

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第742号	氏名	工藤明子
審査委員会委員	主査氏名	石崎 敏理 (印)	
	副査氏名	秦 聡孝 (印)	
	副査氏名	友 雅司 (印)	
論文題目 Indoxyl sulfate and its potential role in mineralocorticoid receptor transactivation in chronic kidney disease (慢性腎臓病においてインドキシル硫酸はミネラルコルチコイド受容体の転写活性化をきたす) 論文掲載雑誌名 Cureus 論文要旨 慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) は、発症と進行に伴って心血管病、骨関節疾患、感染症、悪性腫瘍など種々の疾患の発症頻度が増加し、CKD 患者の生命予後、QOL に影響を及ぼしている。近年では CKD に関与する因子が同定され、予防あるいは治療につながるべく研究が進められている。インドキシル硫酸 (indoxyl sulfate: IS) は慢性腎臓病の進行に伴い増加する尿毒素であり、尿細管の炎症や線維化などにより腎障害を進行させることが報告されている。近年の大規模臨床試験の結果では、CKD に対するミネラルコルチコイド受容体 (MR) 拮抗薬による CKD 進行抑制や心血管イベントの抑制効果が示された。その一方で、そのメカニズムについては十分解明されておらず、本研究では CKD において蓄積する IS が MR 活性化をきたす可能性を明らかにすることを目的とした。 雄SDラット (8週齢) において 5/6 腎臓を摘出し、手術 10 週後、腎組織の IS 蓄積、MR 発現を検討した。その結果、5/6 腎摘群では、血清 IS 濃度が 5 倍増加し、血漿アルドステロン濃度は対照群と比して約 50% に低下していた。免疫組織染色により、5/6 腎摘群では傷害を受けて拡張した尿細管に IS が発現していること、また、連続切片で MR 発現と共局在を認めた。 次いで、IS と MR 機能との関連を調べるため、ヒト MR 遺伝子および MR 応答ルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドを導入した COS-7 細胞をアルドステロンおよび IS で処理し、MR 転写活性をルシフェラーゼアッセイで評価した。その結果、MR のアゴニストであるアルドステロンがない状態においても、IS 濃度 150 μM 以上で MR 転写活性がおよそ 2 倍に増強を認めた。この増加は抗酸化薬 (αリポ酸) で抑制された。MR 蛋白発現レベルはアルドステロン存在に関係なく、IS 添加により 1.6 倍に増加した。αリポ酸による MR 蛋白発現レベルに対する効果は、アルドステロン非存在下では有意に抑制されたが、アルドステロン存在下では有意ではないが 30% 程抑制された。 本研究により、IS は MR 蛋白レベルを増加させることにより MR 転写活性化を増強させることが示された。また、IS による MR 転写活性および MR 蛋白発現が抗酸化薬 (αリポ酸) で抑制されたことから、IS による酸化ストレスが MR 蛋白の翻訳後蛋白修飾を介して MR 蛋白を安定化させることにより、MR 転写活性化をきたしていることが考えられた。in vivo において、MR が発現した尿細管と同じ尿細管で IS 蓄積がみられ、アルドステロン濃度は低下していたことから、CKD における尿細管障害の機序の一部に IS による MR 活性化が寄与する可能性が示された。 本研究は、IS による直接的な MR の活性化を in vivo および in vitro で示したものであり、今後の慢性腎疾患の治療および予防の一助となることが期待される。 このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。			

最終試験 の結果の要旨 ~~学力の確認~~

審査区分 (課)・論	第742号	氏名	工藤明子
審査委員会委員	主査氏名	石崎 敏雄 (印)	
	副査氏名	秦 聡孝 (印)	
	副査氏名	友 雅司 (印)	
学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。 1. Uremic toxinの分類と定義は改訂されており、新分類ではISはsmall water soluble soluteであり、尿毒素として扱っていいのか？ 2. 本研究で用いた腎摘ラットにおけるIS濃度（測定値）と、細胞実験に用いた濃度に乖離がみられるのではないのか？ 3. ISの近位尿細管への蓄積を経時的と考えるのであれば、高濃度を一度に暴露するのではなく、測定された血中濃度のISを頻回に細胞に暴露する実験系も考えて良かったのではないのか？ 4. 尿蛋白量の濃度は測定しているか？尿細管細胞にISが取り込まれる場合には、蛋白濃度も影響すると思われる。原尿に蛋白が存在すると思われるが、その点については考慮したか。 5. COS-7細胞を用いたISと酸化ストレスとの関係を検討した暴露実験で、ISを暴露した細胞群とISを暴露していない細胞群でのGAPDHの発現に差がみられないのはなぜか？ 6. 500 μmol/Lは高濃度であり浸透圧に影響する可能性もあり、浸透圧は酸化ストレスを誘導することが報告されている。浸透圧に関して対照群を用いての酸化ストレスに関しての検討を行ったか？ 7. 図1Dで血漿アルドステロン濃度が1/2程度に低下していた理由について、CKDモデルラットを用いた研究の妥当性も含めて、説明せよ。 8. 図1Eに関連して、インドキシル硫酸による尿細管障害の主座は、近位あるいは遠位尿細管のいずれと考えられるか、既報との差異も含めて、説明せよ。 9. COS-7細胞を本研究に用いた理由とその妥当性・アッセイの条件について。 10. インドキシル硫酸添加によってミネラルコルチコイド受容体(MR) mRNA発現に変化はあったか？ 11. 図2BおよびCに関連して、インドキシル硫酸によるプロモーター活性の上昇は、MRがプロモーター領域のレスポンスエレメントに直接結合したことが理由と判断する根拠があるか？ 12. 本研究において、インドキシル硫酸によって酸化ストレスが惹起されたことを具体的に示すデータがあるか？ 13. 抗体がISを認識しているようであるが、組織固定で保持されているのか？ 14. MRの核内イベント以外の作用とCKD発症との関連について 15. 臨床への応用 これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 工藤 明子

