

氏 名	田中 裕紀
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博士 甲第749号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成28年 3月 10日
学位論文題目	1-Methylnicotinamide ameliorates lipotoxicity-induced oxidative stress and cell death in kidney proximal tubular cells (1-メチルニコチンアミドは腎臓の近位尿細管細胞において脂肪毒性による酸化ストレスおよび細胞死を改善する)
審査委員	主査 教授 河内 明宏 副査 教授 縣 保年 副査 教授 伊藤 俊之

論文内容要旨

※整理番号	756	姓(ふりがな)名	たなか ゆき 田中 裕紀
学位論文題目	1-Methylnicotinamide ameliorates lipotoxicity-induced oxidative stress and cell death in kidney proximal tubular cells (1-メチルニコチンアミドは腎臓の近位尿細管細胞において脂肪毒性による酸化ストレスおよび細胞死を改善する)		
<p>【目的】腎臓の糸球体性疾患で見られる蛋白尿は、尿細管障害を引き起こし、腎機能を低下させる主要な因子である。実臨床では、降圧薬などの薬物治療が蛋白尿を抑制し腎保護効果を示している。しかし、治療を行っても蛋白尿を抑制できず末期腎不全へ至る症例は未だ多く存在し、新たな治療法が期待されている。尿蛋白の成分であるアルブミンは血中で様々な分子と結合しており、糸球体で濾過されると結合した分子とともに近位尿細管で再吸収される。近年、糖尿病や肥満で見られる蛋白尿では、脂肪酸結合アルブミン (FFA-alb) の再吸収による酸化ストレスが近位尿細管細胞障害の原因と考えられ、新たな治療標的として着目されている。また、細胞内 Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 代謝がエネルギー代謝や細胞死と関連し、その代謝関連分子が病態を制御することが解明されつつある。しかし、FFA-alb の脂肪毒性による酸化ストレスと NAD 代謝との関連は明らかではない。そこで本研究では、FFA-alb による尿細管の酸化ストレスや細胞障害と関連する NAD 代謝関連分子が存在すると仮説を立て、脂肪毒性による近位尿細管障害に対する新たな治療戦略となり得る NAD 代謝関連分子の新規同定を試みた。</p> <p>【方法】①FFA-alb による近位尿細管障害と関連する NAD 代謝酵素の新規同定：FFA-alb を 11 日間腹腔内投与し尿細管障害を誘導した雄性 C57BL/6J マウスの腎臓、および FFA-alb で刺激したマウス培養近位尿細管細胞から cDNA を抽出し、NAD 代謝酵素 19 個の Real-time PCR 法を行い、FFA-alb 刺激により両者の遺伝子発現が同様に变化する酵素を同定した。また、同定した酵素の代謝分子の細胞内濃度を HPLC 法で測定し、同定酵素や尿細管細胞障害マーカー(MCP-1, Fibronectin, PAI-1) の遺伝子発現との相関関係を解析した。</p> <p>②FFA-alb による近位尿細管障害における同定酵素の役割の検討：培養近位尿細管細胞において、RNA 干渉法を用いて同定酵素遺伝子の発現を抑制し、FFA-alb によるアポトーシスへの影響を検討した。また、レトロウイルスを用いて同定酵素遺伝子の過剰発現培養細胞株を樹立し、FFA-alb による細胞死への影響を検討した。アポトーシスは Western Blot 法を用いて切断化 Caspase-3 および切断化 PARP の蛋白量を評価した。また、Annexin-V、Propidium Iodide を用いて FACS 法により細胞死を評価した。</p> <p>③同定酵素の代謝分子が FFA-alb による細胞死および酸化ストレスに及ぼす効果の検討：培</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

養近位尿細管細胞に脂肪酸刺激の1時間前に同定酵素の代謝分子を孵置し FFA-alb による細胞死への影響を Western Blot 法および FACS 法で評価した。また、細胞内 NAD および NADH 濃度の変化を HPLC 法で測定した。酸化ストレスへの影響は H2DCFDA、Mito Sox Red を用いて評価し、抗酸化酵素 MnSOD, HO-1 の遺伝子発現は Real-time PCR 法で測定した。

