



Effects of inflammatory substances and growth factors on albumin secretion in primary cultured rat hepatocytes : possible roles for hypoalbuminemia in hemodialysis patients

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小田巻, 眞理 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1207

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 354号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏名	小田巻 眞 理		
論文題目	Effects of inflammatory substances and growth factors on albumin secretion in primary cultured rat hepatocytes: possible roles for hypoalbuminemia in hemodialysis patients (初代培養ラット肝細胞におけるアルブミン分泌に対する炎症性物質および成長因子の関与：血液透析患者の低アルブミン血症に対する役割について)		

博士(医学) 小田 巻 眞 理

論文題目

Effects of inflammatory substances and growth factors on albumin secretion in primary cultured rat hepatocytes: possible roles for hypoalbuminemia in hemodialysis patients

(初代培養ラット肝細胞におけるアルブミン分泌に対する炎症性物質および成長因子の関与：血液透析患者の低アルブミン血症に対する役割について)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

本邦の血液透析患者は20万人まで増加しているが、現在も生命予後は不良であり、死亡率は健常人の数倍高い。生命予後に最も影響する因子の1つは低アルブミン血症であるが、その成因については明らかになっていない。近年、血液透析患者において血中CRP濃度と血清アルブミン値とが有意に逆相関することが報告されており、炎症反応が血液透析患者の低アルブミン血症に何らかの役割を果たしている可能性が示唆されている。培養肝細胞において、炎症性サイトカインおよび成長因子が急性炎症反応物質の産生に直接作用することが報告されているが、アルブミン産生にどの程度関与しているかは明らかでない。今回初代培養ラット肝細胞を用い、血液透析患者における低アルブミン血症の原因を検索する目的で、血液透析患者血清中に上昇がみられる炎症物質ならびに尿毒性物質がアルブミン分泌に及ぼす直接作用を検討した。

〔材料ならびに方法〕

雄性SDラット(5-6週齢)の肝臓を *in situ* にて門脈から0.05%コラゲナーゼ含有液で灌流により単離肝細胞を得た。肝細胞は、 24×10^4 cells/ml で24wellのコラーゲンコートプレートに蒔いた後、牛胎児血清(FBS)10%、インスリン 10^{-9} M、デキサメタゾン 10^{-9} 、L-グルタミン200mM、ペニシリン125U/ml、ストレプトマイシン125 μ g/mlを含むWilliams' medium Eで培養した。4時間後にFBSを含まない同液と交換し、アプロチニン 5×10^{-7} g/mlを加えた。同時に膠質浸透圧に影響するデキストランおよびbovine serum albumin(BSA)(0-8g/dl)、炎症性サイトカインのinterleukin(IL)-6(0-10ng/ml)、tumor necrosis factor(TNF)- α (0-10ng/ml)、IL-4(0-10ng/ml)、IL-12(0-10ng/ml)、成長因子であるhepatocyte growth factor(HGF)(0-10ng/ml)、epidermal growth factor(EGF)(0-10ng/ml)、insulin-like growth factor(IGF)-I(0-10ng/ml)を培養液中に添加した。20時間培養後にPBSで2回洗浄し、新たな培養液に交換後、6時間に培養液内に分泌されたアルブミンをELISA法にて測定した。分泌されたアルブミン濃度を細胞数で補正するため、wellに接着した細胞を1N NaOHに溶解し、Bradford法にて総蛋白量を測定した。また、近年新しい炎症性マーカーとして注目されるプロカルシトニン(0-10ng/ml)および尿毒性物質であるインドキシル硫酸(0-100ng/ml)のアルブミン分泌への影響も検討した。すべてのデータは平均 \pm SDで表した。また、それぞれのラットでアルブミン分泌量が異なるため、アルブミン分泌量は対象物質を添加しない状態での分泌量を100%として示した。用量依存性はJonckheere's検定、多群間の比較はScheffe's検定を用い、 $p < 0.05$ をもって有意とした。

〔結果〕

デキストランおよびBSAは、従来の報告と同様、アルブミン分泌量を有意に用量依存性に減少させ、

8g/dl の添加でそれぞれ対照群の $34 \pm 13\%$ 、 $2 \pm 1\%$ まで低下させた。

炎症性サイトカインの IL-6 は、アルブミン分泌量を用量依存性に減少させ、10ng/ml で対照群の $63 \pm 7\%$ と有意に低下させた ($p < 0.01$)。TNF- α も、アルブミン分泌量を用量依存性に減少させ、10ng/ml で対照群の $85 \pm 5\%$ まで有意に低下させた ($p < 0.05$)。一方、IL-4 と IL-12 の添加は、全ての濃度においてアルブミン分泌に対して影響しなかった。HGF は肝細胞からのアルブミン分泌量を用量依存性に増加させ、対照群に比して10ng/ml では $141 \pm 8\%$ と有意に上昇させた ($P < 0.01$)。EGF も、10ng/ml で対照群の $133 \pm 7\%$ までアルブミン分泌を増加させた ($P < 0.01$)。プロカルシトニンは、肝細胞からのアルブミン分泌量を用量依存性に有意に増加させ、10ng/ml において対照群の $117 \pm 7\%$ まで増加させた ($p < 0.01$)。また、プロカルシトニン100ng/ml および $1 \mu\text{g/ml}$ を IL-6 と同時に添加すると IL-6 (10ng/ml) によるアルブミン分泌低下作用 ($55 \pm 5\%$) をそれぞれ $72 \pm 9\%$ 、 $87 \pm 3\%$ まで有意に改善させた ($P < 0.01$)。インドキシル硫酸は、アルブミン分泌量を用量依存性に有意に増加させ、100ng/ml において対照群の $132 \pm 18\%$ まで増加させた ($P < 0.01$)。インドキシル硫酸 (100ng/ml) を IL-6 に同時に添加すると、IL-6 (10ng/ml) 単独添加 ($55 \pm 5\%$) に比して $84 \pm 9\%$ と有意にアルブミン分泌量を上昇させた ($p < 0.01$)。