論 文 題 目

Indoxyl sulfate and its potential role in mineralocorticoid receptor transactivation in chronic kidney disease

(慢性腎臓病においてインドキシル硫酸はミネラルコルチコイド受容体の転写活性化をきたす)

要 旨

【緒言】慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) の進行に伴い増加する尿毒素であるインドキシル硫酸 (indoxyl sulfate: IS) は、尿細管の炎症や線維化などにより腎障害を進行させる。近年の大規模臨床試験において、CKD に対するミネラルコルチコイド受容体 (mineralocorticoid receptor: MR) 拮抗薬による CKD 進行抑制や心血管イベントの抑制効果が示されたが、そのメカニズムについては十分解明されていない。そこで、CKD において蓄積する IS が MR 活性化をきたす可能性を明らかにすることを目的とし、以下の検討を行った。

【方法と結果】

1. CKD モデルラットでの検討：雄 SD ラットを 5/6 腎摘群と sham 手術群（開腹のみ施行）に分け、手術 10 週後（19 週齢）における腎組織の IS 蓄積、MR 発現について免疫組織染色で検討した。5/6 腎摘群では sham 群と比較して、血清 IS 濃度が 5 倍に増加しており、血漿アルドステロン濃度は 1/2 程度に低下していた。腎臓の免疫組織染色において、sham 群、5/6 腎摘群ともに MR 蛋白が遠

位尿細管細胞の核に孤発的に発現していた。sham 群では IS の蓄積はみられなかったが、5/6 腎摘群では傷害を受けて拡張した尿細管に IS が発現しており、連続切片で MR 発現と共局在を認めた。

2. COS-7 細胞（腎線維芽細胞）における MR 転写活性：ヒト *MR* 遺伝子および MR 応答ルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドを導入した COS-7 細胞にアルドステロンおよび IS 処置を行い、MR 転写活性をルシフェラーゼアッセイで評価した。アルドステロンによる MR 転写活性は濃度依存性に増強した。アルドステロンがない状態では、IS 濃度 150 $\mu\text{mol/L}$ 以上で MR 転写活性がおおよそ 2 倍に増強した。アルドステロン存在下に IS を添加すると、アルドステロンが介在する MR 転写活性は 2 倍に増強された。
3. COS-7 細胞における MR 活性化に対する抗酸化薬の抑制効果：*MR* 遺伝子を導入した COS-7 細胞において、IS による MR 活性化が抗酸化薬（ α リポ酸）で抑制されるかをルシフェラーゼアッセイおよびウェスタンブロットで検討した。IS 500 $\mu\text{mol/L}$ 添加により増強された MR 転写活性はアルドステロン存在、非存在のいずれにおいても α リポ酸 10^{-3} mol/L により有意に抑制された。MR 蛋白発現レベルはアルドステロン存在に関係なく、IS 添加により 1.6 倍に増加した。 α リポ酸による MR 蛋白発現レベルに対する効果は、アルドステロン非存在下では有意に抑制されたが、アルドステロン存在下では有意ではないが 30% 程抑制された。

【考察とまとめ】リガンドに依存しない MR 活性化のメカニズムとして、MR 感受性の増加、核移行の亢進、MR 蛋白の安定化などが報告されている。本研究では、IS は MR 蛋白レベルを増加させることにより MR 転写活性化を増強させることが示された。また、IS による MR 転写活性および MR 蛋白発現が抗酸化薬（ α リポ酸）で抑制されたことから、IS による酸化ストレスが MR 蛋白の翻訳後蛋白修飾を介して MR 蛋白を安定化させることにより、MR 転写活性化をきたしていることが考えられた。さらに、*in vivo* において、MR が発現した尿細管と同じ尿細管に IS の蓄積がみられており、アルドステロン濃度はむしろ低下していたことから、CKD における尿細管障害の機序の一部に IS による MR 活性化が寄与する可能性が示された。IS による MR 蛋白修飾の詳細やその他の CKD モデルにおける検討が今後の課題と考えられた。