

AMPKおよびACCのリン酸化は有意に低下していた。

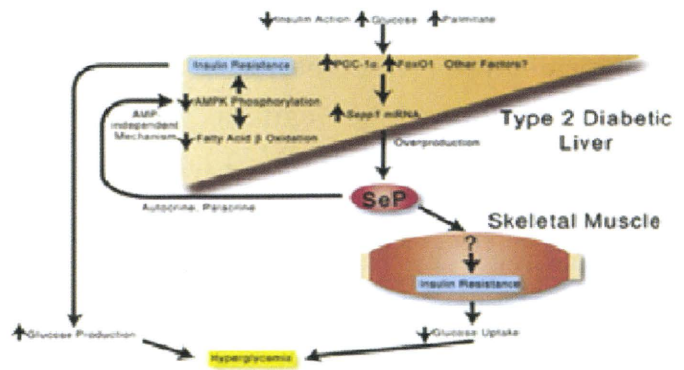
13. Dominant negative alpha AMPKをコードするアデノウイルスを感染させたH4細胞では、SeP投与によるインスリン抵抗性誘導作用はほぼ消失した。
14. SeP投与でも細胞内AMP, ATP濃度には変化はなかった。
15. SeP投与細胞では、AMPKリン酸化を負に制御するプロテインフォスファターゼ2C(PP2C)のタンパク発現が亢進していた。一方、AMPKKであるLKB1、CaMKK betaの総タンパク発現量に差はなかった。

D. 考察

2型糖尿病患者の肝臓では分泌タンパクSePの産生が亢進しており、この過剰産生が全身のインスリン抵抗性と高血糖を生じさせている可能性がある。最近になって、サプリメントを通じてセレンを過剰に摂取すると糖尿病発症リスクが高まるとする疫学研究が報告され、セレンと糖尿病の関係についても注目されている。

本研究は、肝臓由来ホルモン「ヘパトカイン」が2型糖尿病の病態形成に寄与していること、ヘパトカインが2型糖尿病を代表とするインスリン抵抗性関連疾患の治療標的になりうることを示唆する。

SePはautocrine, paracrineとして肝細胞に作用し、AMPKのリン酸化を減弱させることで肝インスリン抵抗性を誘導する。SePのAMPKリン酸化減弱作用は主にAMP非依存性メカニズムを介すると思われるが、その詳細の解明にはさらなる検討を要する。



E. 結論

2型糖尿病患者肝臓の包括的発現遺伝子解析から同定した新規ヘパトカイン、セレノプロテインPは、抗酸化作用を有するにもかかわらず、一部にAMPキナーゼ活性の抑制を介して、全身のインスリン抵抗性を増大する。このことは、過栄養状態で脂肪化した肝臓が、糖尿病の病態に成因として関与する可能性を示唆する。

今後は、SeP受容体の同定と機能解析、SeP遺伝子のプロモーター解析から発現制御機構の解明、SeP産生を制御する薬剤のスクリーニング、迅速血中濃度アッセイ系の確立と臨床的意義の解明等が課題となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N,

- Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S: A liver-derived secretory protein, selenoprotein p, causes insulin resistance. *Cell Metab* 12:483-495, 2010
- 2) Hamaguchi E, Takamura T, Sakurai M, Mizukoshi E, Zen Y, Takeshita Y, Kurita S, Arai K, Yamashita T, Sasaki M, Nakanuma Y, Kaneko S: Histological course of nonalcoholic fatty liver disease in Japanese patients: tight glycemic control, rather than weight reduction, ameliorates liver fibrosis. *Diabetes Care* 33:284-286, 2010
 - 3) Ootsuji H, Honda M, Kaneko S, Usui S, Okajima M, Okada H, Sakai Y, Takamura T, Horimoto K, Takamura M: Altered hepatic gene expression profiles associated with myocardial ischemia. *Circ Cardiovasc Genet* 3:68-77, 2010
 - 4) Ando H, Ushijima K, Kumazaki M, Eto T, Takamura T, Irie S, Kaneko S, Fujimura A: Associations of metabolic parameters and ethanol consumption with messenger RNA expression of clock genes in healthy men. *Chronobiol Int* 27:194-203, 2010
 - 5) Ando H, Ushijima K, Kumazaki M, Takamura T, Yokota N, Saito T, Irie S, Kaneko S, Fujimura A: Influence of age on clock gene expression in peripheral blood cells of healthy women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65:9-13, 2010
 - 6) Kobayashi D, Takamura M, Murai H, Usui S, Ikeda T, Inomata JI, Takashima SI, Kato T, Furusho H, Takeshita Y, Ota T, Takamura T, Kaneko S: Effect of pioglitazone on muscle sympathetic nerve activity in type 2 diabetes mellitus with alpha-glucosidase inhibitor. *Auton Neurosci* 158:86-91, 2010
 - 7) Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Matsushima K, Kaneko S: CD14+ monocytes are vulnerable and functionally impaired under endoplasmic reticulum stress in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 59:634-643, 2010
2. 学会発表
 - 1) 篁 俊成 : 糖尿病臨床医として脂肪肝をどう捉えるか? 第44回糖尿病学の進歩 教育講演. 大阪. 2010年3月6日
 - 2) 篁 俊成, 御簾博文, 金子周一 : Molecular pathology underlying insulin resistance in type 2 diabetic liver. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム, 岡山, 2010年5月29日
 - 3) Takamura T : Molecular pathology underlying insulin resistance in type 2 diabetic liver. Symposium at Kangwon National University “Integrative approaches in the battle against diabetes” 招待講演, Chuncheon, Korea, 2010年9月9日
 - 4) 篁 俊成 : アンチエイジングを見据えた2型糖尿病の総合的治療戦略. *Bio Japan* 2010 講演, 横浜, 2010年9月30日

