

難治性腎疾患の進展抑制の為の新たな指標作成とそれに基づく治療指針作成に関する研究  
(I)ヒト細胞の NADPH oxidase mRNA 発現とアンジオテンシン II(AngII)及び高糖濃度による影響の検討

研究者: 武 玉萍 国立佐倉病院リサーチレジデント  
松田 利恵子 国立佐倉病院リサーチレジデント  
山田 研一 国立佐倉病院臨床研究部部长

研究要旨

細胞内スーパーオキシドの  $O_2^-$  生成が遺伝子発現の細胞内情報伝達機構に関与していることが知られている。この  $O_2^-$  産生を司る NADH/NADPH oxidase 系が AngII 受容体刺激により活性化されるが、その詳細な機構がまだ不明な点が多い。もう一方、高血糖では細胞内の活性酸素が上昇するが、in vitro で高糖濃度による遺伝子の変化は不明である。今回我々は、HUVEC、ヒトメサンギウム細胞(NHMC)、健常者リンパ球(LC)における NADPH oxidase の component である p22phox、gp91phox、NOX4 mRNA の発現と AngII 及び高糖濃度の影響について検討した。HUVEC と NHMC では、AngII による NADPH oxidase mRNA 発現量と活性の増加が見られ、HUVEC と LC では高糖濃度による NADPH oxidase mRNA 発現量と活性の増加が見られた。ヒト細胞で AngII と高糖濃度による NADPH oxidase 遺伝子発現の増加が酸化ストレスの亢進による組織傷害に関わる可能性が示唆された。

共同研究者:

鈴木信夫 千葉大学大学院医学研究院教授  
喜多和子 千葉大学大学院医学研究院講師  
和野千枝子 千葉大学大学院医学研究院  
所属施設名: 千葉大学大学院医学研究院  
環境影響生化学教室

A. 研究目的

AngII は腎・血管壁で AngII receptor (AT1) を介し、NADPH oxidase を活性化させ、 $O_2^-$  の産生に関与するとの報告がある。血管平滑筋においては電子伝達系のコンポーネントの p22phox 関連因子に重要な役割があることが知られている。高血糖状態においては、AGE 産生、PKC の活性化、ポリオール代謝経路の亢進はそれ自身が酸化スト

スを促進させるという報告があった。そこで、培養 HUVEC、培養 NHMC、健常者由来 LC での NADPH oxidase 発現と AngII 及び高糖濃度の依存性の違いについて検討した。

B. 研究方法

健常者末梢血より LC を採取した。正常ヒト細胞を AngII および AngII 受容体拮抗剤(ARB)、または各糖濃度(5.6mMと28mM)存在下で培養し、real time PCR (Table 1) により mRNA 発現量を測定し、NADPH oxidase 活性を測定し、化学発光法を用いて  $O_2^-$  の産生量を測定した。

C. 研究結果

①HUVEC および NHMC の p22phox mRNA のベースレベル発現量は LC のそれに比べ、約 5 および 20% であった。一方、HUVEC の gp91 mRNA

の発現量は LC の約 5%であった。NOX4 mRNA 発現量は HUVEC 及び NHMC で同等で発現して、LC では発現していないことがわかった(Table 2)。

②HUVEC は AngII 存在下で  $O_2^-$  の産生量が 2.7 倍に増加し(Fig.1)、NADPH oxidase 活性が 1.6 倍に上昇し(Fig.2)、p22phox、gp91phox と NOX4 mRNA 発現量が 1.4 倍、1.4 倍、1.7 倍に増加し(Fig. 3A)、三者ともに ARB 添加で抑制された(Fig. 1、2と4A)。NHMC では AngII による  $O_2^-$  の産生量が 2.2 倍に増加し(Fig.1)、NADPH oxidase 活性が 1.8 倍に上昇し(Fig.2)、NOX4 mRNA 発現量は 1.8 倍に増加し(Fig. 3B)、三者ともに ARB 添加で抑制された(Fig. 1、2と4B)。LC では AngII による遺伝子の変動は認められなかった(Fig. 3C)。

③高糖濃度共培養により HUVEC での  $O_2^-$  産生量

と NADPH oxidase 活性は 1.4 倍と 1.6 倍にそれぞれ増加し(Fig. 5と6)、gp91phox mRNA 発現量は 1.7倍に増加した(Fig. 7A)。NHMC では、 $O_2^-$  産生量と NADPH oxidase 活性はそれぞれ 1.3 倍と 2 倍(Fig. 1と2)に増加し、遺伝子発現量の変化は見られなかった。LC では、 $O_2^-$  産生量、NADPH oxidase 活性と p22phox mRNA 発現量はそれぞれ 1.6 倍、1.4 倍と 1.4 倍に増加した(Fig. 5、6と7B)。

#### D. 考察

細胞の違いにより、AngII と高糖濃度に対する NADPH oxidase の遺伝子発現量の増加と活性上昇の違いが見られた。 $O_2^-$  過剰産生に関連した AngII 及び高糖濃度による HUVEC、NHMC と LC の NADPH oxidase 発現亢進による組織障害への可能性が示唆され、今後の課題が残された。

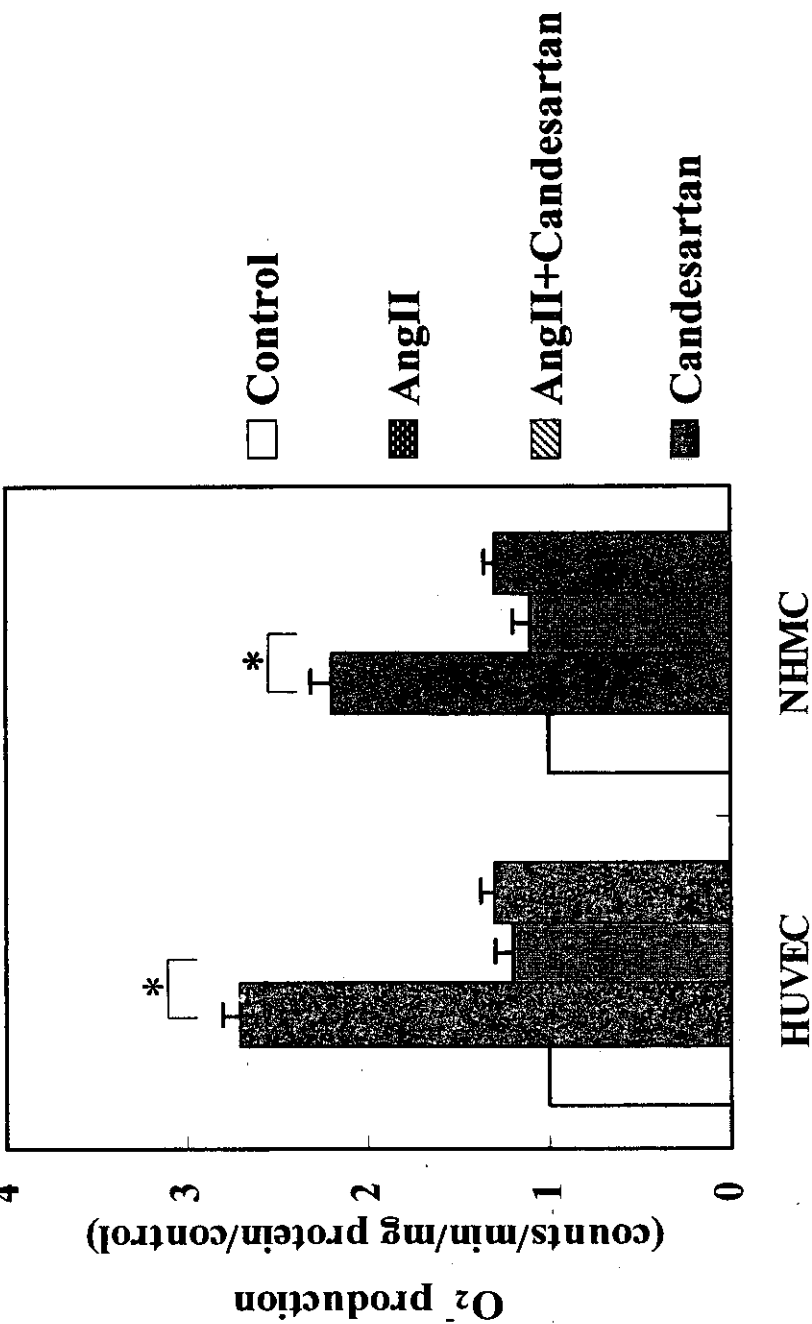
**TABLE 1**  
**Sequence of Taqman Primers and Probes Used**

