博士（医　学）　一　宮　由紀子

学位論文題名

Increased glomerular cytosolic phospholipase A2 activity of OLETF rats with early diabetes

（初期糖尿病 OLETF ラットにおける腎糸球体 cytosolic phospholipase A2 活性の上昇）

学位論文内容の要旨

糖尿病性腎症の初期に認められる特徴として腎糸球体の過剰濾過があり、その後、腎糸球体硬化へ進展すると考えられている。糸球体過剰濾過の原因として様々な要因が考えられているが、中でも腎糸球体における血管拡張性プロスタグランジンの過剰産生が注目を集めている。プロスタグランジンの大部分はシクロオキシゲナーゼ経路を介してアラキドン酸から産生される。その産生過程において、phospholipase A2 (PLA2)はシクロオキシゲナーゼ経路の律速酵素であり、グリセロリン脂質のグリセロール２位にエステル結合する脂肪酸を加水分解する働きを持つ。現在まで10個のPLA2 アイソフォームが確認されており、中でも85-kDaの分子量を有する cytosolic PLA2 (cPLA2) はアラキドン酸代謝を調節する上で中心的な役割を果たすことが知られている。腎糸球体内ではメサンギウム細胞が主にプロスタグランジンを産生すると考えられているが、糖尿病性腎症初期の腎糸球体における cPLA2 の役割については未だ明らかではない。

糖尿病研究にはいくつかの実験動物が用いられているが、その一つに自然発症肥満 NIDDM モデルの Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty （OLETF）ラットがある。OLETF ラットの臨床的そして腎臓の病理組織的な特徴は、遅い発症、緩徐な経過、肥満、腎糸球体メサンギウム領域の拡大や基底膜の肥厚を伴う腎硬化症である。これらの所見はヒトの糖尿病性腎症の臨床経過に極めて類似しているため、今回我々は、OLETF ラットを用いて、糖尿病性腎症の初期発症過程における腎糸球体 cPLA2 の果たす役割について検討した。

方法として、雄性 OLETF ラットの腎糸球体より細胞質分画を分離して、cPLA2 活性とその遺伝子発現、蛋白発現を検討した。cPLA2 活性測定には、1-palmitoyl-2-[^{14}C] arachidonyl phosphatidyl ethanolamine を基質として用い、腎糸球体細胞質分画と酵素反応させ、反応後に遊離したアラキドン酸を抽出、その放射活性を測定した。遺伝子発現はラット cPLA2 プローブを用いた Northern blot 法で、蛋白発現は抗ラット cPLA2 モノクローナル抗体を用いた Western blot 法で検討した。対照としては OLETF ラットと同系であるが、糖尿病非発症の Long-Evans Tokushima Otsuka （LETO）ラットを用いた。メサンギウム細胞の組織培養実験

ではSDラット用い、対照群（5.5mM）と高グルコース濃度下で培養した群（27.5mM）に分け、5日間の各培養条件下でのcPLA2活性について比較検討した。

OLETFラットは18週齢頃より血糖値が上昇し始め、40週齢頃より腎糸球体の組織学的変化が出現し、70週齢ではほとんどの糸球体が硬化し糖尿病性腎症が完成する。実験の結果、30週齢のOLETFラットではLETOラットと比較して、血糖値、尿蛋白量、クレアチニンクリアランスが上昇していたが、腎糸球体の病理組織学的変化は30週齢以降で出現していることが判明したため、30週齢を糖尿病性腎症の初期段階として位置付けた。腎糸球体cPLA2活性は、30週齢のOLETFラットでは著明な増加を示した（N=8)。興味深いことに、腎糸球体cPLA2活性は、血糖値、クレアチニンクリアランスとそれぞれ正相関を示した。次にメサンギウム細胞を用いた組織培養実験を行い、cPLA2 活性に対する細胞外グルコース濃度の影響を調べた結果、高グルコース濃度群ではcPLA2活性は約2倍と著明な上昇を示した。しかし、高グルコース濃度培養下メサンギウム細胞および30週齢のOLETFラット腎糸球体では両者ともcPLA2 mRNAの発現、cPLA2蛋白の発現については対照と差を認めなかった。

OLETFラットの糖尿病性腎症の初期状態において、腎糸球体cPLA2活性は著明に増加していた。メサンギウム細胞は高グルコース刺激によりcPLA2活性の上昇を示したことから、糖尿病性腎症の初期状態での腎糸球体cPLA2活性増加は、高グルコース濃度に対するメサンギウム細胞の反応によるものと考えられた。また、血糖値、クレアチニンクリアランスは腎糸球体のcPLA2 活性と正の相関を示した。血管拡張性プロスタグランジンにより選択的に輸入細動脈拡張と輸入細動脈血管抵抗減少がおこり、これらにより静水圧が上昇して糸球体過剰濾過が起こることが報告されている。OLETFラットでは、cPLA2を介する代謝経路によりメサンギウム細胞で産生された血管拡張性プロスタグランジンの増加が、糸球体過剰濾過を引き起こすと考えられた。OLETFラット腎糸球体および高グルコース濃度培養下メサンギウム細胞のcPLA2活性は増加していたが、そのmRNAおよび蛋白の発現は変化を認めなかった。この結果より、cPLA2活性上昇はcPLA2蛋白の増加によるものではなく、cPLA2の直接的な活性化によると推測された。cPLA2はmitogen-activated protein kinase（MAPK）によるセリン残基のリン酸化により活性化されることが報告されている。メサンギウム細胞ではグルコース刺激によりdiacylglycerol (DG)産生が増加し、protein kinase C (PKC)が活性化されることが報告されており、また、PKCによりMAPKが活性化されることも示されている。以上より、メサンギウム細胞では、グルコース刺激によりPKC、MAPKの活性化によってcPLA2のリン酸化が生じたと推測される。