- 5) 篁 俊成：スローエイジング糖尿病ケアにおけるインスリン療法のあり方。第25回日本糖尿病合併症学会総会 ランチョンセミナー，滋賀，2010年10月23日
- 6) Toshinari Takamura, Shuichi Kaneko: Nutrition and fitness for prevention / treatment of NAFLD / NASH. The 9th Single Topic Conference NASH 2010, 東京、2010年11月19日
- 7) Toshinari Takamura, Toshiki Otda, Hirofumi Misu, Tsuguhito Ota, and Shuichi Kaneko: Proteasome dysfunction in obesity contributes to ER stress, enhanced autophagy and insulin resistance in type 2 diabetic liver. Keystone Symposia - Type 2 Diabetes, Insulin Resistance and Metabolic Dysfunction, Keystone, Colorado, 2011年1月15日
- 8) Hirofumi Misu, Kazuhide Ishikura, Hiroaki Takayama, Hiroto Hayashi, Tsuguhito Ota, Shuichi Kaneko, and Toshinari Takamura (発表者) : Keystone Symposia - Obesity, Keystone, Colorado, 2011年1月16日
- 9) 篁 俊成：過栄養状態の肝臓が形成する2型糖尿病の病態。第45回糖尿病学の進歩，福岡、2011年2月18日
- 10) 篁 俊成：スローエイジングを目指す2型糖尿病の全人的ケア。第52回北陸支部生涯教育講演会，金沢、2011年3月13日
- 11) 篁 俊成：スローエイジングを見据えた糖尿病の総合的治療戦略。第50回日本臨床検査医学会東海・北陸支部総会、第322回日本臨床化学会、東海・北陸

支部例会 連合大会 シンポジウム、金沢、2011年3月13日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

篁 俊成、金子周一、御簾博文、高倉伸幸：「インスリン抵抗性誘導・血管新生抑制作用を有する糖尿病関連肝臓由来分泌蛋白」、特願2006-206747、PCT (国際特許) 出願(WO/2008/013324)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（腎疾患対策研究事業）
研究報告書

糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発

研究協力者

森 潔 京都大学大学院医学研究科・内分泌代謝内科

栗原 孝成 京都大学大学院医学研究科・内分泌代謝内科
向山 政志 京都大学大学院医学研究科・内分泌代謝内科
笠原 正登 京都大学大学院医学研究科・内分泌代謝内科
横井 秀基 京都大学大学院医学研究科・内分泌代謝内科
齋藤 陽子 京都大学大学院医学研究科・内分泌代謝内科
小川 喜久 大阪赤十字病院・腎臓内科
今牧 博貴 京都大学大学院医学研究科・内分泌代謝内科
川西 智子 京都大学大学院医学研究科・内分泌代謝内科
石井 輝 京都大学大学院医学研究科・内分泌代謝内科
古賀 健一 京都大学大学院医学研究科・内分泌代謝内科
森 慶太 京都大学大学院医学研究科・内分泌代謝内科
加藤 有希子 京都大学大学院医学研究科・内分泌代謝内科
菅原 照 大阪赤十字病院・腎臓内科
中尾 一和 京都大学大学院医学研究科・内分泌代謝内科

研究要旨

高脂血症による糖尿病性腎症進展に関わる分子病態マーカーの解析

A. 研究目的

脂質代謝異常が糖尿病腎症悪化の独立した危険因子であることは多くの疫学的研究から報告されており、我々は高脂肪食(HFD)負荷が1型および2型糖尿病モデルマウスの腎病変を悪化させることを確認した。今回、高脂血症による糖尿病性腎症進展の分子機構の解明を目指した。

B. 研究方法

1) 糖尿病性腎症の病態修飾に関わる候補遺

伝子を同定するために、発症機序および遺伝的背景が異なる2種の糖尿病マウスの単離糸球体でgene microarrayを行った。

2) 病態修飾の候補分子の機能を明らかにするために、その欠損マウスに疾患を誘発し観察した。実験動物に対しては動物愛護上の配慮を行い動物実験委員会により実験計画の事前承認を受けた。

C. 研究結果

ストレプトゾトシン(STZ)誘発インスリン

依存性糖尿病マウス、および A-ZIP/F-1 脂肪萎縮性糖尿病マウスで共通して発現増加する遺伝子として、内因性リガンド/受容体の関係にある HE1(既知の分泌蛋白)/toll-like receptor 4(TLR4)を同定した。TLR4 ノックアウト(KO)マウスおよび野生型(WT)マウスに STZ 及びあるいは HFD を投与した。STZ 単独の効果には WT・KO 両者でほとんど差を認めなかった。また STZ に HFD を併用すると糖脂質代謝異常・腎脂肪蓄積は WT・KO 両者で同程度であった。一方、WT では STZ 単独と比較して HFD の併用により腎臓の形態・機能の著しい悪化を認めたが、KO ではこれが強力に抑制されていた。

