

論 文 内 容 の 要 旨

Influence of renal ischemia-reperfusion injury on renal neutrophil gelatinase-associated lipocalin receptor (24p3R) in rats

ラット腎虚血再灌流障害における 24p3R の影響

日本医科大学大学院医学研究科 腎臓内科学分野

研究生 荒 川 裕 輔

Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 18 June 2019 掲載

## 【Introduction】

NGAL は 25kDa の蛋白で、リポカリンファミリーである。NGAL はシデロフォアと結合することで、鉄が細胞内に入るのを抑制し、細菌の成長を阻害している。NGAL は好中球、腎、肝臓、肺、上皮細胞に発現している。

昨今 NGAL は腎虚血再灌流障害において腎臓での NGAL の蛋白発現が増加しており、なおかつ尿中の NGAL が血清 Cre よりも早期に上昇するため AKI のバイオマーカーになるといわれている。

尿中 NGAL は近位尿細管でメガリン/キュブリン複合体を通じて再吸収されるだけでなく、遠位尿細管で 24p3R によって再吸収されている。In vivo で虚血再灌流障害においてメガリン/キュブリンの mRNA は減少し、NGAL の尿中排泄が増強しているかもしれないと報告されているが、一方で、虚血再灌流での 24p3R の変化については報告されていない。尿細管上皮細胞を用いた in vitro での低酸素再灌流障害の報告はあるが、それでは外因性に NGAL を投与するとこれらの受容体は減少するとされている。このデータは過剰な内因性 NGAL により虚血再灌流後に腎での 24p3R 発現も減少することを推測すると思われる、今回この仮説を評価するために行った。

## 【Results】

### 1 腎組織の変化

0, 10, 20, 30, 45 分と腎頸部をクランプし、それぞれ腎虚血を行い、その後再灌流した。虚血再灌流後 24 時間後に腎組織をサンプリングし、PAS 染色を行った。結果として 0, 10, 20 分までは変化を認めず、30 分より尿細管障害を認め、45 分で刷子縁の消失、核の脱落、空胞変性と高度の尿細管障害を認めた。

### 2 虚血再灌流後の NGAL と Cre の変化

尿中 NGAL は 20 分虚血より有意に上昇したが、NGAL の蛋白発現は軽度であり、有意な増加は認めなかった。血清 Cre, NGAL は 10, 20 分では変化は認めなかったが、30, 45 分で有意な上昇を認めた。

### 3 24p3R, メガリン, NGAL の免疫染色

近位尿細管のメガリン、遠位尿細管のカルビンディンと 24p3R の共染色を行い、局在を確認した。結果は、メガリンカルビンディンと共に染色されているのが分かり、近位、遠位尿細管に存在していることが確認された。

また、24p3R 陽性細胞は 10 分の虚血では変化は認めず、20 分以降で減少を認めた。NGAL は 0, 10 分では認めなかった。虚血 20 分以降で NGAL と共染色されるのが確認された。

### 4 虚血再灌流後の 24p3R の蛋白発現

24p3R は 20, 30 分でわずかに減少し、45 分では有意に減少した。

#### 5 虚血再灌流後のメガリン、キュビリン mRNA の発現

メガリンとキュビリンの mRNA の減少は 10 分ではわずかに減少しており、20 分以降で有意に減少していた。

#### 6 NRK52E での虚血再灌流後の Slc22a17

アンチマイシン A にてラット腎尿細管細胞である NRK52E の ATP を 1 時間遮断し、その後アンチマイシン A を wash out 後、12 時間 recovery を行った。その結果、ATP は有意に改善を認めたが、Slc22a17 は減少を認めていた。

### **【DISCUSSION】**

既報では明らかな病理組織学的変化は片側腎虚血では 45 分、両側腎虚血では 30 分であったが、今回の研究では 30 分より認め、また、尿中 NGAL は血清 Cre や血清 NGAL よりも鋭敏な AKI のバイオマーカーであった。

本研究では、NGAL の蛋白発現は有意ではなかったが、軽度上昇を認めていた。腎虚血再灌流は MCP-1 や IL-10 を含む炎症性サイトカインの mRNA の発現を増加させ NGAL の分泌を刺激するといわれており、今回の NGAL の軽度の蛋白発現の増加は腎障害に関連する機序と同様に炎症性サイトカインによるものかもしれない。

腎臓ではメガリンとキュビリンは近位尿細管細胞の apical 側で発現しており、両蛋白は糸球体で濾過された基質の再吸収に関与している。最近の研究ではキュビリンが近位尿細管での up take に重要であり、メガリンはキュビリン基質複合体のエンドサイトーシスに必要と言われている。

今回の研究では、メガリンの mRNA は虚血再灌流後で減少しており、それは既報と同様である。それは虚血再灌流において腎での炎症性サイトカインを産生させ、メガリンの発現を抑制していると推測される。それに加え、既報ではキュビリンの発現も低下していると報告されており、本研究でも同様に確認された。NGAL はメガリン/キュビリン経路を介して再吸収されているため、メガリン/キュビリンの減少は尿中 NGAL の増加につながる。

NGAL 受容体である 24p3R は遠位尿細管と集合管の apical 側に発現し、尿で濾過された蛋白の受容体を介したエンドサイトーシスに寄与している。本研究でも期待通り、遠位尿細管で発現しているカルビンディンと共染色されたが、今回は近位尿細管で認められるメガリンとも共染色された。24p3R とメガリンの相互作用についての報告は今まで認めてい

