

平成27年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	2型糖尿病モデルラットにおける糖尿病性腎症の進行と HB-EGF の関連性	
研究者所属・氏名	研究代表者：医学部 小児科学教室 医学部講師 宮沢 朋生	

1. 研究目的・内容

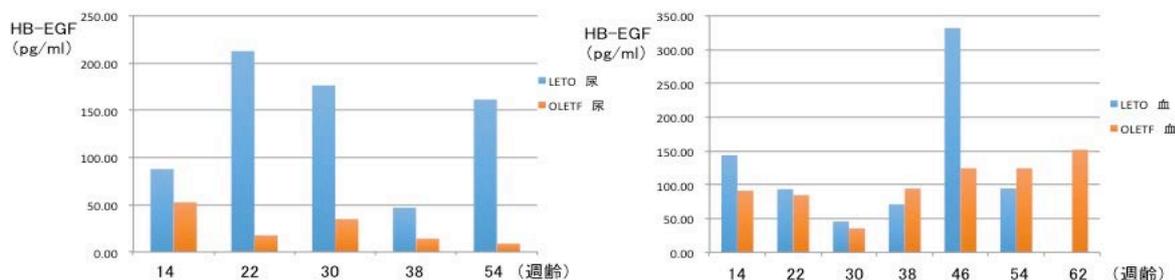
Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) は EGF ファミリーに属する成長因子であり、創傷治癒、腫瘍増殖、腎炎などの病理学的プロセスに関与する。腎ではメサンギウム細胞や、尿細管上皮、血管内皮に発現し、我々は HB-EGF が糖尿病性腎症の増悪因子である可能性を以前に報告した。糖尿病動物モデルとして OLETF、対照群に LETO を使用し、腎障害進行と HB-EGF 発現量、部位の変化を経時的に観察し、腎症の進展への HB-EGF の寄与を検討する。

2. 研究経過及び成果

糖尿病モデルとしてOLETF：24匹を、正常対照群としてLETO：18匹を生後4週齢より飼育開始した。OLETFは生後20週齢頃には糖尿病を発症し、30週齢頃から徐々に尿蛋白の増加、糖尿病性腎症の組織学的変化は40週頃より明らかとなることが報告されている。糖尿病性腎症の進行の組織所見、尿蛋白の増加、HB-EGFの発現についての経時的評価を行うために、22週齢より8週間毎（22週齢、30週齢、38週齢、46週齢、54週齢、62週齢）に血糖の測定、血液、尿、腎検体の採取を実施した。

血糖値は22週齢時点以降、OLETFにて有意な高値を示し糖尿病状態を確認した。

尿、血液検体におけるHB-EGF濃度の変化と糖尿病、糖尿病性腎症の進行への関連を評価し、腎症発症の予測、進行のバイオマーカーとなり得るかを検討した。ELISA Kit for HBEGF (SEB479Ra、Cloud-Clone Corp.) を用い、22週、30週、38週、46週、54週、62週における血液、尿検体を評価した。尿中HB-EGFはLETOにて高値であったが、尿量、尿中クレアチニンによる補正を要すると考え、現在実施中である。出現のタイミングについても、OLETFは一般に30週前後での尿蛋白増加が知られ、より早期に出現していると言えるが、LETOでも同様に排泄されるとすれば、マーカーとしての意義はなさないと思われる。OLETFでは血液検体については、OLETFの血清中のHB-EGF濃度は週齢により上昇傾向はみられたが、LETOと比較して有意ではなかった。



組織学的評価として、4%PFAに浸漬した腎検体より、パラフィンブロックを作製し、パラフィン切片のPAS染色による糖尿病性腎症の進行の評価と、酵素抗体法を用いた免疫組織染色にてHB-EGF発現の経時的变化を確認した。OLETFでは30週には増殖性病変、分節性硬化病変が出現しており、徐々に増悪を認めていた。一方、HB-EGFはより早期の22週齢時点で主に尿細管、血管内皮に発現を認めており、38週齢にて発現は最も強くみられることを確認し得た。しかし、メサンギウム細胞を含めた糸球体内部には有意な発現はみられなかった。

現時点での評価としては、糖尿病性腎症におけるHB-EGFの発現は、尿細管が主体と考えられ、組織学的病変の顕在化より早期に出現していると考えられた。しかし、病理学的変化への直接の影響については現時点で明確とはなっていない。培養メサンギウム細胞でのHB-EGF発現の亢進は報告されており、糖尿病性腎症におけるメサンギウム増殖との関連を示唆することから、生標本を用いた再度の検討や、発現量の定量評価を要すると考えられる。マーカーとしての意義については、血中、尿中ともに現時点では有意な結果を得られなかったが、腎尿細管における発現量を定量し、尿中HB-EGFとの相関を検討する方針である。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

今回採取した腎の凍結生検体を用いて、ELISA法、またはWestern blotting法にてHB-EGFの発現を経時的に定量評価を実施する。

今回の検討ではHB-EGFの糸球体内の発現は有意でなかったが、マウス腎のポドサイトでの発現、培養メサンギウム細胞での発現が報告されており、凍結標本を用いた蛍光免疫染色とpodocin、CD31を用いた2重染色にて発現の同定を試みる方針である。有意な結果が得られない場合は、腎尿細管のHB-EGF発現の部位、発現時期を再度検討し、腎症の病態への影響を考察する。

近年、ジフテリア毒素の無毒変異体(CRM197)が、HB-EGFの細胞増殖活性を阻害することが示され、卵巣癌など腫瘍に対する分子標的として注目されており、HB-EGFが糖尿病性腎症治療においても分子標的となり得るかを検討する。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)