

厚生科学研究費

長寿科学総合研究事業

老年病分野に関する研究

平成 10 年度 総括研究報告書

平成 11 年 3 月

主任研究者 牧 田 善 二

北海道大学医学部附属病院講師

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

老年病分野に関する研究

主任研究者 牧田 善二 北海道大学医学部附属病院講師

研究要旨

糖尿病で特徴的な「持続する高血糖状態」より形成される終末糖化産物（AGE）が合併症の重要な原因であることが解明されている。我が国で開発された新しいAGE阻害剤OPB-9195は優れた糖尿病性腎症改善効果を有しており、合併症治療薬としての臨床応用が期待される。本研究では、腎症における本薬剤の作用機序をインスリン非依存性糖尿病のモデルラットであるOLETFを用い検討した。その結果、AGE阻害剤OPB-9195はOLETF糖尿病ラットで上昇したTGF- β 、VEGFのmRNAおよび蛋白レベルの腎での発現を有意に改善し、同時に観察したcollagen type IVのmRNAおよび蛋白レベルの腎での発現も、TGF- β と平行して低下させた。AGE阻害剤OPB-9195は、TGF- β 、VEGFなどの強力な増殖因子を抑えることにより腎症の発症、進展に重要な細胞外基質増生を阻止すると考えられた。腎症の機能的変化として重要な尿蛋白に対してAGE阻害剤OPB-9195は早期腎症には効果を示さず、中期以降に改善効果を認めた。

A. 研究目的

本研究は、糖尿病治療で問題となっている合併症、特に糖尿病性腎症による血液透析患者数増加を阻止する新しい治療薬の開発を目指している。過去、約20年間の基礎的研究から、糖尿病で特徴的な「持続する高血糖状態」より形成される終末糖化産物（AGE）が合併症の重要な原因であることが解明されている。AGE形成を阻害する薬剤、アミノグアニジンは既に欧米で大規模臨床試験が開始されているが、我が国では、AGE臨床応用研究はほとんど行われていない。申請者は、すでに、我が国で開発された新しいAGE阻害剤、OPB-9195が平均血糖値270mg/mlの高血糖が持続する糖尿病ラットにおいて、糖尿病性腎症を確実に阻止することを示した。OPB-9195はアミノグアニジンを凌ぐ合併症治療薬として臨床応用が期待されるが、その薬理作用機序は不明である。本研究の主目的は2点。一つは、本剤がAGE構造体の中で主にlipid peroxidationで形成されるCMLを阻止するのか、CML以外のAGEを阻止するのかを2種のAGE抗体を用いて確認し、AGE阻害剤による腎基底膜に存在するチャージバリアーへの影響を評価すること。第2点は、増殖因子に対する作用である。糖尿病性腎症の病理学的特徴は、腎基底膜の肥厚とメサンジウム領域の拡大である。この2つの変化は、コラーゲンを始めとする各種細胞外基質の増生が原因であり、特に細胞増殖因子、TGF- β が最も重要な調節因子とされている。AGEの刺激により細胞外基質成分を増生させるTGF- β や、蛋白の血管透過性を高めるVEGFが亢進することが証明されている。以上の過去の研究成果から、本研究においては「AGE阻害剤は糖尿病状態において過剰に発現するTGF- β 、VEGFを抑えることにより糖尿病性腎症の発症、進展を阻止する」という作業仮説をin vivoの実験により証明することを目的とする。

B. 研究方法

本研究においては、新しいAGE阻害剤OPB-9195の糖尿病性腎症改善効果の作用機序を2つの観点から、動物実験およびin vitro実験の両面より解明する。第1点は、このAGE阻害剤が阻止するのは、CMLかCML以外のAGE構造体かを解明する。前述の如く、過去に作成されたAGE抗体は主にCMLを認識することが明らかにされている。しかし、CMLは糖化反応からではなく脂質の過酸化反応の過程で主に形成されると考えられており酸化のマーカールとして重要とされている。したがってAGE阻害剤がCMLを阻止するのかCML以外のAGE構造体を阻止するのかはその作用機序の上で重要な問題である。この点を申請者が作成したCMLおよびnon-CML AGE抗体を用い解明する。さらに腎症で認められるタンパク尿に関し、腎基底膜に存在するチャージバリアーが基底膜の糖化、AGE形成にて障害され増悪する可能性が考えら

