

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

安達 崇之

専攻分野：内科学

コース：腎臓・高血圧内科

指導教授：柴垣 有吾

主論文の題目：

**Roles of Layilin in TNF- α -Induced
Epithelial-Mesenchymal Transformation of Renal
Tubular Epithelial Cells**

(腎尿細管上皮細胞の TNF- α 誘導性上皮間葉移行に対する layilin の役割)

共著者：

Mitsumi Arito, Naoya Suematsu,
Atsuko Kamijo-Ikemori, Kazuki Omoteyama,
Toshiyuki Sato, Manae S. Kurokawa, Kazuki Okamoto,
Kenjiro Kimura, Yugo Shibagaki, Tomohiro Kato

緒言

糸球体腎炎は、腎不全を起こす主要な原因の一つであるが、その発症経路と病態には不明確な部分が多い。近年、tumor necrosis factor (TNF)- α や transforming growth factor (TGF)- β が尿細管上皮細胞の上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transformation: EMT) を誘導し、間質線維化を促進することで、糸球体腎炎での腎不全が進行することが提唱されている。しかし、その詳細な機序は十分に解明されていない。

Layilin (LAYN) は、c 型レクチン様の膜蛋白質でヒアルロン酸受容体である一方、細胞間接着に寄与していることが報告されている。ヒトでは肺、軟骨などに発現していることが報告されているが、腎臓での発現の有無や腎疾患への関与は全く不明である。

近年、当グループでは、ヒト関節軟骨細胞において、TNF- α により LAYN が増加することを報告した。以上のことから、我々は、LAYN がヒトの腎尿細管上皮細胞で、TNF- α が誘導する EMT に重要な役割を担っていると仮説を立てた。この仮説を検証するために、1) マウスの腎臓及びヒト腎淡明細胞癌細胞株 (KMRC-1) でも TNF- α により LAYN の発現が増加するか否か、2) 糸球体腎炎患者の腎臓での LAYN の発現は、健常者と比べて高いか否か、3) TNF- α が誘導する EMT に LAYN が関与するか否かについて検討した。

方法・対象

腎臓で、TNF- α により LAYNが増加するかについて調べるために、TNF- α 投与マウス及び非投与マウスの腎臓での LAYN の発現をウエスタンブロット (WB) 及び免疫組織化学染色で評価した。また、TNF- α で刺激した KMRC-1 細胞及び無刺激の同細胞での LAYN の発現を WB 及び定量的 PCR で評価した。次に、糸球体腎炎 (IgA 腎症、ループス腎炎、抗好中球細胞質抗体関連糸球体腎炎) 患者及び健常者 (移植腎) から採取した腎組織を用いて、LAYN の発現と局在を免疫組織化学染色で評価した。さらに、LAYN の EMT への関与を調べるために、small interfering RNA (siRNA) を用いて、KMRC-1 細胞の LAYN 発現を特異的に抑制し、TNF- α 及び TGF- β 刺激による EMT 誘導の有無を調べた。並行して、コントロール siRNA を導入した KMRC-1 細胞で同様の検討を行った。EMT の評価は、定量的 PCR によるビメンチン及びE-カドヘリンの mRNA 測定と F-アクチン及びZO-1 の蛍光染色による細胞の形態変化の観察により行った。統計処理は、student' s test を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。なお、本研究は聖マリアンナ医科大学の生命倫理委員会の承認を得ている (承認番号 542 号)。

結果

マウスの TNF- α 投与により、腎臓、特に尿細管で LAYN の発現が増加

した。また、KMRC-1 細胞でも、TNF- α により LAYN の発現が増加した。一方、TGF- β により KMRC-1 細胞の LAYN の発現は低下した。糸球体腎炎 (IgA 腎症、ループス腎炎、抗好中球細胞質抗体関連糸球体腎炎) の腎組織では、健常腎組織と比較して、特に尿細管で LAYN の発現が強かった。コントロールの KMRC-1 細胞では、TNF- α 刺激により、ビメンチンの増加、E-カドヘリンの減少、及び線維芽細胞様変化が認められた。それに対し、LAYN の発現を抑制した KMRC-1 細胞では、上記の変化が抑制された。TGF- β で刺激した KMRC-1 細胞では、LAYN の発現抑制による EMT 抑制は認められなかった。

考察

本研究で、1)マウスの腎尿細管や尿細管上皮由来とされるヒトの腎癌細胞で TNF- α により LAYN の発現が増強すること、2) 糸球体腎炎患者の腎臓での LAYN の発現は、健常者と比べて高いこと、3) LAYN は、TNF- α が誘導する EMT に必須であることを見出した。

1) の結果から、ヒトの腎尿細管でも TNF- α により LAYN が増加すると考えられる。また、糸球体腎炎では、TNF- α が上昇していることが知られており、2) の結果と合わせると TNF- α が糸球体腎炎患者の尿細管での LAYN の発現を増強していると考えられる。

また、3)について、糸球体腎炎の腎機能障害に尿細管上皮細胞で TNF- α が誘導する EMT が関与していることと考え合わせると、糸球体腎炎では TNF- α が LAYN を介して尿細管上皮の EMT を起こし、それが間質障害に繋がっていると推測された。TGF- β も EMT を起こすことは良く知られているが、TGF- β は LAYN を減少させることから糸球体腎炎の EMT に対しては、TNF- α と比べ、関与が低い可能性がある。

結論

LAYN は、尿細管上皮細胞での TNF- α 誘導による EMT に必須分子であり、

糸球体腎炎の間質障害において重要な役割を果たしている可能性がある。