

考察およびまとめ：再生医療の利点は、ドナー採取部の犠牲を最小限にできることであるが、その手術結果が長期にわたり安定していることが重要となる。これまで、耳介軟骨の再生誘導では、主に（１）播種細胞の選択と至適濃度、（２）軟骨細胞増殖や細胞外基質産生を誘導するサイトカイン、（３）細胞が増殖する足場材料（スキャホールド）、（４）３次元形状を維持する力学的強度の４要素に関する基盤技術を至適に組み合わせて再生誘導を試みた免疫不全の小動物モデルを用いた研究が数多く報告されてきた。一方、再生誘導技術をヒトへ臨床応用するためには、免疫を有する大動物（自家移植モデル）において、臨床的に必要なサイズと耳介特有の形状をもつ軟骨再生誘導法の確立が急務であるが、その実験成績は未だに不良である。本研究結果は、これまで困難とされた大動物における（１）軟骨組織の再生誘導と（２）複雑な３次元形状の長期維持、が可能であることを示唆しており、今後、３次元形状軟骨の再生誘導を臨床応用する上で、重要な価値を有すると考える。

| | |
|---------|---|
| 氏名 | 宮 沢 朋 生 |
| 学位の種類 | 博 士 (医学) |
| 学位記番号 | 医 第 1 1 1 5 号 |
| 学位授与の日付 | 平 成 2 5 年 3 月 2 2 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 5 条 |
| 学位論文題目 | Nitric oxide の生物学的利用能の減少は eNOS 欠損糖尿病マウスの腎において heparin-binding EGF-like growth factor 発現を増加させる |

| | | | |
|--------------|-----|-----|-----|
| 論文審査委員 (主 査) | 教 授 | 竹 村 | 司 |
| (副主査) | 教 授 | 池 上 | 博 司 |
| (副主査) | 教 授 | 西 尾 | 和 人 |

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

Nitric oxide (NO) の生物学的利用能の減少は糖尿病性腎症進行の重要な要素であるが、その機序は明らかではない。内因性 NO は NO 合成酵素 (NOS) により合成され、NOS のアイソフォームの1つである endothelial NOS (eNOS) は血管内皮における主要な NOS である。eNOS 欠損 (eNOS^{-/-})、eNOS 欠損糖尿病マウス (eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db}) は腎の NO 産生が減少し、重篤な腎障害が出現する。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、上皮細胞、内皮細胞、血管平滑筋細胞などに発現し、創傷治癒、動脈硬化、腫瘍増殖、糸球体腎炎などに関与する。糖尿病の増悪因子である高脂血症、終末糖化産物 (AGEs) や酸化ストレスは NO 産生を減少させ、HB-EGF 発現を増加させるとの報告があり、NO と HB-EGF 発現の関連が推察される。そこで、今回我々は、糖尿病性腎症モデルとして eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db} マウスを用い、eNOS と HB-EGF 発現の関連性を検討した。

【方法】

野生型、eNOS^{-/-}、Lepr^{db/db}、eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db}マウスを用い HB-EGF 発現をウエスタンブロット(WB)法、in situ hybridization (ISH)、HB-EGF 免疫染色にて評価した。腎障害の重症度は尿中アルブミン、腎組織のPAS染色、sirius red 染色にて評価した。

【結果】

生後 8 週、16 週の eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db}マウスの腎の WB 法における HB-EGF 発現、HB-EGF 尿中排泄は有意に増加した。マウス腎組織の HB-EGF 免疫染色では eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db} マウスにおいて、糸球体ではポドサイトと内皮細胞、腎内小動脈の血管内皮細胞、平滑筋細胞が染色された。腎髄質では、尿管、特に thick ascending limb (TAL) と集合管に発現が見られた。Lepr^{db/db} と野生型マウスに対し、NOS 阻害薬である L-NAME を 2 週間投与すると、Lepr^{db/db} マウスの腎では尿中アルブミンの増加、HB-EGF 発現亢進、HB-EGF 尿中排出の増加を認めた。eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db} マウスに対する NO 投与の効果を検討するために、sodium nitrate を飲料水に加え、腎障害と HB-EGF の発現を比較すると、血漿中、尿中の NO 濃度は投与群で著明に増加した。アルブミン尿は投与群で増加が抑制され、16 週間の投与後の腎組織では、投与群で有意に硬化、線維化が抑制され、NO 投与が eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db} マウスにおける腎障害の進行を抑制することを示した。ISH、WB 法も、HB-EGF 発現は投与群で減少し、尿中 HB-EGF 排出も投与群で著明に低値であった。

【考察】

本研究により、NO の生物学的利用能の減少が HB-EGF 発現の亢進を引き起こすことが明らかとなった。eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db} マウスにおける HB-EGF 尿中排出の増加は、存在する腎障害の進行と正比例しており、尿中 HB-EGF は糖尿病性腎障害の潜在的なマーカーとなる可能性が示唆された。

