

氏 名	田川 安都子
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博士 甲第748号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成28年 3月 10日
学位論文題目	Impaired podocyte autophagy exacerbates proteinuria in diabetic nephropathy (糸球体上皮細胞オートファジー不全は糖尿病性腎症における蛋白尿を増悪させる)
審査委員	主査 教授 等 誠司 副査 教授 安藤 朗 副査 教授 河内 明宏

論文内容要旨

※整理番号	755	姓 名	たがわ あつこ 田川 安都子
学位論文題目	Impaired podocyte autophagy exacerbates proteinuria in diabetic nephropathy (糸球体上皮細胞オートファジー不全は糖尿病性腎症における蛋白尿を増悪させる)		
<p>【目的】糖尿病性腎症（腎症）は糸球体障害から蛋白尿を呈し末期腎不全へ至る進行性の疾患である。これまで集学的治療により一部の症例で蛋白尿が寛解しうることが示されているが、その一方で高度蛋白尿に移行する症例も認められる。その違いが何に起因するのかは未だ不明であり、この病態を解明することが、腎症に対する新たな治療法の開発につながると考えられる。高度蛋白尿をきたす主な原因の1つに糸球体上皮細胞(ポドサイト)障害があるが、糖尿病状態におけるこのポドサイトの障害機構は未だ不明な点が多い。また、近年オートファジーという細胞内浄化機構の異常が様々な疾患で関与しその機構が解明されつつあるが、糖尿病性腎症との関わりは明らかではない。そこで本研究では、ヒト腎生検組織ならびに動物モデルを用い、腎症発症におけるポドサイトのオートファジーの役割を検討した。</p> <p>【方法】1) ヒト腎生検組織での蛋白尿の程度とポドサイト障害ならびにオートファジー活性との関連の検討：ヒト腎生検組織を用い、ポドシン染色によりポドサイト障害を、オートファジー不全マーカーである p62 免疫染色によりオートファジー活性を評価した。</p> <p>2) 腎症モデル動物での蛋白尿の程度とポドサイト障害ならびにオートファジー活性との関連の検討：軽度の蛋白尿モデルとして高脂肪食(HFD)負荷2型糖尿病モデルマウスと32週齢の自然発症糖尿病 OLETF ラットを用い、高度の蛋白尿モデルとして50週齢のOLETFを用い、腎組織にてポドサイト障害とオートファジー活性を評価した。</p> <p>3) 糖尿病に伴うポドサイト障害におけるオートファジーの役割の検討：①動物モデル：オートファジーの活性化に必須の遺伝子の1つである Atg5 を Cre-LoxP システムを用いポドサイト特異的ノックアウト(KO)マウス (Podo-Atg5^{-/-}マウス) を作製した。このマウスに対し32週間のHFD負荷により糖尿病を誘発し、尿蛋白定量と電子顕微鏡(電顕)・ポドシン染色・WT1染色によるポドサイト障害を評価した。②細胞実験：オートファジーの活性化に必須の遺伝子の1つである Atg7 を同様に Cre-LoxP システムを用い Podo-Atg7^{-/-}マウスを作製した。このマウスと野生型マウスからそれぞれ単離したポドサイトに温度感受性不死化遺伝子を導入し培養ポドサイト(Atg7KOポドサイト、Atg7WTポドサイト)を作製し、HFD負荷糖尿病マウスと非糖尿病マウスの血清を孵置し、Western blotにてオートファジー不全を p62 と LC3-II/LC3-I 比の低下で、細胞死を cleaved caspase-3 で評価した。</p> <p>4) 高度蛋白尿を呈する糖尿病状態の血清にオートファジー活性を落とす因子が存在するか否かの検討：糖尿病でオートファジー不全を呈する50週齢のOLETFラットの血清を正常培養ポ</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

ドサイトに孵置し Western blot にて p62 と LC3-II/LC3-I 比および cleaved caspase-3 を評価した。

5) 糖尿病状態にオートファジー不全が伴うとポドサイト障害を起こす機序についての検討:

3) ①実験の HFD 負荷 Podo-Atg5^{-/-}マウスの透過型電顕所見よりリソソームの障害を疑い、Lamp2 染色によるリソソームの局在とユビキチン化蛋白の染色によるリソソームの機能障害を確認した。また 50 週齢の OLETF でも同様に確認した。

