

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	渡邊 淳
<h3>学位論文題目</h3>			
<b>TGF-<math>\beta</math> Enhances Insulin-Like Growth Factor Binding Protein- Related Protein 1 (IGFBP-rP1) Expression in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells.</b>			
(TGF- $\beta$ は、ヒト腎近位尿細管上皮培養細胞において、Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-Related Protein 1 (IGFBP-rP1)発現を増強する。)			
<h3>共著者名</h3>			
滝山 由美、本庄 潤、牧野 雄一、藤田 征弘、立野 正敏、羽田 勝計			
<h3>未公表</h3>			
<h3>研究目的</h3>			
<p>糖尿病性腎症の特徴的病変は腎系球体に存在するが、近年の病理学的検討等により、尿細管間質障害が腎機能不全に関連することが明らかとなっている。尿細管病変形成においては、尿細管上皮細胞を間質細胞に形質転換させる Epithelial Mesenchymal Transition (EMT)が、間質線維化機序として考えられており、その最も強力な誘導因子が transforming growth factor (TGF)-<math>\beta</math>である。今回、我々は、ヒト近位尿細管上皮細胞(human renal proximal tubular epithelial cell; HRPTEC)を TGF-<math>\beta_1</math> で刺激後、培養液中に分泌増加の認められる蛋白について liquid-chromatographic method coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)を用いた peptide mass fingerprint (PMF)法にて同定した。その蛋白の発現制御機構を解明すると共に、2 型糖尿病患者尿検体を用い、尿中への分泌と腎症との関連性について検討した。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

1. HRPTEC (Lonza 社) を 2.5 ng/ml TGF- $\beta_1$  あるいは 30 mM D-glucose 存在下に 24 時間培養後、培養液を回収濃縮した
2. 濃縮培養液を 5-20% SDS-PAGE にて分離し、coomassie brilliant blue で染色し目的のバンドを切り出し後、ゲル内トリプシン消化によって、ペプチドに断片化した。断片化ペプチドを更に濃縮・脱塩して、LC にて分離、MS/MS にて質量分析後、MASCOT(ver.2)にてデータベース検索を行った。
3. 同定された蛋白の遺伝子発現は real time RT-PCR 法、蛋白発現は Western blot 法を用いて検討した。
4. TGF- $\beta_1$  刺激による蛋白の発現制御経路について、MAP 系については、extracellular signal-regulated kinase (Erk)1/2 阻害剤 PD98059、p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)阻害剤 SB203580、c-Jun N-terminal kinase (JNK)阻害剤 SP600125 を用い、また Smad 経路については Smad2、Smad3、Smad4 の特異的 siRNA を用いて検討した。
5. HRPTEC における EMT への関与について、特異的 siRNA を用い TGF- $\beta_1$  刺激下に $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)、E-cadherin 蛋白発現について検討した。
6. 2 型糖尿病顕性腎症患者のパラフィン包埋腎生検組織標本を用い、蛋白の局在について免疫組織化学的検討を行った。
7. 旭川医科大学糖尿病内科に通院中の 2 型糖尿病患者 26 名を対象に、蛋白の尿中分泌と、腎機能等の臨床指標との関連について検討した。

## 成 績

1. HRPTEC 培養液中に、TGF- $\beta_1$  処理により増強した蛋白が数種類存在したが、その一つが 33kDa の Insulin-like Growth Factor Binding Protein-related Protein 1(IGFBP-rP1)であった。
2. HRPTEC は、恒常的に IGFBP-rP1 mRNA、また 33 kDa IGFBP-rP1 蛋白を発現していた。
3. TGF- $\beta_1$  は、HRPTEC において濃度、時間依存性に IGFBP-rP1 mRNA、蛋白発現を増強した。

