

## 学位論文の要旨

※ 整理番号		ふりがな 氏名	こばやし まみこ 小林 麻美子
学位論文題目	Short-chain fatty acids, GPR41 and GPR43 ligands, inhibit TNF- $\alpha$ -induced MCP-1 expression by modulating p38 and JNK signaling pathways in human renal cortical epithelial cells（ヒト腎皮質上皮細胞において，短鎖脂肪酸は GPR41/43 を介し，p38 と JNK のリン酸化を抑制することで TNF- $\alpha$ 誘導性 MCP-1 発現を抑制する.）		
<p><b>【研究の目的】</b></p> <p>近年，肥満，糖尿病，動脈硬化など腸疾患以外のさまざまな病態への腸内細菌叢の関与が注目されており，慢性腎臓病患者（CKD）においても腎機能の悪化に伴い腸内細菌叢の変化が報告されている．また CKD における腸内細菌叢の変化や悪化は，尿毒素蓄積などの機序を介して腎線維化などの CKD の病態に影響を及ぼしているという，「腸腎連関」の概念が提唱されており，腸内細菌を含む腸内環境を是正することが CKD の新しい治療介入になる可能性が期待されている．そこで，新規治療ターゲットとして腸内細菌叢が産生する有用な短鎖脂肪酸と，その受容体である GPR41 と GPR43 に着目した．GPR41 は交感神経節に発現し，交感神経系を活性化することで体内エネルギーの恒常性を維持し，GPR43 は脂肪細胞に発現し，インスリンシグナルを制御して脂肪組織への脂肪の過剰蓄積を防ぎ，他の組織での利用促進することが報告されている．</p> <p>CKD の進展は，腎局所での炎症の増幅，遷延化から最終的に線維化に至ることが原因であり，炎症などにより単球の遊走を引き起こすケモカインである MCP-1（Monocyte chemoattractant protein-1）は，尿細管から産生され炎症細胞の受容体と結合して線維化を引き起こす．つまり腎臓保護の観点から，MCP-1 の制御の重要性が考えられている．</p> <p>本研究では，ヒト腎皮質上皮細胞（HRCE）において短鎖脂肪酸の TNF-<math>\alpha</math>誘導性 MCP-1 の発現への関与に GPR41/43 が介することを検討し，短鎖脂肪酸の抗炎症作用をその分子機序を通して解明することを目的とした．</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>HRCE は形質保持のため 4 継代を使用した．</p> <p><b>1. GPR41 と GPR43 の腎臓における発現</b></p> <p>ヒト正常腎で，GPR41/43 受容体の発現の有無及び発現部位を免疫染色法で検討した．またウェスタンブロット法（WB 法）で HRCE の細胞破碎液内の GPR41/43 蛋白の存在を検討した．</p> <p><b>2. 短鎖脂肪酸による MCP-1 発現の解析</b></p> <p>短鎖脂肪酸として酢酸，プロピオン酸，酪酸を用い，炎症性サイトカインである TNF-<math>\alpha</math> 刺激により誘導される MCP-1 の発現を解析した．HRCE を短鎖脂肪酸と TNF-<math>\alpha</math> で 24 時間刺激後に，MCP-1 の mRNA を Real-time PCR 法で，MCP-1 蛋白を ELISA 法で測定した．</p> <p><b>3. プロピオン酸の抗炎症作用発揮の分子機序の解析</b></p> <p>プロピオン酸による MCP-1 発現が GPR を介する事を確認するために，Gi/o を阻害する PTX，Gi<math>\beta\gamma</math> サブユニットを阻害する Gallein，G<math>\alpha</math> サブユニットを阻害する NF023 を用い阻害実験を行い，TNF-<math>\alpha</math> 誘導性 MCP-1 の mRNA を測定した．</p>			

更に GPR41/43 の siRNA を行い、TNF- $\alpha$ 誘導性 MCP-1 の mRNA を測定した。

#### 4. プロピオン酸による TNF- $\alpha$ シグナル伝達経路の阻害機序に関する解析

TNF- $\alpha$ で誘導される分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) である p38, JNK について検討した。p38 を阻害する SB203580 と JNK を阻害する SP600125 は、それぞれ TNF- $\alpha$ 誘導性 MCP-1 の mRNA 発現を抑制したため、プロピオン酸が TNF- $\alpha$ 刺激後の p38 と JNK のリン酸化に与える影響を WB 法で検討した。

##### 【結果】

1. ヒト正常腎で、GPR41/43 とともに遠位尿細管と集合管を中心に発現することを確認した。また HRCE においても、GPR41/43 蛋白の発現を確認した。
2. 主要な短鎖脂肪酸である、酢酸、プロピオン酸、酪酸は、TNF- $\alpha$ 誘導性 MCP-1 の mRNA と蛋白の発現を有意に抑制した。
3. プロピオン酸による TNF- $\alpha$ 誘導性 MCP-1 の mRNA の発現抑制は、PTX と Galleanin で解除されたが、NF023 では解除されず、この発現抑制は Gi/o- $\beta\gamma$  signal によることが分かった。さらに control siRNA ではプロピオン酸により TNF- $\alpha$ 誘導性 MCP-1 の mRNA を有意に抑制したが、GPR41/43 の double knockout 条件下では MCP-1 の抑制を解除した。
4. TNF- $\alpha$ 刺激により、p38 のリン酸化が増強し、プロピオン酸はこれを有意に抑制した。またその抑制は PTX で解除された。JNK でも同様の結果となり、プロピオン酸は TNF- $\alpha$ 下流の MAPK の経路を抑制することで MCP-1 発現を抑制した。

##### 【考察】

短鎖脂肪酸は腸管で血中に吸収され、エネルギー源となり栄養素として不可欠だけでなく、細胞内のシグナル伝達因子として働く作用があり、宿主の細胞機能の調節に関与していると言われている。それは好中球や単球、マクロファージの産生を抑制し、それらによる TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ などの産生を抑制することで炎症性疾患を改善し、動物モデルにおいてはアレルギー性気道疾患を改善したという報告がある。しかし腎細胞においては短鎖脂肪酸による抗炎症作用の報告はされていなかった。

本研究の結果から HRCE において短鎖脂肪酸は TNF- $\alpha$ 誘導性 MCP-1 の発現を抑制することが分かった。また、プロピオン酸による MCP-1 発現の抑制が、Gi/o の  $\beta\gamma$ シグナルを介しており、さらに TNF- $\alpha$ により誘導される p38 と JNK のリン酸化を抑制することが分かった。しかし最近、ヒト単核球において、GPR43 は Gq シグナルを介して p38 のリン酸化を促進するという報告もあり、GPR41/43 の効果は GPR サブタイプと細胞特異性に依存している可能性があると考えられる。

##### 【結論】

短鎖脂肪酸は HRCE において、GPR41/43 を介して p38 と JNK のリン酸化を抑制することで TNF- $\alpha$ 誘導性の MCP-1 発現を抑制する。つまり短鎖脂肪酸が腎臓において炎症や線維化の進行を抑制し、CKD に対し新たな治療となる可能性がある。

備考 1 ※印の欄は、記入しないこと。

2 学位論文の要旨は、和文により研究の目的、方法、結果、考察、結論等の順に記載し、2,000 字程度にまとめタイプ等で印字すること。

3 図表は、挿入しないこと。