

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

渡邊康弘より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 596 号

学位申請者 : わた なべ やす ひろ  
渡 邊 康 弘

学位審査論文 : 7-Ketocholesterol induces ROS-mediated mRNA expression of 12-lipoxygenase, cyclooxygenase-2 and pro-inflammatory cytokines in human mesangial cells: Potential role in diabetic nephropathy

(7-ケトコレステロールは、ヒトメサンギウム細胞において 12-リポキシゲナーゼ、シクロオキシゲナーゼ-2 および炎症性サイトカインの mRNA 発現を ROS を介して誘発する : 糖尿病性腎症における潜在的な役割)

著 者 : Yasuhiro Watanabe, Takashi Yamaguchi, Noriko Ishihara, Shoko Nakamura, Sho Tanaka, Rena Oka, Haruki Imamura, Yuta Sato, Noriko Ban, Hidetoshi Kawana, Masahiro Ohira, Naomi Shimizu, Atsuhito Saiki, Ichiro Tatsuno

公 表 誌 : Prostaglandins and Other Lipid Mediators 134 : 16-23, 2018

論文内容の要旨 :

【背景】 7-ketocholesterol (7-KCHO) に代表されるオキシステロールは強力な酸化作用と細胞毒性を有する。7-KCHO は動脈硬化性プラーク病変の主要成分であり、種々のオキシステロールの中で最も血中濃度が高い。これまでに我々は糖尿病性腎症を合併した 2 型糖尿病患者で血中の 7-KCHO 濃度が上昇しており、糖尿病性腎症の病態に深く関与する可能性を報告してきた。一方で、糖尿病性腎症の病態には慢性炎症が深くかかわっており、炎症惹起にかかわるアラキドン酸カスケードの活性化が重要であることが知られている。シクロオキシゲナーゼ (COX; cyclooxygenase) やリポキシゲナーゼ (LOX; lipoxygenase) はアラキドン酸の代謝酵素であるが、これらの酵素がどのように炎症の調節に関与しているか、そのメカニズムは十分に検討されていない。

【目的】 主要オキシステロールである 7-KCHO によりヒトメサンギウム細胞 (HMC; human mesangial cells) 障害時の COX、LOX および炎症性サイトカイン発現と細胞内活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) の制御を messenger RNA (mRNA) の発現評

価により明らかにすることを目的とした。

**【方法】** HMC に 7-KCHO (0  $\mu$ M-30  $\mu$ M) を添加し、WST-8 法で経時的 (3h-48h) に cell viability を評価した。同時に COX-2、5-LOX、12-LOX、15-LOX および炎症関連遺伝子 (IL-6、IL-1 $\beta$ ) の発現変化を real-time PCR 法及び細胞内 ROS 産生を FACS 法によって評価した。次に ROS を抑制する N-アセチルシステイン (NAC; N-acetylcysteine) を添加し、その効果を検討した。さらに、12-LOX の特異的阻害剤である PD146176 と COX-2 の特異的阻害剤である celecoxib を用い、炎症関連遺伝子の発現変化を検討した。統計解析は SPSS 2 ソフトウェアを用いて行い、すべてのデータは平均 $\pm$ SD として表記した。各薬剤の添加効果は、one-way ANOVA と Bonferroni 法による多重比較検定を用いて評価し、0.05 未満の P 値を有意とみなした。

**【結果】** HMC において、7-KCHO の濃度および時間による cell viability への影響はなかったが、7-KCHO は濃度依存性、時間依存性に COX-2、12-LOX、IL-6、IL-1 $\beta$  の mRNA 発現を亢進させた。7-KCHO は 5-LOX、15-LOX の mRNA 発現には影響しなかった。また、7-KCHO は濃度依存性に細胞内 ROS の産生を上昇させ、NAC により ROS の産生が抑制された。NAC は 7-KCHO により発現が亢進した COX-2、12-LOX、IL-6、IL-1 $\beta$  の mRNA 発現も抑制した。さらに PD146176 により IL-6 と IL-1 $\beta$  の、celecoxib により IL-1 $\beta$  の mRNA 発現が抑制された。

