

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	宮内和誠
<h3>学位論文の題目</h3> <p>IL-18 Expression is Up-Regulated in Renal Tubular Cells in Type 2 Diabetic Subjects with Nephropathy.</p> <p>(2型糖尿病性腎症患者尿細管における IL-18 の発現増強)</p> <h3>共著者名</h3> <p>滝山 由美、本庄 潤、立野 正敏、羽田 勝計</p> <h3>未公開</h3> <h3>研究目的</h3> <p>糖尿病性腎症は糖尿病 3 大合併症の 1 つである。糖尿病腎症を原疾患とする慢性腎不全により透析療法に導入される症例は、急増の一途をたどり、1998 年からは慢性糸球体腎炎を抜いて透析導入原疾患の第 1 位となっている。また、その予後も極めて不良であることから、治療法及びメカニズムの解明が急務とされている。現在、糖代謝亢進による特定の代謝経路の亢進、transforming growth factor β (TGF-β) などのサイトカインの関与、アンギオテンシン II (AII) の関与、接着因子の関与など多方面から研究が進められている。</p> <p>インターロイキン 18 (IL-18) は、肝臓の Kupffer Cell よりインターフェロン γ を誘導する因子として同定されたサイトカインである。IL-18 は、インターロイキン 1β と類似性を有しており、24kDa の不活性型の前駆蛋白 (Pro IL-18) として合成され、インターロイキン 1β convertin enzyme (ICE) によって切断され、18kDa の活性型の IL-18 として作用することが知られている。IL-18 産生細胞は主に免疫担当細胞、特にマクロファージとされているが、骨芽細胞、副腎皮質細胞、滑膜細胞、血管内皮細胞、脂肪細胞など免疫系以外の細胞でも産生されることが報告されている。</p>			

近年の臨床研究により、急性高血糖状態による血清 IL-18 濃度の上昇、健常人との比較における 2 型糖尿病患者の血清・尿中 IL-18 値の上昇、また血清 IL-18 濃度と糖尿病性腎症病期との関連性について報告があり、糖尿病腎症発症・進展因子としての IL-18 の関与が示唆されている。

今回、糖尿病性腎症患者の血清、尿中 IL-18 値上昇の原因・産生臓器としての腎臓の可能性について、ヒト腎生検組織標本及び、ヒト近位尿細管細胞 (Human proximal tubular epithelial cell; HRPTEC)・ヒトメサンギウム培養細胞 (Human mesangial cell; HMC) を用い、腎臓における IL-18 の発現とその制御について検討した。

材 料 ・ 方 法

免疫組織学的検討には、顕性蛋白尿を呈する糖尿病性腎症患者 13 名、微小変化群患者 8 名のパラフィン包埋の腎生検組織標本を対象とした。抗ヒト IL-18 モノクローナル抗体及び抗 IL-18 レセプター (IL-18R) モノクローナル抗体を用い、それぞれの腎組織標本における IL-18、IL-18R 蛋白発現について評価した。

次に、HRPTEC 及び HMC における IL-18、IL-18R 及び IL-18 の活性化因子である IL-1 β converting enzyme (ICE) の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検討した。HRPTEC、HMC は、それぞれの専用培地 (REGM、MsGM) にて培養した。Total RNA 抽出は QIAGEN 社の RNeasy mini kit を用い、cDNA の合成には Invitrogen 社の Super Script™ III First-strand Synthesis for RT-PCR を使用した。PCR 法は、Takara 社の Takara Taq™ Hot Start Version を用い、エシジウムブロマイド含有 2%アガロースゲルにて電気泳動後可視化した。

続いて、HRPTEC における IL-18mRNA 発現制御について、糖尿病性腎症の発症進展に関与することが知られている TGF- β (2.5ng/ml)、A II (10⁻⁷M) の影響について real-time RCR 法を用いて検討を加えた。検討は RT-PCR 法と同様の過程にて cDNA 作成後、Applied Biosystems 社の TaqMan Universal PCR Master Mix を用い、同社の 7300 Real-Time PCR System を用いて検出した。HRPTEC を 0.2%ウシ血清アルブミン (BSA) 添加の無血清 DMEM 培地にて 24 時間培養後、それぞれの試薬を添加し、4 時間培養した。

