

氏名(生年月日)	武 田 将 伸
本 籍	
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	乙第2117号
学位授与の日付	平成13年11月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	<b>High glucose stimulates hyaluronan production by renal interstitial fibroblasts through the protein kinase C and transforming growth factor-<math>\beta</math> cascade</b> (高糖濃度は PKC, TGF- $\beta$ を介し腎間質線維芽細胞におけるヒアルロン酸産生を亢進させる)
論文審査委員	(主査) 教授 岩本 安彦 (副査) 教授 二瓶 宏, 小林 槇雄

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

糖尿病性腎症の発症機序において, protein kinase C (PKC) および transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) が key mediator となって, 細胞外基質の構成が変化することが重要と考えられている。ヒアルロン酸(HA)は細胞外基質成分の一つであり, 腎症発症との関連が示唆されている。

本研究は, 腎間質線維芽細胞(NRK)の高糖濃度下でのHA産生能および細胞増殖への影響, さらにそれらに対するPKCおよびTGF- $\beta$ の関与を明らかにすることを目的とした。

#### 〔方法〕

①糖濃度とHA産生: 24-well dishに confluent になったNRKを正常糖濃度(5.6mM D-グルコース, NG)あるいは高濃度(25.6mM D-グルコース, HG)の無血清DMEM培地で12~24時間培養後, 上清中のHA濃度を測定した(細胞溶解液中の蛋白量で補正)。L-グルコース, マニトールを添加した条件で高浸透圧の影響も検討した。

②PKC, TGF- $\beta$ とHA産生: NG, HG培地にPMA, PKC阻害剤(Staurosporine, Calphostin C), TGF- $\beta$ , 抗TGF- $\beta$ 中和抗体をそれぞれ加え, 上清中のHA濃度を測定した。

③高糖濃度とPKC活性: NRKをNG, HG培地でそれぞれ24時間培養後, EGF receptor substrateを基

質として in situ PKC 活性を測定した。

④PKC, TGF- $\beta$ の相互作用: NG培地にPMAおよび抗TGF- $\beta$ 中和抗体を添加し上清HA濃度を測定, またTGF- $\beta$ およびPKC阻害剤を加え同様の検討を行った。

⑤HAと細胞増殖: NRKを0~200ng/mlのHAを添加した無血清DMEM培地で24時間培養し, 比色法で細胞増殖に対する影響を検討した。

#### 〔結果〕

①24時間の高糖濃度刺激により, NRKのHA産生は有意に増加した。一方L-グルコース, マニトールを添加した検討では, HA濃度の増加は認めなかった。

②PMAあるいはTGF- $\beta$ 添加によって上清HA濃度は有意に上昇した。また高糖濃度による上清中HA濃度の有意な上昇は, PKC阻害剤あるいは抗TGF- $\beta$ 中和抗体のいずれによっても抑制された。

③HG群におけるPKC活性は, NG群に比し有意に増加した。

④HA濃度に対するPMAの効果は抗TGF- $\beta$ 中和抗体により抑制されたが, TGF- $\beta$ による効果はPKC阻害剤によって抑制されなかった。

⑤50~100ng/mlのHA添加により, 有意な細胞数増加を認めた。

#### 〔考察〕

L-グルコース, マニトールを添加した検討より, 高糖

濃度により上清 HA 濃度の上昇は D-グルコースに特異的と考えられた。また PKC, TGF- $\beta$  に関する一連の検討より, 高糖濃度が NRK の PKC 活性を亢進させることを認め, HA 産生が亢進する機序に PKC および TGF- $\beta$  が介在すると考えられた。さらに NRK に対し

HA は増殖促進作用を有することも確認された。

〔結論〕

ヒアルロン酸は糖尿病性腎症の発症に関与する可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

糖尿病性腎症の成因の 1 つにプロテインキナーゼ C (PKC) 活性の亢進が注目されている。本研究は, 培養腎間質線維芽細胞を用いて高糖濃度がヒアルロン酸 (HA) の産生や細胞増殖に及ぼす影響などを検討したものである。その結果, 高糖濃度刺激により HA 産生が増加すること, PKC 活性が上昇すること, それらの作用が PKC 阻害剤によって抑制されること, PMA または TGF- $\beta$  により HA 産生が増加することなどが示された。

