



Endothelial cell-selective adhesion molecule regulates albuminuria in diabetic nephropathy

原, 哲也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4662

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004662>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	原 哲也
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4662 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Endothelial cell-selective adhesion molecule regulates albuminuria in diabetic nephropathy(血管内皮特異的接着分子は糖尿病性腎症においてアルブミン尿を規定する)

審 査 委 員

主 査	教 授	深川	雅史
	教 授	清野	進
	教 授	横崎	宏

[緒言]

糖尿病性腎症は糖尿病における主要な合併症の一つであり、末期腎不全の原因となりうる。アルブミン尿はこの糖尿病性腎症の発症早期に出現するが、尿中へのアルブミンの漏出は糸球体の、有窓性血管内皮細胞、糸球体基底膜、足突起の三層構造により防御されていることが知られている。この三者の中では、有窓性の血管内皮細胞の影響は少なく、主に後二者の役割が大きいと一般的に考えられてきたが、近年、血管内皮細胞の糸球体バリアー機能における役割も注目されている。

一方、血管内皮特異的接着分子 (ESAM) は我々が近年発見した、血管内皮に特異的に発現する新規の接着分子であり、細胞同士の接着や血管透過性の調節において役割を果たしていることを我々は報告した。また、ESAM は腎臓糸球体においても発現していることが知られていることから、ESAM が腎臓糸球体での透過性に関与している可能性が示唆される。それゆえ、我々は高血糖状態での ESAM の発現や機能を検討することによって、糖尿病性腎症におけるアルブミン尿の発症機序における ESAM の役割を検討した。

[方法]

高血糖状態における ESAM の発現レベルを検討するために、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を低血糖状態もしくは高血糖状態で培養し、ESAM の mRNA 及び蛋白発現レベルをそれぞれ、リアルタイム PCR 及びウェスタンブロットにて評価した。高血糖状態に伴う高浸透圧の影響を除外するために、マンニトールを用いた高浸透圧状態においても ESAM の発現レベルを確認した。また、siRNA を用いて ESAM 選択的にノックダウン、また ESAM 過剰発現 PY4.1 細胞を用いて ESAM 過剰発現モデルにおける血管透過性を検討した。

生体内で高血糖状態における腎臓における ESAM の発現を検討する目的で、マウスにストレプトゾトシン (STZ) 200mg/kg を腹腔内投与することにより、高血糖状態を作成し、その四週間後にマウス腎臓を採取して ESAM の発現レベルを検討した。また、ESAM ノックアウトマウスにおいて尿中のアルブミン濃度を検討し、さらに ESAM ノックアウトマウスの腎臓を電子顕微鏡で詳細に検討することによって、糸球体の構造変化の有無を検討した。また、ESAM は接着分子であるため、血管内皮におけるタイトジャンクションの構造を野生型マウス及び ESAM ノックアウトマウスの血管内皮細胞において比較検討した。

[結果]

1. 培養血管内皮細胞における高血糖刺激時の ESAM の発現

HUVEC に 35mM の高血糖刺激を行うと、ESAM の mRNA、蛋白発現量は

5.5mM の低血糖刺激群に比較して減少したが、マンニトールによる高浸透圧性刺激では変化を認めなかった。

2. ESAM の血管透過性における役割の検討

HUVEC に高血糖刺激を行うと、血管透過性は亢進した。この透過性の亢進に ESAM が役割を果たしているかを確認するために、HUVEC に対して siRNA を用いて ESAM 選択的にノックダウンを行うと、アルブミンの透過性が亢進した。逆に、ESAM 過剰発現 PY4.1 細胞ではコントロール PY4.1 細胞に比較して血管透過性は低下し、また、高血糖刺激による透過性の亢進が抑制された。

3. 生体内における高血糖状態での腎臓における ESAM の発現

野生型マウスに STZ を腹腔内投与することにより高血糖状態を作成し、四週間後にマウス腎臓を採取した。この腎臓において ESAM の mRNA および蛋白発現量は正常血糖群に比較して著明に減少した。

4. ESAM ノックアウトマウスにおける尿中アルブミン濃度

生体内においてアルブミン尿発症における ESAM の役割を直接的に検討するため、ESAM ノックアウトマウスにおける尿中アルブミン濃度を測定した。結果、尿中アルブミン・クレアチニン比は野生型マウスと比較して有意に高値を示した。

5. ESAM ノックアウトマウスにおける糸球体、及び血管内皮におけるタイトジャンクションの構造変化

ESAM ノックアウトマウスにおいては野生型マウスに比較して尿中アルブミン濃度が高いことより、バリアー機能を果たしている糸球体構造に何らかの変化がある可能性がある。また、ESAM はタイトジャンクション部位に高発現しており、血管透過性にも関わっていることから、このタイトジャンクションにも構造変化がある可能性がある。それゆえ、電子顕微鏡的に詳細に検討を行った。糸球体においては、光学顕微鏡的には構造変化を認めなかったものの、電子顕微鏡で検討すると、糸球体血管内皮細胞における開窓が野生型マウスに比較して、著明に減少していることが明らかになった。

