

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	箸方 厚之
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
微細な慢性炎症が慢性腎臓病の発症および進展に及ぼす影響に関する研究			
論文審査担当者			
主査	教授	浅野 知一郎	印
審査委員	教授	谷本 幸太郎	
審査委員	准教授	鎌田 英明	
〔論文審査の要旨〕			
<p>歯周病はこれまで局所の慢性感染症と考えられてきたが、歯周病原細菌 <i>Porphyromonas gingivalis</i> に対する血清 IgG 抗体価と末梢血中 CRP 濃度が正の相関を示すことや、重度歯周病を併発した2型糖尿病患者に歯周治療を行った場合、治療後に高感度 CRP 値が有意に低下していることから、歯周病は単なる局所感染としてのみでなく軽微な慢性炎症を全身的に惹起すると捉えられようになった。重度歯周病による炎症反応によって、活性化されたマクロファージから種々の炎症性サイトカインが産生されることによって、歯周病が糖尿病や心血管系疾患などの全身疾患に影響を及ぼすことが明らかにされつつある。</p> <p>近年、慢性腎臓病（CKD: Chronic kidney disease）の原因・病態が注目されている。この理由としては、腎透析や腎移植を必要とする末期腎不全患者数が急激に増加していること、腎透析患者の生命予後が不良であること、CKD に有用なバイオマーカーがないこと、そして CKD が心血管疾患の強力なリスク因子であることが挙げられる。さらに、諸外国および本邦において、CKD の患者数は数年前と比較して、明らかな増加傾向にある。CKD を引き起こす主な疾患は、糖尿病性腎症（腎症）であり、CKD 患者全体の 40% 以上を占めている。腎症の原因として、高血糖に基づく代謝異常が示唆されてきた。しかしながら、CKD の発症・進行の機序を高血糖に基づく代謝異常のみで説明するのは困難である。</p> <p>これまでに腎症の進行に伴い、糸球体間質細胞であるメサンギウム細胞からの基質産生が増加し、メサンギウム細胞の周囲に蓄積することによって、尿細管間質の線維化やろ過率の減少などの腎機能の低下が引き起こされることが報告されている。一方、腎症患者の病理組織において、糸球体や間質に多量のマクロファージが浸潤している。さらに、CKD 患者では重篤な歯周病罹患が多いとの疫学研究がある。これらのことは炎症と CKD の発</p>			

症・進行との関連の可能性を示唆する。

そこで、炎症とCKDの関連性についての分子基盤を明らかにするために、軽微な慢性感染を想定した低濃度LPS刺激を加えたメサンギウム細胞とマクロファージの共培養系におけるサイトカインの発現動態と発現遺伝子の変化を解析した。さらに、発現が有意に上昇した特定の分子について、CKDとの関連を疫学的に調べた。

マウス糸球体メサンギウム細胞株 CRL-1927 とマウスマクロファージ由来細胞株 RAW 264.7を用いた。両細胞を液性因子のみが移動可能なトランスウェルシステムで共培養し、両細胞を *E. coli*. LPS (1ng/ml) 刺激後、0, 4, 8, 12, 24 時間後のメサンギウム細胞と培養上清を回収した。mRNA を精製後、DNA マイクロアレイ法によって各時間におけるメサンギウム細胞の遺伝子発現を解析し、発現遺伝子群を LPS 未刺激の細胞と比較した。発現が明らかに亢進しているものを抽出し、リアルタイム PCR 法、ELISA 法によって遺伝子発現とタンパク産生量を検証した。

淀川キリスト教病院における33歳～82歳(平均年齢: 55.98 ± 9.34)の428人の成人健診受診者を対象に同病院の倫理委員会の承認後、同意の得られた被験者について血液・生化学検査を行った。統計解析はSPSS社のソフトウェアを用いて解析した。

LPS 刺激下メサンギウム細胞-マクロファージ共培養系におけるメサンギウム細胞で、LPS 未刺激の場合と比較して様々な遺伝子の発現が変動した。その中でも腎疾患との関連が指摘されている *Lipocalin2* (*Lcn2*)や *Cxcl5* などの炎症性ケモカイン産生に関与する遺伝子発現が亢進し、タンパク産生量も顕著に増加した。また、共培養系に LPS および TNF- $\alpha$  刺激を加えると、LPS 単独刺激、TNF- $\alpha$  単独刺激の場合と比較して、*Lcn2* の遺伝子発現が亢進した。

ヒト血中 LCN2 濃度はクレアチニンと正の相関関係を、推算糸球体濾過量 (eGFR) と逆相関関係を示した。また全被験者臨床血液データにおいて LCN2 濃度とクレアチニン、eGFR, WBC, sTNF-R2, 尿酸値が有意に相関した。

軽微な慢性炎症によって活性化されたマクロファージが腎組織に浸潤し、その結果、種々の炎症性サイトカイン産生量が増加し、さらなるマクロファージ浸潤が生じ、炎症が増悪することでCKDが進行すること、および LCN2 は TNF シグナルを介して産生が促進される可能性が示唆された。LCN2 ノックアウトマウスでは、CKD の進行が抑制されることが報告されている。したがって、LCN2 はこれまで考えられてきた単なる尿細管細胞傷害マーカーとしてだけでなく、CKD の進行程度を示すマーカー候補因子であると考えられた。

以上の結果から、本論文は、軽微な慢性炎症により活性化したマクロファージが腎組織に浸潤し、CKD が進行する可能性、また、軽微な炎症刺激によって惹起される腎障害の程度を示すマーカー候補因子 LCN2 の有用性を示唆した点において高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(歯学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