れる。AGEの基底膜蓄積とチャージバリアーの破壊を比較検討する。第2点は、AGE阻害剤が具体的にどのような機序を介して腎症を改善するのかを解明する目的で行う。糖尿病性腎症の特徴的病理学的変化は、腎基底膜の肥厚とメサンジウム領域の拡大である。この2つの変化は、コラーゲンを始めとする各種細胞外基質の増生が原因であり、特に細胞増殖因子、TGF- β が最も重要な調節因子とされている。AGEの刺激により細胞外基質成分を増生させるTGF- β や、蛋白の血管透過性を高めるVEGFが亢進することが証明されている。以上、過去の研究成果を総合し、AGE阻害剤は糖尿病状態において過剰に発現するTGF- β 、VEGFの抑制を介し糖尿病性腎症の発症、進展を阻止する機序が考えられる。この作業仮説をin vitroおよびin vivoの実験により証明することを目的とする。

平成10年度には、我が国の95%以上を占めるインスリン非依存性糖尿病のモデルラットであるOLETFを用い、新しいAGE阻害剤OPB-9195の糖尿病性腎症に及ぼす効果を、1)腎の病理学的変化、2)チャージバリアーへの影響、3)腎症に伴う機能的変化におよぼす影響(尿タンパクへの影響)、4)腎細胞外基質増生に関与する増殖因子(TGF- β 、VEGF)に及ぼす効果を検討する。具体的研究計画・方法として、生後24週から糖尿病発症を確認して、OPB-9195を含んだ薬餌投与を開始。投与直前(0)、投与後4ヵ月、投与6ヵ月、投与10ヵ月、の各時点で、OLETFラット薬剤投与群(n=6)を、非投与群(n=6)および非糖尿病コントロールラット(LETOラット、n=6)と比較する。検討項目は、PAS染色による光学顕微鏡による糖尿病性腎症の病理組織学的変化(PAS染色)に対する効果、CMLおよびnon-CML AGE抗体を用いた蛍光免疫組織学的検討により腎組織でのAGE蓄積阻害の程度を比較検討。電子顕微鏡を用いpolyethyleneimine法にて腎基底膜のanionic siteへの影響(チャージバリアーへの検討)、尿タンパクに対する効果の検討。AGE阻害剤OPB-9195投与の有無による糖尿病性腎症におけるTGF- β 、VEGF、collagen type IVに及ぼす効果を分離した腎糸球体中のmRNA量でそれぞれ比較検討。方法はnorthern blot法、定量的PCR法などで行う。さらにTGF- β 、VEGF、collagen type IVに対する特異的抗体を用い腎組織を免疫組織染色により比較する。

C. 研究結果

平成10年度の本研究の遂行により、インスリン非依存性糖尿病のモデルラットであるOLETFを用い、新しいAGE阻害剤OPB-9195の糖尿病性腎症に及ぼす効果を検討し、以下の研究結果を得た。

- 1) TGF- β 、VEGFのmRNAおよび蛋白レベルの腎での発現は、OLETFラットにおいて有意に上昇していたが、AGE阻害剤OPB-9195により有意に低下した。
- 2) OLETFラット腎におけるVEGFの発現上昇は、糖尿病発症の早期に認められ、TGF- β の発現上昇は糖尿病発症後、糖尿病性腎症が病理学的に確認された時期以降に認められた。
- 3) collagen type IVのmRNAおよび蛋白レベルの腎での発現は、OLETFラットにおいて有意に上昇していたが、AGE阻害剤OPB-9195により有意に低下した。
- 4) 腎組織におけるCMLおよびnon-CML AGE抗体を用いた蛍光免疫組織学的検討で、両抗体ともOLETFラットの腎症進展とともに染色性は増加したがAGE阻害剤OPB-9195投与によりnon-CML AGE抗体の染色性は低下を認めたのに対しCML抗体では差異を認めなかった。
- 5) 電子顕微鏡を用いpolyethyleneimine法にて腎基底膜のanionic siteへの影響(チャージバリアーへの検討)を観察したがAGE阻害剤OPB-9195治療の有無で差異を認めなかった。
- 6) 尿蛋白はAGE阻害剤OPB-9195治療にて投与後4ヵ月、投与6ヵ月では有意さを認めず投与10ヵ月では約40%の有意な低下を認めた。