[考察]

今回の検討では、IL-6、TNF- α がアルブミン分泌抑制的に作用すること、HGF、EGF、プロカルシトニン、インドキシル硫酸はアルブミン分泌促進的に作用することが明らかとなった。TNF- α に比し IL-6 が肝細胞からのアルブミン分泌を強力に抑制したこと、および血液透析患者では血中 IL-6 濃度が健常人の数倍上昇していることより、IL-6 が低アルブミン血症の成立に中心的な役割を果たしている可能性があると思われた。HGF は IL-6 の遺伝子発現を直接抑制することが知られているほか、血液透析患者では血中 HGF 濃度が上昇し、血中 CRP 濃度と正相関することから、血液透析患者における高 HGF 血症は炎症性物質によるアルブミン産生抑制に対して拮抗的に作用する可能性があると考えられた。同様に、早期炎症性物質のプロカルシトニンはアルブミン分泌を増加させ、IL-6 によるアルブミン分泌抑制効果を減弱させたことより、プロカルシトニンも IL-6 作用に拮抗して低アルブミン血症出現に対して予防的に働く可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者は栄養士であり、修士論文では脂質代謝や栄養指標について研究したが、本学大学院では血液透析患者の栄養状態に着目して研究を行った。血液透析患者は約20万人くらいいるが、何年来も生命予後が不良のままである。摂取食事カロリー、蛋白量に差のない患者群において、血清アルブミンが 3.6g/dl 以下の患者は以上の患者よりも生命予後が悪いことから、低アルブミン血症は予後不良の因子と考えられる。では、なぜ血液透析患者で低アルブミン血症になるのだろうか。炎症性サイトカインのいくつかはアルブミン合成を抑制することは知られている。また、IL-6 や TNF- α などは血液透析患者の血清中で高値を示す。そこで、血液透析患者が低アルブミン血症をきたす原因を明らかにするために、申請者は初代培養ラット肝細胞を用い、種々の炎症性サイトカイン、成長因子、尿毒性物質などが単独、もしくは共同でアルブミン分泌量に及ぼす影響を検討した。

雄性 SD ラットから作成した初代培養肝細胞をコラーゲンコートプレート上で培養し、種々の物質を加えて、培養液中に分泌されたアルブミン量を測定し、その時の総蛋白量で補正した。また、ラット間差

を補正するため、対象物質を添加しない状態でのアルブミン分泌量を100%として表した。

膠質浸透圧に関係するデキストランはアルブミン分泌量を用量依存性に減少させた。IL-6、TNF- α も用量依存性にアルブミン分泌量を減少させたが、前者の方がその作用は強かった。HGF、EGF、プロカルシトニン、インドキシル硫酸は用量依存性にアルブミン分泌量を増加させた。なお、プロカルシトニン、インドキシル硫酸はIL-6と一緒に加えると、IL-6によるアルブミン低下作用を軽くした。

以上より、血液透析患者における低アルブミン血症の原因として、IL-6が中心的な役割を果たすこと、HGF、EGFなどの成長因子はIL-6などの炎症性サイトカインによるアルブミン産生抑制作用に対して、拮抗的に働くことが判明した。また、急性相反応タンパクと考えられるプロカルシトニンや尿毒性物質のインドキシル硫酸もIL-6によるアルブミン産生抑制に拮抗的に働くことが明らかとなった。

審査委員会では、血液透析患者における低アルブミン血症の原因解明のために、従来個々には報告されていた原因物質の相互作用にも着目して実験条件を設定し、その解明をしたこと、また新しい炎症性マーカー、尿毒性物質の作用も明らかにしたことから、このテーマにおける研究を着実に前進させたものと評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

1. 透析することによって、なぜサイトカイン濃度が上昇するのか
2. サイトカイン濃度と透析期間、腎クリアランスとの関係はどうか
3. サイトカイン濃度の保存期腎不全患者と透析患者との違い
4. 透析で減少するサイトカインは、なぜ減少するのか
5. 可溶性TNF-Rの2種類の分子はどのようにして生成されるのか、構造の違いは
6. サイトカイン、アルブミン濃度は、透析になった原因別に分けるとどうか
7. なぜ、初代培養ラット肝細胞を使用したか
8. 培養、およびアルブミン濃度測定のためのサンプリング条件について
9. アルブミン濃度補正のために総蛋白量を用いた理由
10. 培養液に添加したサイトカイン濃度の設定理由
11. プロカルシトニンについて(構造、機能、役割)
12. プロカルシトニンを研究対象に含めた理由
13. データ解析の統計処理法
14. アルブミン遺伝子のプロモーター領域の構造、および核内転写因子との関連
15. 透析患者における核内転写因子量について
16. 組織中のサイトカイン濃度について
17. 透析膜の種類によってサイトカイン、アルブミンの濃度は異なるか
18. 今後の研究の進展に向けての研究方針について
19. 本研究成果の栄養学への応用について

これらの質問に対して申請者の解答はほぼ適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 前川 真人
副査 中村 浩淑 副査 鈴木 和雄