4. TGF- $\beta_1$ 刺激による IGFBP-rP1 発現増強作用は、TGF- $\beta_1$ の下流シグナル伝達系である MAPK 系阻害剤の前処理による影響を受けなかったが、特異的 siRNA を用いた Smad2、4 の knockdown により抑制された。
5. TGF- $\beta_1$ は HRPTEC において、 $\alpha$ -SMA 蛋白発現を誘導し、E-cadherin 蛋白発現を抑制するが、IGFBP-rP1 特異的 siRNA 処理にて TGF- $\beta_1$ 誘導  $\alpha$ -SMA 発現は有意に抑制された。
6. 2 型糖尿病顕性腎症患者腎生検組織において、IGFBP-rP1 は尿細管細胞質にその発現を認め、メサンギウム細胞などの糸球体内細胞には認められなかった。
7. 26 名の 2 型糖尿病患者のうち、正常アルブミン尿 14 例中 1 例、微量アルブミン尿 7 例中 4 例、顕性アルブミン尿 5 例中 4 例に 25 kDa の分断型 IGFBP-rP1 を検出した。尿中 25 kDa IGFBP-rP1 陽性症例は、陰性症例と比較して、有意にアルブミン/クレアチニン比 (152.1 vs 18.4 mg/gCr、 $p=0.0029$ )、cystatin C (1.22 vs 0.85 mg/L、 $p=0.0446$ )が高値を呈し、eGFR (36.9 vs 75.4 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>、 $p=0.011$ )は低値を呈した。尿中 25 kDa IGFBP-rP1 陽性、陰性両群間において、HbA1c、糖尿病歴、糖尿病治療薬、収縮期血圧、コレステロール、BMI、糖尿病性網膜症の有無、喫煙歴等に有意差は認められなかった

## 考 案

IGFBP-rP1 は、1993 年、正常髄膜細胞で発現し、髄膜腫細胞において発現が減少する遺伝子 MAC25 としてクローニングされた。その発現は、全身の臓器に広く分布しており、他の IGFBP ファミリーに比べ、インスリンとの親和性が数百倍高いことから、最近では糖代謝における役割が報告されている。IGFBP-rP1 は、マトリプターゼにより 97 番目リジンと 98 番目アラニンの部位で分断化され、25kDa の分断型蛋白になり、インスリン、IGF 結合能力を失い、インスリン、IGF 依存性増殖促進作用が減少する一方、syndecan-1 を介した細胞接着性が増強することが知られている。また、最近 2 型糖尿病患者における血清中 IGFBP-rP1 濃度とインスリン抵抗性が相関することが報告された。

今回の検討で、ヒト腎近位尿細管上皮細胞において、TGF- $\beta_1$ が Smad 系を介し、IGFBP-rP1 の発現を増強する事が明らかになった。また、IGFBP-rP1

knockdownによる $\alpha$ -SMA 発現抑制効果は、IGFBP-rP1 が TGF- $\beta_1$  誘導 EMT に関与し、尿細管障害の新しい病態構成因子として作用することが示唆される。更に、IGFBP-rP1 は 2 型糖尿病性顕性腎症患者腎において、尿細管細胞質に局在し、糖尿病性腎症進行症例尿中に分断型と考えられる 25kDa IGFBP-rP1 が有意に多く認められた。糖尿病における尿細管病変の早期診断には、特異的診断マーカーの発見が必要とされており、尿プロテオミクス解析により多くの候補蛋白が報告されているが、未だ診断上有用なバイオマーカーの同定には到っていない。尿検体の結果は、糖尿病性腎症患者腎における IGFBP-rP1 分断化酵素の活性化と、尿中 25kDa IGFBP-rP1 が糖尿病性腎症尿細管特異的バイオマーカーとなる可能性を示唆する。

#### 結 論

LC-MS/MS 法を用い、TGF- $\beta_1$  刺激により尿細管細胞より分泌増加する蛋白 IGFBP-rP1 を同定した。IGFBP-rP1 は、TGF- $\beta_1$  誘導 EMT を介し、糖尿病性腎症における尿細管間質障害に関与する可能性が示唆された。IGFBP-rP1 は、糖尿病性腎症における新規尿細管バイオマーカー候補として期待される。

