

氏名	高島 康利		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第	7906	号
学位授与年月	平成 28年 6月 30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	Heparan Sulfate 6-O-EndoSulfatases, Sulf1 and Sulf2, Regulate Glomerular Integrity by Modulating Growth Factor Signaling		
	(ヘパラン硫酸 6-O-エンドスルファターゼは成長因子シグナル伝達を調整し糸球体構造と機能の維持に関与する)		
主査	筑波大学教授	医学博士	加藤 光保
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	高屋敷典生
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	古川 宏
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	臼井 丈一

論文の内容の要旨

高島康利氏の博士学位論文は、腎糸球体におけるヘパラン硫酸 6-O-エンドスルファターゼの機能を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

(目的)

腎臓糸球体では糸球体基底膜の構成要素としてヘパラン硫酸の役割が捉えられてきたが、ヘパラン硫酸は多種多様な成長因子と相互作用することで細胞分化や細胞増殖を制御することが報告されるようになった。ヘパラン硫酸糖鎖の6位の硫酸基を細胞外で選択的に分解する Endosulfatase1 (Sulf1)、Endosulfatase2 (Sulf2) によりヘパラン硫酸糖鎖の2位、N位、6位が硫酸化された三硫酸化二糖を多く含む領域で6位の硫酸基が脱硫酸化されると、ヘパラン硫酸と成長因子間の親和性が低下するため、Sulf1/2はヘパラン硫酸と成長因子の相互作用を調節することで、成長因子シグナル伝達を制御している。Sulf1/2は腎臓糸球体に発現しているが、その役割は十分に解明されていない。本研究は Sulf1/2 欠損マウスに糖尿病性腎症を誘導して、糸球体恒常性維持における Sulf1/2 の役割を解析した。

(対象と方法)

1. 遺伝子改変マウスを用いた実験

遺伝的背景を合わせた野生型マウス、*Sulf1* 単独欠損マウス(*Sulf1*^{-/-}、*Sulf2*^{+/+})、*Sulf2* 単独欠損マウス(*Sulf1*^{+/+}、*Sulf2*^{-/-})、*Sulf1*、*Sulf2* 両欠損マウス(*Sulf1*^{-/-}、*Sulf2*^{-/-} マウス)を使用して、*Sulf1/2* によるヘパラン硫酸糖鎖リモデリングが糸球体恒常性維持に関与するかを検討した。さらに、Streptozotocin 腹腔内投与により糖尿病性腎症モデルマウスを作製して糸球体障害の進展機序を解析した。

2. 遺伝子改変マウスから単離した糸球体を用いた実験

Sulf1/2 による糸球体内成長因子シグナル伝達制御を解明するために、*in vivo* のヘパラン硫酸構造を維持したマウス単離糸球体へ高濃度の成長因子を添加して、細胞内シグナル伝達経路の活性化を Western blot 法により評価した。

(結果)

Sulf1/2 欠損マウスでは腎臓糸球体機能障害が見られ、メサンギウム領域と糸球体基底膜の形態異常が出現した。野生型マウス由来の培養単離糸球体と比較して、*Sulf1*^{-/-}、*Sulf2*^{-/-} マウス由来の培養単離糸球体では Platelet derived growth factor-B (PDGF-B) や Vascular endothelial growth factor (VEGF), Transforming growth factor-β (TGF-β) で刺激後の細胞内シグナル経路の活性化が抑制されており、適切な成長因子シグナル伝達が阻害されていた。糖尿病発症 *Sulf1*^{-/-}、*Sulf2*^{-/-} マウスでは糖尿病性腎症病変が野生型マウスよりも増悪した。また、糖尿病を発症した野生型マウスでは、糸球体内で *Sulf1/2* 発現が増加しており、糖尿病発症 *Sulf1*^{-/-}、*Sulf2*^{-/-} マウスと比較して糸球体面積拡大や糸球体内成長因子シグナル伝達の下流因子である Akt のリン酸化の亢進が認められた。

(考察)

ヘパラン硫酸の 6 位の硫酸化はメサンギウム領域と糸球体濾過障壁の恒常性維持に不可欠である。*Sulf1*^{-/-}、*Sulf2*^{-/-} マウスで観察されたメサンギウム領域の増殖細胞は主に活性型メサンギウム細胞でありメサンギウム基質の増加も認められた。また、メサンギウム領域の恒常性維持に不可欠な PDGF-B や VEGF, TGF-β のシグナル伝達が抑制されており、*Sulf1/2* により酵素的修飾を受けたヘパラン硫酸が複数の成長因子シグナル伝達を制御することが示された。PDGF β receptor 構造改変マウスや糸球体内のポドサイトにおける VEGF 欠損マウスでもメサンギウム領域異常が報告されており、PDGF-B と VEGF の糸球体内シグナル伝達抑制が *Sulf1*^{-/-}、*Sulf2*^{-/-} マウスのメサンギウム病変出現に関与すると考えられた。糸球体内の成長因子シグナル伝達亢進により病変が進展する糖尿病性腎症モデルマウスでも、糸球体内の成長因子シグナル伝達調節機序における *Sulf1/2* の役割を検討した。糖尿病を発症した野生型マウスでは糸球体内の *Sulf1/2* 発現が亢進したが、糖尿病発症 *Sulf1*^{-/-}、*Sulf2*^{-/-} マウスのメサンギウム病変増悪と糸球体濾過機能障害が認められ、*Sulf1/Sulf2* は糖尿病性腎症進展に対して保護的に作用すると考えた。糖尿病を発症した野生型マウスでは糸球体肥大と糸球体における Akt のリン酸化亢進がみられたが、糖尿病発症 *Sulf1*^{-/-}、*Sulf2*^{-/-} マウスでは明らかでなかったため、糸球体内の成長因子シグナル伝達は *Sulf1/Sulf2* により促進されていると推察された。糖尿病環境において糸球体内 VEGF 発現低下が血管内皮細胞とメサンギウム細胞の障害を促進することが知られており、糖尿病発症 *Sulf1*^{-/-}、*Sulf2*^{-/-} マウスでみられた糖尿病性腎症増悪のメカニズムにも VEGF シグナル伝達の抑制が関与していると示唆された。しかし、糖尿病性腎症の増悪機序には成長因子シグナル伝達異常だけでなく Matrix metalloproteinase (MMP) の調節異常が関与しているため、*Sulf1/Sulf2* による MMP 制御についても検討が必要であると考えられる。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、腎糸球体の維持に Sulf1/Sulf2 が関与しており、Sulf1/Sulf2 の欠失は、腎障害の誘導並びに糖尿病性腎症の悪化をもたらすことを示した。また、Sulf1/Sulf2 は、ヘパラン硫酸の 6 位の硫酸基を脱硫酸化することでヘパラン硫酸による細胞増殖因子の増殖因子受容体への結合阻害を解除し、細胞増殖シグナルを正の制御を行っている可能性を示している。実験結果は明瞭で論文の論旨もしっかりしており論理的である。

平成 28 年 5 月 2 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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