

氏 名 桑形 尚吾

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 博士甲第772号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項

学位授与年月日 平成29年 3月10日

学位論文題目 MicroRNA148b-3p inhibits mTORC1-dependent apoptosis in diabetes by repressing TNFR2 in proximal tubular cells

(MicroRNA-148b-3p は近尿細管細胞における TNFR2 の発現制御を介して糖尿病で惹起される mTORC1 依存性のアポトーシスを抑制する)

審査委員 主査 教授 小島 秀人

副査 教授 村上 節

副査 教授 辻川 知之

論文内容要旨

※整理番号	780	(ふりがな) 氏名	くわがた しやうご 桑形 尚吾
学位論文題目	MicroRNA148b-3p inhibits mTORC1-dependent apoptosis in diabetes by repressing TNFR2 in proximal tubular cells (MicroRNA-148b-3pは近位尿細管細胞における TNFR2 の発現制御を介して糖尿病で惹起される mTORC1 依存性のアポトーシスを抑制する)		
【目的】 糖尿病性腎症(腎症)において、尿蛋白排泄量の軽減を主眼とした治療法が確立されているが、腎機能低下の進行抑制に有効な治療法は未だ確立されていない。腎機能低下に尿細管病変の関与が知られているが、糖尿病を原疾患とする場合には低酸素状態が、その病態形成に大きく寄与することが注目されている。元来、すべての細胞は、低酸素状態でも生存できるように、転写因子 HIF1 α を活性化し、栄養感知分子 mTORC1 を抑制する低酸素応答を備えている。そこで、我々は、「糖尿病に伴う全身の糖・脂質代謝異常が腎局所の低酸素応答を破綻させ尿細管障害を惹起する」と仮説を立て、尿細管保護を目的とした新規腎症治療標的の同定を目指すこととした。			
【方法】 ① 低酸素応答機構の破綻が糖尿病の近位尿細管障害に及ぼす影響の検討 50 週齢の肥満 2 型糖尿病モデル OLETF ラットと対照 LETO ラットから腎臓を摘出し、連続切片として免疫染色に用いた。尿細管障害の指標となるアポトーシスの検出には TUNEL 法、低酸素状態の検出には HIF1 α の免疫染色、mTORC1 活性の検出には、リン酸化 S6 蛋白の免疫染色を行った。			
② 糖尿病の糖・脂質代謝異常が低酸素応答と近位尿細管障害に及ぼす影響の検討 培養近位尿細管細胞 (mProx24 細胞) を、低酸素 (1%酸素)、高糖濃度 (ブドウ糖 25.5mM)、高脂肪酸 (パルミチン酸 150 μ M) を組み合わせた条件下で培養し、9 時間後に回収した。Western Blot 法で、低酸素状態の検出に HIF1 α の定量、mTORC1 活性の検出に P70S6K と S6 蛋白のリン酸化の定量、アポトーシスの検出に切断化 Caspase3 と切断化 PARP の定量を行った。また mTORC1 阻害薬 (Rapamycin) の共孵置が、尿細管障害に及ぼす影響を検討した。			
③ mTORC1 依存性の近位尿細管障害を制御する microRNA (miR) の同定 アポトーシスに関連する mTORC1 シグナルを特異的に制御する分子を同定するため、mTORC1 シグナルを様々な機序で制御する miR に着目した。mProx24 細胞を、対照群、低酸素、高糖濃度、高脂肪酸の各単独刺激群、低酸素+高糖濃度+高脂肪酸			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。

の混合刺激群、混合刺激+Rapamycin 群の6群に分け、miRの発現量をmicroarray解析で測定した。各単独刺激群と混合刺激群+Rapamycin 群の発現が同等となりこれらと比較して混合刺激群で発現が変動するmiRを選定し、強制発現または発現抑制で尿細管障害が改善するmiRを候補遺伝子として同定した。さらに生理的なmTORC1活性に影響するmiRを除外するため、InsulinによるmTORC1活性化に対する候補遺伝子の作用を検討した。

④ miRの標的遺伝子の同定

Web上に公開されているmiRの標的候補遺伝子の中から、6群での発現様式がmiRと相補的となり、miRの強制発現で発現が抑制される遺伝子を選定した。このうちLuciferase Reporter 実験でmiRとの結合が確認できた遺伝子を標的遺伝子とした。さらにRNA干渉法を用いた標的遺伝子の発現抑制が尿細管障害に及ぼす影響を検討した。

⑤ 標的遺伝子がOLETFラットの近位尿細管障害で果たす役割の検討

OLETFラットとLETOラットの腎連続切片で、標的遺伝子の免疫染色を行った。

【結果】

OLETFラットでは、近位尿細管細胞におけるHIF1 α の発現増強が認められた。HIF1 α が活性化した近位尿細管細胞の中で、mTORC1も活性化した細胞でアポトーシスの惹起が認められた。低酸素状態で高糖濃度と高脂肪酸の刺激を同時に付加したmProx24細胞では、mTORC1が活性化し、アポトーシスが惹起された。次にmicroarray解析で、InsulinによるmTORC1活性に影響せず、尿細管障害を制御するmiR-148b-3pを同定、さらにその標的遺伝子Tumor necrotic factor receptor 2 (TNFR2)を同定した。TNFR2の発現を抑制したmProx24細胞では、混合刺激によるアポトーシス惹起が抑制された。さらにOLETFラットでは、HIF1 α とmTORC1が活性化し、アポトーシスを惹起した近位尿細管細胞でTNFR2の発現増強が認められた。

【考察】

糖尿病における近位尿細管障害の発症には、血管病変に起因した低酸素状態だけでなく、糖・脂質代謝異常による腎局所の低酸素応答機構の破綻が関与することが示唆された。血清TNFR2は、尿蛋白排泄量に依存せず腎機能低下を示す腎症の予後予測因子と報告されており、本研究が示すmTORC1/miR-148b-3p/TNFR2の経路が腎症の病態に関与する可能性が示された。

【結語】

mTORC1/miR-148b-3p/TNFR2経路の制御が、腎症における腎機能低下阻止を目指した新たな治療戦略になる可能性を示した。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	780	氏名	桑形 尚吾
論文審査委員			
<p>本論文では「糖尿病に伴う全身の糖・脂質代謝異常が腎局所の低酸素応答を破綻させ尿細管障害を惹起する」との仮説を立て、糖尿病性腎症の発症要因を検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none">1) 脂質異常症を併発する糖尿病モデル動物 OLETF ラットの近位尿細管では、低酸素時に働く HIF1α の活性化と同時に細胞のアポトーシスを観察した。2) 培養細胞において低酸素下で高糖濃度と高脂肪酸の刺激を同時に行い、細胞のアポトーシスを観察した。3) Microarray 解析により、尿細管障害を制御する因子として miR-148b-3p を同定し、その標的遺伝子が TNF-α 受容体 2 型 (TNFR2) であることを明らかにした。4) 培養細胞ならびに OLETF ラットにおける腎障害の原因として miR-148b-3p の発現低下に伴う TNFR2 の発現増強が関与する可能性を示した。 <p>本論文は、糖尿病の腎臓の発症要因として、近位尿細管での miR-148b-3p ならびに TNFR1 を介した異常の重要性をはじめて明らかにしたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判定されたので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 462 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 29 年 1 月 24 日)</p>			