

Title	Participation of autophagy in renal ischemia/ reperfusion injury
Author(s)	鈴木, ちぐれ
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49950">https://hdl.handle.net/11094/49950</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

慢性移植腎症の原因として、腎虚血再灌流傷害に伴う細胞死が重要であると考えられている。オートファジーは、細胞が自身の一部をリソソームで分解する系の総称で細胞の恒常性の維持に働く他、飢餓状態など劣悪な環境下では、細胞保護機構として働いているが、病的な環境下では、細胞死を誘導することが報告され、アポトーシスとともにプログラム細胞死の一つとして注目されている。近年、様々な疾患へのオートファジーの関与が報告されているが、オートファジーが細胞保護的に働くのか、細胞死を誘導するのかは評価が定まっていない。最近、我々は、ヒト腎移植後早期の腎生検ならびに虚血再灌流傷害モデルマウスの電顕にて尿細管細胞にオートファジー像を認めた。今回、手術時の影響を最もうけやすい虚血再灌流傷害に焦点をあて、マウス *in vivo* 虚血再灌流モデルとヒト尿細管細胞を用いた *in vitro* 虚血再灌流モデルを用いて、オートファジーとの関連を検討することとした。

〔 方法ならびに成績 〕

マウス虚血再灌流モデルの作成は負荷1週間前に右腎摘を行い、負荷当日は左腎動静脈を血管用クリップで遮断。45分後に開放し血流を再開させた。負荷なしを0hrとして、6hr、24hr、48hr後に左腎を摘出し、オートファジーのマーカーであるLC3、リソソームのマーカーであるLAMPによる免疫組織染色、PAS染色、電子顕微鏡により腎尿細管細胞における虚血再灌流傷害とオートファジーの関連を検討した。虚血再灌流6hrでLC3陽性のオートファゴソーム顆粒は最も増加。その後、24、48hr後には減衰傾向を認めた。一方、オートファゴソームの分解過程にあたるオートリソソームは24hr以降に増加しはじめ、PAS染色ではPAS陽性顆粒は6hr後より増加、24から48hrにかけてはPAS陽性粗大顆粒と空胞形成が目立つようになり、脱落尿細管細胞の増加を認めた。このことから、マウスの虚血再灌流傷害モデルにおいては、初期には、オートファジーが亢進するが、その後、オートファジーに伴う細胞死に陥ることが確認された。ヒト尿細管培養細胞に対する低酸素やH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷による *in vitro* 虚血再灌流モデルを作成し、虚血再灌流傷害とオートファジーの関連を検討した。低酸素負荷によりLC3陽性顆粒は6hr後より増加するも、24hr後ではLC3陽性顆粒は減衰していた。一方、LAMPに関しては24hrでLAMP陽性の粗大顆粒を認めた。しかし、ある時点でのオートファゴソームとして存在している量は形成と分解のバランスによって決まることから、培養尿細管細胞に対して、プロテアーゼ阻害剤 (E64d /ペプスタチンA 各10μg/ml) を用いてオートリソソームの分解を阻害することにより、オートファジー産生が上昇しているかを検討したところ、プロテアーゼ阻害剤存在下では、24hr後においてもLC3陽性顆粒は増加(細胞内平均LC3陽性顆粒数: 通常酸素6.9個vs 低酸素25.7個)しており、これにより、低酸素刺激にてオートファジーの形成・分解がともに亢進していることが示唆された。次に、過酸化水素(500μM)により虚血再灌流による活性酸素傷害モデルを作成し、オートファジーの活性をオートファジー阻害剤(3MA)、プロテアーゼ阻害剤、オートファジー関連因子であるAtg7に対するsiRNA(50nM)により抑制した状態での細胞死の変化をLDHアッセイにて評価したところ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷では、オートファジーの阻害により有意に細胞死は抑制された。

〔 総 括 〕

慢性移植腎症の進展に虚血再灌流傷害に伴うオートファジーの関与が考えられた。

論文審査の結果の要旨

慢性移植腎症の原因として、腎虚血再灌流傷害に伴う細胞死が重要であると考えられている。オートファジーは、細胞が自身の一部をリソソームで分解する系の総称で細胞の恒常性の維持に働く他、飢餓状態など劣悪な環境下では、細胞保護機構として働いているが、病的な環境下では、細胞死を誘導することが報告され、アポトーシスとともにプログラム細胞死の一つとして注目されている。近年、様々な疾患へのオートファジーの関与が報告されているが、オートファジーが細胞保護的に働くのか、細胞死を誘導するのかは評価が定まっていない。ヒト腎移植後早期の腎生検ならびに虚血

【 3 】

氏 名	鈴木 ちぐれ
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 22345 号
学位授与年月日	平成20年4月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Participation of autophagy in renal ischemia/ reperfusion injury (腎虚血再灌流傷害へのオートファジーの関与)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 楽木 宏実 教授 奥山 明彦

再灌流傷害モデルマウスの電顕では、尿細管細胞にオートファジー像を認めた。今回、手術時の影響を最も受けやすい虚血再灌流傷害に焦点をあて、マウス *in vivo* 虚血再灌流モデルとヒト尿細管細胞を用いた *in vitro* 虚血再灌流モデルを用いて、オートファジーとの関連を検討した。

マウス虚血再灌流モデルでは、初期には、オートファジーが亢進するが、その後、オートファジーを伴う細胞死に陥ることが確認された。さらに、ヒト尿細管培養細胞に対する低酸素や $\text{H}_2\text{O}_2$  負荷による *in vitro* 虚血再灌流モデルを作成し、虚血再灌流傷害とオートファジーの関連を検討したところ、低酸素刺激にてオートファジーの形成・分解がともに亢進していることが示唆された。また、過酸化水素により虚血再灌流による活性酸素傷害モデルを作成し、オートファジーの活性をオートファジー阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、オートファジー関連因子であるAtg7に対するsiRNAにより抑制した状態での細胞死の変化を評価したところ、 $\text{H}_2\text{O}_2$  負荷では、オートファジーの阻害により有意に細胞死は抑制された。

今回の検討により、慢性移植腎症の進展に虚血再灌流傷害に伴うオートファジーの関与が考えられた。本研究の成果により腎移植などの手術に伴う虚血再灌流傷害において、オートファジーを制御することが、組織傷害の抑制につながる事が期待でき学位論文に値する。