D. 考察

受容体TLR4欠損によって内因性リガンド HE1の発現亢進の抑制を認めたことから、糖尿病と高脂血症の合併において HE1-TLR4-HE1のpositive feedback loopの形成が示唆された。HE1はマウス及びヒトの糖尿病性腎症糸球体に浸潤しているマクロファージに発現しており、マクロファージ活性化が腎症悪化に関与するものと考えられた。

E. 結論

高脂血症による(1型の)糖尿病性腎症進展には、TLR4を介するシグナルが重要な役割を果たしていることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

現在投稿中

2. 学会発表

1)Kidney Frontier 2010・最優秀賞受賞

(2010年12月18-19日 東京)。

2)World Congress of Nephrology 2011・特別 Travel Grant Award 受賞内定 (Apr. 8-12, 2011, Vancouver, Canada)。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

尿バイオマーカー探索のための尿プロテオームデータベースの構築

研究協力者

山本 格 新潟大学大学院医歯学総合研究科附属腎研究施設構造病理学分野

研究要旨

糖尿病性腎症の尿バイオマーカー探索の基盤情報となる健常者の尿のプロテオームを質量分析計で解析し、同定できた尿タンパク質のうち腎臓組織プロテオームと共通し、血漿プロテオームに含まれないタンパク質のデータに腎臓内局在を示す免疫組織化学法画像データの統合したデータベースを作製した。

A. 研究目的

糖尿病腎症の診断、病態把握、予後予測などを可能にする尿バイオマーカーを探索、検証するために、尿タンパク質のうち腎臓から由来するタンパク質の腎臓内局在をデータベース化する。

B. 研究方法

健常者から得られた尿からタンパク質を分離し、2次元電気泳動法で分離後、ゲルをスライスし、ゲル内トリプシン消化し、ペプチドを分離する。そのペプチドを質量分析計で解析し、タンパク質を同定する。同定されたタンパク質の腎臓内局在はHuman Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>)などで探索する。

（倫理面への配慮）

尿、腎臓組織の採取、解析は新潟大学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

健常者の尿サンプルを質量分析計で解析

し、1500種類のタンパク質をどうていた。そのうち約半分が血漿由来のタンパク質であった。残りのタンパク質は腎臓組織のプロテオームと共通するものとそれ以外に分けられる。前者について腎臓の発現部位をHuman Protein Atlasや抗体を用いて検討し、それらをデータベース化した。それにより腎臓の部位特異的に発現しているタンパク質が尿中に検出されるタンパク質がリストされた。

D. 考察

糖尿病性腎症に必要なバイオマーカーの一つとしては尿中微量アルブミンより早期に患者を発見できるものがあげられる。そのようなバイオマーカーを発見するためには、糖尿病腎症が発症していない糖尿病あるいはその予備軍の人の尿を継続的に集めて、病気の進行とともに増加し、微量アルブミンより早期に検出されるものを探索しなければならない。このような検討は設置した尿バンクにより可能となる。また、本研究で構築された腎臓に発現し、尿中で検

出されるタンパク質から臨床上有用なバイオマーカーが検出されると考えられた。

E. 結論

健常者の尿と腎臓組織のプロテオームに共通に存在し、血漿プロテオームにないタンパク質群が選択され、腎臓疾患の障害部位を示す可能性のあるタンパク質が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) 山本 格：腎臓病のプロテオーム解析, Modern Physician 31(1), 190-193, 2011
 - 2) 山本 格：腎臓病のプロテオーム解析, 日本内科学会雑誌 99(7), 1671-1677, 2010
 - 3) 山本 格：腎臓病学におけるプロテオミクス, 日本腎臓学会誌 52(4), 457-460, 2010
 - 4) 山本 格：Human Proteome Organization (HUPO)のヒト腎臓・尿プロテオームプロジェクト, 新潟医学会雑誌 124(2), 55-64, 2010
 - 5) 山本 格：糸球体タンパク質のデータベース, 病理と臨床 28(5), 524-529, 2010
 - 6) 山本 格：バイオインフォマティクスの利用法(1), Nephrology Frontier, 9(3), 297-300, 2010
 - 7) 山本 格：バイオインフォマティクスの利用法(2), Nephrology Frontier, 9(4), 398-403, 2010
2. 学会発表
未発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

【分科会：糖尿病性腎症の新規治療法の開発】

厚生労働科学研究費補助金（腎疾患対策研究事業）
研究報告書

“AGEs-DNA aptamer による糖尿病性腎症進展抑制の可能性”に関する研究

研究分担者

奥田 誠也 久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門

研究協力者

深水 圭 久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門

研究要旨

Advanced glycation end products (AGEs) は糖尿病性腎症発症進展に重要な役割を担っている。今回我々は AGEs と特異的に、かつ強力に結合する AGEs-DNA aptamer を作製し、KKAy/Ta マウスに投与した。その結果、AGEs- aptamer により腎機能改善とともに、糖尿病由来尿中アルブミン排泄、糸球体肥大・硬化は有意に抑制された。今後は将来の臨床応用への可能性について検討する予定である。

A. 研究目的

Advanced glycation end products (AGEs) は、糖尿病における長期間の高血糖状態において、糖と蛋白が非酵素的に反応し生成される糖化最終産物である。近年、AGEs の蓄積や生物化学的反応が糖尿病性腎症の発症、進展に重要な働きをしていることが報告されている。近年、我々は AGE と特異的に、かつ強力に結合する AGEs-DNA aptamer を作製した (Microvas Res 2007, 74, 65-69)。本研究の目的は、AGE-アプタマーを糖尿病モデル動物に投与して、アプタマーの糖尿病性腎症への有効性を検討し、将来の臨床応用への可能性を模索することである。