**【考察】** 7-KCHO は oligodendrocyte や MC3T3-E1 cell など多種の細胞において、ROS を介した細胞毒性を有することが確認されている。今回我々は、HMC において、7-KCHO が細胞内 ROS の上昇を介して炎症性サイトカインの発現を亢進させ、また、これらは COX-2、12-LOX の発現亢進によって調整され、さらに NAC や COX-2、12-LOX の特異的阻害剤によって抑制されることを明らかにした。これらの知見は、7-KCHO および COX、LOX が部分的ではあるが糖尿病性腎症発症の分子メカニズムに寄与することを示唆する。一方で、腎臓はメサングウム細胞だけでなく、ポドサイトや血管内皮細胞など多種の細胞によって構成されるため、これらの細胞間相互作用についてはさらなる検討が必要であり、さらに in vivo でも同様である。

**【結論】** HMC において 7-KCHO は ROS を介した炎症性サイトカインの発現を亢進し、これらは一部 COX-2 および 12-LOX により調整される。このことは、糖尿病性腎症の病態解明の一助となるかもしれない。

## 1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 596 号	氏 名	渡 邊 康 弘
学位審査担当者	主 査	武 城 英 明
	副 査	酒 井 謙
	副 査	長 谷 弘 記
	副 査	盛 田 俊 介
	副 査	赤 羽 悟 美

### 学位審査論文の審査結果の要旨 :

糖尿病性腎症は末期腎不全の主要な原因であり糖尿病患者の予後を規定する合併症である。著者らの研究室はこれまでに2型糖尿病で血中 7-ketocholesterol (7-KCHO) 濃度が上昇していること、とくに糖尿病性腎症で上昇していることを示した。7-KCHO に代表されるオキシステロールは強力な酸化作用と細胞毒性を有し動脈硬化を惹起する可能性が示されているが糖尿病性腎症における役割や機序は不明である。本研究は、糖尿病性腎症の病態に慢性炎症に関わる報告に着目し、ヒトメザンギウム細胞 (HMC) における炎症惹起にかかわるアラキドン酸カスケードの重要な酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) とリポキシゲナーゼ (LOX) への7-KCHO の役割に注目し、COX、LOX と炎症性サイトカイン、細胞内活性酸素種 (ROS) の関わりを培養細胞を用いて検討した。まず最初に、本研究で用いた 7-KCHO 濃度および時間内による HMC の cell viability への影響はみられなかった。そこで、7-KCHO による mRNA 発現効果を検討したところ、濃度依存性、時間依存性に COX-2、12-LOX、IL-6、IL-1 $\beta$  発現を亢進させた。また、7-KCHO は濃度依存性に細胞内 ROS の産生を上昇させ、この作用は、ROS 産生を抑制する N-アセチルシステイン (NAC) を添加することで抑制された。さらに、NAC は7-KCHO により発現が亢進した COX-2、12-LOX、IL-6、IL-1 $\beta$  の mRNA 発現も抑制した。12-LOX の特異的阻害剤である PD146176 により IL-6 と IL-1 $\beta$  の mRNA 発現、COX-2 の特異的阻害剤である celecoxib により IL-1 $\beta$  の mRNA 発現が抑制された。以上の結果から、7-KCHO は細胞内 ROS を上昇させることで、HMC の炎症性サイトカインの発現を亢進し、さらに、その効果は COX-2、12-LOX の発現調節によって制御されたことから、その機序にアラキドン酸カスケードが関与すると考えられた。これらの知見は、糖尿病性腎症発症における 7-KCHO とアラキドン酸カスケードの役割を示唆し、新たな糖尿病性腎症の病態解明とともに本機序を標的とした治療の可能性を提示した。

過日行われた学位審査会では、7-KCHO による ROS の産生機序、COX や LOX を介した分子機序、メザンギウム細胞での特異性、蛋白レベルでの効果、糖尿病性腎症における本研究の意義、標的治療の可能性など詳細な質疑が行われた。申請者は、一つ一つの質問に対して的確な回答を述べて結果の意義を考察した。本研究により明らかになったメザンギウム細胞でのオキシステロール作用機序は、糖尿病の病態解明や臨床医学に貢献するものと考えられ、たいへん意義があると評価された。以上より、本研究は代謝糖尿病学の研究分野において重要で新規な知見をもたらし十分に学位に値するものと判断された。