HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	免疫プロテアソーム機能低下が腎虚血再灌流傷害に与える影響［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	石井, 保志
Description	配架番号：2664
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14930号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85760
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	ISHII_Yasushi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　石井　保志

学 位 論 文 題 名

免疫プロテアソーム機能低下が腎虚血再灌流傷害に与える影響
（Impaired immunoproteasomal function exacerbates ischemia-reperfusion injury）

【背景と目的】

虚血再灌流傷害（ischemia-reperfusion injury; I/R injury）は一時的な血流の途絶と、その後の再灌流により障害が引き起こされる現象で、腎臓においては急性腎障害や移植腎機能発現遅延（delayed graft function; DGF）の原因として知られている。DGF は移植後早期に発生する移植合併症であり、移植片の予後に悪影響を及ぼす。しかし、DGF に影響を及ぼす分子の変化については今のところ明らかにされていない。

I/R injury では再灌流する際に産生される活性酸素種（reactive oxygen species; ROS)による酸化ストレスが組織傷害に深く関わっており、抗酸化反応はプロテアソームの重要な役割の一つである。免疫プロテアソームはプロテアソームの特殊なアイソフォームの一つであり、抗原ペプチドの生成能が高いことが知られてきたが、近年の研究で酸化ストレス応答やタンパク恒常性維持に重要な役割を果たす可能性が示唆されている。本研究では免疫プロテアソームの発現変化が腎 I/R injury に及ぼす影響について検討した。

【材料と方法】

DGF や糖尿病を含む腎疾患症例や正常な腎移植症例などのヒト腎組織を用いて免疫染色により免疫プロテアソーム β5i サブユニットの発現を検討した。

また、β5i 遺伝子欠損（β5i homo-knockout; KO）マウス、酸化ストレス可視化レポーター（Keap1-dependent Oxidative stress Detector, No-48; OKD）マウス、およびこれらのマウスを交配した OKD/KO マウスを用いて、マウス腎 I/R injury モデルによる実験を行った。実験には 9-12 週齢のマウスを使用し、コントロールには野生型 C57BL/6（wild type; WT）マウスを用いた。マウス腎 I/R injury モデルは、右腎摘出後に左腎血管にクリップをかけ 25 分間阻血し、その後に再灌流を行うことで作製し、24 時間後あるいは 48 時間後に解剖して、組織学的および血清学的に評価した。酸化ストレスの検討には、腎 I/R 後のルシフェリンの発光量を IVIS® Spectrum CT にて測定した。CD31 と C4d の蛍光二重染色により内皮細胞への C4d 沈着を検討した。左腎臓組織から抽出した total RNA を用いて、炎症性サイトカイン、細胞接着分子、抗酸化酵素群の発現を定量的逆転写 PCR 法にて検討した。抽出したタンパク質を用いて、内皮型一酸化窒素合成酵素のウェスタンブロッティング法による解析とカルボニル化タンパク質の測定を行った。

さらに、C57BL/6 マウス初代腎臓内皮細胞（mouse primary kidney endothelial cells; MPKECs）を用いて in vitro 実験を行った。低酸素/再酸素化（hypoxia/reoxygenation; H/R）処理として低酸素培養キットを使用し低酸素状態（0.1%O2）で 1 時間培養後に再酸素化した。免疫プロテアソーム阻害剤（ONX-0914; ONX）負荷と、H/R 処理を行い、細胞生存率、ROS の産生、定量的逆転写 PCR 法による炎症性因子の発現解析を行った。また、パルミチン酸（palmitic acid; PA）やグルコース添加培地で 48 時間培養し、定量的逆転写 PCR 法にて β5i の発現を

検討した。

【結果】

DGF 患者では、傍尿細管毛細血管と小血管の内皮細胞で β5i の発現が低下していた。また、KO マウスは WT マウスに比して I/R 後 48 時間時点で高度の尿細管傷害と血中尿素窒素、血清クレアチニン値の上昇を認めた。同時に炎症反応、酸化ストレス、血管内皮細胞傷害の増悪を認めた。MPKECs を用いた実験では、H/R 処理と ONX 負荷が、細胞死、ROS の産生、炎症性因子の発現を増加させた。また、PA を含む培地は β5i の発現を有意に低下させた。さらにヒト糖尿病性腎症や ANCA 関連腎炎で血管内皮細胞の β5i の発現が低下する傾向が窺われた。

【考察】

本研究では、DGF の病態形成に重要な I/R injury と免疫プロテアソームの関連性を明らかにした。I/R injury の組織傷害には酸化ストレスが重要であり、その制御は I/R injury の治療法として有望な選択肢であると考えられる。従来、免疫プロテアソームは抗原提示に特化したプロテアソームのアイソフォームと考えられていた。しかし、近年の研究で酸化ストレス応答における役割が注目されており、様々な疾患との関連性が報告されている。本研究により、β5i は血管内皮細胞に発現し、I/R 誘導による内皮細胞傷害を β5i 欠損マウスに強く認めた。また、マウス内皮細胞を用いた in vitro 実験により、免疫プロテアソーム阻害が H/R 後の細胞ストレスを増大させることを明らかにした。内皮細胞は I/R injury によるダメージを受ける主要なターゲット細胞の 1 つであり、遷延性微小循環障害や炎症を誘導し、傷害プロセスを増悪させる。血管内皮細胞における生理的な免疫プロテアソームの発現はストレス耐性を高め、I/R injury を軽減する働きを担っていると考えられる。

ヒト DGF 症例を用いた解析では血管内皮における β5i 発現の低下を認めたが、β5i 発現に影響を与える要因については十分にわかっていない。我々の検討では、マウス内皮細胞を用いた in vitro 実験により、PA 負荷が免疫プロテアソームの発現を低下させることが示された。またヒトの糖尿病性腎症の生検組織で内皮細胞の免疫プロテアソーム発現が減弱する傾向がみられ、脂質や糖質代謝異常が免疫プロテアソーム発現を減少させる可能性が示唆された。肥満や糖尿病は DGF のリスクとされており免疫プロテアソーム発現の低下と DGF の病態形成を考える上では大変興味深い。今後、DGF 症例の臨床病理学的検討を進め、免疫プロテアソームの発現に与える影響を含め、より多数例での解析が望まれる。

これまで様々な DGF の治療法が研究されているものの、現時点ではアメリカ食品医薬品局に承認された DGF の治療法はない。また、DGF を予測するバイオマーカー確立が腎移植治療成績の向上を目指す上で重要な課題となっている。DGF 症例では 0h 生検時にすでに PTCs の β5i の発現が低下する傾向がみられ、DGF を予測するバイオマーカーとして活用できる可能性がある。

【結論】

免疫プロテアソームの発現低下は腎 I/R injury を増悪させることで、DGF の発症リスクとなる可能性がある。特に内皮細胞の免疫プロテアソーム機能低下はストレス耐性の低下から内皮細胞傷害や機能障害を引き起こし、I/R injury の増悪に繋がると考えられる。今後、免疫プロテアソームをターゲットとして DGF の予防と腎移植治療成績の向上に結び付く研究が展開されることが期待される。