Gene	Forward primer	Reverse primer	Probe
p22phox	ACC GCC GTG GTG AAG CT	ACC GAG AGC AGG AGA TGC A	FAM-ITC GGG CCC TTT ACC AGG AAT TAC TAT GTT C-TAMRA
gp91phox	CAT CCG CCC CTG AGG AA	GCA TTG AAC AGC CCC CTC TGT	FAM-ACT TCT TTA GTA TCC ATA TCC GCA TCG TTG GG-TAMRA
NOX4	TTA ACC TCA ACT GCA GCC TTA TCC	TTT TAT CCA ACA ATC TCC TGG TTC TC	FAM-CCT CCG AGG ATC ACA GAA GGT TCC AA-TAMRA
$\beta$ -actin	AAA TCG TGC GTG ACA TTA AGG A	CAG CCG TGG CCA TCT CTT	VIC-TGC TAC GTC GCC CTG GAC TTC GA-TAMRA

**TABLE 2.**  
 Evidence for the presence of oxidase subunits in  
 isolated nonphagocytic cells

mRNA	p22phox	gp91phox	NOX4
HUVEC	+	+	+
NHMC	+	-	+
LC	+++	+++	-

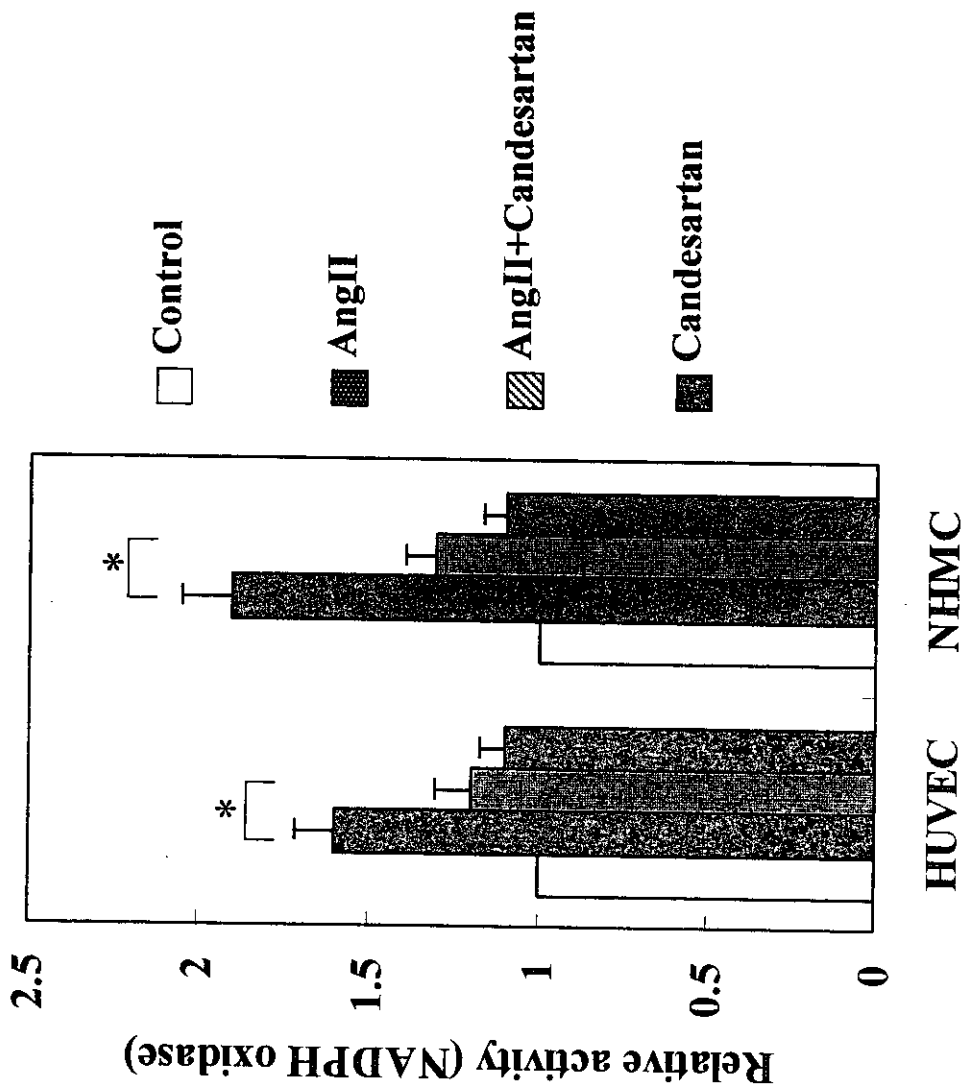
+, expressed; -, not expressed; and +++, strongly expressed.



