

学位授与番号：甲 964 号

氏 名：石澤 将

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 26 年 3 月 26 日

学位論文名：

**Sphingosine-1-phosphate** は **S1P2** 受容体を介して **Rho kinase** の活性化を生じ、培養腎尿細管細胞の分化を惹起する。

主論文名：

**Sphingosine-1-phosphate induces differentiation of cultured renal tubular epithelial cells under Rho kinase activation via the S1P2 receptor.**

(**Sphingosine-1-phosphate** は **S1P2** 受容体を介した **Rho kinase** の活性化により培養腎尿細管細胞の分化を惹起する。)

学位審査委員長：教授 山田尚

学位審査委員：教授 池上雅博 教授 大野岩男

# 学 位 論 文 要 旨

論文提出者名	石澤 将	指導教授名	宇都宮一典、馬目佳信
<p>主論文 Sphingosine-1-phosphate induces differentiation of cultured renal tubular epithelial cells under Rho kinase activation via the S1P2 receptor. (Sphingosine-1-phosphate は S1P2 受容体を介した Rho kinase の活性化により培養尿細管細胞の分化を惹起する。)</p> <p><i>Clinical and Experimental Nephrology</i></p> <p>Rho kinase は糖尿病腎症発症機転に関与することが知られているが、その活性化機構は不明である。一方、Sphingosine-1-phosphate(S1P)は、その特異的受容体である S1P2 受容体を介して、Rho kinase を活性化することが判明している。糖尿病腎症の進展機序は現在まで糸球体障害が主体と考えられてきたが、近年尿細管障害に伴う epithelial-mesenchymal transition (EMT)が腎症進展に寄与することが注目されている。また、S1P2 受容体は、尿細管細胞に分布することが知られている。こうした背景から、本研究では S1P/S1P2 受容体シグナルが Rho kinase の活性化を介して、尿細管細胞における EMT を生じ、腎症進展に寄与するという仮説を立て、これを検証した。</p> <p>2 型糖尿病モデルマウスを対象に、血中 S1P 濃度を液体クロマトグラフィータンデム質量分析法で測定し、非糖尿病マウスと比較検討した。腎組織における S1P2 受容体分布を、免疫組織染色で検討した。培養尿細管細胞を用いて S1P 刺激下における Rho kinase 活性、<math>\alpha</math>-SMA 発現、E-cadherin 発現を real-time RT-PCR、免疫ブロット法、形態変化を蛍光免疫染色で検討し、併せて Rho kinase 阻害薬、S1P2 受容体阻害薬による変化を検証した。糖尿病モデルマウス血清では、有意に S1P 濃度が上昇し、腎組織では全ての尿細管に S1P2 受容体の発現が認められた。培養尿細管細胞では S1P 刺激で S1P2 受容体を介して Rho kinase 活性は上昇し、<math>\alpha</math>-SMA 発現増加、E-cadherin 分布の細胞膜上から細胞質への拡散を惹起した。また、S1P は S1P2 受容体を介して E-cadherin の発現を抑制したが、これには Rho kinase 活性化は関与しないことが明らかになった。</p> <p>以上の結果から、本研究は S1P の S1P2 受容体を介した Rho kinase の活性化が尿細管の EMT をきたし、糖尿病腎症進展のメカニズムの一因を担う可能性を示した。S1P2 受容体や Rho kinase が糖尿病腎症治療における新たな治療ターゲットと成り得ると考えられた。</p>			

## 論文審査の結果の要旨

石澤 将氏の学位申請論文は主論文1編からなり、原題は「Sphingosine-1-phosphate induces differentiation of cultured renal tubular epithelial cell under Rho kinase activation via the S1P2 receptor.」と題するものでClinical and Experimental Nephrology, 2014 Jan 25.に発表されたものです。学位論文標題は「Sphingosine-1-phosphateはS1P2受容体を介してRho kinaseの活性化を生じ、培養腎尿細管細胞の分化を惹起する。」である。