④同定酵素の代謝分子がマウスにおける FFA-alb による腎障害に及ぼす効果の検討：FFA-alb を腹腔内投与し尿細管障害を誘導するモデルマウスにおいて、腹腔内投与7日前より予防的に 1-MNA 含有水を与え、腎臓におけるアポトーシス（切断化 Caspase-3、TUNEL 染色）、ネクローシス（HE 染色）、炎症（F4/80、MCP-1）、線維化（Fibronectin、PAI-1）、酸化ストレス（4-HNE 染色）を評価した。また、FFA-alb の腹腔内投与5日目から治療的に 1-MNA 含有水を与え、腎障害（アポトーシス、ネクローシス、酸化ストレス）の評価を行った。

【結果】①マウスの腎臓において、19個の NAD 代謝酵素のうち5個の酵素で、FFA-alb 刺激による遺伝子発現の有意な上昇を認めた。その中で、Nicotinamide n-methyltransferase (NNMT) のみが、培養近位尿細管細胞への FFA-alb 刺激においても同様に有意な上昇を認めた。また、NNMT の代謝分子である 1-Methylnicotinamide (1-MNA) の細胞内濃度上昇を認め、NNMT や細胞障害マーカーの遺伝子発現と正相関を示した。

②培養近位尿細管細胞において、NNMT の発現抑制は 1-MNA の細胞内濃度を減少し、FFA-alb によるアポトーシスを増悪した。また、NNMT の過剰発現は 1-MNA の細胞内濃度を上昇させ、FFA-alb による細胞死を抑制した。

③培養近位尿細管細胞において、1-MNA の前孵置は FFA-alb による細胞死および酸化ストレスを、細胞内 NAD、NADH 濃度や抗酸化酵素の発現に影響せず抑制した。

④1-MNA の予防的な経口摂取は、マウスの腎臓において FFA-alb による細胞死、炎症、線維化、酸化ストレスを抑制した。また、1-MNA の治療的投与においても、マウスの腎臓で FFA-alb による細胞死、酸化ストレスを抑制した。

【考察】 FFA-alb による近位尿細管障害に関連する NAD 代謝酵素として、障害時に遺伝子発現が上昇する NNMT を新規同定した。NNMT は 1-MNA を産生し、細胞保護的に働いていることが考えられた。また、1-MNA は NAD や NADH の細胞内濃度や抗酸化酵素に関与することなく、FFA-alb による近位尿細管細胞の酸化ストレスを抑制し細胞死を改善させた。さらに動物実験においても、1-MNA の経口摂取は細胞実験同様に FFA-alb による近位尿細管細胞の酸化ストレスならびに尿細管障害に対して予防効果および治療効果を認めた。以上から、1-MNA の補充は糖尿病や肥満で見られる FFA-alb による尿細管障害の新たな治療戦略となり得る可能性が示唆された。

【結論】 1-MNA は FFA-alb による近位尿細管細胞の酸化ストレスや細胞死を改善する。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	756	氏名	田中 裕紀
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>糖尿病や肥満で見られる蛋白尿では、脂肪酸結合アルブミンの脂肪毒性による近位尿細管障害が腎機能低下の原因であり、新たな治療標的として着目されている。また、細胞内 Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 代謝やその代謝関連分子がエネルギー代謝や細胞死に関わる病態で研究されているが、尿細管障害との関連は明らかではない。本研究では、脂肪毒性による尿細管障害と関連する NAD 代謝関連酵素・分子が存在するという仮説について、マウスおよび培養近位尿細管細胞を用いた検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 腎臓において、Nicotinamide n-methyltransferase (NNMT) の遺伝子発現は脂肪毒性による腎障害と関連がある。 2) NNMT による 1-Methylnicotinamide (1-MNA) の産生は脂肪毒性による腎障害に対し、保護的に働く。 3) 1-MNA は脂肪毒性によるミトコンドリアの酸化ストレスを抑制する。 4) マウスにおいて、1-MNA の経口投与は脂肪毒性による腎障害を改善する。 <p>本論文は、NAD 代謝関連分子である 1-MNA が脂肪毒性による近位尿細管障害に対する新たな治療戦略となり得る可能性について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 589 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 28 年 1 月 27 日)</p>			