

氏名(本籍)	村田 一知朗(岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第 1351 号
学位授与日付	平成 15 年 3 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Apoptotic Cell Loss Following Cell Proliferation in Renal Glomeruli of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats, A Model of Human Type 2 Diabetes
審査委員	(主査) 教授 藤原 久義 (副査) 教授 森 秀樹 教授 安田 圭吾

論文内容の要旨

近年、糖尿病性腎症はその罹患人口の急激な増加とともに、日本においても新規透析導入患者数において慢性糸球体腎炎を抜き第一位を占めるなど医学的、医療経済的に今後の重要課題の一つとなってきた。

一般的に糖尿病性腎症も含めて糸球体疾患は最終的に糸球体細胞数の低下とともに細胞外基質の増加、線維化が認められ、いわゆる糸球体硬化の様相を呈す。しかしそのメカニズムはまだ解明されていない。最近、IgA腎症などの糸球体腎炎疾患において増加した細胞を削除する役割としてアポトーシスが関与していることが報告されている。糖尿病性腎症では尿管におけるアポトーシスに関しては報告を認めるが糸球体に関してはほとんど報告されていない。

最近、2型糖尿病を自然発症する動物モデル(OLETFラット)が開発された。この動物モデルは約20週齢で高血糖を呈し、緩徐に糖尿病を発症する。そして特筆すべきは腎臓の病理学的所見が人間の糖尿病性腎症の進展過程に類似していることである。本研究の目的はこのモデルを用い糖尿病性腎硬化症の進展にともなう細胞数減少におけるアポトーシスの関与を検討することである。

対象と方法

糖尿病自然発症ラット(OLETFラット)とコントロールラット(LETOラット)を生後週齢6週より当院飼育室にて飼育(室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、昼夜12時間交代)。食餌は一般的なラット用の餌を与え週齢10週、30週、50週、70週にてそれぞれ各8匹sacrifice施行し腎臓を摘出し腎重量を測定した後分割、ホルマリン、グルタルアルデヒド、凍結にて固定しその後病理学的検討をした。病理学的検討ではPAS染色により細胞数と糸球体面積を測定し、In situ nick end-labeling(TUNEL)法とTaq polymerase-based in situ ligation法と電子顕微鏡にてアポトーシス細胞の有無と糸球体基底膜の検討を、免疫染色では細胞分裂、増殖の指標であるPCNA法、アポトーシス抑制の指標であるBcl-2、アポトーシス促進の指標であるBAX、をそれぞれに施行した。各切片にて50個の糸球体を検討した。

結果

10週齢においては体重、血糖値はOLETFラットとLETOラットに差は認めないが、30週齢以降はOLETFラットのほうが、体重、血糖値ともに有意に増加していた。糸球体の病理学的所見に関してはLETOラットが週齢を通じてほとんど変化しないのに対してOLETFラットは30週齢以降には細胞外基質、細胞数の増加とともに糸球体面積の有意な増加いわゆる糸球体肥大を認め、70週齢には細胞数の減少とともに硬化病変が出現した。糸球体基底膜に関しても30週齢以降、OLETFラットに有意な肥厚を認めた。この病理学的変化は人の糖尿病性腎症の変化と類似していた。PCNA陽性細胞数はLETOラットよりOLETFラットの方が10週齢より50週齢まで有意に

多いが、10週齢が最高値で次第に低下、70週齢ではほぼ同数となっている。週齢を経て行くほどに細胞の増殖能が低下していくことを示していると思われる。アポトーシス細胞、TUNEL陽性細胞、in situ ligation陽性細胞はLETOラットにおいてはほとんど、どの週齢においても認められなかった。OLETFラットでは初期の週齢(10週齢~30週齢)では同様に認められないが、TUNEL陽性細胞数は、50週齢では全体の細胞数における0.38±0.14%、70週齢では0.55±0.25%認め、in situ ligation陽性細胞は50週齢では全体の細胞数における0.13±0.22%、70週齢では0.27±0.33%認めた。TUNEL陽性、in situ ligation陽性を示した細胞をタイプ別に検討してみると、どちらも多い順にメサンギウム細胞、内皮細胞、上皮細胞であった(64 vs 34 vs. 4%、68 vs. 30 vs. 2%)。また電子顕微鏡においてもOLETFラットにおいてアポトーシス細胞をそれぞれのcell typeにおいて観察、認めた。アポトーシス抑制の指標であるBcl-2免疫染色陽性細胞数は初期の10週齢~30週齢においてOLETFラットの方が増加していたが後期(50~70週齢)においてはLETOラットとほぼ同数であった。アポトーシス促進の指標であるBAX免疫染色陽性細胞数は後期(50-70週齢)にOLETFラットが有意に増加していた。その為BAX/Bcl-2の割合はOLETFラットにおいて後期になる程増加していた。

考察

今回の動物モデル、OLETFラットの糸球体細胞数は初期には増加を認めるが中期から後期に減少していく。この動物モデルは後期まで腎機能の低下は認めなかった。その為このモデルは人における比較的早期から中期の糖尿病性腎症をモデルしていると思われる。人の糖尿病性腎症では初期の糸球体細胞数増加に関しては論議の分かれるところである。人における糖尿病発症早期における腎生検が少数であることに起因していると思われる。PCNA陽性細胞数の初期の増加と中期から後期のアポトーシス促進因子であるBAXと抑制因子であるBcl-2の割合(BAX/Bcl-2)の増加、アポトーシス細胞(TUNEL陽性細胞・Taq陽性細胞数)の増加、電子顕微鏡によるアポトーシス細胞の確認は糸球体細胞の減少にアポトーシスが関与していることを示唆している。またこの細胞数減少の持続が人の糖尿病性腎症後期の腎硬化につながると思われる。今後このアポトーシス促進因子であるBAX/Bcl-2の抑制などアポトーシス発現の阻害が糖尿病性腎硬化症の治療につながると思われる。

結語

糖尿病自然発症ラットにおいて糸球体細胞数の減少にアポトーシスが関与しており、アポトーシス促進因子であるBAX/Bcl-2の発現がその重要な役割を果たしていることが判明した。これは現在有効な治療法が確立されていない糖尿病性腎症の新たな治療戦略を構築する上で有用な所見であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者 村田一知朗は、糖尿病性腎症動物モデルを用いて糖尿病性腎硬化症進行にアポトーシスが関与していることを示した。これは今後糖尿病性腎症治療の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Apoptotic Cell Loss Following Cell Proliferation in Renal Glomeruli of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats, A Model of Human Type 2 Diabetes

Am J Nephrol.2002;22:587-595