

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 稲永 敏明

論文題目 Syrian hamster of APA strain, an animal model of diabetic nephropathy, and its initiation and progression mechanisms

(糖尿病誘発 APA ハムスターを用いた糖尿病性腎症発症・進展メカニズムの解析)

糖尿病性腎症（腎症）は持続する高血糖を主たる原因として起こる糖尿病合併症のひとつであり、腎臓に進行性の硬化性病変を起こし、患者を末期腎不全に至らしめる。日本には現在 20 万人以上の透析患者がいるが、週 2～3 回の血液透析は患者の体への負担も大きく、QOL を低下させ、また長期の透析には腎アミロイドーシスなどの透析合併症の発症を恐れながらの生活となる。腎症が透析患者を生む最大原因となっていることから、腎症治療法に関する研究は医療費増大の問題からも非常に重要であると言える。本論文は腎症モデル動物の特性を解析し、それを用いて新たな腎症発症メカニズムを明らかにすることを目的としたものである。

第 1 章ではストレプトゾトシン（SZ）誘発糖尿病 APA ハムスターの特に腎機能についての検索を行った。その結果、血液尿素窒素値やクレアチニン値が顕著に上昇しており、また尿中総タンパク（TP）量も顕著に上昇していた。このことから実際に本モデルでの腎機能の低下が明らかになった。組織学的には糸球体の慢性硬化病変が見られることから、本モデルは腎症初期の病態をよく反映したモデルであると考えられた。尿タンパクについてより詳細な解析を行った。一次元の SDS-PAGE の結果、SZ 投与 24 週では糖尿病誘発 APA ハムスターは高分子量性のタンパク尿を呈していることが示唆された。また近位尿細管におけるアルブミンの再吸収・フラグメント化に注目し、尿中のアルブミンをポリクローナル抗体を用いて検出した。糖尿病誘発群では病期が進むにつれて、低分子量のアルブミンのバンドが弱くなり、より高分子量のバンドの強度が上がっていく様子が観察され、アルブミンの再吸収・フラグメント化機構の低下が示唆された。これらが示す機能的な変化は腎症患者で見られる病気の表現型と非常に類似したものであると言え、類似した腎病態の存在が示唆された。以上のことから、本モデルは腎症の病態をよく反映したモデルであると結論付けた。

第 2 章ではこのモデルを用いて、腎症発症機構の解明を目的として研究を行った。まず腎抽出タンパクの 2 次元電気泳動を行い、糖尿病群と対照群で比較した。その結果、4 スポットに差を認め、質量分析（MS）の結果 9 種類のタンパクが挙げられた。なかでも小胞体（ER）シャペロン関連因子は複数のものが糖尿病群で高い発現のあったスポットで見ら

れたことから、糖尿病群の腎臓で ER ストレスが亢進している可能性があると考え、以降の解析を行った。実際に MS の結果挙げた glucose-regulated protein 78kD (GRP78) および calreticulin は ER で作られたタンパクがまず結合する ER シャペロンであり、これによりタンパクの糖鎖修飾、折りたたみが行われる。Western blot 法により、腎抽出タンパク中の発現量を半定量したところ、GRP78 および calreticulin とともに糖尿病群で顕著な発現上昇が見られた。また免疫組織化学的検索ではいずれも遠位尿細管上皮細胞、ボーマン嚢上皮細胞などで陽性像が見られる一方、糸球体メサンギウム細胞や近位尿細管上皮は染色されなかった。とくに遠位尿細管上皮は顕著に陽性を示し、このことはこの領域で特異的に ER ストレスが誘導されている可能性を示唆すると考えられた。本論文では ER シャペロンタンパクの特異的な発現上昇の原因を明らかにするために、APA ハムスターの SZ 投与後 2 週から 4 週にインスリン治療を行った。その結果、血糖値の有意な改善があったものの、GRP78 の発現量はむしろインスリン治療群で有意に上昇していた。このことは ER シャペロンの発現は高血糖により誘導されていたのではないことを示唆する。またインスリン治療群では生理食塩水投与群に比して、腎肥大が有意に改善されており、腎症初期の腎肥大と ER シャペロン発現が関係すること、しかも腎肥大に対して保護的に作用する可能性があることを示唆する結果になった。また遠位尿細管上皮由来とされる MDCK 細胞をマンニトール添加で培養を行ったところ、培養液のみのものに比べて高い GRP78 発現が認められた。このことから高血糖により上昇した浸透圧が遠位尿細管上皮での ER シャペロン発現を促している可能性が示唆された。糖尿病は慢性疾患であり、高血糖による浸透圧利尿も持続するものであることから、この機序が腎症の発症・進展に何らかの役割を果たしている可能性があると考えられ、さらなる検索の必要性を示唆する。

以上のように、本論文は腎症モデル動物を用いた腎症発症・進展機構の解明に一つの道を示したものであり、今後新たな治療法の開発を考える上で有用な情報を提供したと考えられる。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。