これらの研究成果の一部はDiabetologia誌に印刷中となっている。

D. 考察

平成10年度の研究結果から、インスリン非依存性糖尿病のモデルラットであるOLETFにおける糖尿病性腎症の発症進展にはTGF- β 、およびVEGFが関与していると考えられた。特にそれぞれの発現の差異から考え、VEGFは初期腎症へ発症、またTGF- β は後期腎症の発症・進展に深く関わるものと推測される。臨床的な事実として糖尿病性早期腎症の時期には糸球体過剰濾過(hyperfiltration)が存在することが知られているが、今回の研究でOLETFラットの糖尿病発症早期にVEGF発現の上昇が認められた事実は、VEGFが強力な血管透過性亢進物質であることを考慮すると糸球体過剰濾過の一因となっている可能性が推測される。また、腎症発症後のTGF- β の上昇はcollagen type IVの上昇と平行しており、ともにAGE阻害剤OPB-9195により有意に低下したことは、この薬剤の重要な作用点が高血糖により形成されたAGE刺激によるTGF- β の上昇を阻止しcollagen type IVを始めとする細胞外基質成分増生を抑えたためと考えられる。

一方、尿蛋白へのAGE阻害剤OPB-9195効果は、後期腎症では有意であったが早期腎症では、期待されたほどの効果は得られなかった。同じく腎基底膜のanionic siteへの影響（チャージバリアーへの検討）も、AGE阻害剤OPB-9195治療の有無で差異を認めなかった。特に今回の実験で、チャージバリアーへ影響を見るためには、腎症初期の段階で、検討する必要があると考えられた。

これらを考慮しすでに我々は、初期腎症のステージに絞って尿蛋白やチャージバリアーへの治療の効果を検討するプロジェクトをスタートさせている。この初期腎症への糖尿病性腎症治療の有効性を比較検討する実験ではAGE阻害剤のみならず、以前から知られているACE阻害剤や最近合併症治療薬として注目されるPKC- β 阻害剤なども合わせて比較し、糖尿病性初期腎症の治療の可能性を総合的に検討出来るものと期待している。

E. 結論

AGE阻害剤OPB-9195の作用点としてTGF- β 、およびVEGFが関与することが証明された。AGE阻害剤OPB-9195は初期腎症の尿蛋白改善には効果が薄い可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasaki N, Fukatsu R, Tsuzuki K, Takamaru Y, Hayashi Y, Yoshida T, Fujii N, T Koike, Wakayama I, Yanagihara R, Garruto R, Amano N, Makita Z. Advanced glycation end product involved in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disease. *Am. J. Pathol.* 153:1149-1155, 1998.
2. Yanagisawa K, Makita Z, Shiroshita K, Ueda T, Fusegawa T, Kuwajima S, Takeuchi M, Koike T. Specific fluorescence assay for advanced glycation end-products in blood and urine of diabetic patients. *Metabolism* 47:1348-1353, 1998.
3. 渥美敏也、牧田善二：糖尿病合併症の分子機構とAGE (advanced glycation end-products). *Medical Practice*, 15 : 124-125, 1998.
4. 増田創、牧田善二：糖尿病性腎症の成因. *医学のあゆみ*, 184 : 851-854, 1998.
5. 石田三紀子、牧田善二：AGE阻害剤ーアミノグアニジンとその後. *治療学*, 32 : 103-104, 1998.
6. 土田健一、牧田善二、小池隆夫：AGE・増殖因子. *糖尿病* 41 : 11-13, 1998.
7. 牧田善二：ヘモグロビンA_{1c} (分担)、KEY WORD 1998-'99 糖尿病 (河盛隆造、吉川隆一、阿部隆三編)、先端医学社、東京、194-195、1998
8. 牧田善二：糖化 (分担)、KEY WORD 1998-2000 高脂血症・動脈硬化 (荻原俊男、斎藤康、馬淵宏編) 先端医学社、東京、134-135、1998
9. 牧田善二：腎症発症の要因、酸化ストレスと最終糖化産物. *BIO Clinica* 14 : 40-44, 1999.
10. 柳沢克之、牧田善二：Annual Review腎臓1999 (分担)、(長澤俊彦、河辺香月、伊藤克己、浅野 泰、遠藤 仁 編) 中外医学社、東京、242-246、1999

