【210】

氏　名（国籍）	王（おう）　瑩（えい）（中　国）
学位の種類	博　士（医　学）
学位記番号	博　甲　第　3470　号
学位授与年月日	平成16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	**Stimulatory effect of IGF-I and VEGF on eNOS expression, Akt/PKB, eNOS phosphorylation and nitric oxide production in rat glomeruli and the involvement of PI3-K signaling pathway** （ラット糸球体において，IGF-I 及び VEGF は PI3-K signaling pathway を介して eNOS の発現及び Akt/PKB, eNOS の燐酸化を促進し，一酸化窒素産生を増加させる）

主　査	筑波大学教授	医学博士	原　　晃
副　査	筑波大学教授	医学博士	長　田　道　夫
副　査	筑波大学客員教授 （山之内製薬株式会社研究企画部）	薬学博士	四　釜　久　隆
副　査	筑波大学助教授	医学博士	本　間　敏　明

論文の内容の要旨

（目的）

糖尿病性腎症初期における糸球体過剰濾過は糖尿病性腎症の進行，増悪に重要な役割を果たしている。nitric oxide（NO）の増加が糖尿病性腎症糸球体過剰濾過の一因として注目されている。一方，糖尿病性腎症で発現が増えると言われている insulin like growth factor-I（IGF-I）と vascular endothelial growth factor（VEGF）はいずれも endothelial NO synthase（eNOS）の発現に関与するとの報告はあるが，腎において直接に NO の産生を増加させることを示した報告はない。本研究の目的は，1）IGF-I，VEGF が直接的に糸球体で NO 過剰産生を惹起するか。2）糸球体で IGF-I，VEGF による NO 過剰産生はどの NOS isoform によるものか。3）phosphatidylinositol 3-kinase（PI3-K）signal pathway が IGF-I，VEGF による eNOS 発現に関与するか。4）proteinkinase B（Akt）signaling pathway が IGF-I，VEGF によるラット糸球体 NO 過剰産生に関与するか否かを検討することである。

（対象と方法）

1）IGF-I，VEGF による NOS 発現に及ぼす影響ならびに PI3-K の関与：単離した糸球体を 100ng/ml の IGF-I あるいは VEGF と 24 時間 incubate した。また，PI3-K inhibitor として wortmannin を 30 分間前処置し，100ng/ml の IGF-I あるいは VEGF と 24 時間 incubate した。eNOS，inducible NOS（iNOS），neuronal NOS（nNOS）の発現は western blot analysis で測定した。Medium 中の NO_2^- は蛍光法で測定した。eNOS mRNA の発現は半定量的 RT-PCR にて測定した。

2）IGF-I，VEGF による NO 過剰産生に及ぼす Akt/PKB signaling pathway の関与：単離した糸球体を 100ng/ml の IGF-I あるいは VEGF と 30 分間 incubate した。また，PI3-K inhibitor として wortmannin を，100ng/ml の IGF-I あるいは VEGF と 30 分間 incubate した。Akt/PKB，eNOS phosphorylation は western

blot analysis で測定した。さらに rapid NO release は電極法で測定した。

（結果）

1）IGF-I，VEGF はともに eNOS mRNA，蛋白発現を有意に増加させた。wortmannin はその増加を有意に抑制した。24 時間の incubation においては，nNOS についてはその発現はわずかであり，iNOS については発現が全く認められなかった。IGF-I，VEGF ともに NO_2^- 産生を有意に増加させ，wortmannin はその増加を有意に抑制した。

2）IGF-I，VEGF ともに Akt/PKB phosphorylation，eNOS phosphorylation を有意に増加させた。Akt/PKB phosphorylation の増加は 30 分でピークとなり，24 時間持続した。wortmannin は Akt/PKB phosphorylation を完全に抑制したが，eNOS phosphorylation は部分的に抑制した。IGF-I，VEGF ともに NO release を有意に増加させ，wortmannin はその release を有意に抑制した。

（考察）

IGF-I，VEGF によって過剰産生された NO_2^- は eNOS 由来であり，eNOS mRNA および蛋白の過剰発現によるものと考えられた。また，wortmannin は IGF-I，VEGF による eNOS 発現と NO 産生を抑制することが明らかとなった。IGF-I，VEGF による Akt/PKB phosphorylation は糸球体 eNOS phosphorylation，eNOS の増加に関与することが明らかとなり，IGF-I，VEGF による Akt/PKB phosphorylation は rapid response だけではなく，持続的な作用を有することが示された。従って，増加した内因性 IGF-I，VEGF は，糖尿病性腎症における NO 過剰産生に関与している可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

incubation 時間が 24 時間のみであり，長時間の incubation で iNOS が全く関わっていないかは断定し得ないが，単離糸球体を用いた，IGF-I，VEGF による Akt/PKB phosphorylation，eNOS phosphorylation さらには NO 産生を確認した初めての論文であり，糖尿病性腎症における内因性 IGF-I，VEGF の役割を示唆する極めて有用な論文であり，論理性にも優れている。

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。