本研究は糖尿病性腎症の成因に新知見を加えるもので, 高く評価できる。

### 主論文公表誌

High glucose stimulates hyaluronan production by renal interstitial fibroblasts through the protein kinase C and transforming growth factor- $\beta$  cascade (高糖濃度は PKC, TGF- $\beta$  を介し腎間質線維芽細胞におけるヒアルロン酸産生を亢進させる)

Metabolism Vol 50 No 7 789-794 頁 (2001 年 8 月 1 日 発行) Masanobu Takeda, Tetsuya Babazono, Kosaku Nitta, Yasuhiko Iwamoto

### 副論文公表誌

- 1) 培養腎間質由来線維芽細胞の細胞周期とフィブロネクチン産生に対する高糖濃度の影響. 糖尿病 41(2):111-118 (1998) 武田将伸, 新田孝作, 馬場園哲也, 高橋千恵子, 湯村和子, 岩本安彦, 二瓶宏, 大森安恵
- 2) 血液透析導入, 生体腎移植後, 著しい下肢閉塞性動脈硬化症の進行をきたし, 足壊疽を併発した若年発症インスリン非依存型糖尿病の 1 例. Diabetes J 24(1):20-24 (1996) 武田将伸, 大賀聡子, 佐伯明子, 鈴木奈津子, 朝長 修, 横山宏樹, 馬場園哲也, 新城孝道, 高橋千恵子, 渊之上昌平, 太田和夫, 大森安恵
- 3) 高血糖, 非定型的皮疹の出現から 20 年後にグルカゴノーマを発見された糖尿病の 1 症例. 糖尿病 44(5):405-409 (2001) 武田将伸, 菅沼信也, 鈴木奈津子, 馬場園哲也, 岩崎直子, 新城孝道, 高橋健, 岩本安彦
- 4) 糖尿病性腎不全に対する腎移植の予後に関する研究. 糖尿病 38(5):347-352 (1995) 馬場園哲也, 寺岡 慧, 武田将伸, 作家有実子, 青木かを里, 朝長 修, 高野靖子, 横山宏樹, 宇治原典子, 高橋千恵子, 佐中 孔, 高橋公太, 東間 紘, 太田和夫, 大森安恵
- 5) 糖尿病透析患者の眼合併症に対する内科的管理.

眼科手術 7(4):551-556 (1994) 馬場園哲也, 作家有実子, 武田将伸, 青木かを里, 朝長 修, 高野靖子, 宇治原典子, 高橋千恵子, 大森安恵, 北野滋彦, 堀 貞夫

- 6) Predictors of the progression of diabetic nephropathy and the beneficial effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors in NIDDM patients (2 型糖尿病患者における腎症進展の予知因子とアンジオテンシン変換酵素阻害薬の予防効果). Diabetologia 40(4):405-411 (1997) Hiroki Yokoyama, Osamu Tomonaga, Michiyo Hirayama, Akiko Ishii, Masanobu Takeda, Tetsuya Babazono, Noriko Ujihara, Chieko Takahashi, Yasue Omori
- 7) 腎不全患者における糖化アルブミン測定の有効性. 糖尿病 39(11):849-855 (1996) 朝長 修, 馬場園哲也, 田中好子, 石井晶子, 平山美智代, 佐藤 賢, 武田将伸, 作家有実子, 青木かを里, 高野靖子, 宇治原典子, 高橋千恵子, 大森安恵
- 8) 糖尿病性腎症に対するアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬の効果—ACE 遺伝子多型による差異—Ther Res 20(4):244-246 (1999) 朝長 修, 宇治原典子, 平山美智代, 佐藤 賢, 石井晶子, 武田将伸, 作家有実子, 横山宏樹, 馬場園哲也, 高橋千恵子, 岩本安彦
- 9) 早期糖尿病性腎症における尿中トランスフェリン測定の意義. 東女医大誌 68(5):223-229 (1998) 作家有実子, 馬場園哲也, 武田将伸, 朝長 修, 高野靖子, 宇治原典子, 佐中 孔, 高橋千恵子, 大森安恵, 岩本安彦
- 10) 早期糖尿病性腎症でみられる charge selectivity の障害—IgG/IgG4 index による検討. 糖尿病 40(3):165-170 (1997) 佐藤 賢, 横山宏樹, 武田将伸, 朝長 修, 高橋千恵子, 大森安恵