2. 学会発表

1. 渥美敏也、近藤琢磨、土田健一、三好秀明、小原慎司、増田創、石田三紀子、牧田善二、小池隆夫：酸化LDL及びAGEs刺激によるマウスマクロファージのMIF mRNA発現について。第41回日本糖尿病学会年次学術集会、和歌山 1998年5月21日、糖尿病：41 Supplement 1: 215, 1998
2. 土田健一、中村桜子、藤井渉、小原慎司、三好秀明、渥美敏也、柳沢克之、牧田善二、小池隆夫：AGE阻害剤(OPB-9195)の糖尿病性腎症発症進展抑制機序についての検討。第41回日本糖尿病学会年次学術集会、和歌山 1998年5月21日、糖尿病：41 Supplement 1: 225, 1998
3. 中村桜子、河田哲也、土田健一、石川伸太郎、安村貢一、牧田善二、小池隆夫：OLETF ratにおけるAGE阻害剤(OPB-9195)の尿蛋白排泄抑制機序に関する検討。第41回日本糖尿病学会年次学術集会、和歌山 1998年5月21日、糖尿病：41 Supplement 1: 281, 1998
4. 竹内正義、鈴木貴子、亀田幸彦、柳沢克之、牧田善二、小池隆夫：CML and non-CML Advanced Glycation Endproducts特異抗体の調整ならびに臨床応用に関する基礎的検討。第41回日本糖尿病学会年次学術集会、和歌山 1998年5月22日、糖尿病：41 Supplement 1: 399, 1998
5. 柳沢克之、上野洋男、竹内正義、入山禄郎、牧田善二、小池隆夫：CMLおよびnon-CML Advanced glycation endproducts特異抗体の作成ならびに糖尿病性腎症組織への検討。第41回日本糖尿病学会年次学術集会、和歌山 1998年5月22日、糖尿病：41 Supplement 1: 399, 1998
6. 牧田善二、三浦裕幸、伊藤禎司、渥美敏也、土田健一、三好秀明、小原慎司、石田三紀子、増田創、近藤琢磨、小池隆夫：CMLおよびnon-CML Advanced glycation endproductsを特異的に認識するmonoclonal抗体の作製。第41回日本糖尿病学会年次学術集会、和歌山 1998年5月22日、糖尿病：41 Supplement 1: 448, 1998
7. 三好秀明、柳沢克之、渥美敏也、土田健一、小原慎司、牧田善二、小池隆夫：Advanced glycation endproducts (AGE)特異的蛍光測定法による糖尿病患者尿中AGE-peptideの検討。第41回日本糖尿病学会年次学術集会、和歌山 1998年5月22日、糖尿病：41 Supplement 1: 449, 1998
8. 牧田善二：「糖尿病の患者指導について」 後志循環器カンファランス 小樽 1998年5月28日
9. Makita Z, Itoh T, Konno Y, Ichinoseki M, Atsumi T, Fujii W, Obara S, Miyoshi H, Tsuchida K, Koike T.: Modification of Erythrocyte Na/Li Countertransport Activity by Insulin Sensitizers. 58th American Diabetes Association Annual Meeting and Scientific Sessions, Chicago, June 13, 1998 (米国糖尿病学会) (米国), Diabetes 47 Supplement 1: A119, 1998
10. Atsumi T, Makita Z, Koike T, Nishihira J.: Effect of Oxidized LDL and AGEs on Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Expression by Murine Macrophages. 58th American Diabetes Association Annual Meeting and Scientific Sessions, Chicago, June 13, 1998 (米国糖尿病学会) (米国), Diabetes 47 Supplement 1: A112, 1998
11. Tsuchida K, Nakamura S, Fujii W, Atsumi T, Kawata T, Makita Z, Koike T.: Decrease of TGF- β and Type IV Collagen Production in Diabetic Nephropathy by a Novel AGE Inhibitor OPB-