TGF- β による、IL-18mRNA 発現亢進の制御経路を探るため、特異的 kinase 阻害剤を用いて実験を加えた。Extracellular signal-regulated kinase (Erk) 1/2 阻害剤として PD98059、p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) 阻害剤として SB203580 を用いた。両阻害剤とも TGF- β 刺激 1 時間前に前処置した。

HRPTEC における IL-18 蛋白発現について、Western blot 法により検討した。細胞を PBS で 2 回洗浄後、lysis buffer で可溶化し 13,000g 30 分間遠心した上清を用いた。検体は等量化後、免疫沈降処理を行い 12% SDS-PAGE を用い、還元状態で電気泳動を行った。PVDF membrane にブロット後、5% skim milk によりブロッキング処理を経て IL-18 モノクローナル抗体を 1 次抗体として反応させ、2 次抗体として Amersham 社の

anti-mouse IgG 抗体を用い、同社の ECL 法にて蛍光抗体法で検出した。

成 績

ヒト腎生検標本による免疫組織学的検討の結果、IL-18 蛋白は糖尿病性腎症群 13 検体中 10 検体、及び対照群とした微小変化群においては 8 検体中 1 検体の尿細管細胞質に発現を認めた。一方、IL-18R は糖尿病性腎症群・微小変化群全例の糸球体・尿細管細胞において発現が認められた。

RT-PCR による検討では、HRPTEC において IL-18mRNA の恒常的な発現を認めたが、HMC においてはその発現を認めなかった。IL-18mRNA 及び ICE mRNA の発現は、HRPTEC、HMC 両者において恒常的に認めた。

Real-time RT-PCR を用いた検討では、2.5 ng/ml の TGF- β 4 時間刺激により、約 2 倍の IL-18mRNA の発現増強が認められた ($p < 0.05$)。

TGF- β による IL-18mRNA の発現亢進は、PD98059 及び SB203580 前処理により抑制された。これにより、TGF- β の IL-18mRNA 発現増強作用における MAPK pathway の関与が明らかとなった。

Western blot 法により HRPTEC における IL-18 蛋白発現について検討した。24 kDa の不活性型の Pro IL-18 の発現と、18 kDa の活性型 IL-18 の微量な発現を認めた。

考 案

ループス腎炎・急性尿細管壊死・ANCA 関連腎炎において、各腎組織における IL-18 発現増強が報告されている。IL-18 は、それらの発症・進行に重要な役割を担っている事が示唆されている。糖尿病性腎症においても臨床的な研究により、2 型糖尿病患者の血中・尿中 IL-18 濃度の上昇、糖尿病性腎症病期との関連が指摘されており、血中 IL-18 濃度と尿中 $\beta 2$ -microglobulin 値との相関を認めている事から、血中 IL-18 濃度の上昇が腎尿細管障害の関連も示唆されている。今回我々は、顕性蛋白尿を呈する糖尿病性腎尿細管における IL-18、IL-18R 蛋白の発現と HRPTEC における IL-18・IL-18R・ICE mRNA の発現を報告した。さらに、Western blot 法により尿細管細胞における IL-18 蛋白の存在を明らかとした。これらの結果は腎尿管細胞が血中・尿中 IL-18 上昇の原因の 1 つである可能性を示唆するものである。

近年の研究において、尿細管が抗原提示、サイトカイン・ケモカインなどの産生を通して免疫反応の制御に重要な役割を担う可能性が指摘されている。ヒト尿細管細胞も in vitro の研究を通し、接着因子や TGF- β 、IL-6、IL-1 α 、TNF- α など多種のサイトカインを分泌することが知られている。これら上昇したサイトカイン・ケモカインは腎細胞・免疫担当細胞双方に影響し、糸球体・尿細管の炎症を惹起し、腎不全の進行につながる。実際、今回の実験でも、ヒト近位尿細管細胞において TGF- β が、ERK 系・p38-MAPK

系を介し、IL-18mRNA 発現を亢進させる可能性が考えられた。一方、IL-18 は糖尿病性腎症の発症機序につながると考えられている TNF- α や MCP-1・MIP-1 α ・IL-8 などのケモカインの産生を亢進することが知られている。今回の実験は、糖尿病性腎において、尿細管で産生された IL-18 がこれらサイトカイン・ケモカインの産生異常を引き起こしている可能性を示唆する。

結 論

IL-18 は糖尿病性腎症患者の腎尿細管組織において発現が亢進していた。IL-18 は autocrine・paracrine に作用し、糖尿病腎症の病態に関与している可能性が示唆された。

