

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	橘内 博哉
学位論文題目			
<p>High glucose induces platelet derived growth factor-C via carbohydrate response element binding protein in glomerular mesangial cells</p>			
<p>(高グルコースは腎メサンギウム細胞においてグルコース応答性転写因子 ChREBP を介して血小板由来成長因子 PDGF-C の発現を誘導する)</p>			
共著者名			
<p>牧野 雄一, 坂上 英充, 水元 克俊, 柳町 剛司, Kuralay Atageldiyeva</p>			
<p>竹田 安孝, 藤田 征弘, 安孫子 亜津子, 滝山 由美, 羽田 勝計</p>			
未公表			
研究目的			
<p>糖尿病性腎症は、末期腎不全を来す疾患として、透析療法導入の原疾患第一位に位置し、臨床医学のみならず社会医学、医療経済学的にも大きな問題となっている。腎細小血管障害が本態と考えられており、腎糸球体における細胞外基質産生の増加とメサンギウム領域の拡大を病理学的特徴とする。その成因として高血糖が重要である事が、複数の大規模臨床研究の結果より明らかにされており、高血糖により惹起される細胞内シグナルを解明することは、糖尿病性腎症の予防法、治療法の開発に直結する可能性を秘めている。我々の研究室では、これまで、高グルコースがメサンギウム細胞においてグルコース応答性転写因子 Carbohydrate Response Element-Binding Protein (ChREBP)を介して低酸素誘導性転写因子 Hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α)とその標的遺伝子群の発現を酸素分圧非依存性に誘導し、メサンギウム細胞外基質の蓄積に関わることを明らかにしている。すなわち、ChREBP がメサンギウム細胞において、これまで未知の標的遺伝子群をグルコース応答性に作動させ糖尿病性腎症の多彩な病態生理に関与する可能性を示す。我々は、ヒトメサンギウム細胞において高グルコースが ChREBP を介して制御する標的遺伝子群を網羅的に解析し、それらの遺伝子の糖尿病性腎症の成立・進展における意義を解明することを目的とした。</p>			
材料・方法			
<p>正常濃度 (100mg/dl)あるいは高濃度 (450mg/dl)グルコース培地にて培養したヒトメサンギウム細胞を固定後、クロマチンを断片化し、抗 ChREBP 抗体を用いて ChREBP-クロマチン複合体を免疫沈降した。得られたクロマチン断片をプローブとして、Affymetrix 社ゲノムタイリングアレイを用いたハイブリダイゼーション解析を行い、ChREBP 結合遺伝子を抽出した。ChREBP 標</p>			

的遺伝子の mRNA 発現量については、ヒトおよびマウスメサンギウム細胞を用いたリアルタイム PCR 法で定量的に解析した。蛋白質発現レベルは、ウェスタンブロット法を用いて検討した。培養マウスメサンギウム細胞に ChREBP あるいは platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) の small hairpin RNA 発現プラスミドを安定導入し、ChREBP あるいは PDGF-C 発現抑制細胞を作成した。

Streptozotocin (STZ) 誘導 1 型糖尿病モデルマウスを作成し、腎糸球体における ChREBP 標的遺伝子産物発現を免疫組織学的に解析した。また、STZ 誘導糖尿病モデルマウスの尿中 PDGF-C 濃度、アルブミン濃度を、ELISA 法を用いて測定した。2 型糖尿病モデルであるレプチン受容体遺伝子異常肥満マウス (db/db マウス) についても同様に解析した。