9195. 58th American Diabetes Association Annual Meeting and Scientific Sessions, Chicago, June 13, 1998 (米国糖尿病学会) (米国), Diabetes 47 Supplement 1: A128, 1998

12. Nakamura S, Kawata T, Tsuchida K, Ishikawa S, Yasumura K, Makita Z, Koike T.: Loss of anionic sites of the glomerular basement membrane is correlated with the increase of urinary albumin excretion in spontaneous diabetic rats. 58th American Diabetes Association Annual Meeting and Scientific Sessions, Chicago, June 13, 1998 (米国糖尿病学会) (米国), Diabetes 47 Supplement 1: A124, 1998

13. Miyoshi H, Yanagisawa K, Makita Z, Koike T.: Analysis of AGE-peptides in Urine of Diabetic Patients by a Specific Fluorescence Assay for Advanced Glycation End-products. 58th American Diabetes Association Annual Meeting and Scientific Sessions, Chicago, June 13, 1998 (米国糖尿病学会) (米国), Diabetes 47 Supplement 1: A372, 1998

14. Yanagisawa K, Ueno H, Miyoshi H, Iriyama R, Makita Z, Koike T.: The Glomerular Location of CML and non-CML Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy. 58th American Diabetes Association Annual Meeting and Scientific Sessions, Chicago, June 13, 1998 (米国糖尿病学会) (米国), Diabetes 47 Supplement 1: A372, 1998

15. 土田健一、石田三紀子、近藤琢磨、曾根真由美、増田創、小原慎司、三好秀明、岡本珠美、渥美敏也、柳澤克之、牧田善二、小池隆夫：CSII (continuous subcutaneous insulin infusion)における超速効型インスリンLisproの有用性、第32回日本糖尿病学会北海道地方会、札幌、1998年10月24日

16. 渥美敏也、石田三紀子、近藤琢磨、曾根真由美、増田創、小原慎司、三好秀明、岡本珠美、土田健一、牧田善二、小池隆夫：マウスマクロファージの酸化LDL取込みに対するmacrophage migration inhibitory factorの影響、第32回日本糖尿病学会北海道地方会、札幌、1998年10月24日

17. 三好秀明、石田三紀子、近藤琢磨、曾根真由美、増田創、小原慎司、岡本珠美、土田健一、渥美敏也、牧田善二、小池隆夫：計画妊娠を目的にMiniMedポンプを使用し、著しい暈現象の改善を見たIDDMの1例、第32回日本糖尿病学会北海道地方会、札幌、1998年10月24日

18. 石田三紀子、近藤琢磨、曾根真由美、増田創、小原慎司、三好秀明、岡本珠美、土田健一、渥美敏也、牧田善二、小池隆夫：ビッグアナイド剤とSU剤の併用にて著明な血糖コントロールの改善をみたNIDDMの2例：第32回日本糖尿病学会北海道地方会、札幌、1998年10月24日

19. 曾根真由美、石田三紀子、近藤琢磨、増田創、小原慎司、三好秀明、岡本珠美、土田健一、渥美敏也、牧田善二、小池隆夫：低血糖発作を起こした巨大腓外腫瘍の1例：第32回日本糖尿病学会北海道地方会、札幌、1998年10月24日

20. 牧田善二：AGE形成による糖尿病性慢性合併症の成立機序。第33回糖尿病学の進歩・レクチャーC-7 糖尿病性慢性合併症の成立機序、富山 1999年2月26日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

19980165

報告書 P. 7-13は下記に掲載

Advanced Glycation End Products in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Diseases