ない。

本研究は虚血再灌流障害で 24p3R 蛋白発現が減少したことを初めて示した。In vitro では尿細管上皮細胞を用いた 24p3R の mRNA の発現は低酸素再灌流モデルで上昇を示したが、発現は外因性に NGAL を加えることで反対に減少を示した。本研究では 24p3R 蛋白は 45 分の腎虚血で有意に減少した。それゆえ腎での NGAL が増加することによる 24p3R の減少は軽度かもしれない。

既報の in vitro では 24p3R の mRNA 発現が低酸素再灌流で増加した。しかしながら、本研究は異なった結果で、Slc22a17 の mRNA 発現は ATP の減少により低下を認め、recovery 後改善した。低酸素と recovery の medium 既報の研究と同様であり、アンチマイシン A を投与することで ATP を枯渇させることによるものである。実験方法に違いはあるけれども、異なった結果になった説明をすることは難しい。

腎臓で濾過された蛋白はメガリン/キュビリン複合体を通してエンドサイトーシス、遠位尿細管で 24p3R を通してエンドサイトーシスされている。腎障害に対する反応として、NGAL は肝臓など全身で分泌され、糸球体で濾過された後、近位尿細管でメガリン/キュビリン複合体で再吸収される。本研究で血清 NGAL の増加は 30 分以上の虚血で上昇したが、それは肝臓での NGAL の分泌が増加したことによるものかもしれない。免疫染色では、腎での NGAL は 20 分以上の虚血にて 24p3R 陽性細胞と共染色された。それは NGAL が 24p3R によって遠位尿細管で再吸収されていることを示している。この研究ではまた、45 分の虚血で腎での 24p3R の蛋白発現は減少を認めた。

NGAL は急性腎障害の後に up regulate され、腎障害を軽減しているとの報告がある。しかしながら、今回の研究では腎でのメガリン、キュビリン、24p3R の減少を示しており、NGAL による腎保護効果は減衰しているものと推測された。

まとめると、本研究では腎虚血再灌流障害はメガリン、キュビリンだけではなく、24p3R も減少している。比較的長い腎虚血は 24p3R 蛋白を減少させ、24p3R の減少が、尿中の NGAL 排泄を増加させる要因となっているかもしれない。

## 【Methods】

### 1 動物

8 週齢のオス wistar ラットを用いて行った。ラットは SPF で管理され、 $24 \pm 1^\circ\text{C}$  で、12 時間：12 時間の明暗時間で管理を行った。

## 2 腎虚血再灌流モデル

ペントバルビタール(40mg/kg)で全身麻酔を行い、腹部正中切開を行った後、右の腎頸部にそれぞれ 0, 10, 20, 30, 45 分クランプし、その後再灌流させた。左腎には何も処置は施していない。クランプ解除後腎の表面の色を観察し、再灌流されていることを確認したのち腹部を 4-0 ナイロンにて縫合した。

## 3 サンプル採取

虚血再灌流が終わったのち、ラットを代謝ケージへ移し 24 時間蓄尿を行った。尿の採取が終わったあと、再度ペントバルビタール(40mg/kg)にて麻酔した後、虚血腎と血液を採取した。腎組織は病理学的変化の解析と mRNA と蛋白発現の解析に用いた。尿と血液サンプルは NGAL と Cre の解析に用いた。

## 4 組織学

虚血腎の組織は採取後すぐに 10%ホルマリン浸漬し、室温で 24 時間置いた。その後パラフィンブロックを作製したのち 2 $\mu$ m で切片を作製し、PAS 染色を行った。

## 5 細胞培養

NRK52E(ラット腎)は low glucose DMEM 培地に 10%FBS、1%非必須アミノ酸、100U/mL のペニシリン、100U/mL のストレプトマイシンを添加し、37°C、10% CO<sub>2</sub> 下で incubate した。

## 6 ATP 枯渇と回復

NRK52E の ATP 枯渇と recovery は既報を修正して行った。ATP 枯渇は 1 $\mu$ mol/L、10 $\mu$ mol/L のアンチマイシン A に 1.5mmol/L の CaCl<sub>2</sub>、2mmol/L の MgCl<sub>2</sub> を加えた PBS で 1 時間 incubate した。その後 recovery として、PBS で wash した後、10%FBS を加えた DMEM 培地で 12 時間 incubate した。細胞の ATP レベルはルシフェラーゼ発光量で測定した。

## 7 生化学解析

Cre 濃度は酵素学的方法で測定し、NGAL 濃度は ELISA キットで測定した。

## 8 RT-PCR

虚血腎の皮質からの mRNA の抽出を行い、遺伝子発現レベルはリボソーム蛋白 18S で正常化した。

## 9 共染色

凍結切片を 5 $\mu$ m にてスライスし、3% パラホルムアルデヒドで 10 分間浸漬した。それから Goat serum で 1 時間ブロッキングした後、anti-24p3R antibody、anti-calbindin antibody で 4 $^{\circ}$ C overnight でそれぞれ incubate した。また、共染色は anti-24p3R で 4 $^{\circ}$ C 6 時間行った後、二次抗体 (Alexa Flour 488)、その後 anti-NGAL antibody または、anti-megalin antibody で反応させた。その後二次抗体(Alexa Flour 555)で反応させた。