



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト近位尿細管上皮細胞の脂肪滴に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	三浦, 佑介
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/74034
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Miura_summary.pdf



学位論文の要約

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）による腎機能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。脂肪滴の組成を理解することは，糖尿病，肥満，および脂質異常症などの病態を解明する上で重要である。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，ヒト近位尿細管上皮細胞（HK-2）の脂肪酸添加による脂肪滴形成時のコレステリルエステル（CE）やカルジオリピン（CL）の組成を分析した。さらに糖尿病性腎症の尿検体を分析し，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，細胞や尿中の CE 分析に応用した。また，高分解能質量分析装置である Orbitrap を用いて半定量的に CL およびその過酸化化物である CL-OOH を分析した。

はじめに HK-2 細胞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。形成された脂肪滴は 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，CL および CL-OOH 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。

【結果】

Oil Red O 染色により，オレイン酸（FA18:1），リノール酸（FA18:2），アラキドン酸（FA20:4），エイコサペンタエン酸（FA20:5），およびドコサヘキサエン酸（FA22:6）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（FA16:0）添加群では脂肪滴は確認されなかった。同様に不飽和脂肪酸添加群において CE の有意な増加が確認された。一方，CL 分子種はコントロールと比較して差が見られないものや減少傾向を示した分子種が多く存在した。CL の過酸化化物である CL-OOH は FA18:1，FA18:2，20:4 添加群において増加した。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 O 染色量と CL には負の相関が見られた。糖尿病性腎症の尿中 CE は健常者と比較して有意な差が見られた。

【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、FA16:0 を負荷した場合のみ脂肪滴は認められなかった。本実験条件下では、不飽和脂肪酸添加時に脂肪滴が形成されやすいと考えられた。また、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: cholesterolacyltransferase (ACAT) は細胞内において脂肪酸とコレステロールをエステル化し、CE の生成を担う。脂肪酸を HK-2 細胞に添加することで ACAT 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る。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 の減少や酸化がミトコンドリア機能の低下につながったと考えられる。

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、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 CE は早期糖尿病性腎症の鑑別に有用となる可能性がある。