Nobuyuki Sasaki, Ryo Fukatsu, Kayo Tsuzuki, Yorihide Hayashi, Taku Yoshida, Nobuhiro Fujii, Takao Koike, Ikuro Wakayama, Richard Yanagihara, Ralph Garruto, Naoji Amano, and Zenji Makita

American Journal of Pathology. Volume 153, Number 4, pp. 1149-1155, 1998

19980165

報告書 P. 14－19は下記に掲載

**Specific Fluorescence Assay for Advanced Glycation End Products in
Blood and Urine of Diabetic Patients**

Katsuyuki Yanagisawa, Zenji Makita, Koichi Shiroshita, Toshihiro Ueda,
Takeshi Fusegawa, Satoru Kuwajiam, Masayoshi Takeuchi, and Takao
Koike

Metabolism. Volume 47, Number11, pp.1348-1353, 1998

19980165

報告書 P. 20-24は下記に掲載

Progression of Nephropathy in Spontaneous Diabetic Rats Is Prevented by OPB-9195, a Novel Inhibitor of Advanced Glycation (Rapid Publications)

Sakurako Nakamura, Zenji Makita, Shintaro Ishikawa, Koichi Yasumura, Wataru Fujii, Katsuyuki Yanagisawa, Tetsuya Kawata, and Takao Koike
Diabetes. Volume 46, pp.895-899, 1997

19980165

報告書 P. 25-29は下記に掲載

Involvement of β 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages

Y. Hasunuma, E. Matsuura, Z. Makita, T. Katahira, S. Nishi & T. Koike

Clinical and Experimental Immunology. Volume 107, pp.569-573, 1997

19980165

報告書 P. 30-37は下記に掲載

Effects of aminoguanidine on serum advanced glycation endproducts, urinary albumin excretion, mesangial expansion, and glomerular basement membrane thickening in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats

Akira Yamauchi, Izumi Takei, Zenji Makita, Shinya Nakamoto, Norimi Ohashi, Hideko Kiguchi, Toshiharu Ishii, Takao Koike, Takao Saruta
Diabetes Research and Clinical Practice. Volume 34, pp.127-133, 1997

19980165

報告書 P. 38-45は下記に掲載

高血糖と動脈硬化. [特集]糖尿病と大血管障害

柳澤克之, 牧田善二

(掲載誌不明)

19980165

報告書 P. 46-48は下記に掲載

AGE・増殖因子. [特集]糖尿病性腎症の発症・進展機序

牧田善二, 土田健一, 小池隆夫

糖尿病. 41 巻 1 号, pp. 11-13, 1998

19980165

報告書 P. 49-52は下記に掲載

糖尿病性腎症の成因-環境因子. [特集]糖尿病性腎症-最近のトピックス②

増田創, 牧田善二

医学のあゆみ. 184 卷 11 号, pp.851-854, 1998

19980165

報告書 P. 53-54は下記に掲載

糖化.

牧田善二

pp.134-135

KEY WORD 1998-2000 高脂血症・動脈硬化. (萩原利夫, 斎藤康, 馬淵宏編) 先端医学社, 東京, 1998

19980165

報告書 P. 55－56は下記に掲載

糖尿病合併症の分子機構と AGE (advanced glycation end-products).

[特集]糖尿病・トピックス

渥美敏也, 牧田善二

Medical Practice. 15 巻 1 号, pp.124-125, 1998

19980165

報告書 P. 57-61は下記に掲載

糖尿病性腎症とAGE 阻害. XII.治療法

柳沢克之, 牧田善二

Annual Review 腎臓. Pp.242-246, 1999

19980165

報告書 P. 62-66は下記に掲載

酸化ストレスと最終糖化産物. 6. 腎症発症の要因
牧田善二

BIO Clinica. 14 巻2号, pp.146-150, 1999

19980165

報告書 P. 67－70は下記に掲載

赤血球膜蛋白の非酵素的糖化. 血液関係. 糖尿病(3)

牧田善二, 桑島悟

日本臨床.. 56 巻増刊号, pp.181-184, 1998