

氏名(本籍)	坂口 正芳(大阪府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第 526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18年3月24日
学位論文題目	Inhibition of mTOR signaling with rapamycin attenuates renal hypertrophy in the early diabetic mice  (ラパマイシンによるmTOR経路の阻害は早期糖尿病マウスの腎肥大を抑制する)
審査委員	主査 教授 岡村 富夫 副査 教授 堀池 喜八郎 副査 教授 山路 昭

## 論 文 内 容 要 旨

※整理番号	<b>531</b>	(ふりがな) 氏 名	さかぐち まさよし 坂口 正芳
学位論文題目	Inhibition of mTOR signaling with Rapamycin attenuates renal hypertrophy in the early diabetic mice (ラパマイシンによる mTOR 経路の阻害は早期糖尿病マウスの腎肥大を抑制する)		
<b>【目的】</b> 腎肥大は糖尿病性腎症における初期病変であり、この肥大に伴う糸球体過剰濾過、尿細管機能の亢進が腎症の進展に関与している。これまで腎肥大を誘発する成長因子等が報告されているが、肥大を制御する詳細なメカニズムは未だ解明されていない。近年、細胞増殖や蛋白合成に関わる細胞内シグナル伝達分子である mammalian target of rapamycin (mTOR)の働きが注目されている。すなわち、mTOR やその上流、下流のシグナル分子である Akt や Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)、70kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6k) の活性化が細胞肥大、特に心臓や骨格筋細胞の肥大に関与していることが報告されている。さらに、圧負荷心不全モデル動物や片腎摘出後の代償性の腎肥大モデルにおいて、mTOR の選択的阻害剤であるラパマイシン投与により臓器肥大が改善すると報告されている。すなわち mTOR 経路が、病的状態での臓器肥大に重要な役割を果たしていると考えられる。 したがって、本研究ではストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病マウス(1 型糖尿病モデル)の腎臓肥大が mTOR 経路の活性化に関連しているか否かを確認し、mTOR の選択的阻害薬であるラパマイシンがその腎肥大を抑制するかを検討した。			
<b>【方法】</b> 8 週齢雄性 C57BL/6 マウスに STZ 150mg/kg を 2 日間腹腔内投与し糖尿病マウスを作成した。非糖尿病、糖尿病マウスに対し、それぞれラパマイシン 2mg/kg/日の腹腔内投与を行うことによって、非糖尿病群、非糖尿病+ラパマイシン群、糖尿病群、糖尿病+ラパマイシン群の 4 群を作成した。10 日後、体重、腎重量、心重量、血糖値、24 時間尿量、血圧を各々測定するとともに、腎臓での Akt, p70S6k のリン酸化と肥大の分子マーカーであるサイクリン依存性キナーゼインヒビター (CKI) p21 <sup>Cip1</sup> , p27 <sup>Kip1</sup> の発現をイムノブロット法にて検討した。次に尿細管肥大についてマウス培養近位尿細管細胞内に Lipofection 法を用いて p70S6k 恒常的活性化プラスミド, p70S6k 不活性化プラスミドを導入し、フローサイトメリー法を用いて細胞のサイズを測定し、p70S6k の活性化と尿細管細胞肥大の関係について検討した。			

(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で印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

**【結果】**

非糖尿病群に比べ、糖尿病群の血糖値、食餌量は有意に増加し、体重は有意に減少した。一方、腎重量、腎重量/体重比はともに非糖尿病群に比べ糖尿病群で有意に増加した。しかし、ラパマイシン投与により、血糖値、血圧、体重、心重量/体重比、食餌量に影響を与えることなく、糖尿病で増加した腎重量が特異的に抑制された。またイムノブロット法によって測定したマウス腎臓での p70S6k のリン酸化は、糖尿病群で増加し、その増加はラパマイシン投与で抑制された。さらに、腎肥大の分子マーカーである CKI p21<sup>Cip1</sup>、p27<sup>Kip1</sup> の蛋白発現も同様に糖尿病群で亢進し、その亢進はラパマイシン投与で抑制された。一方、Akt のリン酸化は各群ともに有意な変化を認めなかった。腎肥大機構として Akt 以後の過程の調節異常が示された。また p70S6k 恒常的活性化プラスミドを培養近位尿細管細胞に導入することにより細胞は肥大し、p70S6k 不活性化プラスミドを導入された細胞ではサイズが減少した。

**【考察】**

本研究にて早期糖尿病のマウス腎臓では mTOR 直下の p70S6k の活性化が明らかとなった。ラパマイシンの投与は、他の臨床パラメーターを変化させずに、早期糖尿病状態で亢進した p70S6k のリン酸化および CKI の蛋白発現を抑制するとともに、腎肥大を抑制した。また培養近位尿細管細胞においても p70S6k の活性化が細胞肥大を誘発すること、糖尿病の腎肥大は主として近位尿細管細胞によるものであることから mTOR-p70S6k 経路の活性化が早期糖尿病での腎肥大に重要であることが示された。近年 mTOR 経路を活性化する 2 つの経路が知られている。一つは growth factor による Akt を介した経路、もう一方は培養液中の糖、アミノ酸の増加により Akt を介さず mTOR を活性化する経路である。2型糖尿病モデルマウス(db/db マウス、腎臓)、1型糖尿病モデルラット(STZ 誘発、12 週、糸球体)においてインスリン等の growth factor が Akt をリン酸化すると報告されている。それに対し、今回、早期糖尿病マウスの腎臓を用いた我々の検討では、Akt のリン酸化はみられなかった。糖尿病状態で増加した食餌摂取により近位尿細管に対する糖、アミノ酸等の過負荷が生じ、このことが mTOR 経路の活性化に関連していると考えられる。今回、mTOR 選択的阻害剤のラパマイシンが早期糖尿病の腎肥大を抑制した。このことから mTOR 経路の制御が、糖尿病性腎症治療の新しいアプローチの可能性となりうることを示した。

**【結論】**

糖尿病発症初期の腎臓において mTOR 経路の p70S6k が活性化されており、この活性化が腎肥大の原因と関連する可能性が示された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	531	氏名	坂口 正芳
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は、細胞肥大に関与する mTOR-p70S6k 経路が糖尿病初期の腎肥大に関与しているか否かを検討したものである。</p> <p>STZ 誘発糖尿病マウスの腎臓において mTOR 経路活性化の指標である p70S6k のリン酸化は正常に比し増加していた。肥大の指標である腎重量、p21,p27 の蛋白発現も糖尿病マウスで増加していた。これらの異常はすべて mTOR 阻害薬である rapamycin 投与により改善した。一方 mTOR 経路の上流である Akt のリン酸化には変化が見られなかった。また、培養近位尿細管細胞に p70S6k の恒常的活性化プラスミドを導入すると細胞は肥大し、不活性化プラスミドの導入では縮小した。</p> <p>本論文は糖尿病初期の腎肥大に mTOR 経路が関与することを明らかにし、糖尿病性腎症の理解に寄与するものである。よって博士(医学)の学位を授与するに値すると評価された。</p> <p>なお、本学位授与申請者は 2006 年 2 月 1 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た。</p>			
(平成 18 年 2 月 2 日)			