【背景】 糖尿病罹患者数は約890万人であり、増加の一途をたどっている。糖尿病は様々な血管障害から重篤な合併症を惹起し、その一つは糖尿病性腎症である。これを予防・治療することは喫緊の課題である。治療は血糖・血圧の管理が重要であり、レニンアンジオテンシン経路の阻害薬と共に、近年、実臨床においては脂質異常症の治療薬であるスタチン系薬剤の効果が注目されている。スタチン系薬剤はコレステロールの代謝過程において低分子G蛋白であるRho/Rho kinase系カスケードを抑制する。このRho kinaseは糖尿病腎症発症機転に関与することが知られているが、その活性化機構は不明である。一方、Sphingosine-1-phosphate(S1P)は、その特異的受容体であるS1P2受容体を介して、Rho kinaseを活性化することが判明している。糖尿病腎症の進展機序は糸球体障害が主体と考えられてきたが、近年尿細管障害に伴うepithelial-mesenchymal transition (EMT)が腎症進展に寄与することが注目されている。また、S1P2受容体は、尿細管細胞に分布することが知られている。こうした背景から、本研究ではS1P/S1P2受容体シグナルがRho kinaseの活性化を介して、尿細管細胞におけるEMTを生じ、腎症進展に寄与するという仮説を立て、これを検証した研究である。

【方法】 2型糖尿病モデルマウスを対象に、血中 S1P 濃度を液体クロマトグラフィータンデム質量分析法で測定し、非糖尿病マウスと比較検討した。腎組織における S1P2 受容体分布を、免疫組織染色で検討した。培養尿細管細胞を用いて S1P 刺激下における Rho kinase 活性、 $\alpha$ -SMA 発現、E-cadherin 発現を real-time RT-PCR、免疫プロット法、形態変化を蛍光免疫染色で検討し、併せて Rho kinase 阻害薬、S1P2 受容体阻害薬による変化を検証した。

【結果】 糖尿病モデルマウス血清では、有意に S1P 濃度が上昇し、腎組織では全ての尿細管に S1P2 受容体の発現が認められた。培養尿細管細胞では S1P 刺激で S1P2 受容体を介して Rho kinase 活性は上昇した。また、S1P は E-cadherin の発現を抑制したが、これには Rho kinase 活性化の関与はなかった。しかし、E-cadherin 分布の細胞膜上から細胞質への拡散には Rho kinase 活性が関与していた。また、S1P は $\alpha$ -SMA の発現を増加し、この増加には Rho kinase 活性が関与していた。

【結語】 以上の結果から、本研究は S1P の S1P2 受容体を介した Rho kinase の活性化が尿細管の EMT をきたし、糖尿病腎症進展に繋がるメカニズムの一因を担う可能性を示した。S1P2 受容体や Rho kinase が糖尿病腎症治療における新たな治療ターゲットと成り得ると

考えられた。

学位審査会は3月10日、池上雅博教授、大野岩男教授また、指導教授宇津宮一典教授の御臨席のもとに、公開で行われました。石澤氏の研究概要の発表に引き続き、口頭試問を実施した。席上、以下の質問を含めた多くの質疑がなされた。

(1) ヒトにおける S1P 受容体の局在について。(2) S1P2 から Rho Kinase に至る系はどのようなものか。(3) 糖尿病性腎症における糸球体病変と尿細管変化についてはどのように関連するのか。(4) 使用した尿細管細胞の尿細管部位はどこか。(5) E-cadherin の発現と局在に対する、Rho-kinase 系の関与はどのように説明するのか。(6) S1P による尿細管細胞の EMT を形態学的に捉えることはできるのか。(7) S1P の上昇はどのような機序が想定できるか。(8) TGF-beta を用いた検討をすれば S1P を用いた場合と同様の変化が得られるのか。(9) E-cadherin の分布の変化とは具体的にはどのようなものか。(10) 今回の研究を基にした糖尿病性腎症への臨床応用についてどのように考えているか。

これらの質問に対して、石澤氏は最新の関連論文や研究室でのこれまでの成果を交えて自らの見解を回答し、活発な議論がなされた。その後、池上、大野両教授と慎重に審議した結果、石澤氏の研究は、糖尿病腎症の病態の把握と治療法の開発に繋がる新たな分子機序を提起しており、学位論文として価値があるものと認定した。