

氏 名	寺井 健太郎
(ふりがな)	(てらい けんたろう)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲博医第22号
学位審査年月日	令和3年7月7日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Mechanism of Albuminuria Reduction by Chymase Inhibition in Diabetic Mice (糖尿病マウスにおけるキマーゼ阻害によるアルブ ミン尿の減少機序の解明)
論文審査委員	(主) 教授 朝日 通雄 教授 森 龍彦 教授 芦田 明

学位論文内容の要旨

《目的》

糖尿病性腎疾患(DKD)は、糖尿病の合併症の1つであり、糖尿病の罹患後10~15年以上経過してから発症することが多い。近年、DKDは増加の一途を辿っており、慢性糸球体腎炎にかわり血液透析導入の原因疾患の1位となっている。そのため、本病態の発症、進展の予防および治療法の確立が急がれている。

キマーゼは肥満細胞に発現するプロテアーゼであり、アンジオテンシン(Ang) IIやトランスフォーミング増殖因子(TGF)- β などの産生を介して心血管疾患や線維性病変に関与する可能性が示唆されてきた。臓側糸球体上皮細胞でアルブミンやグロブリンなどの高

分子蛋白質が尿中へ漏出するのを防いでいるポドサイトを用いた実験において、高血糖負荷がAng IIの産生促進を介してポドサイト傷害を起し、この傷害をアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬では止められず、キマーゼ阻害薬で有効だったと報告されている。また、DKD患者の糸球体においてキマーゼ発現の有意な増加も報告されている。しかし、DKDの発症および進展におけるキマーゼの役割は不明であったため、アルブミン尿を指標としてキマーゼ阻害薬の効果を検討すると共に作用機序を解析した。

《方 法》

雄性 6 週齢の 2 型糖尿病マウス（db/db マウス）の尿中アルブミン値、クレアチニン値および空腹時血糖値を測定し、これらが均等になるようにプラセボ投与群とキマーゼ阻害薬（TY-51469）投与群に分け、同週齢の db/m マウスを正常群とした。プラセボに生理食塩水、キマーゼ阻害薬として TY-51469（1 mg/kg/day）を浸透圧ポンプに入れて持続的に 4 週間皮下投与した。

実験開始 4 週後に摘出した腎臓におけるキマーゼ（MMCP-4）の遺伝子発現量および活性、腫瘍壊死因子- α （TNF- α ）、TGF- β 、ネフリンおよび NADPH oxidase（NOX）-4 の遺伝子発現量、酸化ストレスのマーカーであるマロンジアルデヒド（MDA）について評価した。また、腎臓の組織切片を用いて糸球体の形態学変化を PAS 染色で解析し、肥満細胞をトルイジンブルーにて染色した。そして、キマーゼおよびネフリンは、それぞれの抗体を用いて免疫染色を行った。

《結 果》

試験開始前の時点で体重および空腹時血糖値は、正常群に比してプラセボ投与群および TY-51469 投与群で有意に高値を示していたが、プラセボ群と TY-51469 群の間に有意差を認めず、試験終了時まで両群間に有意差を認めなかった。一方、試験開始前の時点で尿中アルブミン/クレアチニン比も正常群に比してプラセボ投与群および TY-51469 投与群で有意に高値を示していたが、試験開始 2 週間および 4 週間において経時的にプラセボ投

与群で増加したのに対し、TY-51469 投与群では増加を認めず、両時点でプラセボ投与群に比して TY-51469 投与群で有意な低下を認めた。

試験開始後 4 週の時点で腎臓のキマーゼ活性および遺伝子発現量は、プラセボ投与群で正常群に比して有意に高かったが、TY-51469 投与群で有意に抑制されていた。腎組織切片を用いた組織解析においても正常群に比してプラセボ群で肥満細胞数およびキマーゼ陽性細胞数が有意に増加し、TY-51469 投与群において減少していた。

酸化ストレス関連因子である NOX-4 の遺伝子発現量および MDA 値はプラセボ投与群で有意に増加し、TY-51469 投与群では有意に減少していた。また、炎症に関与する TNF- α および線維性病変に関与する TGF- β の遺伝子発現量はプラセボ群で有意に上昇し、TY-51469 投与群で有意に低下した。キマーゼの遺伝子発現量は、NOX-4、TNF- α 、TGF- β の遺伝子発現量とそれぞれ有意な正の相関を認めた。