**Fig. 1**

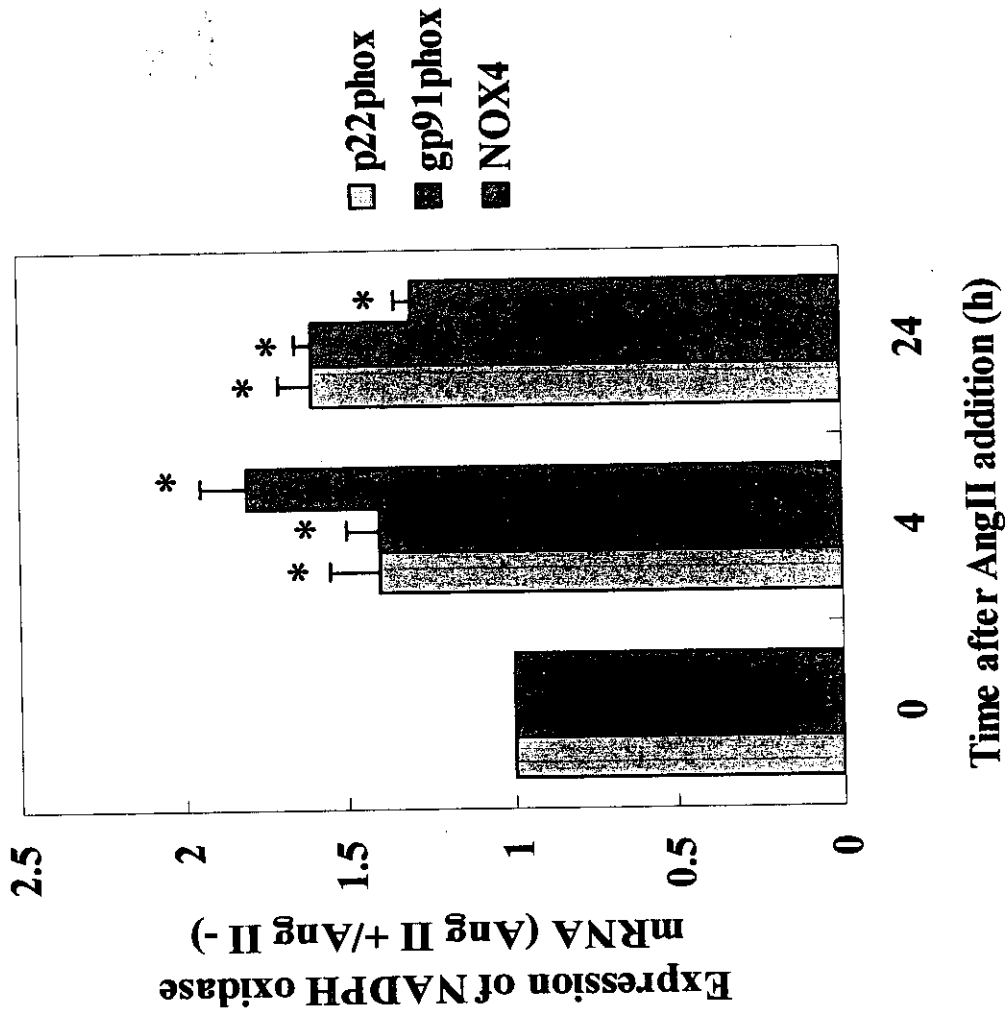
Fig. 1 AngII-induced  $O_2^-$  anion generation was abolished with candesartan in HUVECs and NHMCs (\* $p < 0.01$  vs control,  $n = 3$ ). HUVECs and NHMCs were pre-incubated with candesartan ( $10^{-6}M$ ) for 1 hr, then treated with Ang II ( $10^{-6}M$ ) for 6 hrs.  $O_2^-$  levels were determined by lucigenin (5 mmol/l) chemiluminescence.

**Fig. 2**



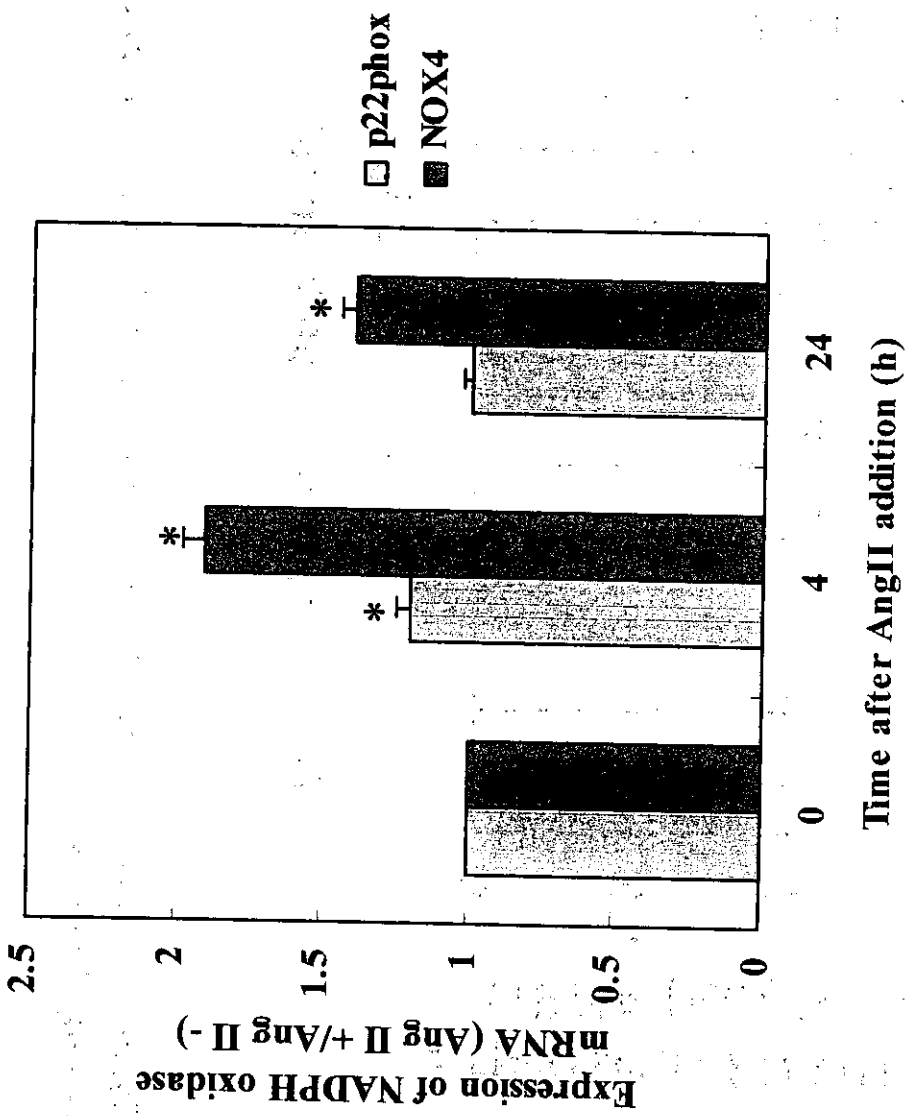
**Fig. 2** AngII-induced NADPH oxidase activity was abolished with candesartan in HUVECs and NHMCs (\*  $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ). NADPH oxidase was measured as NADPH oxidase activity assay.

**Fig. 3A**



**Fig.3** Expression of NADPH oxidase in Ang II-treated human cells. Serum-deprived cells were exposed to Ang II ( $10^{-6}$ M, 4 h and 24 h). NADPH oxidase mRNA expression was determined by real time PCR. 3A. Ang II stimulated the mRNA expression of NADPH oxidase in HUVECs (\*  $p < 0.01$  vs 0 hr,  $n=5$ ).