B. 研究方法

KK-Ay/Ta マウスと、そのコントロールである C57BL/6j マウスを腎障害、尿中 albumin が出現すると思われる 16 週令まで観察する。AGEs-aptamer を 8 週令のマウスに浸透圧ポン

プにて持続的に投与し、16 週まで観察し sacrifice した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育や sacrifice の方法に関しては、当大学動物実験計画書に記載しており、審査の結果問題ないことを確認している。

C. 研究結果

AGE-aptamer を浸透圧ポンプにて投与した。その結果、血中 AGEs-aptamer は濃度依存性に増加し、腎臓での aptamer の存在を確認出来た。AGEs-aptamer により糖尿病由来腎機能の悪化、尿中アルブミン排泄、糸球体肥大、硬化は有意に抑制され (図 1)、腎症の発症・進展を抑制した。今後は血中、組織中の AGE の測定、増殖因子の発現等の解析を行う予定である。

D. 考察

今回、新たな AGE 抑制薬としての

AGEs-apptamer が 2 型糖尿病性腎症の発症、進展を抑制しうることが明らかとなった。今後は AGEs-apptamer による糖尿病性腎症発症進展抑制メカニズムを明らかにし、新たな治療薬として臨床応用していく予定である。

E. 結論

AGEs-apptamer は糖尿病性腎症治療薬として有用である可能性がある。具体的に臨床応用を考えていく。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujimi-Hayashida A, Ueda S, Yamagishi S, Kaida Y, Ando R, Nakayama Y, Fukami K, Okuda S. Association of asymmetric dimethylarginine with severity of kidney injury and decline in kidney function in IgA nephropathy. *Am J Nephrol.*33(1):1-6, 2011.
- 2) Nagano M, Fukami K, Yamagishi SI, Sakai K, Kaida Y, Matsumoto T, Hazama T, Tanaka M, Ueda S, Okuda S. Tissue level of advanced glycation end products (AGEs) is an independent determinant of high sensitive C-reactive protein levels in hemodialysis patients. *Nephrology.* 2010 Nov 3. doi: 10.1111/j.1440-1797.2010.01419.x.
- 3) Matsui T, Yamagishi S, Takeuchi M, Ueda S, Fukami K, Okuda S. Nifedipine inhibits advanced glycation end products (AGEs) and their receptor

(RAGE) interaction-mediated proximal tubular cell injury via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 23;398(2):326-30, 2010.

- 4) Yoshimura J, Fukami K, Koike K, Nagano M, Matsumoto T, Iwatani R, Kusumoto T, Hazama T, Ueda S, Adachi H, Hirai Y, Takasu K, Ohshima K, Yamagishi S, Okuda S. Interstitial Foxp3-positive T cells may predict renal survival in patients with myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*37(9):879-83, 2010.
- 5) Fukami K, Yamagishi SI, Okuda S. Development of enzyme-linked immunosorbent assay system for PEDF and its clinical utility. *Curr Mol Med.* 2010 Apr;10(3):317-20.
- 6) Matsui T, Yamagishi S, Ueda S, Fukami K, Okuda S. Irbesartan inhibits albumin-elicited proximal tubular cell apoptosis and injury in vitro. *Protein Pept Lett.* 17(1):74-7, 2010.

論文に関しては、JASN、KI 等への論文発表を目指している。

2. 学会発表

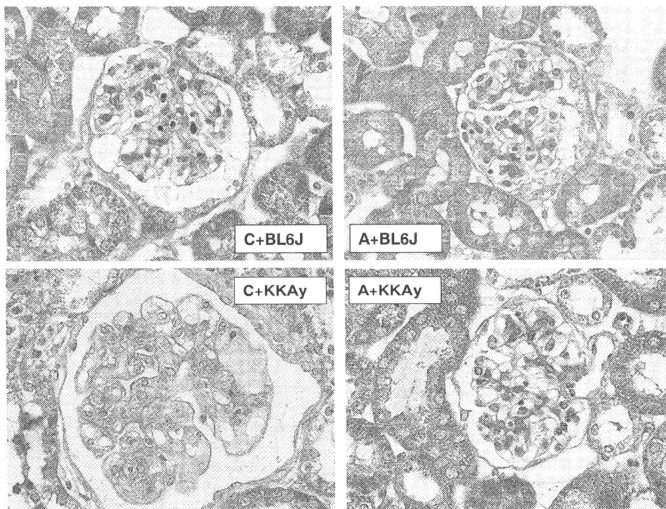
現在はデータ収集の段階であり、2011年ISN、日本腎臓学会での学会発表を予定している。

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在、特許出願中である。

☒ 1

Masson-Trichrome staining (× 600)



C: control DNA-aptamer, A: AGEs DNA-aptamer, BL: C57BL/6J mouse, KKAy: KKAy/Ta mouse

