

|           |                                                                                                                                                       |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | なが い こう じ ろう<br>長 井 幸 二 郎                                                                                                                             |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 (医 学)                                                                                                                                             |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 2694 号                                                                                                                                          |
| 学位授与の日付   | 平 成 16 年 3 月 23 日                                                                                                                                     |
| 学位授与の要件   | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                                                                                                               |
| 研究科・専攻    | 医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻                                                                                                                                   |
| 学位論文題目    | Growth arrest-specific gene 6 is involved in glomerular hypertrophy<br>in the early stage of diabetic nephropathy<br>(Gas6は糖尿病性腎症の初期病変において糸球体肥大に関与する) |
| 論文調査委員    | (主 査) 教 授 中 尾 一 和 教 授 清 野 裕 教 授 北 徹                                                                                                                   |

### 論 文 内 容 の 要 旨

Gas6 (growth arrest-specific gene 6) は細胞増殖停止時に発現誘導される遺伝子群の一つとしてクローニングされた。Gas6はそのN末端に Gla domain が存在し、これがビタミンK存在下に $\gamma$ カルボキシル化される (Gla化) ことによって生理活性を獲得し、逆に、ビタミンK阻害剤であるワーファリンによりこのGla化が阻害され、Gas6が不活化されることが明らかにされた。Gas6が受容体型チロシンキナーゼであるAxlに結合し、リン酸化することも示された。

糖尿病性腎症初期の臨床所見は微量アルブミン尿の出現である。その時期には病理組織学的にはメサンギウム細胞及び糸球体の肥大、機能的には糸球体濾過値増加がみられる。これらの現象はそれぞれ末期腎症にみられる糸球体硬化、腎機能低下に必ず先立ってみられる。従って、このような初期糖尿病性腎症において重要な役割を担う因子を解析し、治療への応用を検討することは非常に重要と考えられる。そのため、初期糖尿病性腎症モデルである、ストレプトゾトシン (STZ) による糖尿病ラットを作製した。まず、STZ投与にて糖尿病惹起後、12週にて初期病変が見られることを確認した。この12週の時点でメサンギウム領域にGas6とその受容体であるAxlの発現増加を認めた。糖尿病の初期病変形成にGas6が関連する可能性を見いだしたため、次にワーファリンによる治療を試みた。ワーファリンは *in vitro* にて0.1 $\mu$ MでもGas6の活性を阻害することから、血中濃度が臨床使用濃度 (4-5 $\mu$ M) を大きく下回る0.7 $\mu$ M程度となるような少量投与とした。その結果12週にて糖尿病ラットにおいてワーファリン群ではAxlの発現抑制を確認した。Gas6に関しては変化を認めなかったが、その原因としては使用した抗体がGas6の活性状態を、認識しえないものであったことが考えられた。また、糖尿病性腎症の進展においてその関連が報告されている細胞内伝達系、p44/42 MAPキナーゼのリン酸化がワーファリンにて抑制されていることを見いだした。すでにメサンギウム細胞においてGas6の下流に p44/42 MAPキナーゼが存在することを報告されており、ワーファリンの治療効果が確認された。また同時に、糖尿病ラットにおいてワーファリン治療群は有意にメサンギウム細胞肥大、糸球体肥大の抑制、及びアルブミン尿排泄量抑制、過濾過の是正を認め、少量ワーファリン投与による治療効果が確認された。次にワーファリンの治療効果のGas6に対する特異性を検討するため、Gas6ノックアウトマウスを使って、STZによる糖尿病マウスを作成した。ワイルドタイプでは糖尿病誘導後12週にてメサンギウム細胞、及び糸球体の肥大が認められるが、ノックアウトマウスではその時点でワイルドタイプと比較し、有意に肥大が抑制されており、ワーファリンがGas6の不活化を介して治療効果を発揮していることを強く示唆した。*In vitro* では、Gas6が糸球体肥大に関わるメカニズムを検討するため、培養メサンギウム細胞を使って、Gas6に肥大作用が有るかどうかロイシン取り込み実験にて検討した。すると濃度依存性に取り込みが約1.3倍に増加した。このGas6による濃度依存性の細胞肥大はフローサイトメトリーにおいても確認された。以上の結果よりGas6/Axlがメサンギウム細胞肥大を介して糖尿病性腎症初期病変に関わることや、Gas6/Axl系を阻害すると糖尿病性腎症の進展を抑制し、少量ワーファリンは糖尿病性腎症の治療薬としての可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

以上の研究は糖尿病性腎症初期に特徴的で、末期腎不全に至るまでに必ず先立つメサンギウム細胞肥大の新たなメカニズムと治療法を提唱したものである。この研究では、糖尿病モデルラットにて糸球体の、主にメサンギウム領域に新規メサンギウム細胞増殖因子 Gas6 とその受容体である Axl の発現が増強することを確認した上で、さらに同ラットに Gas6 の作用を抑制するワーファリンを通常臨床使用量の約 20% といった少量投与を行った。その結果、メサンギウム細胞の肥大、糸球体肥大が抑制され、機能的にも過剰濾過の是正、尿中アルブミン排泄の減少といった改善が得られ、しかも糸球体における MAP キナーゼの活性が抑制された。ワーファリンの Gas6 に対する特異性は糖尿病を誘発した Gas6 ノックアウトマウスにて野生型に比較して糖尿病性腎症の改善、すなわちメサンギウム細胞の肥大、糸球体肥大の改善がみられたことから明らかである。さらに *in vitro* において Gas6 がメサンギウム細胞肥大作用をもつことを示し、Gas6 がメサンギウム細胞肥大作用を介して糖尿病性腎症初期病変の発症に関与することを提示した。すなわち Gas6 が TGF- $\beta$  やアンジオテンシン II とともに、糖尿病性腎症発症のキー分子であり、Gas6/Axl 系を抑制するワーファリンが糖尿病性腎症の病態改善に役立つ可能性を示唆する結果であり、糖尿病性腎症進展増悪の抑制に寄与するところが多い。

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。

なお、本学位授与申請者は、平成15年1月22日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。