell はメサングウム細胞由来と考えられた。PAS 染色と IV 型コラーゲン染色による糸球体硬化の評価では、apoE<sup>-/-</sup>ND マウスに比し、apoE<sup>-/-</sup>HD マウスでは糸球体のメサングウム領域及び IV 型コラーゲン染色領域の増加を認めた。この増加は、apoE<sup>-/-</sup>/OPN<sup>-/-</sup>HD マウスでは抑制されていた。また炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-6 の遺伝子発現は、apoE<sup>-/-</sup>HD マウスで増加し、apoE<sup>-/-</sup>/OPN<sup>-/-</sup>HD マウスで抑制されていた。糸球体での脂肪沈着の機序を解明するために、糸球体におけるスカベンジャー受容体の遺伝子発現を解析した。ApoE<sup>-/-</sup>ND マウスに比し、apoE<sup>-/-</sup>HD マウスでは、LOX-1 mRNA の増加を認めたが、その増加は apoE<sup>-/-</sup>/OPN<sup>-/-</sup>HD マウスでは抑制されていた。OPN の LOX-1 遺伝子発現への効果を明らかにするために *in vitro* で解析した。単離したメサングウム細胞において、リコンビナント OPN により LOX-1 mRNA 及び蛋白が増加した。さらに、リコンビナント OPN は ERK のリン酸化を誘導した。ERK リン酸化阻害薬 PD98059 は、リコンビナント OPN による ERK のリン酸化ならびに LOX-1 蛋白の増加を抑制した。

### 【結論】

以上のことより、OPN は ERK のリン酸化を介して LOX-1 遺伝子の発現を誘導することにより、糸球体での foam cell を形成する一方、TNF- $\alpha$  や IL-6 を誘導することで高コレステロール血症における腎障害に関与すると考えられた。OPN の抑制は、高コレステロール血症による腎障害の予防に有用である可能性が想定された。

本論文の公開審査会は、平成 28 年 2 月 8 日に開催された。申請者は、本研究の意義と内容について明確に発表した。各審査員からは、糸球体単離の純度、オテオポンチンのメサングウム細胞への脂肪蓄積効果、オステオポンチンヘテロのノックアウトマウスの表現型、血中酸化 LDL 濃度、オテオポンチンの LOX1 遺伝子転写活性化におけるシグナル伝達経路や転写因子の役割、本研究の limitation、オテオポンチン中和抗体の臨床応用の可能性と副作用等についての広範に渡る質問がなされた。

申請者は、これらに対し、いずれにも的確に回答した。審査委員は、発表、質疑応答を含めて本論文を高く評価し、全員一致で、博士(医学)の学位論文に十分値すると評価した。