糖尿病性腎症の新規治療法の開発に関する研究

研究分担者

古家 大祐 金沢医科大学糖尿病・内分泌内科

研究要旨

2型糖尿病腎症モデルマウスにレスベラトロールを投与して、代謝マーカー、腎組織病変、酸化ストレス、Mn-SOD に対する効果を非投与群と比較検討した。レスベラトロール投与によって、血糖、脂質異常の改善と、尿アルブミンの減少、酸化ストレスの抑制がみられた。その分子機構として、糖尿病状態におけるミトコンドリア Mn-SOD の活性低下を、レスベラトロールが改善することを見出した。また、その作用は抗老化分子 SIRT1 の活性化を介さない、抗酸化作用であることが明らかとなった。

A. 研究目的

糖尿病腎症（腎症）は、いまや慢性腎臓病の主たる疾患である。しかし、血糖、血圧に対する治療薬の進歩にも拘らず、この傾向が続いている。したがって、糖尿病性腎症の発症・進展機構に基づいた抜本的な新規治療法が望まれる。そこで、SIRT1 活性化薬として注目されているレスベラトロールに、糖尿病性腎症保護効果があるか、また、どのような分子機構によって作用を発揮しているのかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

2型糖尿病モデルマウスである db/db マウスに、摂餌中にレスベラトロールを 0.3% を添加して 8 週間飼育した。その後、代謝マーカー、尿アルブミン量、腎組織検査、酸化ストレス、Mn-SOD 活性と発現量を検討した。（倫理面への配慮）

本実験は、金沢医科大学動物実験倫理委員会規程に基づいて行なった。

C. 研究結果

2型糖尿病性腎症モデルマウスにレスベラトロールを投与して、代謝マーカー、腎組織病変、酸化ストレス、および Mn-SOD に対する効果を非投与群と比較検討した。レスベラトロール投与によって、血糖、脂質異常の改善とともに、尿アルブミン排泄の減少、酸化ストレスの抑制、組織所見の改善がみられた。その分子機構として、糖尿病状態におけるミトコンドリア Mn-SOD の活性低下を、レスベラトロールが抗酸化作用を発揮して改善することを見出した。一方、レスベラトロールは、肝臓では AMPK の活性化していた。

D. 考察

レスベラトロールは抗老化作用として、MAPK-Sirt1 活性化を介することが報告されているが、本研究では、抗酸化作用を Mn-SOD 活性化を介していることが明らかとなった。一方、肝臓では AMPK を活性化しており、組織特異性があることが示唆された。

E. 結論

抗老化ポリフェノールに糖尿病性腎症に対する有効性が見出された。その分子機構は、Sirt 活性化ではなく、抗酸化作用であることを見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitada M, Shinji K, Imaizumi N, Koya D: Resveratorol improves oxidative stress through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1-1-independent pathway, Diabetes, in press
- 2) Kume S, Uzu T, Horiike K, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, Araki S, Sugimoto T, Haneda M, Kashiwagi A, Koya D. Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. J Clin Invest 120, 1043-1055, 2010
- 3) Araki S, Haneda M, Koya D, Isshiki K, Kume S, Sugimoto T, Kawai H, Nishio Y, Kashiwagi A, Uzu T, Maegawa H. Association between urinary type IV collagen level and deterioration of renal function in type 2 diabetic patients without overt proteinuria. Diabetes Care, 33, 1805-1810, 2010
- 4) Soumura M, Kume S, Isshiki K, Takeda N, Araki S, Tanaka Y, Sugimoto T, Chin-Kanasaki M, Nishio Y, Haneda M, Koya D, Kashiwagi A,

Maegawa H, Uzu T. Oleate and eicosapentaenoic acid attenuate palmitate-induced inflammation and apoptosis in renal proximal tubular cell. Biochem Biophys Res Commun. 402, 265-271, 2010

- 5) 古家大祐：糖尿病性腎症, CKD のサイエンス 基礎と臨床 19-30, 2010
 - 6) 古家大祐：糖尿病/耐糖能障害、AKI と CKD のすべて 113-118,2010
 - 7) 古家大祐, 北田宗弘：糖尿病性腎症の発症・進行の原因は?これを阻止する方法はあるか? 糖尿病性腎症でみられる検査異常, 知りたいことがわかる糖尿病性腎症教室 35-46, 59-72, 2010
- ### 2. 学会発表
- なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（腎疾患対策研究事業）
研究報告書

糖尿病性腎症の進展に対するケモカイン受容体阻害薬の検討

研究分担者

和田 隆志 金沢大学医薬保健研究域医学系血液情報統御学

研究協力者

原 章規 金沢大学附属病院腎臓内科・救急部

研究要旨

ケモカイン受容体 CCR2 を介した骨髄由来細胞 CD45/type I collagen (COL1) 二重陽性細胞の制御による糖尿病性腎症の治療の可能性を検討した。ヒト末梢血より分離・培養した CD45/COL1 二重陽性細胞を高糖培養した結果、pro-COL1 および TGF-β1 の mRNA 発現が濃度および時間依存性に亢進した。高糖下の CD45/COL1 二重陽性細胞には CCR2 が発現することが確認された。高糖下の MCP-1 刺激により、pro-COL1 および TGF-β1 の mRNA 発現はさらに亢進した。CCR2 阻害薬を添加した結果、pro-COL1 および TGF-β1 の mRNA 発現はいずれも低下した。以上の結果より、骨髄由来細胞の制御を介した糖尿病性腎症に対する CCR2 阻害薬の有効性が示唆された。