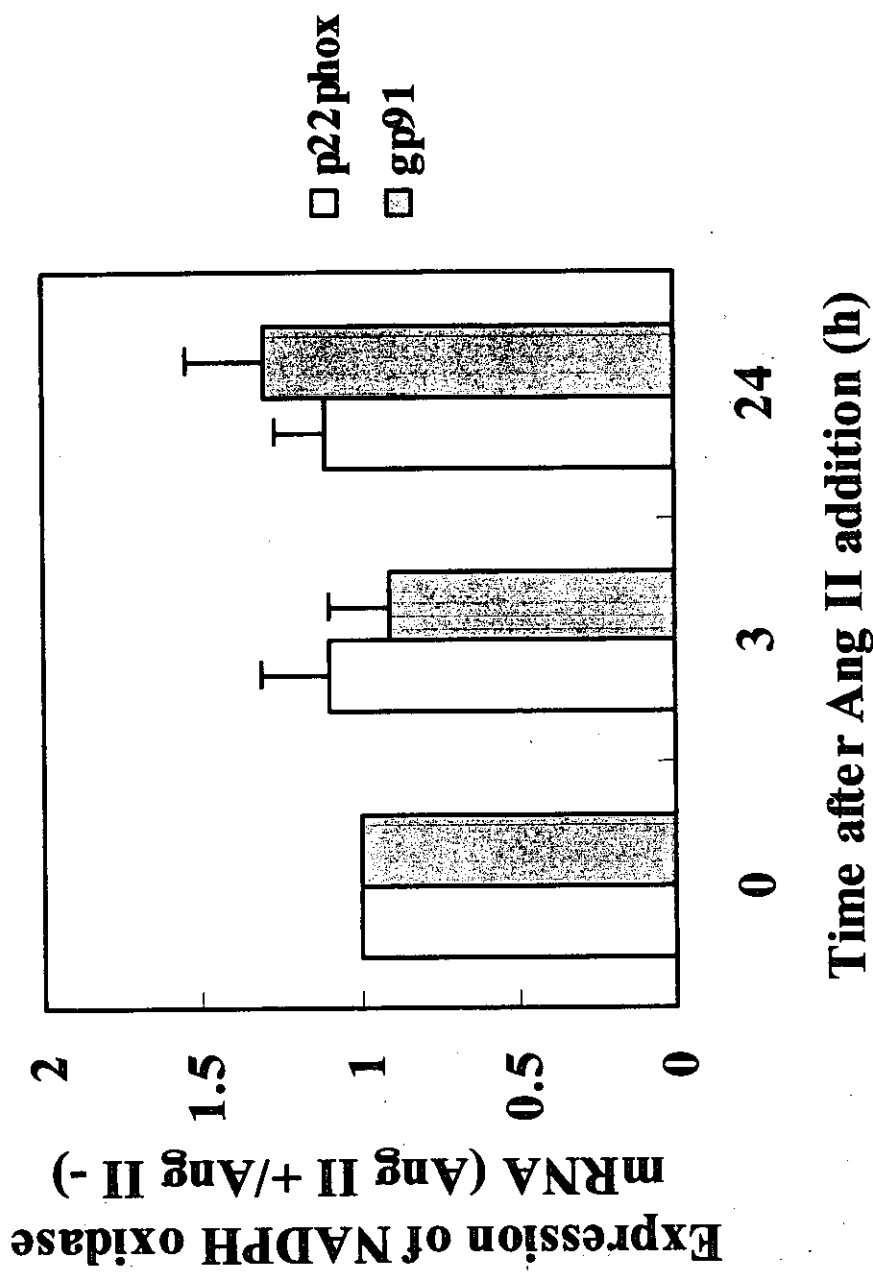
**Fig. 3B**



**Fig. 3B** Ang II stimulated the mRNA expression of NADPH oxidase in NHMCs (\* p<0.01 vs 0 hr, n=5).

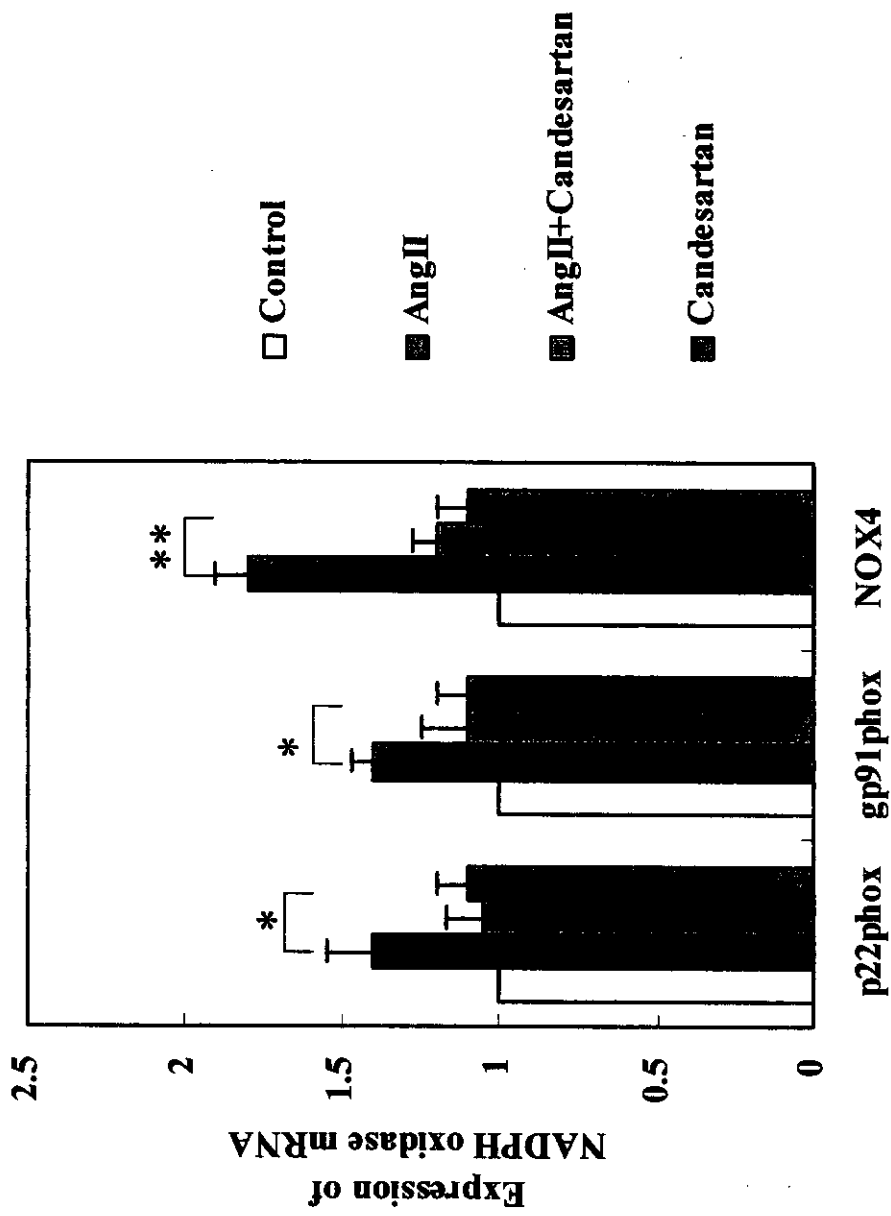


**Fig. 3C**



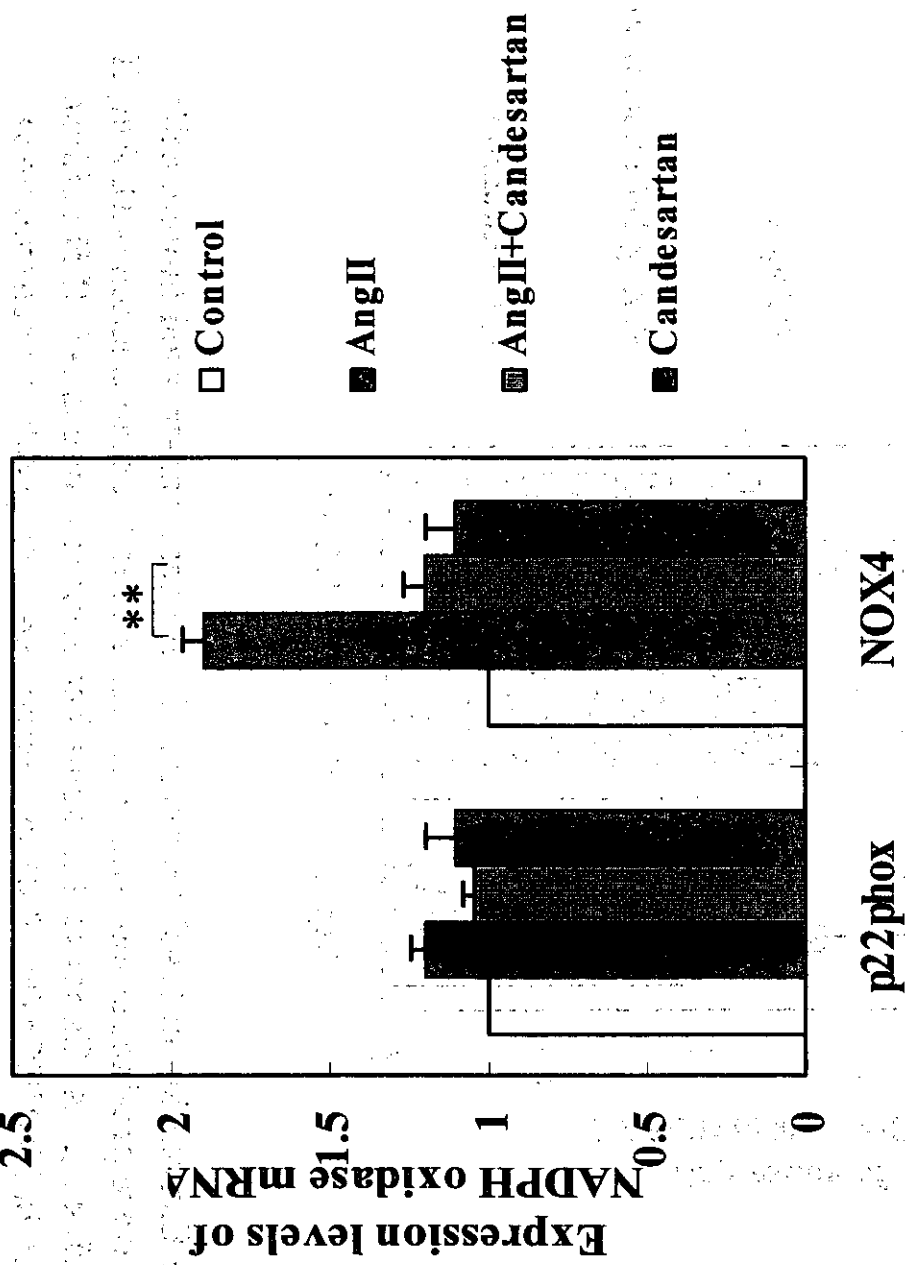
**Fig. 3C** Expression of p22phox and gp91phox mRNA was not affected by Ang II in LCs.

**Fig. 4A**



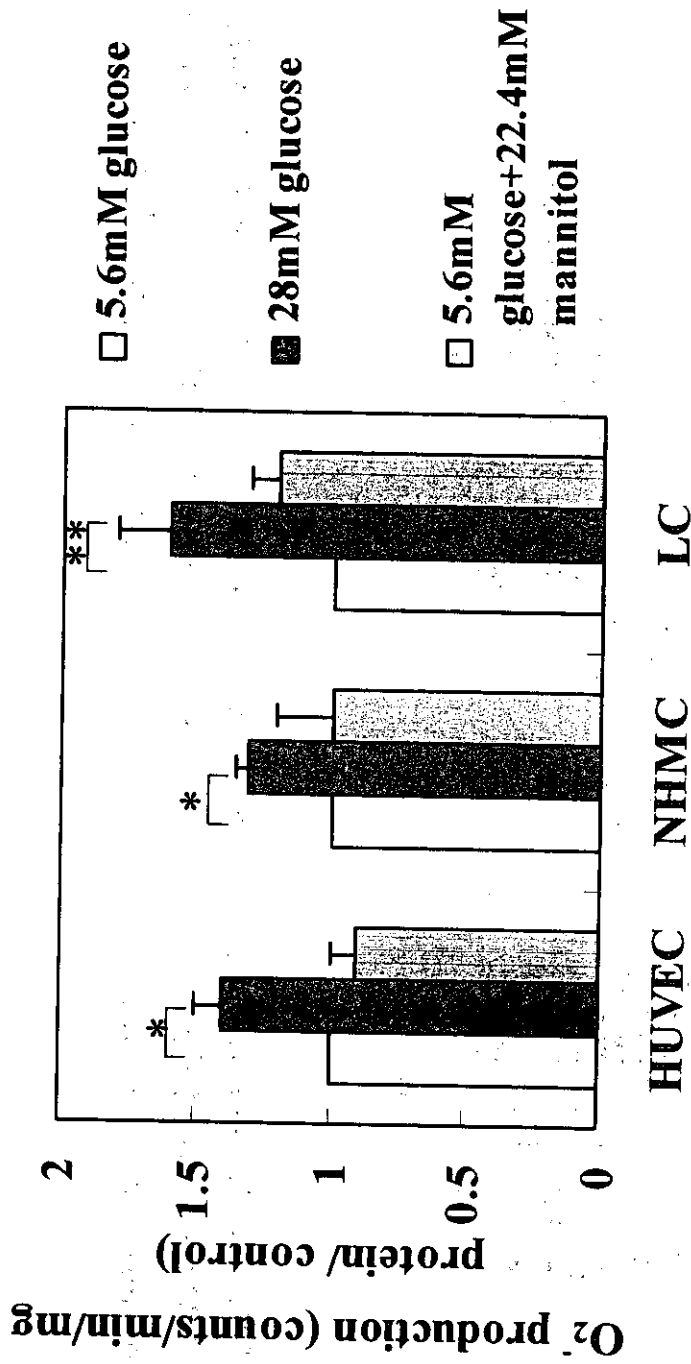
**Fig. 4** Expression of NADPH oxidase in candesartan-treated human cells. Cells were pre-incubated with candesartan for 1h, then treated with Ang II ( $10^{-6}$ M, 4 h). 4A. Candesartan abolished Ang II-induced NADPH oxidase mRNA in HUVECs (\* $p < 0.01$  vs control,  $n=3$ ; \*\*  $p < 0.05$  vs control,  $n=3$ ).

