

Title	Ablation of the N-type calcium channel ameliorates diabetic nephropathy with improved glycemic control and reduced blood pressure(Abstract_要旨)
Author(s)	Ohno, Shoko
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2017-01-23
URL	http://hdl.handle.net/2433/218006
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（医学）	氏名	大野祥子
論文題目	<p>Ablation of the N-type calcium channel ameliorates diabetic nephropathy with improved glycemic control and reduced blood pressure (N型カルシウムチャネルの欠損による糖代謝の改善と血圧の低下を伴う糖尿病性腎症軽減作用に関する研究)</p>		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>糖尿病性腎症は慢性腎不全の最大の原因疾患であり、患者人口は増加傾向にある。N/L型 Ca²⁺チャネル阻害薬であるシルニジピンを用いた臨床試験では、N型 Ca²⁺チャネル(NCaC)の阻害は高血圧を伴う慢性腎疾患患者に蛋白尿抑制効果を示すことが報告されている。また、動物実験においてシルニジピン投与が糖尿病性腎症を改善することも報告されているが、シルニジピンはN型 Ca²⁺チャネル特異的な阻害薬ではなく、NCaC阻害による腎保護効果の機序については不明な点が多い。本研究では糖尿病性腎症におけるNCaCの役割を明らかにするために、N型 Ca²⁺チャネルα1サブユニット(Ca_v2.2: <i>Cacna1b</i>)をノックアウト(KO)した <i>db/db</i> マウスを用いて解析を行った。また、ポドサイトにおけるNCaCの機能を調べるために、培養ヒトポドサイトに種々のCa²⁺チャネル阻害薬を加え、Ca²⁺流入とポドサイト関連蛋白の発現を検討した。</p> <p>C57BLKS background の <i>db/db</i> Ca_v2.2 ワイルドタイプマウス(<i>db/db</i> WT), <i>db/db</i> Ca_v2.2 ヘテロ KO マウス(<i>db/db</i> HKO), <i>db/db</i> Ca_v2.2 ホモ KO マウス(<i>db/db</i> KO)の double mutant マウスを作製し、<i>db/+</i>マウスをコントロールとして用いた。血圧は <i>db/db</i> WT に比べて <i>db/db</i> KO は低値であった。また、尿中カテコラミン排泄は、<i>db/db</i> WT に比べて <i>db/db</i> KO で約 50%低下していた。<i>db/db</i> WT はアルブミン尿の著明な増加を認めたが、<i>db/db</i> HKO および <i>db/db</i> KO では、いずれも <i>db/db</i> WT に比し約 70%低下した。血糖値は <i>db/db</i> KO で低く、糖代謝の改善を認めた。<i>db/db</i> KO は糸球体内の線維化関連遺伝子の発現の低下を認めた。組織学的には、<i>db/db</i> HKO および <i>db/db</i> KO ではメサンギウム基質の増加が抑制され、ポドサイト関連蛋白のネフリンおよびポドシンが保たれており、<i>db/db</i> KO で糸球体基底膜の肥厚が軽減していた。また糖尿病性腎症で亢進することが知られている糸球体内 ERK のリン酸化は、<i>db/db</i> WT で亢進し、<i>db/db</i> KO で抑制を認めた。さらに、N型 Ca²⁺チャネルの薬理的な阻害効果を調べる目的で、<i>db/db</i> WT に N/L 型 Ca²⁺チャネル阻害薬のシルニジピンを投与する実験を行った。L 型 Ca²⁺チャネル阻害薬のニトレンジピンを対照に使用した。薬剤投与にて血圧は <i>db/db</i> HKO と同程度まで低下したが、尿中アルブミン排泄はシルニジピン投与群のみで約 35%の有意な低下を認めた。Ca_v2.2 は免疫染色にてマウス糸球体内のポドサイトに発現を認めた。<i>In vitro</i> では、培養ヒトポドサイトのカルシウムイメージング法において、細胞内 Ca²⁺濃度上昇は N 型 Ca²⁺チャネル特異的阻害薬の ω-conotoxin および L 型 Ca²⁺チャネル阻害薬のニフェジピン、そしてシルニジピンのいずれにおいても抑制された。さらに培養ヒトポドサイトでは TGF-β 投与によるネフリン減少が ω-conotoxin またはシルニジピン投与によって改善を認めた。また ERK の阻害薬投与によっても TGF-β 投与によるネフリン減少は改善を認め、TGF-β によるポドサイト障害に N 型 Ca²⁺チャネルおよび ERK の関与が示唆された。これらの結果から、N 型 Ca²⁺チャネル阻害は、糖代謝の改善、血圧降下、ポドサイト障害の軽減を介して糖尿病性腎症の改善に作用する可能性が示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

糖尿病性腎症は慢性腎不全の最大の原因疾患であり、その新規治療の必要性は増大している。本研究は糖尿病性腎症治療における N 型 Ca²⁺チャネル阻害の意義を明らかにすることを目的とした。N 型 Ca²⁺チャネルα1サブユニット(Ca_v2.2: *Cacna1b*)をノックアウト(KO)した *db/db* マウスを用いて解析し、さらに培養ヒトポドサイトを用い N 型 Ca²⁺チャネルの機能を検討した。

db/db Ca_v2.2 ヘテロ KO マウス(*db/db* HKO)と *db/db* Ca_v2.2 ホモ KO マウス(*db/db* KO)は、対照糖尿病 *db/db* マウスに比較して血圧・血糖が低値であり、尿中アルブミン排泄が約 70 %減少し、交感神経活性の減少、メサンギウム基質の増加抑制、ポドサイト障害の減弱が認められた。また *db/db* Ca_v2.2 野生型マウスへの N/L 型 Ca²⁺チャネル阻害薬シルニジピン投与にて同様に糸球体障害とポドサイト障害の減弱が認められた。さらに培養ヒトポドサイトにおいて N 型 Ca²⁺チャネルは細胞内 Ca²⁺流入に関与し、N 型 Ca²⁺チャネル阻害は TGF-β によるポドサイト関連蛋白ネフリンの減少に拮抗した。これらの結果から、N 型 Ca²⁺チャネル阻害は、降圧のみならず、交感神経活性亢進の抑制、糸球体血行動態の改善、糖代謝改善およびポドサイト障害軽減作用を介して糖尿病性腎症を軽減させることが示唆された。

以上の研究は糖尿病性腎症における N 型 Ca²⁺チャネル阻害の意義および機序の解明に貢献し、糖尿病性腎症の新たな治療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 28 年 12 月 26 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。