A. 研究目的

糖尿病性腎症の成因に炎症が関与することが判明しつつある。病理学的には単球・マクロファージに代表される炎症・免疫担当細胞の浸潤を認める。一方、臓器線維化と密接に関連する新規細胞成分として骨髄由来細胞、CD45/type I collagen (COL1) 二重陽性細胞が注目されている。CD45/COL1 二重陽性細胞はケモカイン・ケモカイン受容体を介して腎に浸潤し、マウス腎線維化に重要な役割を果たすことが報告されている。また、ヒト糖尿病性腎症の腎生検組織においても CD45/COL1 二重陽性細胞を認め、その細胞数は腎機能および間質線維化と相関することから、同細胞の線維化への関与が示唆されている。ケモカインの代表である MCP-1 は

その受容体 CCR2 を介して炎症・免疫担当細胞の浸潤に関与する重要な腎臓病の進展因子である。これまでの検討から、CD45/COL1 二重陽性細胞がマウス糖尿病性腎症モデルの腎間質に存在することが確認された。加えて、CCR2 阻害により CD45/COL1 二重陽性細胞数が減少するとともに、腎線維化およびアルブミン尿が改善することが判明している。そこで本研究では、培養ヒト CD45/COL1 二重陽性細胞を用いて、高糖下での動態ならびに CCR2 を介した CD45/COL1 二重陽性細胞の制御による糖尿病性腎症の治療の可能性を検討した。

B. 研究方法

健康成人末梢血の単核球分画より

CD45/COLI 二重陽性細胞を分離・採取し、D-glucose による高糖濃度あるいは浸透圧コントロールとして D-mannitol による刺激培養を行った。刺激 12 または 24 時間後に CD45/COLI 二重陽性細胞を回収し、1 型プロコラーゲン $\alpha 1$ 鎖(pro-COL1A1)、TGF- $\beta 1$ ならびに MCP-1 の mRNA 発現を real-time RT-PCR で検討した。また、同様の実験系を用い、ヒト CD45/COLI 二重陽性細胞を高糖かつ MCP-1 の添加した条件下で培養した。この系に MCP-1/CCR2 シグナリングを阻害する目的で CCR2 阻害作用を有するプロパゲルマニウム(PG)または RS-504393 を添加し、pro-COL1A1 ならびに TGF- $\beta 1$ 発現に及ぼす影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した薬剤である PG については、提供される三和化学研究所と覚書(MTA)を締結のうえで使用した。

C. 結果

ヒト末梢血より分離・培養した CD45/COLI 二重陽性細胞を高糖培養した結果、pro-COL1A1 および TGF- $\beta 1$ の mRNA 発現が濃度および時間依存性に亢進した。この発現の亢進の一部はマニトールによる刺激によっても認められた (図 1)。MCP-1 の発現についても同様の結果であった。高糖濃度培養を行った CD45/COLI 二重陽性細胞においては、CCR2 が発現することが確認された(図 2)。高糖下の CD45/COLI 二重陽性細胞において、MCP-1 刺激による pro-COL1A1 ならびに TGF- $\beta 1$ の mRNA 発現はグルコース単独刺激に比較し、より亢進した(図 3)。MCP-1 の mRNA 発現も同様であった。さらに CCR2 阻害薬である PG を添加した結果、pro-COL1A1 および TGF- $\beta 1$ の mRNA 発現はいずれも低下した(図 3)。

MCP-1 の mRNA 発現についても CCR2 阻害により低下した。

D. 考察

本研究では、ヒト CD45/COLI 二重陽性細胞を高糖培養した結果、pro-COL1A1、TGF- $\beta 1$ および MCP-1 の mRNA 発現が亢進した。高糖下の MCP-1 刺激により、これらの分子発現がさらに亢進した。さらに、CCR2 阻害により、pro-COL1A1、TGF- $\beta 1$ および MCP-1 の mRNA 発現はいずれも低下した。以上の結果より、CD45/COLI 二重陽性細胞は少なくとも 3 つの系を介して臓器線維化の進展に関与することが示唆される。一つ目は、MCP-1 を産生してマクロファージを介する機序が挙げられる。二つ目は TGF- $\beta 1$ を産生することにより線維芽細胞を介する機序である。そして 3 つ目は直接コラーゲンを産生する機序である。CCR2 阻害は高糖下の線維化病態における悪性サイクルを断ち切ることにより、糖尿病性腎症の進展抑制に有効性を発揮することが示唆された。今後の CCR2 阻害薬の臨床試験への応用が期待される。

E. 結論

CCR2 阻害薬は骨髄由来細胞 CD45/COLI 二重陽性細胞の機能を制御することにより糖尿病性腎症の進展を抑制する新規治療薬として有用であることが示唆された。

F 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 和田隆志:糖尿病性腎症, 日本腎臓学会誌, 52, 7, 2010

2) Sakai N, Furuichi K, Shinozaki Y, Yamauchi H, Toyama T, Kitajima S, Okumura T, Kokubo S, Kobayashi M, Takasawa K, Takeda S, Yoshimura M, Kaneko S, Wada T. Fibrocytes are involved in the pathogenesis of human chronic kidney disease. Human Pathol 41, 672-678,2010

3) Wada T, Sakai N, Sakai Y, Matsushima K, Kaneko S, Furuichi K. Involvement of bone marrow-derived cells in kidney fibrosis. Clin Exp Nephrol ,in press

