

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目：「腎疾患の進展における遊離脂肪酸と脂肪酸結合蛋白の基礎的および臨床的検討」

指導教官 後藤淳郎助教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 10 年 4 月入学
医学博士課程
内科学専攻
名前 上條敦子

研究の背景

慢性糸球体疾患は進行すると末期腎不全に至り、透析療法が必要となる。この治療は、患者の社会生活を制限するだけでなく、莫大な医療費を必要とするため大きな社会問題となっている。そのため、腎疾患の進行を抑制するための研究が、多くの施設でなされている。最近、慢性糸球体疾患の予後が、病理学的に糸球体障害より間質尿細管障害の程度と強く相関することが明らかになり注目されている。この糸球体病変に伴う間質尿細管障害の原因として、特に臨床的に重要な因子が、尿蛋白である。尿蛋白は、間質尿細管障害の原因として、腎不全進行の mediator となることが知られている。しかし、その詳細な機序は現在のところ明らかでない。

血液中の遊離脂肪酸 (以下脂肪酸) は 99%以上がアルブミンと結合しており、糸球体で濾過され、近位尿細管でアルブミンとともに再吸収される。そのため大量の尿蛋白のみられる慢性糸球体疾患では、近位尿細管に蛋白だけでなく脂肪酸が過剰に負荷されることになる。負荷された脂肪酸は、炎症性のサイトカインの産生に関与し、また容易に過酸化を受けることにより、間質尿細管障害の発症、進行に関与する可能性がある。

そこでヒト近位尿細管に発現し、細胞内の脂肪酸代謝に関与する蛋白—肝臓型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)に注目した。L-FABP は、脂肪酸をミトコンドリアやペルオキシソームの細胞内小器官に搬送することで脂肪酸代謝に関与する低分子量蛋白(分子量 ; 14kd)である。私たちは、L-FABP のモノクローナル抗体を作成し、尿中 L-FABP の測定法を確立した。予備検討の段階で、慢性糸球体疾患で尿中 L-FABP が高値の患者では、その後の腎

疾患の進行が速いことが示唆された。

以上より私たちは、以下の仮説を立てた。

- 1) 尿蛋白が、間質尿細管障害の進行に関与する機序として、尿蛋白そのものよりは、尿蛋白と結合した脂肪酸が重要な働きをしている。
- 2) 尿蛋白と共に脂肪酸が過剰に近位尿細管に負荷されると尿中への L-FABP の排泄が増加する。
- 3) 尿中 L-FABP は腎疾患の進行を予測する上で有用な臨床マーカーである。

私たちは、仮説 1)を証明するためにマウスの蛋白負荷モデルを作成した。このモデルは、動物の腹腔内に大量のウシ血清アルブミン(BSA)を投与することで、オーバーフローにより糸球体障害がないにも関わらず、大量の尿蛋白を認める。そのため尿蛋白による間質尿細管障害を検討するのに適しているモデルと考えられる。研究 1では、脂質を含むアルブミン(r-BSA)と脱脂した純粋なアルブミン(d-BSA)をそれぞれ腹腔内に投与し、間質尿細管障害の進行を比較した。次に仮説 2)を証明するために、研究 2では、田辺製薬の菅谷らにより樹立されたヒト L-FABP 染色体遺伝子導入マウス(Tg マウス)を使用し、研究 1と同様に蛋白負荷モデルを作成し、ヒト L-FABP の動態を観察した。この Tg マウスには、ヒト L-FABP 遺伝子の転写調節領域を含む染色体遺伝子を導入しており、近位尿細管にヒト L-FABP の発現が確認されている。げっ歯類では、L-FABP の遺伝子発現が、近位尿細管において強力に抑制されているため、この Tg マウスを使用することにより、ヒト L-FABP の遺伝子調節を個体レベルで解析することができる。これらの基礎的実験結果をもとに、仮説 3)を証明するために研究 3では、慢性糸球体疾患における尿中 L-FABP の臨床的意義について検討した。

研究 1: 進行性腎疾患の悪化因子としての遊離脂肪酸

仮説：尿蛋白が、間質尿細管障害の進行に関与する機序として、尿蛋白そのものよりは、尿蛋白と結合した脂肪酸が重要な働きをしている。

方法：脂質を含むアルブミン (r-BSA, 250mg を生食 1ml で溶解し投与)、脱脂した純粋なアルブミン (d-BSA, 250mg を生食 1ml で溶解し投与)、コントロールとして生食(1ml)をそれぞれ連日 14 日間腹腔内に投与し、血清生化学的、尿生化学的分析を行った。PAS 染色、マウスマクロファージに対する抗体(F4/80)を使用した免疫組織化学染色により組織障害の程度を検討した。

結果：蛋白負荷初期において、r-BSA 群と d-BSA 群の尿蛋白、尿マウスアルブミン排泄量は、同程度であったが、その後 r-BSA 群では、d-BSA 群に比べ、有意に多量の尿蛋白の排泄を認めた。また組織学的にも r-BSA 群は、d-BSA 群に比べ著明な間質尿細管障害

と間質へのマクロファージ浸潤を認めた。

考察：r-BSA 群では、d-BSA 群に比べ、有意に多量の尿蛋白の排泄を認め、高度な間質尿細管障害と間質へのマクロファージ浸潤を認めたことより、脂肪酸と結合したアルブミンは、純粋なアルブミンに比べ有意に間質尿細管障害を進行させると考えられる。

