

氏名・(本籍)	中 川 浩 子 (大阪府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第347号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成12年3月27日
学位論文題目	Immunohistochemical characterization of glomerular PDGF B-chain and PDGF $\beta$ -receptor expression in diabetic rats (糖尿病ラットにおける糸球体 PDGF-B 鎖および PDGF- $\beta$ 受容体発現の免疫組織化学的特徴)

審査委員	主査 教授	岡 田 裕 作
	副査 教授	挾 間 章 忠
	副査 教授	吉 川 隆 一

## 論文内容の要旨

### 【目 的】

腎炎モデルあるいはヒト糸球体腎炎において、platelet-derived growth factor (PDGF) -B 鎖によるメサンギウム細胞の増殖および細胞外基質の蓄積が、その発症進展過程に関与していることが報告されている。また、糖尿病ラットの糸球体においても、PDGF-B mRNA 発現増加が報告されている。しかし、糖尿病ラットの糸球体において PDGF-B および PDGF- $\beta$  受容体 (PDGFR- $\beta$ ) 蛋白発現が増加しているか否か、また、いかなる糸球体構成細胞で増加しているのかはいまだ明らかではない。そこで本研究は、糖尿病ラット糸球体における PDGF-B および PDGFR- $\beta$  蛋白の発現を免疫組織化学的に検索し、さらにそれらの機能的役割を検討することを目的とした。

### 【方 法】

1. 6週齢 Sprague-Dawley 雄性ラットに streptozotocin (50mg/kg body weight in 0.1M citrate buffer) を尾静脈より注射し、糖尿病ラットを作成した。Citrate buffer のみを注射したラットを正常ラットとした。一部の糖尿病ラットには insulin 治療を行った (insulin 治療ラット)。
2. 糖尿病ラット作成 2、4、12週後に深麻酔下に左右腎臓を Ringer 液で脱血し、左腎を methyl Carnoy 液にて浸透固定、さらに右腎を10%ホルマリン液にて灌流固定し、同液にて浸透固定後、パラフィン切片を作製した。
3. 抗 PDGF-B monoclonal 抗体と抗 PDGFR- $\beta$  polyclonal 抗体を用い、これら蛋白の発現を ABC 法にて半定量的に比較した。また、抗体の特異性は吸収試験にて確認した。
4. 上皮細胞のマーカーである抗 WT 抗体とメサンギウム細胞のマーカーである抗 Thy-1 抗体を用いて、ミラー切片にて PDGF-B 又は PDGFR- $\beta$  の局在を確認した。
5. 画像解析装置を用いて PAS 染色切片にて糸球体断面積を求め、それから糸球体体積を算出した。
6. PDGF の機能的役割を明らかにするため、PDGF 拮抗的阻害剤である trapidil (80mg/kg body weight) を糖尿病ラットに連日腹腔内投与した。4週間後、糸球体体積を正常および糖尿病ラットと比較した。

### 【結 果】

1. 各週における血糖値は、正常および insulin 治療糖尿病ラットに比較して、糖尿病ラットにおいて有意に高く、体重は逆に有意に低かった。腎重量/体重比も正常ラットに比較して糖尿病ラットにおいて有意に高く、insulin 治療により正常化した。
2. 糸球体 PDGF-B 蛋白の発現は、正常および insulin 治療糖尿病ラットに比し、2 から12週間糖尿病ラットにおいて約1.8倍に増加していた。ミラー切片にて PDGF-B は、メサンギウム細胞だけでなく、糸球体上皮細胞にも発現していることが証明された。

3. 糸球体 PDGFR- $\beta$  蛋白の発現は、正常ラットに比し 4、12週で糖尿病ラットにおいて約 2 倍増加し、12週の insulin 治療により減少した。ミラー切片にて PDGFR- $\beta$  陽性細胞は、糸球体上皮細胞あるいはメサンギウム細胞であることが確認された。
4. 2 から12週間の糖尿病ラットでは糸球体体積の増加が認められ、insulin 治療により改善した。
5. 4 週間の trapidil 治療により糖尿病ラットに認められた糸球体肥大は正常化した。尚、trapidil 治療群で血糖値、体重、血清クレアチニン値の変化は認められなかった。

#### 【考 察】

本研究で、PDGF-B および PDGFR- $\beta$  蛋白の発現が、正常および insulin 治療糖尿病ラットに比較して、糖尿病ラット糸球体において増加していることを明らかにした。さらに、これら蛋白は糸球体メサンギウム細胞および上皮細胞に発現していることを確認した。PDGF-B は、メサンギウム細胞の増殖因子であると同時に細胞外基質の蓄積にも関与しており、この発現の増加は、糖尿病性腎症に認められるメサンギウム基質の拡大に関与している可能性が示される。PDGF が上皮細胞を活性化するという報告もあり、本研究結果は PDGF-axis が糖尿病性早期腎症の発症に関与している可能性を示唆する。本研究では、PDGF-B および PDGFR- $\beta$  発現増加と平行して、糖尿病ラットにおいて糸球体肥大が認められ、この糸球体肥大が PDGF-B の阻害剤である trapidil により抑制された。糖尿病糸球体で PDGF 発現が増加する機序はまだ明らかではないが、高糖濃度条件下で活性化される protein kinase C と高糖濃度条件下で蓄積する advanced glycation end products が関連している可能性がある。

#### 【結 論】

糖尿病ラット糸球体において、PDGF-B および PDGFR- $\beta$  蛋白の発現は増強していた。さらに、糖尿病早期の腎病変（糸球体肥大）発症に、PDGF 発現増強が関与している可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

糖尿病糸球体病変の成立機序を明らかにする目的で、実験的糖尿病ラットにおける PDGF-B および PDGF- $\beta$  受容体蛋白の発現およびそれらの機能的役割を組織化学的に検討し、以下の結果が得られた。

- 1) 糖尿病ラット糸球体において、PDGF-B および PDGF- $\beta$  受容体蛋白の発現は正常は比して増加していた。
- 2) PDGF-B および PDGF- $\beta$  受容体蛋白の発現はメサンギウム細胞および糸球体上皮細胞に認められた。
- 3) PDGF-B および PDGF- $\beta$  受容体蛋白の発現増強と平行して糸球体肥大が認められ、insulin 治療により両者は共に改善した。
- 4) PDGF 阻害剤 trapidil 治療により糖尿病ラットに認められた糸球体肥大は改善した。

以上の研究は、糖尿病早期の糸球体病変（糸球体肥大）成立に対する PDGF-B の役割を明らかにする上で重要な意味を持つものであると考えられる。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

尚、本学位授与申請者は、平成12年2月15日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められらものである。