



Gene expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in the kidneys of insulin-dependent diabetic rats

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 劉, 雁軍 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1115

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 262号	学位授与年月日	平成10年 3月26日
氏 名	劉 雁 軍		
論文題目	Gene expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in the kidneys of insulin-dependent diabetic rats (インスリン依存性糖尿病ラットの腎臓における 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 及び type 2 の遺伝子発現)		

博士(医学) 劉 雁 軍

論文題目

Gene expression of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in the kidneys of insulin-dependent diabetic rats

(インスリン依存性糖尿病ラットの腎臓における 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 及び type 2 の遺伝子発現)

論文内容の要旨

[はじめに]

11β -hydroxysteroid dehydrogenase (11β -HSD) は活性型ステロイドであるコルチコステロンから不活性型ステロイドである 11 デハイドロコルチコステロンへの転換を触媒し、ミネラルコルチコイド受容体へ内因性のグルココルチコイドが結合することを調節し、ミネラルコルチコイド受容体にアルドステロンに対する選択性を与える酵素である。哺乳類では少なくとも2種類の 11β -HSD (type 1と type 2) が存在し、 11β -HSD type 2の方がミネラルコルチコイド受容体への結合、血圧のコントロールなどにより重要な役割を果たしているとされている。近年、 11β -HSD type 1と type 2が精製され、それぞれのcDNAが肝臓および腎臓からクローニングされたが、生物学的存在意義や疾患における作用機序などについては不明な点が少ない。今回の研究では糖尿病における腎臓の 11β -HSDの変化及びインスリンの腎臓における 11β -HSDに対する調節作用を解析し、糖尿病性高血圧の発症における 11β -HSD type 1及び 11β -HSD type 2の関与を酵素活性及び遺伝子発現から検討した。

[材料及び方法]

糖尿病ラットは雌のSDラットにストレプトゾトシンを静脈内投与することにより作成し、インスリン投与群と非投与群に分けた。インスリンは 12.5IU/kg を1日2回2週間投与した。ストレプトゾトシンまたは対照液投与後3週間目に採血及び組織を採取した。 11β -HSDの活性はコルチコステロン (B) から 11 デハイドロコルチコステロン (A) への転換率により求めた。腎臓の 11β -HSD type 1及び 11β -HSD type 2の活性を測定するために腎臓をホモジネート後、上清蛋白に基質であるBと共にNADP (type 1) またはNAD (type 2) を加え 37°C 12分間反応させた。B及びAはエチルアセテートにて抽出後、クロロホルム-エタノール (9:1) のシステムにより薄層クロマトグラフィーにて分取した。BからAへの転換率はそれぞれの分画のradioactivityを計測することにより算出した。

11β -HSD mRNA の発現はノーザンブロット法により解析した。RNAは腎臓より acidguanidinium isothiocyanate phenol-chloroform (AGPC) 法にて抽出した。 $20\mu\text{g}$ のRNAを1.4%のアガロースゲルにて電気泳動後、ナイロンメンブレンにトランスファーし、UVにて固定した。ラット 11β -HSD type 1及びtype 2はニックトランスレーション法にて $[^3\text{p}]\text{-dCTP}$ でラベルした。 11β -HSD mRNA の発現量は 18SrRNA の発現量にて補正して求めた。血糖はグルコースオキシダーゼ法により、血清インスリンはELISA法により、血圧は非観血的方法により測定した。

[結果]

糖尿病ラットの血糖は正常対照に比べ有意に上昇し ($p < 0.001$)、血清インスリンは有意に低下した ($p < 0.01$)。ストレプトゾトシン投与3週間後に糖尿病ラットの収縮期血圧は $147 \pm 5\text{mmHg}$ と正常対照

の $127 \pm 4 \text{ mmHg}$ に比べ13.6%の上昇を認めた ($p < 0.01$)。糖尿病ラットを2週間インスリンにて治療すると血糖及び血圧には対照群と有意な差を認めなかった。

糖尿病ラットでは腎臓における $11\beta\text{-HSD type 1}$ の活性が正常対照に比べ有意に増加していた ($p < 0.01$)。2週間のインスリン投与により腎臓における酵素活性は正常対照ラットとほぼ同じレベルまで有意 ($p < 0.01$) に低下した。糖尿病ラットでは腎臓における $11\beta\text{-HSD type 1 mRNA}$ も正常対照に比べ有意に増加していた ($p < 0.05$)。この増加した遺伝子発現はインスリン投与により正常化した。

一方、糖尿病ラットの腎臓における $11\beta\text{-HSD type 2}$ の活性は、正常対照に比べ有意に低下していた ($p < 0.005$) ($26.10 \pm 1.18\%$ vs $15.10 \pm 0.7\%$)。2週間のインスリン投与により腎臓における $11\beta\text{-HSD type 2}$ の活性は正常対照ラットと同じレベルまで有意に増加した ($p < 0.005$)。糖尿病ラットの腎臓における $11\beta\text{-HSD type 2}$ 遺伝子発現は正常対照に比べて著しく低下していた ($p < 0.001$)。低下した $11\beta\text{-HSD type 2}$ の遺伝子発現は活性と同様にインスリン投与により正常対照レベルまで増加した。

[考察]