今回の研究から、糖尿病性腎症の初期において、グルコース刺激によりメサンギウム細胞のcPLA2が活性化され、血管拡張性プロスタグランジン産生を介して、糸球体過剰濾過を引き起こすことが示唆された。今後、メサンギウム細胞のcPLA2を介した糸球体過剰濾過機構のさらなる解明により、糖尿病性腎症の予防に新たな展開がもたらされるものと期待される。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　石　橋　輝　雄
副　査　教　授　小　池　隆　夫
副　査　教　授　川　上　義　和

学 位 論 文 題 名

Increased glomerular cytosolic phospholipase A2 activity of OLETF rats with early diabetes

（初期糖尿病 OLETF ラットにおける腎糸球体 cytosolic phospholipase A2 活性の上昇）

糖尿病性腎症の初期には腎糸球体過剰濾過が認められ、その後、腎糸球体硬化へ進展すると考えられている。糸球体過剰濾過の原因は様々考えられているが、中でも腎糸球体における血管拡張性プロスタグランジンの過剰産生が注目を集めている。プロスタグランジンの大部分はアラキドン酸から産生され、phospholipase A2 (PLA2) はその産生過程の律速酵素であり、グリセロリン脂質のグリセロール２位にエステル結合する脂肪酸を加水分解する働きを持つ。現在まで10個のPLA2アイソフォームが確認されており、中でもcytosolic PLA2 (cPLA2) が主にアラキドン酸代謝を調節することが示された。今回我々はヒト糖尿病性腎症に極めて類似した臨床経過を持つ自然発症型肥満２型糖尿病モデルのOtsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットを用い、糖尿病性腎症の初期発症過程における腎糸球体cPLA2の果たす役割について検討した。

方法：雄性 OLETF ラットの腎糸球体より細胞質分画を分離して 1-palmitoyl-2-[^{14}C] arachidonyl phosphatidyl ethanolamineを基質とし、腎糸球体細胞質分画と酵素反応させ、反応後に遊離したアラキドン酸を抽出、その放射活性を測定した。遺伝子発現はラットcPLA2プローブを用いたNorthern blot法で、蛋白発現は抗ラットcPLA2モノクローナル抗体を用いたWestern blot法で検討した。対照としてOLETFラットと同系で、糖尿病非発症のLong-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットを用いた。Sprague-Dawleyラットより単離培養したメサンギウム細胞を用いた組織培養実験では、対照群（グルコース 5.5 mM）と高糖濃度下で培養した群（グルコース 27.5 mM）に分けて比較検討した。

実験結果：30週齢のOLETFラットではLETOラットと比較して、血糖値、尿蛋白量、クレアチニンクリアランスが上昇していたが、腎糸球体の病理組織学的変化は30週齢以降で出現していたため、30週齢を糖尿病性腎症の初期段階として位置付けた。糖尿病性腎症の初期段階の

OLETFラットでは、腎糸球体cPLA2活性が著明に増加していた。メサンギウム細胞は高グルコース刺激によりcPLA2活性の上昇を示したことから、糖尿病性腎症の初期状態での腎糸球体cPLA2活性増加は、高グルコース濃度に対するメサンギウム細胞の反応によると考えられた。また、血糖値、クレアチニンクリアランスは腎糸球体のcPLA2活性と正相関を示し、OLETFラットではcPLA2を介する代謝経路によりメサンギウム細胞で産生された血管拡張性プロスタグランジンの増加が糸球体過剰濾過を引き起こすと考えられた。OLETFラット腎糸球体および高グルコース濃度培養下メサンギウム細胞のcPLA2活性は増加していたが、そのmRNAおよび蛋白の発現は変化を認めなかった。この結果より、cPLA2活性上昇はcPLA2蛋白の増加ではなく、cPLA2の直接的な活性化によると推測された。

今回の研究から、糖尿病性腎症の初期において、グルコース刺激によりメサンギウム細胞のcPLA2が活性化され、血管拡張性プロスタグランジン産生を介して糸球体過剰濾過を引き起こすことが示唆された。今後、メサンギウム細胞のcPLA2を介した糸球体過剰濾過機構のさらなる解明により、糖尿病性腎症の予防に新たな展開がもたらされるものと期待される。

審査に当り、副査小池教授より、cPLA2の組織分布について、高グルコース濃度に対するcPLA2活性上昇がメサンギウム細胞に特異的であるかについて、継時的なcPLA2活性の変化とその可逆性について、糸球体硬化を是正するためにcPLA2活性が上昇している可能性について質問があり、主査石橋教授より、cPLA2活性を上昇させる誘因として高血糖以外のmediatorの存在について、メサンギウム細胞の細胞外グルコース濃度を段階的に変化させた場合のcPLA2活性の変化について、酵素量が増加せずにcPLA2活性が増加した機序について、cPLA2活性測定系における基質の選択について質問があった。副査川上教授からは、OLETFラットがヒト2型糖尿病、また糖尿病性腎症のモデルとして適切であるか、またその問題点について、糖尿病実験モデルとしてのOLETFラットの国内外での評価について、この研究をふまえた糖尿病性腎症の予防についての質問があった。申請者はこれらの質問に対して適切な解答をおこなった。

審査員一同は本研究を、糖尿病性腎症の初期発症過程における腎糸球体cPLA2の意義について検討した研究として高く評価し、博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有すると判定した。