成 績

- 1) クロマチン免疫沈降-ゲノムマイクロアレイ法を用いて、高グルコース培養下ヒトメサンギウム細胞における ChREBP 標的遺伝子として、PDGF-C を同定した。
- 2) 高グルコース培養ヒト及びマウスメサンギウム細胞における PDGF-C 発現が mRNA および蛋白レベルで増強した。
- 3) クロマチン免疫沈降法 (ChIP) により、高グルコース培養下ヒトメサンギウム細胞において ChREBP が PDGF-C 遺伝子プロモーターに直接結合することが示された。
- 4) RNA 干渉法により ChREBP の発現を抑制した細胞において、高グルコースによる *Pdgf-c* の mRNA 発現誘導は有意に減少した。
- 5) STZ 誘導糖尿病モデルマウスの腎糸球体において、PDGF-C の発現が対照群に比べて有意に増加していた。PDGF-C 陽性細胞の一部は、 α -smooth muscle actinin (α -SMA) 陽性細胞と共局在したことから、メサンギウム細胞であることが示唆された。他方、Nephrin 陽性細胞との共局在も認められ、PDGF-C が糸球体上皮細胞にも発現していることが示唆された。
- 6) PDGF-C 添加により、ヒトメサンギウム細胞において細胞外基質 *COL4A1*, *COL6A1* の mRNA 発現が増強した。
- 7) RNA 干渉法により PDGF-C の発現を抑制したマウスメサンギウム細胞において、高グルコースによる *Col4a1*, *Col6a1* の発現増強が是正された。また、PDGF 受容体阻害により、高グルコースによる *COL4A1*, *COL6A1* の発現増強が是正された。
- 8) STZ 誘導糖尿病モデルマウス、db/db マウスにおいて、尿中 PDGF-C 濃度が、対照群に比べて有意に増加した。

考 案

高グルコースがヒトメサンギウム細胞において ChREBP を介して誘導する遺伝子として、新たに PDGF-C を同定した。PDGF-C 遺伝子プロモーターには、Carbohydrate Response Element (ChRE) が存在し、高グルコース培養下メサンギウム細胞において ChREBP が同配列に直接結合した。さらに、メサンギウム細胞における ChREBP 発現抑制により高グルコース培養下での

PDGF-C の発現増強が是正されたことから、高グルコースによる PDGF-C の発現誘導には ChREBP が直接関与する可能性が高い。

PDGF-C は、ホモダイマー(PDGF-CC)を形成して、PDGF Receptor α に結合、活性化する。PDGF-C は、線維芽細胞の増殖、基質産生などに関与し、肺、肝、心臓など種々の臓器における線維化のほか、慢性腎疾患における間質の線維化、細胞外基質の増加に関わることが示唆されているが、糖尿病性腎症の病態との関わりについては知られていない。今回、免疫組織学的解析により、STZ 誘導糖尿病モデルマウスの腎糸球体メサンギウム細胞において、PDGF-C の発現が亢進していることが明らかになった。培養メサンギウム細胞では、高グルコース刺激により細胞外基質蛋白 COL4A1, COL6A1 の mRNA 発現が誘導されるが、PDGF Receptor 阻害剤はこの誘導を是正した。また、RNA 干渉法により PDGF-C 発現を抑制したメサンギウム細胞では、高グルコースによる Col4a1, Col6a1 発現誘導は減弱していた。さらに、メサンギウム細胞の PDGF-C 刺激により COL4A1, COL6A1 発現が正常濃度グルコース下培養でも誘導された。以上の結果は、糖尿病あるいは高血糖により誘導された PDGF-C が、メサンギウム細胞外基質産生に重要な役割を果たしている可能性を示す。

一方、STZ 誘導糖尿病モデルマウス、db/db 2 型糖尿病モデルマウスのいずれにおいても尿中 PDGF-C 濃度が上昇していた。尿中 PDGF-C の出現は、従来糖尿病性腎症の診断に有用とされる尿中アルブミン出現にやや先行する傾向があった。尿中 PDGF-C が糖尿病性腎症診断の新たなマーカーとなる可能性が期待されるが、尿中 PDGF-C が腎以外の組織に由来する可能性の検討、糖尿病患者尿で検出可能か否かの検討は必須であり、現在進行中である。




