

氏名	山口 安乃
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医工農博4甲 第55号
学位授与年月日	令和4年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	医学専攻
学位論文題名	<b>Hyperthyroidism exacerbates ischemic reperfusion injury in the kidney</b> (過剰な甲状腺ホルモン補充は虚血再灌流下の尿細管上皮細胞のネクロトーシスの原因となる)
論文審査委員	委員長 教授 中島 博之 委員 教授 鈴木 章司 委員 講師 高野 勝弘

## 学位論文内容の要旨

### 【背景】

甲状腺機能異常は慢性腎臓病(CKD)の腎機能悪化の危険因子となる可能性が報告されているが、レボチロキシン(LT4)補充とその腎保護効果を検討した介入研究の結果は様々であり、甲状腺ホルモンの腎保護効果は明らかになっていない。一方、CKDでは動脈硬化を合併することが多く、多くの酸素を必要とする腎臓の尿細管上皮細胞は慢性的な虚血の状態にある。さらに、糖尿病性腎症・慢性糸球体腎炎・腎硬化症といったCKDの基礎疾患に関わらず、尿細管上皮細胞の虚血と細胞死、それに続いておこる間質の線維化はそのCKDの共通した腎予後規定因子であることが知られている。

### 【目的】

虚血再灌流下の尿細管上皮細胞における甲状腺ホルモン(T3)—甲状腺ホルモン受容体 $\beta$  (TR $\beta$ )の作用を解明する。

### 【方法】

週齢7-9の雄のC57BL/6マウスをLT4投与群(LT4 250 $\mu$ g/kg/日 ×14日間)とコントロール群を用意する。さらに両群のマウスの右腎動脈を45分クランプして虚血後に再灌流(I/R)もしくは偽手術(sham)を行い、14日後の障害(I/R or sham)側の腎臓の炎症細胞の浸潤、線維化、活性酸素(ROS)産生、ネクロトーシスを比較検討する。

近位尿細管上皮細胞に特異的に発現するメガリンとTR $\beta$ ・細胞死関連蛋白質の共染色を行い、尿細管の障害部位の評価を行う。タモキシフェン誘導型の近位尿細管特異的TR $\beta$ コンディショナルノック

クアウト (TR $\beta$  cKO) マウスを作成し、I/R による尿細管上皮細胞における I/R 下の TR $\beta$  の作用を検討する。

#### 【結果】

sham、I/R 群とも LT4 投与により甲状腺ホルモン値は上昇した (T4 : sham 群  $3.6 \pm 0.2$  vs  $10.5 \pm 0.6$   $\mu$ g/dl、I/R 群  $3.4 \pm 0.4$  vs  $10.0 \pm 0.4$   $\mu$ g/dl、T3 : sham 群  $79.6 \pm 2.3$  vs  $177.2 \pm 7.9$  ng/dl、I/R 群  $71.6 \pm 2.3$  vs  $170.4 \pm 8.9$  ng/dl)。sham、I/R 群とも LT4 投与による血圧、体重に変化はみられない。I/R による腎機能障害は、コントロール群と比較して LT4 投与群でより悪化していた (Cr  $0.3 \pm 0.1$  vs  $0.5 \pm 0.1$  mg/dl、BUN  $67.5 \pm 10.3$  vs  $128.5 \pm 22.0$  mg/dl)。

I/R により近位尿細管上皮細胞において、TR $\beta$  mRNA/蛋白の発現が増加した。LT4 投与群の腎臓では I/R によりアルギナーゼ 2 (ARG2)蛋白の発現が増加し ROS の蓄積が増加していた。Mixed lineage kinase domain-like (MLKL) 蛋白のリン酸化の増加が LT4 投与群の I/R 腎臓の尿細管上皮細胞で見られ、ネクローシスによる細胞死が誘導されていると考えられた。フローサイトメトリーでは CD11b、Ly6C 陽性の骨髄由来の炎症性のマクロファージの集積が増加し、シリウスレッド染色で線維化の増加が、LT4 投与の I/R 腎臓で認められた。

I/R による TR $\beta$  の発現誘導が近位尿細管上皮細胞で特に有意にみられていたことから、薬剤誘導型の近位尿細管上皮細胞特異的なコンディショナル KO マウス TR $\beta$  cKO マウスを作成した。TR $\beta$  cKO マウスでは、LT4 投与により野生型マウスと同様に甲状腺ホルモンの上昇がみられるが、LT4 投与群においても I/R による腎機能障害は認められなかった。また、過剰な甲状腺ホルモンによる ARG2、ROS、P-MLKL の増加は認められなかった。

#### 【考察・結論】

虚血再灌流により尿細管上皮細胞では TR $\beta$  の発現が増加しており、LT4 投与による過剰な甲状腺ホルモンは、尿細管上皮細胞における ARG2 の発現を増加させ ROS の蓄積の原因となる可能性がある。過剰な ROS の蓄積は尿細管上皮細胞のネクローシス・細胞死を誘導して腎機能障害を悪化させる。甲状腺機能低下症患者に対しての過剰な甲状腺ホルモンの補充は虚血再灌流下にある細胞において ROS の蓄積を増加させ臓器障害を増悪させる可能性があり、適切な投与の開始と慎重な投与量の調節が必要である。

## 論文審査結果の要旨

慢性腎臓病 (CKD) において甲状腺機能異常が腎機能悪化の危険因子となる可能性が報告されている。CKD では甲状腺ホルモン代謝異常の合併により T3、T4 が低下することがあるが、このような症例に

においてレボチロキシンを積極的に投与すべきかについての介入研究の結果は確立しておらず、甲状腺ホルモンの腎保護効果は明らかになっていないと言える。一方、多くの CKD は動脈硬化を背景としており慢性的な虚血・再灌流によって尿細管細胞死を惹起し次第に腎機能が低下していくことになる。そこで本研究では虚血再灌流下にある尿細管細胞における甲状腺ホルモン (T3) -甲状腺ホルモン受容体 (TR $\beta$ ) の作用、細胞保護/障害の効果について検討された。マウスの片側腎動脈の虚血再灌流モデルにおいてレボチロキシン投与群と対照群を比較したところ、投与群では尿細管障害、ネクロトーシスが増悪していることが判明した。また TR $\beta$  に加えアルギナーゼ 2 (ARG2) にも着目し、近位尿細管細胞特異的 TR $\beta$  ノックアウトマウスを用いて検討したところ、TR $\beta$ 、ARG2 ともに虚血再灌流下では活性酸素による尿細管障害に大きな役割を果たしていることが判明した。また過剰な甲状腺ホルモンの投与は尿細管障害をさらに悪化させる可能性が示唆された。以上より甲状腺機能低下を呈した CKD 症例において、過剰な甲状腺ホルモンの補充は腎機能障害を増悪させる懸念があり、慎重な投与量の調整の必要性が示唆された。

本研究は T3、T4 値の低下した CKD 症例に対して甲状腺ホルモンを投与すべきか否かという極めて臨床的な疑問から研究が始まり、慢性虚血腎において TR $\beta$  と ARG2 が活性酸素を介した近位尿細管障害に大きな役割を果たすという機序の解明にまで到達し、過剰な甲状腺ホルモンの補充は慎重にすべきという知見が得られた。これらの点で学術的にも臨床的にも極めてインパクトの高い研究成果と考えられその意義は大きい。

研究方法及びデータの信頼性については、統計学的な処理も含めて何ら問題ないと考える。今回の研究結果はすでに英文論文にまとめられ *Endocrine Journal* に掲載されており、医学博士論文としての質を十分に満たしていると評価できる。