結論：尿蛋白が間質尿細管障害を進行させる機序として、尿蛋白そのものよりは、尿蛋白に結合した脂肪酸が重要であることが示された。

研究 2: 細胞内の脂肪酸代謝に關与する脂肪酸結合蛋白(ヒト L-FABP)の動態- 実験腎症に おいての検討

仮説：尿蛋白と共に脂肪酸が過剰に近位尿細管に負荷されると尿中への L-FABP の排泄が増加する。

方法：ヒト L-FABP 染色体遺伝子導入 (Tg) マウスを使用し、ヒト L-FABP の動態を観察した。Tg マウスに、wild マウスと同様の蛋白負荷モデルを作成した。r-BSA、d-BSA をそれぞれ腹腔内に 28 日間連日投与し、wild と同様に間質尿細管障害の程度を比較した。Tg マウスでは、ヒト L-FABP は近位尿細管のみに発現していることを免疫組織化学で確認した。腎臓でのヒト L-FABP の遺伝子発現を Northern Blot Analysis により検討した。尿中ヒト L-FABP の測定は、栄研化学の樋川ら、田辺製薬の菅谷、山之内らにより確立され、ヒト L-FABP のモノクローナル抗体を使用したツーステップの ELISA 法により行った。

結果：Tg マウスでも wild マウス同様 r-BSA 群では、d-BSA 群に比べ、有意に間質尿細管障害の進行を認めた。また r-BSA 群では、d-BSA 群より有意にヒト L-FABP の遺伝子発現が近位尿細管で亢進し、尿中へのヒト L-FABP の排泄が増加した。

考察及び結論：ヒト L-FABP は、近位尿細管に過剰に脂肪酸が負荷されると発現が亢進し、尿中への L-FABP の排泄が増加する可能性が示された。

研究 3: 慢性糸球体疾患における尿中 L-FABP の臨床的意義

目的：慢性糸球体疾患患者を対象に尿中 L-FABP の臨床的意義について検討した。

対象と方法：study 1- 慢性糸球体疾患患者(n=120)を対象に尿中 L-FABP と各種臨床パラメーターとの関係を検討した。尿中 L-FABP を測定した時点から 10 ヶ月～51 ヶ月間(平均 26.3 ヶ月間)経過を観察し、腎疾患の進行と尿中 L-FABP を含む各種臨床パラメーターとの関係を検討した。腎疾患の進行度は、血清 cre の逆数(1/cre)の時間経過における傾きと定義した。

study 2- 腎生検の前に尿中 L-FABP を測定し、かつ血清 cre が正常の慢性糸球体疾患患者(n=31)を対象に、腎生検組織上の間質尿細管障害の有無と各種臨床パラメーターとの

関係を検討した。

study 3- 外来受診時に血清と尿を採取できた慢性糸球体疾患患者(n=71)と C 型慢性肝炎患者(n=73)を対象に血清 L-FABP の尿中 L-FABP に与える影響について検討した。

結果 : study 1- 尿中 L-FABP は、尿蛋白と相関が高いことが示された。腎疾患の進行度は、尿中 L-FABP のみと相関が高いことが示されたが、尿蛋白、血清 cre、血圧との相関は低値であった。

study 2- 腎生検組織において、間質尿細管障害を認めた症例では、認めない症例に比べ尿中 L-FABP が有意に高値を示した。

study 3- 肝疾患では、血清の L-FABP は、腎疾患、正常コントロールより有意に高値を示し、尿中 L-FABP と高い相関を認めたが、尿中 L-FABP は正常コントロールと有意差を認めず低値であった。腎疾患では、血清 L-FABP は、正常コントロールと有意差を認めず、また尿中 L-FABP との相関は低値であった。

考察 : 尿蛋白が、尿中 L-FABP と相関が高い因子として選ばれたことから、尿蛋白が近位尿細管のストレスとなり、尿中への L-FABP の排泄を促している可能性が示された。腎疾患の進行度が、尿中 L-FABP のみと相関が高いことから、尿中 L-FABP は、近位尿細管にかかる蛋白尿などのストレスの程度に応じて尿中へ排泄され、腎疾患の進行を反映する指標であると考えられる。

L-FABP は、低分子量蛋白であり、腎臓以外にも肝臓や消化管で発現を認めるため、慢性腎不全や肝疾患などで血清の L-FABP が上昇し、尿中へ影響する可能性がある。しかし、study 3 の結果より、血清 L-FABP の尿中 L-FABP への影響は、無視しうると考えられる。

結論 : 尿中 L-FABP は、近位尿細管にかかる蛋白尿などのストレスの程度を反映し、腎疾患の進行の予測因子となりうると考えられる。

結論

基礎的実験により、尿蛋白が、間質尿細管障害を進行させる一つのメカニズムとして、尿蛋白と結合した脂肪酸が、重要であることを明らかにし、このような状況では、近位尿細管における L-FABP の発現が亢進し、尿中への排泄が増加する可能性が示された。さらに臨床的検討により尿中 L-FABP は、蛋白尿などの近位尿細管にかかるストレスの程度に応じて尿中へ排泄され、腎疾患の進行を予測する有用な臨床マーカーとなりうると考えられる。

今後、近位尿細管における L-FABP についてのさらなる基礎的研究が進むことにより、腎疾患における L-FABP の臨床的重要性が明らかになることが期待される。