



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト近位尿細管上皮細胞の脂肪滴に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	三浦, 佑介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	甲第13633号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74027
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Miura_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（保健科学）

氏名：三 浦 佑 介

学位論文題名

ヒト近位尿細管上皮細胞の脂肪滴に関する研究

【緒言】

慢性腎臓病（CKD）は腎機能の低下は不可逆的であり，CKD の進展を抑制するためには早期発見・早期治療が重要である。しかし，既存の診断基準であるアルブミン・クレアチニン比の診断能力には課題がある。CKD に有効な早期診断マーカーは未だ確立されておらず，新たなバイオマーカーが望まれている。本研究では，近位尿細管上皮細胞に形成される脂肪滴の脂質分子の分析を目的とした。そのため，液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS/MS）法を用いて，脂肪酸添加によりヒト近位尿細管上皮細胞（HK-2）に形成される脂肪滴のコレステルエステル（CE）の組成を分析した。さらに糖尿病性腎症の尿検体に応用し，CE が早期診断のバイオマーカーとなり得るか検討した。

【対象と方法】

化学合成によって入手した標品と内部標準物質を用いて，LC-MS/MS 法による CE の 8 分子種同時定量法を確立した。

HK-2 の各種脂肪酸に対する細胞生存率を求めることで，脂肪滴形成に使用する脂肪酸の濃度を決定した。形成した脂肪滴は Oil Red O 染色し，その染色量から細胞内の脂肪滴量を確認した。次いで，細胞内の脂質を抽出し，LC-MS/MS による CE やカルジオリピン（CL）の分子種の解析を行った。CE と CL の関連性や，Oil Red O 染色量と CE 或いは CL との関連性を検討した。

最後に糖尿病性患者の尿中 CE を測定し，CE が早期バイオマーカーとなり得るか検討した。健康者（N = 58）、糖尿病性腎症第 1 期（N = 57）および第 2 期（N = 32）の尿中 CE を分子種ごとに比較した。

【結果】

Oil Red O 染色により，オレイン酸（OA），リノール酸（LA），アラキドン酸（AA），エイコサペンタエン酸（EPA），およびドコサヘキサエン酸（DHA）添加群において脂肪滴形成が確認された。しかし，パルミチン酸（PA）添加群では脂肪滴は確認されなかった。

同様に，OA，LA，AA，EPA，DHA 添加群において CE の有意な増加が確認された。一方，CL は添加した脂肪酸を含む分子種に増加が見られたものの，CL の総和は減少傾向を示した。CE と CL の総和の間に負の相関傾向が見られた。また，Oil Red 染色量と CE には正の相関，Oil Red 染色量と CL には負の相関が見られた。

糖尿病性腎症 1 期では健康者と比較して，CE18:2，CE18:3，CE20:4，CE20:5 において有意な増加が見られ，CE18:1 では有意な減少が見られた。総 CE はコントロールと 1 期で差は見られな

ったが、2 期では有意に増加した。コントロール群と糖尿病性腎症第 1 期群の鑑別において、CE20:5 は ROC 解析で曲線下面積 (AUC) が 0.74 ($P < 0.001$) であり、ACR の AUC 値である 0.68 ($P < 0.001$) よりも良好であった

【考察】

HK-2 細胞に各種脂肪酸 100 μ M を 24 時間負荷することで脂肪滴が形成されたが、PA を負荷した場合のみ脂肪滴は認められなかった。PA 添加による脂肪滴形成は濃度および時間依存的に増加することが報告されており、より高濃度、あるいはより長時間の条件下で実験を行った場合に脂肪滴が形成される可能性があると考えられた。

各種脂肪酸を HK-2 細胞に添加した際に総 CE は増加した。Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) は細胞内における CE の生成を担い、ACAT1, ACAT2 と 2 種のアイソザイムが存在する。このうち ACAT1 は全身の組織や細胞に発現しておりコレステロールの恒常性に関与することが報告されている。そのため、脂肪酸を HK-2 細胞に添加することで ACAT1 の発現量が増加し、エステル化が亢進したことが予想され得る。また、CE と Oil Red O 染色量との間に正相関が認められたことは、脂肪滴として CE が細胞内に蓄積したことを示唆する。

CE と CL 間に負の相関傾向が見られ、Oil Red O 染色量の増加と CL は負の相関傾向が見られた。CL はミトコンドリア機能や構造を維持するうえで欠かせない脂質であるため、CL の減少はミトコンドリア機能の低下につながると考えられる。

尿中で CE が増加する機序として、近位尿細管上皮細胞に形成される脂肪滴が関与している可能性が考えられる。近位尿細管上皮細胞に遊離脂肪酸が取り込まれると、細胞内に CE を含む脂肪滴が形成される。脂肪滴の形成にミトコンドリア機能低下が重なることで細胞が障害され、尿中に脱落し、CE の増加として反映されると推察する。

コントロール群と糖尿病性腎症第 1 期の尿中 CE の比較から、尿中 Total CE には差がない一方で、CE18:2, 20:4, 20:5 が有意に増加し、CE18:1 が有意に減少することが明らかとなった。よって、極早期の糖尿病性腎症の診断のために、これらの CE 分子種を質量分析により定量することが有用であると考えられる。

腎疾患における近位尿細管上皮細胞障害と脂質に関するメカニズムは依然として解明されていない。本研究では脂肪滴形成時の CE および CL の変動が明らかとなった。今後、脂質代謝関連遺伝子、炎症関連遺伝子やアポトーシス関連遺伝子との関連性を検討し、尿中に脂質が出現する機序を明らかにしていく。さらに臨床データとの関連性から、尿中 CE が腎疾患の評価や早期診断に有用な測定法となることが期待される。

結論

脂肪酸の添加により HK-2 細胞に脂肪滴を形成させ、その脂質分子種の変動を解析することができた。CE および CL の変動と HK-2 細胞への障害の関連性を明らかにすることで尿細管障害における病態解明の足がかりとなる可能性がある。また、早期糖尿病性腎症患者の尿において質量分析による CE 分子種の定量が効果的であることが示された。尿中 CE20:5 は早期糖尿病性腎症の鑑別に有用となる可能性がある。