PAS 染色による糸球体の形態学的解析では、すべての群で明らかな異常を認めなかった。しかし、ポドサイトで発現するネフリンの免疫染色では、プラセボ投与群で正常群に比して明らかな減少を認め、TY-51469 投与群で減少が抑制された。また、ネフリンの遺伝子発現量もプラセボ群で有意に減少し、TY-51469 投与群で有意に改善された。

《考 察》

今回用いた db/db マウスは、肥満を伴う 2 型糖尿病のモデルマウスであり、試験開始前の 6 週齢の時点で体重、空腹時血糖値、尿中アルブミン/クレアチニン比のすべてが正常群よりも増加していた。このことは投薬前において既に糖尿病を発症し、蛋白尿を呈していたことを示す。キマーゼ阻害薬投与による体重および空腹時血糖値に変化は認めなかったが、尿中アルブミン/クレアチニン比が有意に抑制されたことにより、キマーゼ阻害薬は血糖コントロールとは独立して腎障害の増悪を予防したと考えられた。

プラセボ群で増加した腎臓における酸化ストレス、炎症および線維化関連因子の遺伝子発現量がキマーゼ阻害薬の投与によって有意に改善され、しかもキマーゼの遺伝子発現量とそれぞれの遺伝子発現量は、有意な正の相関を認めた。このことはキマーゼが酸化スト

レス、炎症および線維化と密接に関連することを示唆する。また、アルブミン尿の出現と密接に関連するポドサイトに発現するネフリンがプラセボ群で有意に減少したのをキマーゼ阻害薬は改善した。このことは、キマーゼ阻害薬がポドサイトの傷害の抑制を介してアルブミン尿を減少させた可能性を示唆する。

《結 論》

糖尿病の進行に伴う DKD によるアルブミン尿は、腎臓局所で増加するキマーゼがポドサイト傷害を引き起こすことに起因し、キマーゼ阻害薬はそれを抑制することによりアルブミン尿を減少させることを明らかにした。キマーゼ阻害薬は、酸化ストレス、炎症、線維化の増加を抑制していることから、アルブミン尿の抑制だけでなく、DKD の増悪予防と治療に貢献できる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

糖尿病性腎疾患（DKD）は、増加の一途を辿っており、慢性糸球体腎炎にかわり血液透析導入の原因疾患の1位となっている。そのため、本病態の発症、進展の予防および治療法の確立が急務である。キマーゼは肥満細胞に発現するプロテアーゼであり、アンジオテンシン（Ang）IIやトランスフォーミング増殖因子（TGF）- β などの産生を介して心血管疾患や線維性病変に関与する可能性が示唆されてきたが、DKDの発症・進行におけるキマーゼの役割は不明であった。

本研究で用いた2型糖尿病マウスは、実験開始時に血糖値と尿中アルブミン/クレアチニン比が既に増加していた。キマーゼ阻害薬は血糖値に影響しなかったが、尿中アルブミン/クレアチニン比を有意に改善した。また、糖尿病マウスの腎組織ではキマーゼの発現が増加し、酸化ストレス、炎症、線維化に関連する因子の発現も有意に増加し、キマーゼとこれらの因子が有意に相関することを示した。そして、キマーゼ阻害薬は、これらすべての因子を有意に抑制することも示した。また、アルブミン尿の出現と深く関連するポドサイトで発現するネフリンが糖尿病マウスで減少するのをキマーゼ阻害薬が抑制することを示した。これらのことよりキマーゼは、酸化ストレス、炎症、線維化の増加を介してポドサイト傷害を引き起こし、逆にキマーゼ阻害薬はこれらの因子を抑制することによりアルブミン尿を低下させることが分かった。

本研究では、糖尿病の進行に伴うDKDによるアルブミン尿が、腎臓局所で増加するキマーゼによるポドサイト傷害に起因していることを示し、キマーゼ阻害薬はそれを抑制することによりアルブミン尿を減少させることを明らかにしている。キマーゼ阻害薬は、酸化ストレス、炎症、線維化の増加を抑制していることからDKDの増悪予防と治療戦略に貢献できる可能性が示唆されるため、臨床応用に有用な研究成果と考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第13条第1項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

International journal of molecular sciences

21(20): 7495, 2020 Oct 〈オンライン掲載〉

doi: 10.3390/ijms21207495