**Fig. 4B**



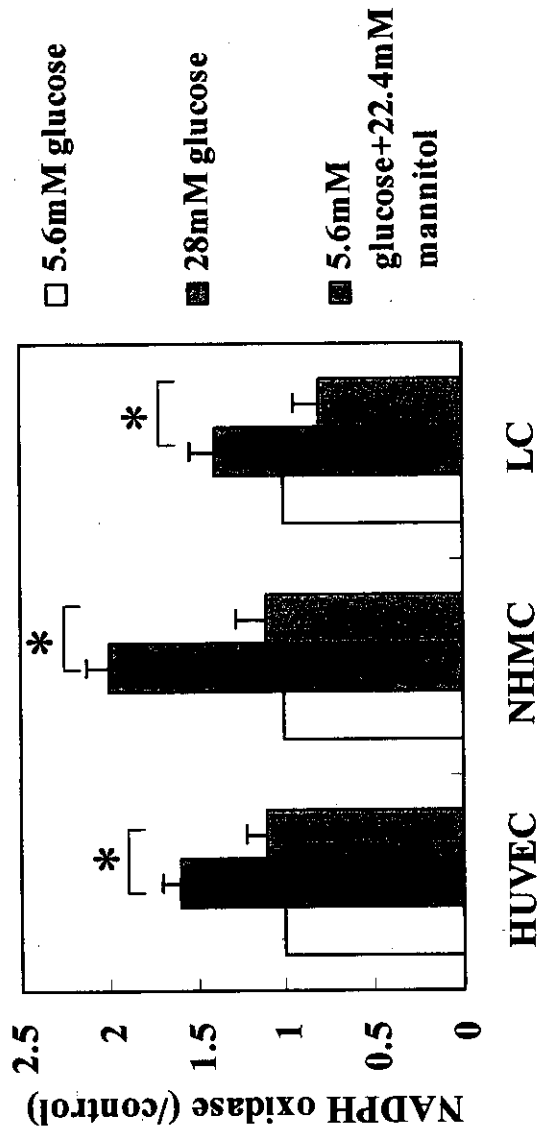
**Fig. 4B Candesartan abolished Ang II-induced NADPH oxidase mRNA in NHMCs (\*\* p<0.05 vs control, n=3)**

**Fig. 5**



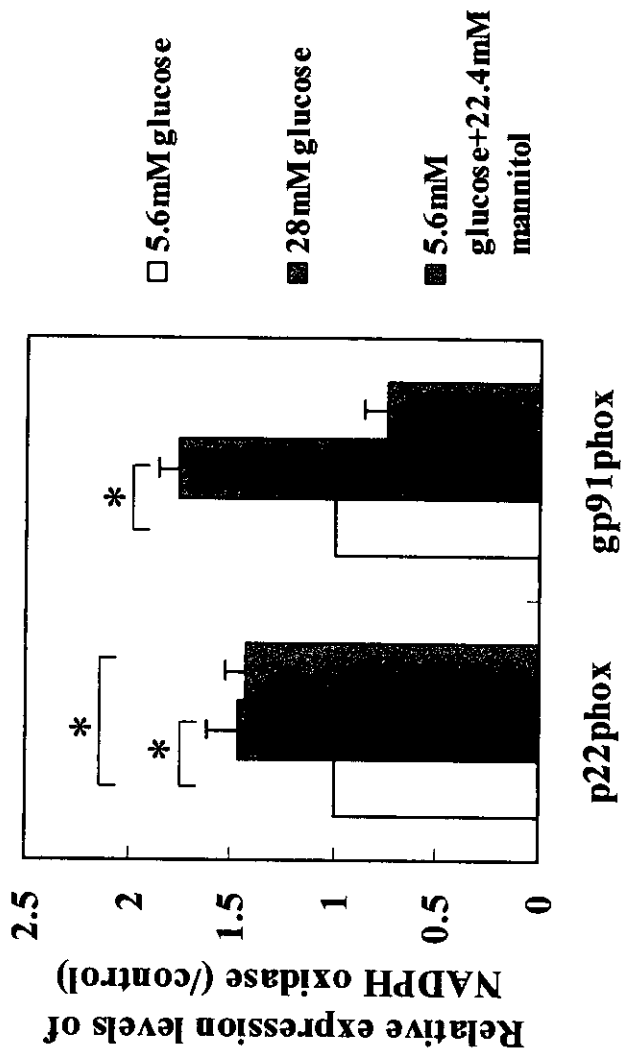
**Fig. 5**  $O_2^-$  production in HUVEC, NHMC and LC cultured with glucose. HUVECs, NHMCs and LCs were incubated with glucose (5.6 mM and 28 mM) for 6hrs.  $O_2^-$  levels were determined by lucigenin (5 mmol/l) chemiluminescence. \* $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ; \*\* $p < 0.02$ ,  $n = 3$ .

**Fig. 6**



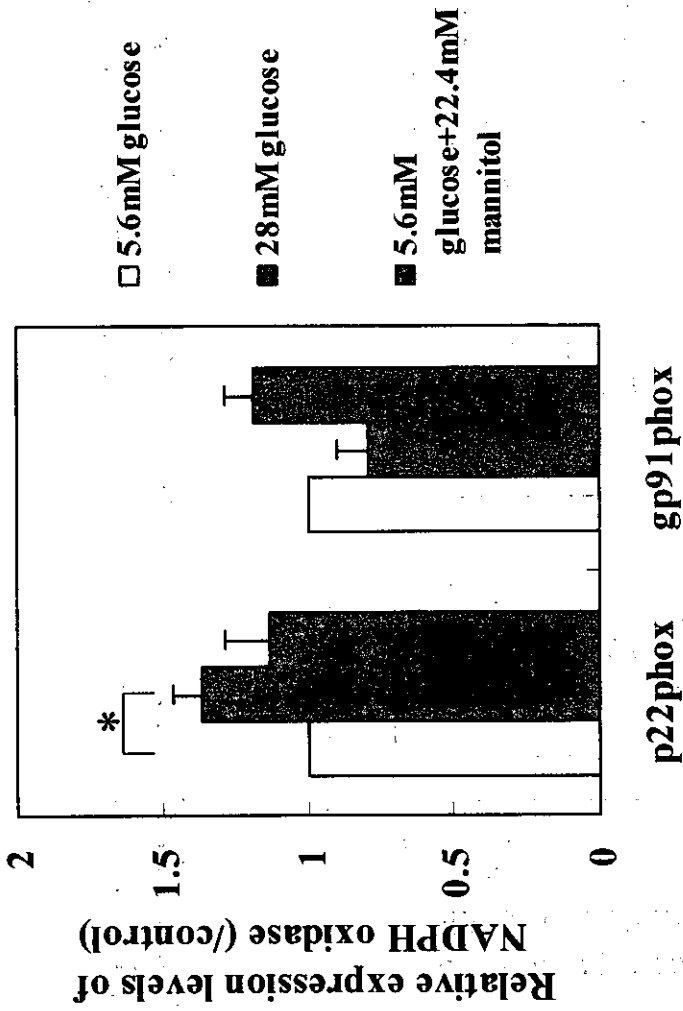
**Fig. 6 NADPH oxidase activity in HUVECs, NHMCs and LCs cultured with glucose. HUVECs, NHMCs and LCs were incubated with glucose (5.6 mM and 28 mM) for 5hrs. NADPH oxidase was measured as NADPH oxidase activity assay. \*p<0.01, n=3**

