


論 文 要 旨

区 分	(甲)・乙	氏名	高田 俊輔 
-----	-------	----	---

「Expression of toll-like receptor 4 in glomerular endothelial cells under diabetic conditions」

研究目的

糖尿病性腎症を引き起こす原因の一つとして、高血糖による advanced glycation end products (AGE) の免疫原性が注目されている。AGE を認識した糸球体内の単球や血管内皮が産生するサイトカインが、メサンギウム細胞に細胞外マトリックスの過形成を促進させ、糸球体硬化症を発症させると考えられている。 toll-like receptor (TLR) は貪食細胞や炎症性血管内皮が発現する自然免疫受容体で、病原体構成成分をパターン認識し、サイトカイン産生を誘導する。近年、AGE の一つである Nε-(carboxymethyl) lysine (CML) が貪食細胞に TLR を介して認識されサイトカイン産生を促すことで、メサンギウムにマトリックス産生を誘導している可能性が報告された。しかし、糖尿病性腎症の糸球体血管内皮における TLR 発現の報告はない。本研究は糖尿病モデルマウス糸球体血管内皮細胞における細菌成分の受容体 TLR4 の発現を免疫組織学的に明らかにすることを目的とした。

材料および方法

5 週齢の♂ ICR マウスにストレプトゾトシン (STZ) のクエン酸緩衝液 (20mg/ml) を 200mg/kg の用量で腹腔内投与し、血糖値 600mg/dl 以上で4か月以上経過したマウスを I 型糖尿病マウス (ICR-STZ) とした。また、9 週齢の♂ KK/Ta マウスに 5 ヶ月間、高脂肪飼料を与え、血糖値 600mg/dl 以上となったマウスを II 型糖尿病マウス (KK/Ta-HF) とした。対照群として ICR にクエン酸緩衝液を投与したもの (ICR)、高脂肪飼料を投餌する前の 9 週齢の♂ KK/ Ta マウス (KK/Ta) を用いた。組織検索は、凍結切片をメタノール固定し、糸球体上皮マーカーとして抗 podoplanin 抗体、血管マーカーとして抗 PECAM-1 抗体および抗 VE-cadherin 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い蛍光顕微鏡 (BZ-8100 , Keyence Corp) ならびに共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 710, Carl Zeiss) で観察した。また、遺伝子検索として *in situ* hybridization を行った。

結果

対照群のマウス腎組織は TLR4 の発現はみられなかった (Fig3, 4)。I 型・II 型糖尿病マウス両者の腎糸球体で TLR4 の発現が見られた (Fig 3, 4)。I 型および II 型糖尿病マウス腎糸球体における TLR4 の発現は、血管内皮マーカーである PECAM-1 と VE-cadherin の陽性領域と一致した (Fig 6, 7)。糸球体上皮、メサンギウム細胞、および糸球体外の腎血管で TLR4 の発現は見られなかった (Fig 3, 4, 5)。TLR4 mRNA は対照群マウス腎組織でほとんど見られないが、I 型および II 型糖尿病マウス腎糸球体で増強した (Fig 8)。

考察

糖尿病マウス腎臓組織では、皮質のほとんどすべての糸球体が抗 TLR4 で免疫染色されたが、対照群の腎臓組織では抗 TLR4 によって免疫染色される糸球体は認めなかった。これらの結果は、糖尿病環境下の高血糖が糸球体においてタンパク質レベルで TLR4 を発現することを示唆している。さらに、糖尿病マウスの腎臓で、糸球体外の他の構造や血管が抗 TLR4 によって免疫染色されなかったことより、TLR4 の発現は糸球体に特異的な事象であることを示唆する。 *In situ* hybridization による糖尿病マウスの腎臓組織における TLR4 mRNA は、対照群の腎臓より強く糸球体に存在することを示した。また、糸球体外のポーマン嚢、遠位および近位尿細管、集合管、リンパ管、および血管においては TLR4 mRNA のいくつかの信号を認めた。これらは、糸球体内皮細胞は通常腎臓において TLR4 遺伝子が発現し、TLR4 を生成する可能性を有すること、また、糖尿病環境下における高血糖は糸球体毛細血管内皮細胞における TLR4 タンパク質の発現を誘導することを示唆している。また、 *In situ* hybridization の TLR4 遺伝子分布より、内皮細胞だけでなくメサンギウム細胞にも TLR4 発現を有する可能性がある。しかし、糸球体のすべての TLR4 陽性細胞は内皮マーカーである PECAM-1 と VE-cadherin を発現することより、糸球体の TLR4 陽性細胞がメサンギウム細胞でなく毛細血管内皮細胞であることを示唆する。したがって、糖尿病環境における糸球体内皮細胞の TLR 伝達経路を介したサイトカイン産生が、メサンギウム細胞に細胞外基質タンパク質を生産させる可能性が考えられた。

結論

I型およびII型糖尿病マウス腎糸球体毛細血管内皮細胞は糖尿病環境下で TLR4 を発現する