さらに、血管内皮細胞間のタイトジャンクションにおいて、ESAM ノックアウトマウスでは間隙の幅が不規則であり、部分的に拡張していることが明らかになった。

[考察]

ESAM は血管内皮細胞におけるタイトジャンクションにおいて豊富に発現している。それゆえ、ESAM の発現低下は細胞間接着の低下を引き起こすことによって、透過性を亢進させることは容易に推測できる。実際、今回我々は ESAM のノックダウンにより、血管内皮細胞のタイトジャンクションが部分的

に拡張することが分かり、また ESAM の発現レベルと血管透過性が逆相関することを明らかにした。さらに、ESAM ノックアウトマウスでは尿中アルブミン濃度が増加することから、ESAM は腎臓におけるバリアー機能を調節していることが推測され、糖尿病性腎症においては、ESAM の発現の減少することによる血管透過性の亢進が、アルブミン尿の発生に役割を果たしていることが示唆された。

また、今回の電子顕微鏡による検討により、ESAM ノックアウトマウスにおいて、糸球体内皮細胞の開窓が野生型マウスに比べて著明に減少することが新規に明らかになった。糸球体内皮細胞の開窓それ自体のバリアー機能における役割は未だ明らかではないが、ヒト糖尿病性腎症において、その重症度と開窓の減少が相関することが報告されている。しかしながら、糸球体の蛋白漏出に対するバリアー機能において、血管内皮細胞には蛋白が容易に通過できる大きな開窓があるため、バリアー機能に関してはほとんど役割を果たしていないと考えられている。一方、糖尿病や子癇など血管内皮が障害される病態においてアルブミン尿が発生することも知られており、糸球体バリアー機能においての血管内皮細胞の役割は未だ議論の分かれるところであるが、本研究により、さらにバリアー機能における糸球体血管内皮細胞の役割が注目されることが期待される。

【まとめ】

培養細胞及び、生体内において高血糖刺激により ESAM の発現は減少し、血管透過性が亢進した。ESAM 選択的ノックダウンにより、血管内皮のタイトジャンクションが部分的に拡張し、糸球体の開窓が減少し、尿中アルブミン濃度が増加した。それゆえ、ESAM は尿中へのアルブミン漏出に関与しており、特に糖尿病性腎症におけるアルブミン尿の発症に役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 2000 号	氏 名	原 哲也
論 文 題 目 Title of Dissertation	Endothelial cell-selective adhesion molecule regulates alubuminuria in diabetic nephropathy 血管内皮特異的接着因子は糖尿病性腎症においてアルブミン尿を規定する		
審 査 委 員 Examiner	主 査 浮川 雅史 Chief Examiner 副 査 清野 進 Vice-examiner 副 査 横崎 公 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0字～2, 0 0 0字程度)

微量アルブミン尿は、糖尿病性腎症の最初の兆候である。糸球体からアルブミンが漏出する機序については、これまで上皮細胞や基底膜の障害が重視されてきたが、最近の研究では、血管内皮細胞の役割が注目されている。

一方、血管内皮特異的接着因子(ESAM)は、Hirata らによってクローニングされた免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、内皮細胞表面に存在する新しいタンパク質であり、細胞接着や血管透過性に関与していると考えられている。その発現は、血管の内皮細胞に局限している。さらに、腎臓において ESAM は、糸球体で発現が見られ、他の内皮細胞のマーカーと共存している。以上の背景より、原哲也氏は、ESAM が糸球体の内皮細胞におけるアルブミン透過性に関与しているのではないかという仮説を立て、それを細胞ならびに動物を用いた実験で詳細に検討した。

まず、ESAM は、正常マウスでは糸球体内皮細胞において強く発現されているが、ストレプトゾチン投与により作成した糖尿病マウスにおいては、発現が低下していた。また、培養内皮細胞では、培養液中のグルコース濃度を上げることにより、ESAM の mRNA とタンパクの発現が低下した。

次に、内皮細胞におけるアルブミンの透過性と ESAM の関係を、エバンスブルーでラベルしたアルブミンを用い、insert 上に単層培養された HUVEC 細胞を介した移行を評価することによって検討している。siRNA を用いて ESAM の発現をノックダウンすると、高血糖によるアルブミン透過性がさらに亢進した。一方、ESAM の発現を亢進させると、アルブミンの透過性は低下した。

これをさらに確認するために、ESAM ノックアウトマウスを用いた検討を行っている。ESAM ^{-/-}マウスでは、ESAM^{+/+}マウスに比べて、尿中へのアルブミンの排泄が亢進しており、透過電子顕微鏡による観察では、ESAM ^{-/-}マウスで糸球体内皮の fenestratio が減少し、tight junction の異常所見が見られた。

以上の観察より、ESAM は糸球体におけるアルブミンの透過性の調節に大きな役割を果たしており、糖尿病性腎症の発症の初期に関与していると考察している。

本研究は、糖尿病性腎症発症における糸球体血管内皮細胞の役割について検討したものであるが、従来検討されていない血管内皮特異的接着因子(ESAM)の関与について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。