【212】

氏名（本籍）	星（ほし）　佐知（さち）（東京都）
学位の種類	博　士（医　学）
学位記番号	博甲第 2920 号
学位授与年月日	平成14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	医学研究科
学位論文題目	The role of podocyte injury in progressive diabetic nephropathy：analysis of *in vivo* and *in vitro* （糖尿病性腎症の進展における糸球体上皮細胞傷害の役割について：*in vivo*, 及び *in vitro* における解析）
主査	筑波大学教授　医学博士　高橋　智
副査	筑波大学教授　医学博士　小山哲夫
副査	筑波大学講師　医学博士　内田克紀
副査	筑波大学講師　医学博士　鴨田和博

論文の内容の要旨

（目的）

糖尿病性腎症の進展のメカニズムを解明するため，Ⅱ型糖尿病に病態が類似し，糸球体硬化が進行する自然発症モデル動物であるZucker Diabetic Fatty（ZDF-*fa/fa*）ラットを用いて，①経時的に糖尿病性腎症の進行過程を解析した。次に②angiotensin-converting enzyme（ACE）阻害剤であるenalaprilを用いて，その腎症進行に対する治療効果を検証した。その結果，本モデルの糖尿病性腎症の進行に糸球体上皮細胞（podocyte）傷害の関与が示され，enalapril投与により糸球体傷害の進展が抑制されたことより，angiotensin Ⅱ（AⅡ）と高糖刺激によるpodocyte細胞株（SV40トランスジェニックマウスから確立された不死化podocyte細胞株）への直接的な影響を検証した。さらに糖尿病性腎症の蛋白尿に至る機序の一つに，podocyte由来のVEGF産生増加により透過性亢進などの糸球体濾過異常が背景にあることを想定し，③podocyte細胞株の高糖刺激によるVEGF産生のメカニズムについて検討した。

（対象と方法）

1．ZDF-*fa/fa*ラットにおける腎障害の進展過程を糸球体濾過値（GFR），蛋白尿，糸球体硬化，desmin染色，糸球体サイズ，及び，fibronectin，type Ⅳ collagen，VEGF各mRNA発現について経時的（3，5，7，9ヵ月齢）に調べ，糸球体のcyclin kinase inhibitor，p21，p27，p57の発現を検討した。また，podocyte細胞株の高糖刺激による^{3}H-thymidine，^{3}H-leucinの取り込み，p27の発現の変化を調べた。

2．4ヵ月齢のZDF-*fa/fa*ラットにenalaprilを10mg/kg/day混餌投与し，16週間後に方法1の各指標に対する作用を検討した。さらに，podocyte細胞株を用い，AⅡtype1（AT1）受容体mRNAの発現を確認し，AⅡ刺激における^{3}H-thymtdine，^{3}H-leucinの取り込み，及び，p27の発現を調べ，これらに対するAT1受容体拮抗薬，losartanの作用を検証した。

3．Podocyte細胞株を用いて高糖刺激によるVEGF mRNAと蛋白の発現を調べ，その増加のメカニズムをPKC阻害剤，GF1020903XとMEK阻害剤，PD98059を用いて検証した。

（結果と考察）

1．ZDF-*fa/fa*ラットは対照ラット（ZDF-lean）に比較し，4ヵ月齢から血中インスリン値が低下し，糖尿病を発症し，5ヵ月齢でGFRと尿中蛋白排泄量が増加し，7ヵ月齢で体重は低下した。病理組織学的にはメサンギウム領域の軽度な拡大とともにpodocyte傷害が認められ，5ヵ月齢より糸球体硬化，desmin染色スコアと糸球体サイズが増加し，fibronectin，type Ⅳ collagen，VEGF各mRNAは経時的に増加した。p21とp27は5ヵ月齢で増加していたが，p57は変化なかった。podocyte細胞株は，高糖刺激により^{3}H-leucinの取り込みとp27の発現が増加し，同時に細胞肥大を認めた。

以上より，ZDF-*fa/fa*ラットは，Ⅱ型糖尿病に類似した病態とpodocyte傷害に因する糸球体障害の進展を呈し，Ⅱ型糖尿病による腎障害の進展を解明する上でよい実験動物モデルであると考えられた。

2．Enalapril投与により，血中インスリン値，体重，血糖値，平均血圧に影響なく，尿中蛋白排泄量，fibronectinとVEGF mRNAの増加が抑制された。Enalaprilは糸球体硬化，desminスコアの増加を抑制し，腎症進展抑制硬化とpodocyte傷害の改善を認め，糸球体におけるp27の発現増加を抑制した。さらにpodocyte細胞株において，AT1受容体の発現が認められ，AⅡ刺激により^{3}H-leucinの取り込みとp27の発現が増加し，losartan処理によりそれらの作用は抑制された。

以上より，ACE阻害剤は，ZDF-*fa/fa*ラットにおいて，糸球体過剰濾過に対する作用を介さずに糖尿病性腎障害の進行を抑制し，AⅡは培養podocyteに対して，細胞肥大等，細胞ストレス等の直接作用を有することが示唆された。これより，ZDF-*fa/fa*ラットにおけるACE阻害薬による腎障害進展抑制のメカニズムの一つにrenin-angiotensin system（RAS）を介するpodocyteの傷害を抑制する経路があるものと考えられた。

3．Podocyte細胞株において，高糖刺激やPMA刺激はVEGF mRNAと蛋白の発現を増加させた。このとき，PKC（分子種はPKC α，β Ⅱ）とERKの活性が増加した。GF109203X及び，PD98059は，高糖刺激やPMA刺激によるAP-1転写活性やVEGF産生増加を阻害した。

以上より，糖尿病性腎症の進行に影響すると考えられるVEGFのpodocyteにおける産生は，高糖刺激によるPKC，ERKの活性化を介し，産生が促進される経路がある可能性が示唆された。

（結論）

Ⅱ型糖尿病モデルのZDF-*fa/fa*ラットにおいて，ACE阻害剤が糖尿病性腎障害の進行を抑制したメカニズムの一つに，RASを介するpodocyteの障害を抑制した可能性が，*in vivo*と*in vitro*で示唆された。また，糖尿病性腎症の初期に認められるpodocyteのVEGF産生増加を*in vitro*で確認し，高糖刺激により活性化されるPKC，ERK経路により産生が促進された。

審査の結果の要旨

著者提出の論文は，新しい糖尿病のモデルマウスであるZucker Diabetic Fatty（ZDF-*fa/fa*）ラットの解析を通じて明らかになった点を株化podocyteを用いてより純粋な系で解析し，糖尿病性腎症の発症機構を分子レベルまで踏み込んで解析したものであり，糖尿病性糸球体硬化症におけるpodocyteの重要性を明らかにした点で，優れた論文と言える。ZDF-*fa/fa*ラットの糸球体硬化が，ヒトの糖尿病に認められる硬化像がメサンギウム領域を中心として認められるのと異なり，糸球体毛細血管の上皮側から形成される点は，ヒトとラットとの血行動態の違いや代謝動態の違い，あるいは発症機序の違いのいずれを反映しているものなのかは，今後検討されなければならない課題ではあるが，研究内容としては非常に優れている論文であると考えられた。

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。