引 用 文 献

1. Nakamura A, Shikata K, Hiramatsu M, Nakatou T, Kitamura T, Wada J, Itoshima T, Makino H. Serum interleukin-18 levels are associated with nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 28:2890-2895, 2005
2. Haneda M, Araki S, Togawa M, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R. Activation of mitogen-activated protein kinase cascade in diabetic glomeruli and mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Kidney Int Suppl* 60:S66-9, 1997.
3. Hewins P, Morgan MD, Holden N, Neil D, Williams JM, Savage COS, Harper L. IL-18 is upregulated in the kidney and primes neutrophil responsiveness in ANCA-associated vasculitis. *Kidney Int.* 69:605-615, 2006

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	宮内和誠
<p>審査委員長 菊池 健次郎 ㊞</p> <p>審査委員 立野 正敏 ㊞</p> <p>審査委員 羽田 勝計 ㊞</p>			
<p>学位論文題目</p> <p>IL-18 Expression is Up-Regulated in Renal Tubular Cells In Type 2 Diabetic Subjects with Nephropathy.</p> <p>2型糖尿病性腎症患者尿細管における IL-18 の発現増強</p>			
<p>近年、我が国では生活習慣の欧米化が進展し、糖尿病並びにその3大合併症の1つである糖尿病性腎症が急増し、後者は新規に血液透析導入される原因疾患の第1位となっており、その予後も極めて不良である。したがって、糖尿病性腎症の進展・増悪に関わる機序の解明は末期腎不全・透析導入への進展阻止上、極めて重要と考えられる。</p> <p>炎症性サイトカインである IL-18 は血管内皮細胞や脂肪細胞など免疫担当細胞以外の細胞からも分泌され、ヒトでは急性高血糖状態で血清 IL-18 濃度が上昇すること、2型糖尿病患者の血中・尿中 IL-18 の上昇がみられ、かつ、これらと糖尿病性腎症病期との関連性を示唆する報告がなされている。しかし、糖尿病性腎症、とくにヒトでの IL-18 の産生、増加に腎臓が関わるのか否かは明らかではない。</p> <p>論文提出者らは、糖尿病性腎症患者の血中・尿中 IL-18 増加の成因・産生臓器としての腎の役割をヒト腎生検組織標本および培養ヒト近位腎細管細胞・ヒトメサンジウム細胞における IL-18 の発現とその制御の面から検討した。</p> <p>まず、ヒト腎生検標本における IL-18 およびヒト IL-18 レセプター(IL-18R)のそれぞれ</p>			

のモノクローナル抗体を用い、IL-18 蛋白および IL-18R 蛋白の発現が検討された。その結果、IL-18 蛋白発現は、糖尿病性腎症患者では 13 検体中 10 検体(77%)に高率に尿細管細胞質に認められたのに対し、対照の尿細管間質障害のない微小変化型ネフローゼ発症群患者(MCNS)では 8 検体中 1 検体(12.5%)にとどまることが示された。一方、IL-18R 蛋白の発現は糖尿病性腎症群、MCNS 群の全側で検出された。これらの成績は糖尿病性腎症の腎尿細管では IL-18 はオートクライン機序で作用している可能性を強く示唆するものと考えられる。次に、IL-18 および IL-18R の mRNA および IL-1 β 変換酵素(ICE)遺伝子発現をヒト培養細胞系で検討すると、IL-18RmRNA および ICEmRNA 発現は近位尿細管細胞、メサンジウム細胞の両方で恒常的に認められたが、IL-18mRNA の発現は近位尿細管細胞においてのみ検出された。さらに、尿細管間質障害を惹起することが知られている TGF- β を用いた検討では、TGF- β 刺激による IL-18mRNA 発現の増強が近位尿細管細胞で認められ、その機序に ErK β 、p38MAPK 系の活性化が関与することを特異的阻害薬を用いた実験により明示した。

本研究は、ヒト糖尿病性腎症の進展に大きく関わる尿細管・間質障害の機序に IL-18 発現亢進が重要な意義を有する可能性を初めて示したもので、急増する糖尿病性腎症の成因解明、進展阻止、治療法の開発への研究の発展に大きく寄与するものと考えられる。

論文提出者に対する審査委員による本論文の内容および関連領域に関する諮問に対し、理論的かつ適切な回答が得られ、十分な学識を有することが確認された。以上より、本審査委員会は本論文が学位(医学博士)授与に十分値すると判断した。