結 論

高グルコース下のメサンギウム細胞において、ChREBP が PDGF-C を介したシグナルを誘導し、糸球体における細胞外基質の蓄積に関与する可能性が示された。また、糖尿病において尿中 PDGF-C レベルが上昇する可能性が示された。

引 用 文 献

1. Isoe T, Makino Y, Mizumoto K, et al. High glucose activates HIF-1-mediated signal transduction in glomerular mesangial cells through a carbohydrate response element binding protein. *Kidney Int*, 2010; 78: 48-59.
2. Jeong Y-S, Kim D, Lee YS, et al. Integrated Expression Profiling and Genome-Wide Analysis of ChREBP Targets Reveals the Dual Role for ChREBP in Glucose-Regulated Gene Expression. *PLoS ONE*, 2011; 6 (7): e22544.
3. Eitner F, Ostendorf T, Van Roeyen C, et al. Expression of a novel PDGF isoform, PDGF-C, in normal and diseased rat kidney. *J Am Soc Nephrol*, 2002; 13 (4): 910-7.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	橘内 博哉
<p>審査委員長 長谷部 直幸 </p> <p>審査委員 奥村 利勝 </p> <p>審査委員 羽田 勝計 </p>			
学位論文題目			
<p>High glucose induces platelet derived growth factor-C via carbohydrate response element binding protein in glomerular mesangial cells (高グルコースは腎メサンギウム細胞においてグルコース応答性転写因子 ChREBP を介して血小板由来成長因子 PDGF-C の発現を誘導する)</p>			

糖尿病性腎症の成因として、高血糖の重要性が指摘されている。申請者らは、そのメカニズムを解明する目的で、高血糖により惹起される細胞内シグナルのうち、グルコース応答性転写因子 Carbohydrate Response Element-Binding Protein (ChREBP) に注目し、糖尿病性腎症の成立・進展における意義を検討した。

まず、*vitro* でクロマチン免疫沈降-ゲノムマイクロアレイ法を用いて高グルコース培養下ヒトメサンギウム細胞を検討した結果、ChREBP 標的遺伝子として platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) が同定された。高グルコース培養下ヒト及びマウスメサンギウム細胞における PDGF-C の発現は、mRNA および蛋白レベルで増強しており、RNA 干渉法により ChREBP 発現を抑制した条件下では、PDGF-C の発現誘導は抑制された。

また *vivo* では、STZ 誘導糖尿病モデルマウスの腎糸球体のメサンギウム細胞および糸球体上皮細胞において、PDGF-C の発現亢進を確認した。

ヒトメサンギウム細胞では、PDGF-C 添加により細胞外基質 *COL4A1*, *COL6A1* の mRNA 発現が増強し、RNA 干渉法もしくは PDGF 受容体阻害薬により PDGF 系を抑制した環境では、高グルコースによる *COL4A1*, *COL6A1* の発現増強は是正された。

これらの結果は、糖尿病あるいは高血糖により誘導される PDGF-C が、メサンギウム細胞外基質産生、ひいては糸球体リモデリングに重要な役割を果たしている可能性を示唆するものであり、糖尿病性腎症進展の新たなメカニズム解明の端緒となる知見である。

さらに申請者らは STZ 誘導糖尿病モデルマウスおよび db/db マウスにおいて尿中 PDGF-C 濃度を検討し、対照群に比べ糖尿病マウスでは、糖尿病性腎症の早期マーカーとして、従来から汎用されている尿中アルブミン出現にやや先行して尿中 PDGF-C が増加していることを確認しており、今後ヒトでの検討を行うことで、新たな臨床的なマーカーとなる可能性も示唆している。

本論文は、学位授与に相応しい価値ある内容を有しており、また審査過程において、論文提出者は、論文の内容および関連分野に関する諮問に対し、適切な解答を提示し、高い資質を有することを確認致しました。

以上より、当審査委員会は、本論文が医学博士の学位に値するものと判断致しました。