6) 腎症患者の蛋白尿病期によるオートファジー活性・リソソーム障害の検討: 腎症患者の血清を病期別に正常培養ポドサイトに孵置し、Western blot にて p62 とユビキチン化蛋白を評価した。

【結果】1) 軽度蛋白尿の腎症や他の腎炎症例の腎組織では、明らかなポドサイト障害やオートファジー活性の低下は認められなかったが、高度蛋白尿を呈する腎症症例では、ポドシンの発現量が低下し顆粒状パターンを呈するなどのポドサイト障害を認め、p62 が蓄積しておりオートファジー活性の低下が認められた。

2) 軽度の尿蛋白モデルでは、明らかなポドサイト障害やオートファジー活性の低下は認められなかったが、高度尿蛋白モデルでは、ヒトの結果と同様にオートファジー活性の低下を伴う顕著なポドサイト障害が認められた。

3) ①対照マウスでは HFD 負荷による糖尿病状態で軽度の蛋白尿を呈するのみであったが、Podo-Atg5^{-/-}マウスでは、糖尿病状態においてのみ、ポドサイト数の減少、足突起の消失、ポドシン発現数の減少を伴う顕著な蛋白尿の増加が確認された。②Atg7KO ポドサイトでは p62 の蓄積と LC3-II/LC3-I 比の減少を認め、オートファジー不全が示された。また HFD 負荷糖尿病マウスの血清刺激は Atg7KO ポドサイトに対してのみ顕著な細胞死を誘導した。

4) OLETF50 週の血清で刺激した細胞では、p62 の蓄積と LC3-II/LC3-I の減少を認め、オートファジー不全が示された。そして、50 週齢の OLETF の血清刺激でのみ細胞死が増加した。

5) HFD 負荷 Podo-Atg5^{-/-}マウスのポドサイトでは Lamp2・ユビキチン化蛋白ともに増加しておりリソソームの障害が示唆された。50 週齢の OLETF でも同様の結果であった。

6) 高度蛋白尿を呈する腎症の血清孵置でのみ p62 とユビキチン化蛋白の増加をみとめオートファジー活性の低下とリソソーム障害が示唆された。

【考察】今回の研究より高度蛋白尿へ進行する原因の一つにオートファジー不全によるポドサイト障害が明らかとなり、その機序としてリソソームの障害が考えられた。また糖尿病血清によりオートファジー不全が確認されたことより、糖尿病が持続することでオートファジー不全をきたすということも明らかとなった。この糖尿病血清中の何がオートファジー不全をもたらすのかを解明することが治療標的になると考えられ、さらなる検討が必要である。

【結語】ポドサイトにおけるオートファジー不全は、糖尿病性腎症における蛋白尿を増悪させる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	755	氏名	田川 安都子
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>糖尿病患者では、腎症の合併をしばしば見るが、糖尿病性腎症の発症および進展のメカニズムには不明な点が多い。一方、糖尿病状態ではさまざまな臓器でオートファジーの低下が見られることから、腎症の病態にもオートファジーの低下が関与しているとの仮説をたて、その検証を行った。特に、糖尿病性腎症の初期から観察されるタンパク尿に深く関わるポドサイトとオートファジーの低下との関係について、詳細な解析を加えた。</p> <p>その結果、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ヒト腎生検組織を用い、高度タンパク尿の腎症症例では、ポドサイトの障害とオートファジー活性の低下がみられた。 2. 腎症モデル動物で、タンパク尿の重症化に従って、ポドサイト障害とオートファジー活性低下が観察された。 3. ポドサイト特異的にオートファジーを欠損するマウスでは、対照群より重度なポドサイト障害とオートファジー活性低下を認めた。 4. 高度タンパク尿を呈する糖尿病患者血清には、培養ポドサイトにオートファジー不全とリソソーム障害を惹起する未知の物質が含まれる。 <p>本論文は、糖尿病性腎症の病態において、糸球体ポドサイトのオートファジー不全の関与について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数555字)</p> <p style="text-align: right;">(平成28年1月25日)</p>			