**Fig.7A**



**Fig. 7A Expression of p22phox and gp91phox mRNA in HUVECs cultured with glucose. HUVECs were incubated with glucose (5.6 mM and 28 mM) for 3 days. \* p<0.01, n=3**

**Fig. 7B**



**Fig. 7B Expression of p22phox and gp91phox mRNA in LCs cultured with glucose. LCs were incubated with glucose (5.6 mM and 28 mM) for 1 day. \*p<0.01, n=3**

難治性腎疾患の進展抑制の為の新たな指標作成とそれに基づく治療指針作成に関する研究

(Ⅱ)糖尿病性腎症患者における AngII receptor blocker (ARB) 投与による

末梢血リンパ球 NADPH oxidase mRNA 発現の変化

研究者: 武 玉萍 国立佐倉病院リサーチレジデント  
松田 利恵子 国立佐倉病院リサーチレジデント  
山田 研一 国立佐倉病院臨床研究部部长

研究要旨 酸化ストレスは組織障害の進展の Key factor であり、細胞内 NADH/NADPH oxidase の関与が注目されている。今回我々は、健常者と糖尿病性腎症(DN)患者末梢血リンパ球(LC)での p22phox と gp91phox mRNA の発現量を比較し、更に同(DN)患者への、ARB の治療効果を NADPH oxidase mRNA レベルと臨床データから検討した。DN 患者の LC における NADPH oxidase mRNA ベーサルレベル発現量は、健常者のそれと比較し、高値であるも、有意差を認めなかった。6ヶ月間の ARB (8mg/日) 投与後、蛋白尿、尿アルブミン排泄の低下を認め、同時に DN 患者 LC の NADPH oxidase mRNA ベーサルレベル発現量は、投与前のそれに比較し、有意に下がった。この間、ARB 投与前後での血圧値、HbA1c 値の変化を認めなかった。しかし、ARB 投与前及び後の p22phox mRNA 発現量はそれぞれの ARB 投与前及び後の尿アルブミン排泄・尿蛋白排泄とは、むしろ負の相関性が示された。

共同研究者:

鈴木信夫 千葉大学大学院医学研究院教授  
喜多和子 千葉大学大学院医学研究院講師  
和野千枝子 千葉大学大学院医学研究院  
所属施設名: 千葉大学大学院医学研究院  
環境影響生化学教室

ARB 反応性の違いについて検討し、臨床検査データとの比較をした。

B. 研究方法

ARB (Candesartan: 8mg/日) を DN 患者に投与し、投与前と投与 6ヶ月後に、末梢血より LC を採取した。健常者(n=20)と DN 患者(n=17)由来の LC を real time PCR により遺伝子発現量を測定した。

C. 研究結果

A. 研究目的

我々は難治性腎疾患進展の分子機構の解明及び進行性腎障害の進展を抑制するための、新たな指標作成とそれに基づく新しい治療法の開発を目的とし、難治性腎疾患、特に糖尿病性腎症の進展におけるレニン・アンギオテンシン系の関与とその分子生物学的意義を明らかにする。健常者と DN 患者由来の LC での NADPH oxidase 発現量と

①DN 患者は健常者と比べ、p22phox と gp91phox mRNA 発現量は増加を認めるも有意ではなかった。6ヶ月 ARB 投与後の末梢血 LC の p22phox と gp91phox mRNA 発現量は投与前より有意に低下が見られた。同時に ARB 投与にて尿蛋白、尿アルブミン排泄の低下が認められた。しかし、投与前後での血圧値、HbA1c 値の有意の変化は認めな



った。

②ARB投与前及び後のNADPH oxidase 遺伝子発現量と、蛋白尿と尿アルブミン排泄量との相関関係を検討したところ、ARB投与前及び後のp22phox発現量は投与前及び後の蛋白尿、尿アルブミン排泄量はむしろ負の相関関係が見られた。ARB投与前のgp91phox発現量も投与前の蛋白尿、尿アルブミン排泄量と負の相関が見られた。

#### D. 考察

糖尿病性腎症に対するARB投与による蛋白尿、

尿アルブミン排泄減少効果も確認された。しかし、末梢血NADPH oxidase mRNA発現の減少と同時にNADPH oxidase 遺伝子発現量はその時点の尿アルブミン排泄とは逆相関することが判明した。従って、末梢血リンパ球NADPH oxidase発現は腎尿細管でのアルブミン等のpermeation（再吸収）の変化を反映しているのか又は間接的な結果なのか不明である。更に、ARB投与前後での変化も内因性AngII抑制によるものとは考えにくく今後の課題が残された。

難治性腎疾患の進展抑制の為の新たな指標作成とそれに基づく治療指針作成に関する研究

－糖尿病性腎症患者の動脈硬化関連因子と食事摂取因子の関係－

研究者 松田 利恵子 国立佐倉病院 リサーチレジデント  
山田 研一 国立佐倉病院 臨床研究部長  
武 玉萍 国立佐倉病院 リサーチレジデント

研究要旨 日本人 2 型糖尿病患者の経年経過観察を行い、研究対象登録時と登録 1 年後の食事摂取変化量と動脈硬化関連因子（血管内皮細胞障害関連因子、脂質代謝関連因子）変化値との相関関係を検討した。その結果、淡色野菜摂取変化量と血漿 RLP-コレステロール、vWF の各変化値に有意な負の相関関係がみられた。また、果実類摂取変化量と血漿 PA-I 変化値にも有意な負の相関関係がみられた。このことから、淡色野菜、果実類の摂取は、血管内皮細胞障害、脂質代謝異常の予防に効果が期待されるが、長期的な観察が必要であり、重要な検討課題であることが明らかになった。

A.研究目的

糖尿病における腎症の発症・進展に、動脈硬化の関与が指摘されている。酸化ストレスの亢進は、血管内皮細胞障害作用を促進し、動脈硬化を惹起するため、糖尿病性腎症の病態上、重要な課題となっている。

本研究では、前年度までに、糖尿病性腎症患者を対象とした Case-Control Study の横断的解析の結果、腎症の進展に伴い、抗酸化ビタミンや果実類の摂取減少・不足、また、抗酸化ビタミンの摂取と血中動脈硬化関連因子に相関関係がみられたことより、野菜や果実類の摂取による腎症発症予防、進展阻止の可能性を示唆した。