糖尿病の合併症として、高血圧は重要なものであり、その成因に関する検討は臨床的にも注目される。 $11\beta\text{-HSD isozyme}$ のうち $11\beta\text{-HSD type 2}$ は、その遺伝子異常によりapparent mineralocorticoid excessを発症させ、高血圧の成因のひとつとして重要な酵素である。本研究においてはストレプトゾトシン糖尿病ラットの血圧は上昇し腎において $11\beta\text{-HSD type 2}$ の活性および遺伝子発現が低下し、それらはインスリン投与により対照と同じレベルまで回復した。この結果は糖尿病における高血圧の発症要因として $11\beta\text{-HSD type 2}$ の活性及び遺伝子発現の抑制が腎臓におけるコルチコステロンの濃度を上昇させ、ミネラルコルチコイドレセプターへの不適当な結合を促すことにより、糖尿病ラットにおける高血圧発症に役割を果たしていることが示唆される。

[結論]

- 1) ストレプトゾトシン糖尿病ラットでは腎臓における $11\beta\text{-HSD type 1}$ と $11\beta\text{-HSD type 2}$ の活性及び遺伝子発現は異なっていることが示された。
- 2) ストレプトゾトシン糖尿病ラットでは血圧が上昇し、 $11\beta\text{-HSD}$ のうち特に血圧上昇に関与する腎臓における $11\beta\text{-HSD type 2}$ の遺伝子発現とその活性が低下していた。糖尿病における高血圧のうち、少なくともその一部は $11\beta\text{-HSD type 2}$ の異常に起因することが示唆される。

論文審査の結果の要旨

糖尿病の合併症として、高血圧は重要なものであり、その成因に関する検討は基礎的にも臨床的にも注目されているが、その発症機序については不明な点も多い。 $11\beta\text{-hydroxysteroid dehydrogenase}$ ($11\beta\text{-HSD}$) は、C11位にOHをもつ活性型ステロイドであるコルチコステロンを、ミネラルコルチコイド受容体との結合性をもたない $11\beta\text{-hydroxysteroid dehydrogenase}$ へ転換させる触媒酵素である。したがって、 $11\beta\text{-HSD}$ は、ミネラルコルチコイド受容体へ内因性のグルココルチコイドが結合することを調節し、ミネラルコルチコイド受容体にアルドステロンに対する選択性を与える酵素である。哺乳類では $11\beta\text{-HSD type 1}$ と $type 2$ の少なくとも2種類が存在する。近年、 $11\beta\text{-HSD}$ と高血圧発症との関係が注目されており、 $11\beta\text{-HSD type 2}$ が腎における血圧のコントロールに重要な役割を果たしていると考えられている。申請者は、ストレプトゾトシン誘発性糖尿病ラットにおける腎臓の $11\beta\text{-HSD}$ の変化、

及びインスリンの腎臓における 11β -HSD に対する調節作用を解析し、糖尿病性高血圧の発症に 11β -HSD type 1及び 11β -HSD type 2が関与しているかどうかを酵素活性と遺伝子発現の面から検討した。

ストレプトゾトシン糖尿病雌ラットを作成し、3週間後、腎臓における 11β -HSD type 1と 11β -HSD type 2の活性及び mRNA の発現を解析し、血糖、血清インスリン及び血圧と比較した。ストレプトゾトシン糖尿病ラットの血糖は正常対照に比べ有意に上昇し、血清インスリンは有意に低下、また収縮期血圧は上昇を認めた。このラットを2週間インスリンで治療すると血糖は正常化し、血圧も正常化した。ストレプトゾトシン糖尿病ラットの腎臓における 11β -HSD type 2の活性は、正常対照に比べ有意に低下したが、2週間のインスリン投与により正常対照ラットと同じレベルまで回復した。 11β -HSD type 2の腎臓における遺伝子発現も正常対照に比べ有意に低下したが、インスリン投与により正常化した。一方、 11β -HSD type 1の活性および遺伝子発現は、ストレプトゾトシン投与により正常対照に比べ有意に増加し、インスリン投与により正常対照レベルまで低下した。

以上のように、ミネラルコルチコイド受容体に結合するグルココルチコイドの濃度を減少させアルドステロンの実効的な作用を調節するという生理機能をもつ 11β -HSD type 2の遺伝子発現と酵素活性は実験的糖尿病ラットにおいて有意に低下していたが、このことは糖尿病における高血圧発症に 11β -HSDが関係している可能性を示唆するものである。

審査の過程において、この論文に関する次のような質疑が行われた。

- 1) 11β -HSD type 1と 11β -HSD type 2の組織分布について
- 2) 11β -HSD type 1と 11β -HSD type 2のアミノ酸配列上の相同性について、また両者の発現調節のちがいについて
- 3) 糖尿病ラットにおける尿細管の細胞内濃度と体内のNa総量はどのようになっていると考えられるか
- 4) 11β -HSDの酵素活性とmRNA量の関係について
- 5) 11β -HSDのmRNA量、酵素活性量を変動させるのはインスリン作用か糖代謝異常か
- 6) 11β -HSD活性とポリオール代謝との関係について
- 7) 本態性高血圧患者の何%に 11β -HSD type 2が関与していると考えられるか
- 8) ヒトの糖尿病患者における高血圧発症に、 11β -HSDは関与していると考えられるか、また高血圧の原因としてはそれ以外にどのような機序が考えられているか
- 9) インスリン抵抗性における高血圧発生機序とストレプトゾトシン糖尿病ラットにおける高血圧発生機序との関連について
- 10) ミネラルコルチコイド受容体に対するコーチゾール、アルドステロンの結合親和性定数について

これらの質問に対して申請者の回答は適切であり、問題点も十分に理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 中 村 浩 淑

副査 教授 藤 田 道 也 副査 助教授 林 秀 晴