【結論】

本研究は、eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db}マウスにおいて、NO の生物学的利用能の減少は HB-EGF 発現を亢進させる重要な要因であることを証明したものである。NO 産生、活性が阻害された場合、その抑制が失われることが HB-EGF 発現の増加に寄与し、腎障害を引き起こすメディエーターとして働く機序が考えられた。

| | | |
|-----------|------------------|------------------------------------|
| 博士論文の印刷公表 | 公 表 年 月 日 | 出版物の種類及び名称 |
| | 平成 25 年 月 日 公表予定 | 出版物名 近畿大学医学雑誌 第 38 巻 第 1・2 号 |
| | 公 表 内 容 | 平成 25 年 月 日 発行予定 |
| | 全 文 | |

論文審査結果の要旨

本研究は、2型糖尿病性腎症における nitric oxide (NO) の生物学的利用能の変化と heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) 発現の相関、腎症進行への影響を、eNOS 欠損 (eNOS^{-/-})、eNOS 欠損糖尿病マウス (eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db}) を用いて検討したものである。

生活習慣の変化に伴う 2 型糖尿病患者数の増加は、現在、世界中で大きな問題となっている。小児においては、肥満症、糖尿病の家族歴との関連が大きいとされ、早期の合併症発症が問題となっている。合併症の中でも糖尿病性腎症は chronic kidney disease (CKD)、さらに end-stage renal disease (ESRD) に至る重要な原因である。最近の研究では、NO の生物学的利用能の減少が糖尿病性腎症の進行に重要な役割を果たすとされているが、その機序はいまだ明らかにはなっていない。

内因性 NO は NO 合成酵素 (NOS) により合成され、NOS のアイソフォームの 1 つである endothelial NOS (eNOS) は血管内皮における主要な NOS である。eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db} においては内因性 NO 産生の減少を伴う重篤な腎障害が出現し、組織学的にも早期より糸球体の硬化や、間質病変を認めることが示されている。HB-EGF は EGF family に属する成長因子であり、上皮細胞、内皮細胞などに発現し、創傷治癒、動脈硬化、腫瘍増殖、糸球体腎炎などに走化性を刺激し、分裂促進的に関与する。脂質異常症、高血糖、終末糖化産物、酸化ストレスなど、種々の糖尿病増悪因子は NO 産生を減少させ、HB-EGF 発現を増加させるとの報告があり、NO と HB-EGF 発現の関連が推察された。そこで、本研究では糖尿病性腎症のモデルとして eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db} を用いて、eNOS、NO と HB-EGF 発現の関連性と腎障害の進行に対する影響についての検討を行った。

実験動物として野生型 (C57/BLKS/J)、eNOS^{-/-}、Lepr^{db/db}、eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db} を用い、HB-EGF 発現をウエスタンブロット法と尿中排出、in situ hybridization、HB-EGF

免疫染色によって評価し、腎障害は 24 時間蓄尿中アルブミン/クレアチニン比、腎組織の PAS 染色、sirius red 染色にて検討がなされた。

eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db} の腎における HB-EGF 発現は有意に増加がみられた。HB-EGF 免疫染色の結果、eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db} の糸球体においては、ポドサイトと血管内皮細胞、平滑筋細胞、腎髄質においては、尿細管上皮、特に thick ascending limb、遠位尿細管と集合管に強い発現が見られた。Lepr^{db/db} と野生型に対し、NOS 阻害薬である L-NAME を投与することによって、Lepr^{db/db} の腎では尿中アルブミン増加、HB-EGF 発現亢進、HB-EGF 尿中排出の増加を認めた。一方で、eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db} に対し、sodium nitrate (NaNO₃) を投与すると、HB-EGF の発現は投与群において有意に減少し、アルブミン尿も抑制が認められた。16 週間の投与を施行した後の腎組織においては、投与群の糸球体硬化、尿細管間質の線維化の進行は明らかに抑制されており、NO の経口投与を行うことによって eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db} における腎障害の進行を抑制できることを示した。

研究結果より、NO の生物学的利用能の減少が HB-EGF 発現の亢進を引き起こし、HB-EGF 尿中排出の増加は、腎障害の進行と正比例しており、糖尿病性腎障害の潜在的なマーカーとなる可能性が示唆された。

本研究は、eNOS^{-/-}/Lepr^{db/db} において、NO の生物学的利用能の減少は HB-EGF 発現を亢進させる重要な要因であることを証明したものである。NO 産生、活性が阻害された場合、その抑制が失われることが HB-EGF 発現の増加に寄与し、腎障害を引き起こす、または増悪させるメディエーターとして働く機序が考えられた。この結果は HB-EGF 発現の増加が糖尿病性腎症の進行に重要な役割を果たし、NO が HB-EGF 発現を調節することを示唆しており、今後の糖尿病研究において、腎症の進行抑制や、新たな治療法へとつながる可能性がある有意義なものと考えられる。