2. 学会発表

1) ASN Renal Week 2010 SA-PO2525 Involvement of fibrocytes in the progression of diabetic nephropathy via MCP-1/CCR2 signaling Akinori Hara, Norihiko Sakai, Hiroyuki Yamauchi, Kiyoki Kitagawa, Kengo Furuichi, Shuichi Kaneko, Takashi Wada 平成 22 年 11 月 20 日 於デンバー

2) 第 53 回日本腎臓学会学術総会 一般演題 O2-09-19. 高糖濃度下におけるヒト fibrocyte の動態 原章規、坂井宣彦、山内博行、北川清樹、古市賢吾、和田隆志 教育講演. 腎臓間質線維化と骨髄由来細胞 和田隆志 平成 22 年 6 月 17 日 於神戸

3) 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 ワークショップ 2W11. 疾患と線維化 腎線維化にはたす骨髄由来細胞の意義 和田隆志 平成 22 年 12 月 8 日 於神戸

発明の名称：腎症の進行度の判定方法並びに線維化抑制剤

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的所有権の出現登録状況

1. 特許取得

出願番号：特願2010-281080

図1. 高糖によりCD45/COLI陽性細胞はI型プロコラーゲン
およびTGF-β1を発現する

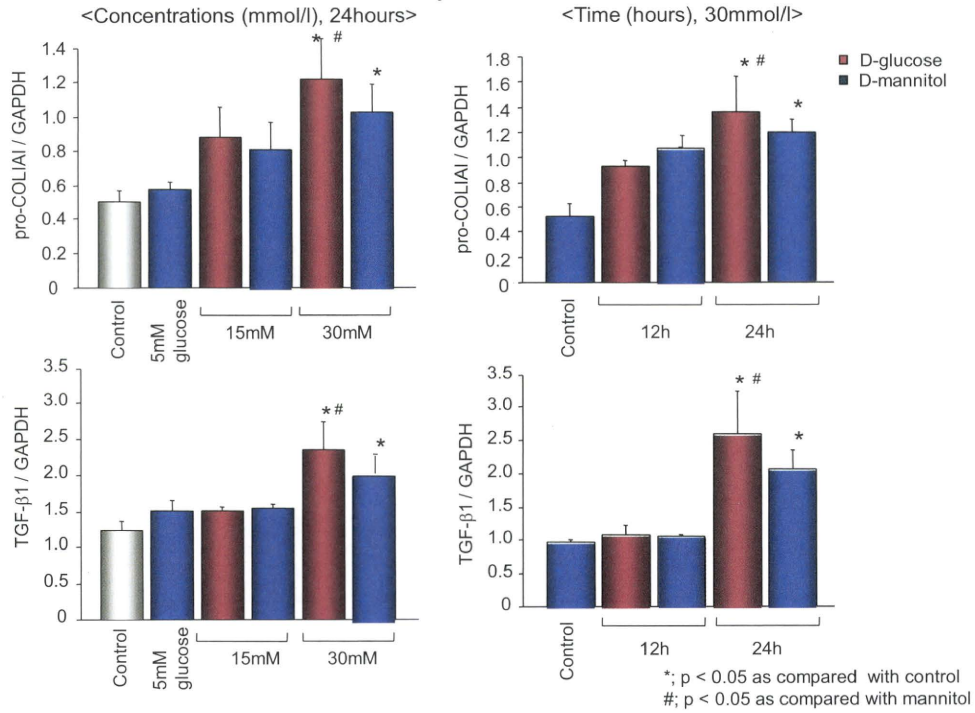
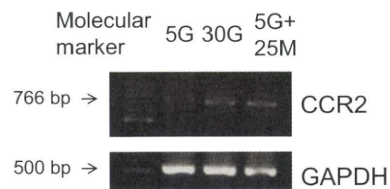
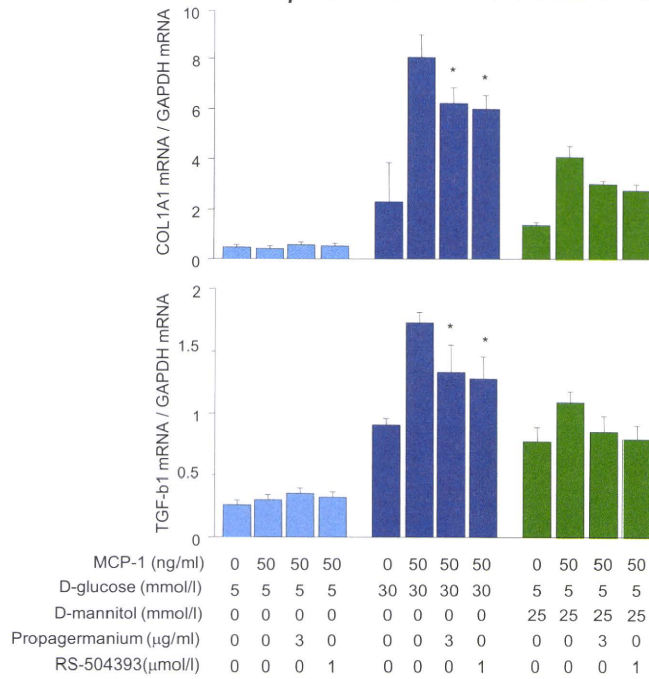