#### 引 用 文 献

1. Guo B, Inoki K, Isono M, Mori H, Kanasaki K, Sugimoto T, Akiba S, Sato T, Yang B, Kikkawa R, Kashiwagi A, Haneda M, Koya D. MAPK/AP-1-dependent regulation of PAI-1 gene expression by TGF-beta in rat mesangial cells. *Kidney Int* 68: 972-984, 2005.
2. Murphy M, Pykett MJ, Harnish P, Zang KD, George DL. Identification and characterization of genes differentially expressed in meningiomas. *Cell Growth Differ* 4: 715-722, 1993.
3. López-Bermejo A, Khosravi J, Fernández-Real JM, Hwa V, Pratt KL, Casamitjana R, Garcia-Gil MM, Rosenfeld RG, Ricart W. Insulin resistance is associated with increased serum concentration of IGF-binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1/MAC25). *Diabetes* 55:2333-2339, 2006.

# 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	渡邊 淳
審査委員長 柿崎 秀宏 (印)			
審査委員 奥村 利勝 (印)			
審査委員 日田 勝計 (印)			
学位論文題目			
TGF- $\beta$ Enhances Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-Related Protein 1 (IGFBP-rP1) Expression in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells			
(TGF- $\beta$ は、ヒト腎近位尿細管上皮培養細胞において、Insulin-Like Growth Factor Binding Protein - Related Protein 1 (IGFBP-rP1) 発現を増強する)			

## 学位論文審査結果の要旨

以下に、渡邊 淳氏による学位論文の審査結果の要旨を述べる。

糖尿病性腎症において、腎機能と相関するのは糸球体病変よりも尿細管間質障害であることが明らかとなってきた。尿細管上皮細胞を間質細胞に形質転換させるEpithelial Mesenchymal Transition (EMT) が間質線維化の機序として考えられており、その最も強力な誘導因子がTGF- $\beta$ である。本研究は、TGF- $\beta$ が誘導するEMTを介する尿細管間質障害の病態に関与する蛋白とその蛋白の発現を制御するシグナル伝達経路を明らかにし、臨床応用することを目的としている。

研究手法として、ヒト腎近位尿細管上皮培養細胞 (HRPTEC) を用いてTGF- $\beta$ で刺激し、培養液中に分泌が増加する蛋白を同定し、その蛋白の発現制御機構を解析するとともに、2型糖尿病患者の尿検体を用いて、その蛋白の尿中への分泌と糖尿病性腎症との関連性について検討している。

TGF- $\beta$ 刺激によりHRPTEC培養液中に増加した蛋白の一つは、Insulin-like Growth Factor Binding Protein-related Protein 1 (IGFBP-rP1) であり、TGF- $\beta$ の下流シグナルのうちSmad系を介してIGFBP-rP1発現を増強させた。TGF- $\beta$ 刺激によるIGFBP-rP1発現増強は、HRPTECのEMTに関与していた。IGFBP-rP1は2型糖尿病顕性腎症患者の腎組織において、尿細管細胞質に局在し、糖尿病性腎症進行症例の尿中に分断型と考えられる25kDa IGFBP-rP1が有意に多く認められた。以上より、TGF- $\beta$ が誘導するIGFBP-rP1の発現増強は、糖尿病性腎症における尿細管間質障害に関与する可能性が示唆された。

本論文は、糖尿病性腎症における尿細管間質障害の機序を明らかにし、IGFBP-rP1が糖尿病性腎症における尿細管障害を推定する新規バイオマーカー候補になりうることを示したきわめて意義深い論文である。本論文は渡邊 淳氏の十分な学問的知識に裏打ちされたものであり、学位論文としてふさわしい内容であると判断する。