

濱田 晋太郎 学位論文審査要旨

主 査 中 曾 一 裕
副主査 山 本 一 博
同 磯 本 一

主論文

Five-aminolevulinic acid (5-ALA) induces heme oxygenase-1 and ameliorates palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress in renal tubules

(5-アミノレブリン酸 (5-ALA)はヘムオキシゲナーゼ-1を誘導し、尿細管におけるパルミチン酸誘発性小胞体ストレスを改善する)

(著者：濱田晋太郎、前ゆかり、高田知朗、花田日向子、久保美咲、谷口宗輔、井山拓治、杉原誉明、磯本一)

令和5年 International Journal of Molecular Sciences 24巻 10151頁

参考論文

1. Creatinine generation rate can detect sarcopenia in patients with hemodialysis

(クレアチニン生成速度は血液透析患者におけるサルコペニアの検出に有効である)

(著者：前ゆかり、高田知朗、山田健太郎、濱田晋太郎、山本真理絵、井山拓治、磯本一)

令和3年 Clinical and Experimental Nephrology 26巻 272-277頁

学位論文要旨

Five-aminolevulinic acid (5-ALA) induces heme oxygenase-1 and ameliorates palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress in renal tubules

(5-アミノレブリン酸 (5-ALA)はヘムオキシゲナーゼ-1を誘導し、尿細管におけるパルミチン酸誘発性小胞体ストレスを改善する)

異所性脂肪沈着は非アルコール性脂肪性肝炎及び慢性腎臓病の根本的な病態である。尿細管の異所性脂肪沈着は小胞体 (ER) ストレスを惹起し、慢性腎臓病を引き起こす。5-アミノレブリン酸 (5-ALA)はヘム生合成経路に必須の天然アミノ酸で、抗酸化物質であるヘムオキシゲナーゼ (HO)-1を誘導する。本研究は尿細管における脂肪毒性誘発性ERストレスへの5-ALAによる抗酸化を介した保護効果を解明することを目的とした。

方法

まずヒト近位尿細管上皮細胞 (RPTECs: Renal Proximal Tubule Epithelial Cells)においてパルミチン酸 (PA: Palmitic Acid) 投与によるアポトーシス誘発をアネキシンV/SYTOX染色により評価した。PAは37°Cで100mMの濃度になるまでイソプロパノールに溶解し、さらに1%ウシ血清アルブミンを含むダルベッコ改変イーグル培地内で10、50、100、及び200 μ Mに調整した。それぞれの濃度のPAをRPTECsへ投与して4時間後及び8時間後のHoechst33342陽性細胞に対するアネキシン陽性細胞比率を定量化して比較した。さらにRPTECsへのPA投与での脂肪沈着に関してLipi-Green染色で検討した。また、RPTECsへPAおよび5-ALAの投与後の*GRP78*、*HMOX1*、*NRF2*、*BACH1*、*NQO1*及び*SLC7A11*のmRNA発現を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応にて測定し、RPTECsへPA及び5-ALAの投与後の*GRP78*及び*HO-1*の蛋白質発現をウェスタンブロット法にて測定した。さらにRPTECsへPA、5-ALA及び*HO-1*阻害剤であるZn- (プロトポルフィリンIX) PpIXを投与してアネキシンV/SYTOX及びCaspase-3/7染色を行うことで5-ALAによるアポトーシス抑制効果が*HO-1*を介したのか検討した。

結果

RPTECsへの10 μ M及び50 μ Mの濃度のPA投与ではアネキシンV/SYTOX染色で染色されたアポトーシス細胞割合の有意な増加は認めなかったが、100 μ Mでは8時間で、200 μ Mでは4時間及び8時間で有意に増加した。RPTECsへの200 μ MのPA投与4時間により十分なアポトーシ

スが誘導されることを確認したため、本研究ではこの条件で細胞刺激を行うこととした。また、RPTECsへの同条件のPA投与によりLipi-Green染色で染色される細胞割合がコントロールと比べて増加し、RPTECsへのPA投与による脂肪沈着を確認した。コントロールと比較してPA単独投与により有意に*GRP78* mRNA発現が増加し、PA及び5-ALA投与でPA単独投与と比較して*GRP78* mRNA発現は有意に減少した。*GRP78*はERストレス応答の主な調節因子であり、3つのセンサー(PERK、ATF6、IRE1a)を介して細胞をアポトーシスへ誘導する。*HMOX1* mRNA及び*SLC7A11* mRNA発現はコントロールと比較してPA単独投与では有意差は認めなかったが、PA及び5-ALA投与で有意に増加した。また、*BACH1* mRNA発現はコントロールと比較してPA単独投与では有意差は認めなかったが、PA及び5-ALA投与で有意に減少した。*NRF2* mRNA発現及び*NQO1* mRNA発現はコントロールと比べてPA単独投与とPA及び5-ALA投与で有意差は認めなかった。*GRP78*蛋白質発現はコントロールと比較してPA単独投与で有意に増加し、さらにPA及び5-ALA投与でPA単独投与と比較して有意に減少した。*HO-1*蛋白質発現はコントロールと比較してPA単独投与では有意差は認めなかったが、PA及び5-ALA投与で有意に増加した。コントロールと比べてRPTECsへのPA投与によりCaspase-3/7染色及びアネキシンV/SYTOX染色ともに陽性細胞割合が有意に増加し、PA及び5-ALA投与でPA単独投与と比較して有意に減少した。さらにPA、5-ALA及びZn-PpIXを投与するとPA及び5-ALA投与と比較して陽性細胞が有意に増加した。

考 察

本研究ではRPTECsにおけるPA誘発性ERストレスとアポトーシスを示した。さらに5-ALAは*GRP78*の発現を抑制し、Caspase-3/7活性と細胞のアポトーシスが減弱した。さらに脂肪毒性に対する5-ALAの保護効果は*HO-1*誘導が関連していることを示した。RPTECsへの5-ALA投与により*HO-1*抑制因子である*Bach1* mRNAを有意に抑制したが、*NRF2* mRNAは有意な変化を認めなかった。*BACH1*は*NRF2*による核内での*HMOX1*の転写を抑制する。過去の報告より5-ALAはミトコンドリア内でヘムへ代謝され、*BACH1*はヘムと結合することで分解されることがわかっている。本研究ではRPTECsへ5-ALAを投与することで*BACH1*発現を抑制し、*NRF2*による*HMOX1*の転写が抑制されなくなり、*HO-1*発現が増加することで*GRP78*発現を抑制し、ERストレスによるCaspase3/7経路を介したアポトーシスを抑制する可能性を示唆した。

結 論

本研究で5-ALAが*HO-1*を誘導して尿細管細胞のPA誘発性ERストレスとアポトーシスを抑制することを示唆した。