

氏 名 (本籍)	石 <sup>いし</sup> 垣 <sup>がき</sup> 直 <sup>なお</sup> 美 <sup>み</sup> (神奈川県)		
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 4764 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	<b>Involvement of glomerular SREBP-1c in diabetic nephropathy</b> (糸球体において SREBP-1c は糖尿病腎症に関与する)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	久 武 幸 司
副 査	筑波大学准教授	医学博士	小 島 寛
副 査	筑波大学准教授	博士 (医学)	楊 景 堯
副 査	筑波大学講師	博士 (医学)	酒 井 俊

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

高脂血症が糖尿病腎症悪化の一因となること、酸化 LDL, lipoprotein ( $\alpha$ ) がメサングウム細胞の形質転換・基質増加をひき起こすことから、脂質代謝系の破綻が腎機能に対し悪影響を及ぼすことが示唆される。

SREBP-1 (sterol regulatory element binding protein-1) は脂質合成に中心的な役割をもつ転写因子であり、糖尿病腎症あるいは肥満に高脂血症を合併した際の腎障害において、病態に影響を及ぼすことが推測される。SREBP-1c は分化した臓器での主要な SREBP アイソフォームであり、SREBP-1c が糖尿病腎症にどのように関わっていくのかを検討した。

### (対象と方法)

PEPCK promoter を用いた h-SREBP-1c トランスジェニックマウスの尿中微量アルブミン、尿中および腎臓ミトコンドリア中 8-OHdG, 腎臓トリグリセリド含量を測定、腎臓病理所見 (PAS, PAM) を検討した。腎臓・糸球体 RNA を採取し Northern blotting, real-time PCR をおこなった。STZ 注射により高血糖を誘導し、同様に解析をおこなった。SREBP-1 ノックアウトマウスについて同様に解析をおこなった。

*In vitro* では、マウス培養メサングウム細胞 (MES13) に遺伝子組み換えアデノウイルスを用いて SREBP-1c を強制発現させ、Northern blotting, real-time PCR により遺伝子変化をみた。

### (結果)

h-SREBP-1c トランスジェニックマウスにおいて、尿中微量アルブミン値の増加をみとめた。糖尿病モデル動物 (STZ ラット) で増加が報告される酸化ストレスマーカー 8-OHdG は、尿中および腎臓ミトコンドリアで増加した。腎糸球体病理所見ではメサングウム基質の増加をみとめた。腎臓 Northern blot では h-SREBP-1c の発現と、糸球体細胞外基質増殖因子 TGF  $\beta$  1 の発現増加、糸球体 real-time PCR では h-SREBP-1c 及びその下流遺伝子 FAS, SCD1 発現増加, TGF  $\beta$  1 および糸球体細胞外マトリックス type 4 collagen  $\alpha$  1, fibronectin のメッセージ増加を確認した。また、腎臓における主要な活性酸素産生源である NADPH oxidase 細胞質分画 (p47phox, p67phox) およびその転写促進因子 PU.1 のメッセージは h-SREBP-1c トランスジェニッ

クマウスの糸球体において増加していた。

次に STZ 注射により糖尿病を誘導したところ、STZ 群の糸球体において、内因性 SREBP-1c および h-SREBP-1c トランスジェニックの増加がみられた。

一方 SREBP-1 ノックアウトマウスにおいては、STZ 注射により糖尿病を誘導した際の尿中微量アルブミンおよび 8-OHdG の増加が抑制された。

*In vitro* の検討では、マウスの培養メサンギウム細胞 MES13 に遺伝子組み換えアデノウイルスを用い SREBP-1c を強制発現させると、ウイルス量に比例した TGF  $\beta$  1, p47phox, PU.1 の mRNA の増加がみられた。(考察)

糸球体で SREBP-1c が発現している SREBP-1c トランスジェニックマウスにおいて糖尿病腎症に似た病理・遺伝子発現パターンをみとめた。SREBP-1c が糸球体で活性化すれば糖尿病腎症を悪化させる作用を持つことが示唆された。SREBP-1c トランスジェニックマウスの糸球体障害の進行機序として PU.1/NADPH oxidase を介した酸化ストレス亢進が想定された。

糖尿病モデルマウスの SREBP-1c をノックアウトすることにより、腎臓の酸化ストレスおよびアルブミン尿の増加が抑制されたことから、SREBP-1c が糖尿病腎症進展に関与することが強く示唆された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、脂質合成に中心的な役割をもつ転写因子 SREBP-1 (sterol regulatory element binding protein-1) のアイソフォーム SREBP-1c が糖尿病腎症にどのように関与するかを明らかにする目的で行われた。著者は、PEPCK promoter を用いた h-SREBP-1c トランスジェニックマウスと SREBP-1c ノックアウトマウスをモデル系として、多方面の解析を行った。具体的には各マウスモデル系において、尿中微量アルブミン、尿中および腎臓ミトコンドリア中 8-OHdG、腎臓トリグリセリド含量、腎臓病理所見 (PAS, PAM) などについて測定および検討を行った。さらに、腎臓・糸球体 RNA を採取し Northern blotting, real-time PCR を行った。また、STZ 注射によりモデルマウスに高血糖を誘導し、同様に解析をおこなったのみならず、SREBP-1c の転写因子としての作用を *in vitro* 培養系にても検討を加えている。

以上の実験より、トランスジェニックマウスにおいて、尿中微量アルブミン値の増加、酸化ストレスマーカー 8-OHdG の尿中および腎臓ミトコンドリアでの増加、また腎糸球体病理所見としてメサンギウム基質の増加をみとめた。また、h-SREBP-1c, TGF  $\beta$  1, FAS, SCD1, type 4 collagen  $\alpha$  1, fibronectin, p47phox, p67phox, PU.1 などの発現上昇が観察された。STZ 誘導糖尿病マウスでは、内因性 SREBP-1c および h-SREBP-1c トランスジェニックの発現増加が起こった。その一方、SREBP-1c ノックアウトマウスでは、STZ で糖尿病を誘導しても、尿中微量アルブミンおよび 8-OHdG の増加は観察されなかった。培養細胞の実験から、h-SREBP-1c がこれらの因子の発現上昇に直接関与することが強く示唆された。

これらの結果より、SREBP-1c が糖尿病腎症に似た病理・遺伝子発現パターンを引き起こして糖尿病腎症進展に関与する可能性が明らかとなり、特に PU.1/NADPH oxidase を介した酸化ストレス亢進の関与が示唆された。

以上の結果は、SREBP-1c の糖尿病腎症への関与を明らかにしたのみならず、その機序についても重要な知見を提供しており、高く評価される。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。