図2. 高糖によりCD45/COLI陽性細胞にCCR2が発現する



5G, 5mM D-glucose
30G, 30mM D-glucose
5G+25M, 5mM D-glucose+25mM D-mannitol

図3. 高糖下のMCP-1刺激により、I型プロコラーゲン
およびTGF- β 1発現がより亢進する



* p < 0.05 as compared with D-glucose+MCP-1

糖尿病性腎症に対するGLP-1受容体作動薬の効果の検討

研究協力者

四方 賢一 岡山大学病院新医療研究開発センター

【背景】

我々は以前より糖尿病性腎症の成因として炎症が重要な因子であることを提言し、抗炎症効果を示す様々な薬剤の腎保護効果を証明してきた。近年、糖尿病治療薬として新たな作用機序を持つインクレチン関連薬が登場し、インスリン分泌増強作用に加え、様々な膵外作用が報告されている。腎臓への作用としては、尿細管におけるNa吸収阻害、体重減少などによる代謝改善に基づく腎保護効果が報告されているが、抗炎症効果については証明されていない。

A. 研究目的

GLP-1の抗炎症効果を介した腎保護効果を検討するため、GLP-1受容体アゴニストであるexendin-4を、streptozotocinで誘発した糖尿病モデルラットに使用し検討した。

B. 研究方法

5週齢の雄のSDラットを1)非糖尿群、2)非糖尿病+exendin-4投与群、3)糖尿病群、4)糖尿病+exendin-4投与群に分け、streptozotocinにて糖尿病を誘発し8週間観察した。代謝データ、尿中アルブミン、CCr、腎組織への影響、酸化ストレス、NF-κB活性について検討を行った。また、THP-1細胞、ヒト糸球体血管内皮細胞を使用し、exendin-4の抗炎症作用による直接的な効果について検討を行った。

C. 研究結果

糖尿病群では正常群にくらべ、有意にHbA1cの増加、摂餌量の増加、体重の低下を認めたと、exendin-4投与による影響は認めなかった。また、血圧に関しては全群間で有意な差は認めなかった。この条件下で、exendin-4は糖尿病群にみられた尿中アルブミンの増加を有意に抑制し(図1a)、CCrも改善させた。腎組織における検討では、exendin-4投与によって糸球体肥大の抑制、メサンギウム領域の増大の抑制、糸球体内マクロファージの浸潤の抑制(図1b)、ICAM-1、IV型コラーゲン発現を有意に抑制した。また、酸化ストレスについては、Nox4と8-OHdGの糸球体内の発現を有意に抑制した。そして、NF-κB活性についても有意に抑制した。in vitroの検討については培養マクロファージ(THP-1細胞)、培養ヒト糸球体内皮細胞にGLP-1受容体の発現を確認し、高血糖刺激によるTHP-1細胞からのTNF-α、IL-1βの産生をexendin-4は有意に抑制した。また、TNF-α刺激による培養ヒト糸球体内皮細胞のICAM-1の発現をexendin-4は有意に抑制した。このexendin-4のin vitroの効果はGLP-1受容体拮抗剤の併用により消失した。

D. 考察

Exendin-4は抗炎症作用を介して腎保護効果を示した。そのメカニズムとしてはマクロ

ファージ、糸球体内皮細胞に存在する GLP-1 受容体を介して、マクロファージにおける炎症性サイトカインの産生の抑制と、糸球体内皮細胞における接着分子の抑制が一因になることが示唆される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kodera R, Shikata K, Kataoka HU, Takatsuka T, Miyamoto S, Sasaki M, Kajitani N, Nishishita S, Sarai K, Hirota D, Sato C, Ogawa D, Makino H.

Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes. Diabetologia.in press.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

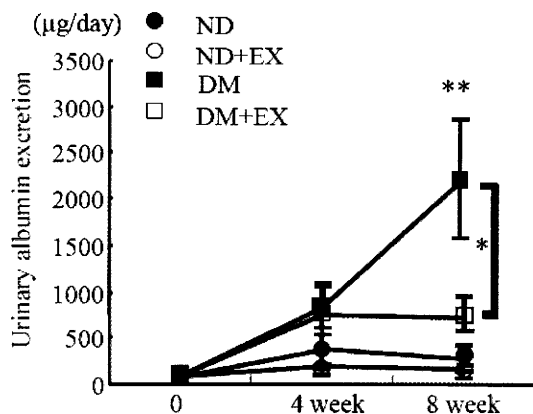
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1a



24時間アルブミン尿排泄量:

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs non-diabetic and non-diabetic + exendin-4 groups.

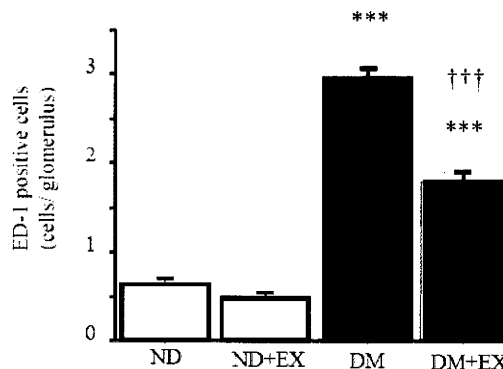
Black circles, non-diabetic group;

white circles, non-diabetic + exendin-4;

black squares, streptozotocin-induced diabetes group;

white squares, diabetes + exendin-4 group.

図1b



糸球体内のマクロファージの浸潤:

*** $p < 0.001$ vs ND and ND+EX;

††† $p < 0.001$ vs DM.