本年度は更に追跡調査を行い、腎症発症・進展阻止のための新たな食事療法の確立を目指し、病態との関連を明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

対象は全国国立病院・療養所のネットワークシステム、HOSPnet で共通プロトコールにより登録された、2 型糖尿病患者 39 例。登録基準として①65 歳以下で推定 8 年以上の罹病期間、②血清クレアチニン値 2.0mg/dl 未満、③糖尿病性網膜症を有する者。

登録時に、写真撮影を含めた食事記録法による連続 3 日間の栄養調査を実施し、調査 3 日目に採血・採尿を行った。更に登録 1 年後、同様の方法で調査、採血・採尿を行った。

検討項目：栄養素摂取量（ビタミン A,C,E、葉酸）・食品群別摂取量（緑黄色野菜、淡色野菜、果実類）、血管内皮細胞障害関連因子（血漿 vWF 値、血漿 PA-I 値、血漿フィブリノーゲン値）、脂質代謝因子（血中リポ蛋白電気泳動比 [LDL/HDL : LDL の小粒子化]、血漿レムナント様リポ蛋白コレステロール値 [RLP-Chol]、血漿中性脂肪値 [TG]、血漿

## HDL-コレステロール値〔HDL-Chol〕

### C.結果

対象患者を尿中アルブミン排泄量で各病期に分けると、登録時は正常アルブミン尿群（ $\leq 30\text{mg/gCr}$ ）22例、微量アルブミン尿群（ $30 \sim 300 \text{ mg/gCr}$ ）6例、顕性腎症群（ $> 300\text{mg/gCr}$ ）11例であった。登録1年後には、正常アルブミン尿群のうち3例が微量アルブミン尿に、微量アルブミン尿群のうち2例が正常アルブミン尿に、顕性腎症群のうち2例が微量アルブミン尿となった。透析導入または血清クレアチニン $>4.0\text{mg/dl}$ となった者はいなかった。

血管内皮細胞障害関連因子の登録時と1年後の変化値と、栄養素・食品摂取の変化量との相関関係を検討したところ、栄養素摂取との間には有意な相関関係はみられなかったが、食品のうち、果実類と血漿PA-I（ $r=-0.36, p=0.034$ ）、淡色野菜と血漿vWF（ $r=-0.44, p=0.007$ ）に負の相関関係がみられた。

また、脂質代謝因子の登録時と1年後の変化値と、栄養素・食品摂取の変化量との相関関係を検討したところ、淡色野菜とRLP-Cholに負の相関関係（ $r=-0.42, p=0.014$ ）がみられた。

### D.考察

今回、経年データの解析により、抗酸化効果を有する栄養素を多く含む食品の摂取と動脈硬化関連因子（血管内皮細胞障害関連因子、脂質代謝因子）に関係がみられたことが分かった。このことから、糖尿病における腎症の発症・進展に強い関連性を認める動脈硬化を予防する上で、抗酸化ビタミンを多く含む食品摂取と動脈硬化関連因子との関連性の解明は、長期観察が必要であり、また、栄養指導において重要な検討課題であることが明らかになった。

### E.研究発表

#### 1.学会発表

- ・アミノ酸摂取状況と糖尿病性腎症の病態進展  
松田利恵子, 桑原節子, 島正之, 西村元伸, 山田研一  
第17回日本糖尿病合併症学会 2002年10月 東京
- ・糖尿病性腎症患者の食事摂取状況  
松田利恵子, 宮内真弓, 桑原節子, 小出信澄, 西村元伸, 山田研一, HOSPnetDM腎症研究班  
日本病態栄養学会 2003年1月 京都
- ・糖尿病性腎症患者の食事摂取状況  
松田利恵子, 武玉萍, 宮内真弓, 桑原節子, 小出信澄, 西村元伸, 山田研一, HOSPnetDM腎症研究班  
第46回日本腎臓学会学術総会 2003年5月 東京
- ・第15回日本糖尿病性腎症研究会

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K. Yamada, E. Hatakeyama, S. Arita, K. Sakamoto, H. Kashiwabara, K. Hamaguchi	Prediction of chronic renal allograft dysfunction from evaluations of TGF $\beta$ 1 and the renin-angiotensin system.	Clin Exp Nephrol.	7	238-242	2003
M. Nishimura, H. Terawaki, Y. Hoshiyama, K. Joh, K. Hamaguchi, K. Yamada	Renal ultrasonography is useful for evaluating diabetic renal failure.	Clin Nephrol.	59	174-179	2003
K. Yoshimura, M. Mishimura, T. Hasegawa, H. Terawaki, T. Nakazato, K. Sakamoto, S. Arita, K. Nakajima, H. Kashiwabara, K. Hamaguchi, R. Nagai, K. Horiuchi, K. Yamada	Effect of successful renal transplantation on coronary AGE accumulation of uremic heart.	Excerpta Medica International Congress Series	1245	183-191	2002
T. Nakazato, T. Kawada, T. Shigematsu, K. Yamada	Left ventricular hypertrophy was infrequent in patients starting dialysis after undergoing a strict blood pressure in the pre-dialytic period.	Intern Med	41(11)	925-930	2002
K. Yamada, E. Hatakeyama, T. Sakamaki, M. Nishimura, S. Arita, K. Sakamoto, K. Hamaguchi, K. Nakajima, M. Otsuka, K. Tanabe	Involvement of platelet-derived growth transplantation factor and histocompatibility of DRB1 in chronic renal allograft nephropathy.	Transplantation	71(7)	936-941	2001
K. Seto, H. Ikehara, T. Obata, K. Sakamoto, K. Yamada, H. Kashiwabara, T. Yokoyama, S. Tanada	Long-Term Assessment of posttransplant Transplantation Renal Prognosis with 31P Magnetic Resonance Spectroscopy.	Transplantation	72(4)	627-630	2001
H. Okonogi, M. Nishimura, Y. Utsunomiya, K. Hamaguchi, H. Tsuchida, Y. Miura, S. Suzuki, T. Kawamura, T. Hosoya, K. Yamada	Urinary type IV collagen excretion reflects renal morphological alterations and type IV collagen expression in patients with type 2 diabetes mellitus.	Clinical Nephrology	55(5)	357-364	2001
M. Nishimura, T. Sasaki, A. Ohishi, M. Ohishi, S. Kono, Y. Totani, Y. Kato, Y. Noto, S. Misaki, K. Higashi, F. Shimada, H. Wakasugi, K. Inoue, Y. Hoshiyama, K. Yamada (HOSPnet Intervention Study for Diabetic Nephropathy, organized by K. Yamada)	Angiotensin converting enzyme inhibitor and probucol suppress time-dependent increase in urinary type IV collagen excretion of type 2 diabetes mellitus patients with early diabetic nephropathy.	Clinical Nephropathy	56(2)	96-103	2001
Y. Gunji, K. Sakamoto, K. Kamura, K. Yamada, H. Kashiwabara, H. Shimada, S. Hori, T. Suzuki, T. Ochiai	Long-Term Outcomes of Immunosuppressed Renal Transplant Recipients with Malignancies.	Surgery Today	31	492-496	2001