

C. 研究結果

1. 肝遺伝子発現が MCR と負に相関し、かつ糖負荷後 120 分血糖値と正に相関したセレノプロテイン P (SeP) を精製した。
2. 2 型糖尿病モデル動物 KKAy マウス、OLETF ラットでは、肝 SeP 遺伝子、血中 SeP タンパクが上昇していた。
3. 2 型糖尿病患者 31 名で血中 SeP 濃度を測定した結果、血糖値、HbA1c 値と有意な正相関を認めた。
4. C57BL マウスに 1mg/kg の精製 SeP を前投与すると、糖負荷 30 分後の血糖値は約 1.8 倍に上昇し ($p=0.001$)、腹腔内インスリン負荷後 30 分の血糖低下率は約 10% 減弱した。
5. このマウスの肝と筋でインスリン刺激性 Akt リン酸化は減弱していた。
6. SeP ノックアウトマウスは体重、摂食量、酸素消費量は正常であったが、糖およびインスリン負荷試験では耐糖能、インスリン感受性は良好であった。
7. SeP ノックアウトマウスの肝と筋ではインスリン刺激によるインスリンレセプターのチロシンリン酸化が亢進していた。
8. H4IIEC 肝細胞を SeP タンパク 10 $\mu\text{g/mL}$ で 12 時間前処置すると、1ng/ml のインスリン 15 分刺激による insulin receptor、IRS-2、Akt のリン酸化はそれぞれ約 40% に減少した。このとき培養液中への糖放出は約 30% 増加した。
9. インスリン抵抗性関連既知因子の発現を同細胞で網羅的に検討した結果、SeP 投与細胞では AMPK のリン酸化とその下流の ACC のリン酸化が減弱していた。
10. AMPK の下流で制御される脂肪酸酸化関連遺伝子群 (PPAR- α 、Cpt-1、Acad1) の発現も減弱した。
11. SeP タンパク投与 H4 肝細胞では、

C-14-oleate の C-14-CO₂ へのベータ酸化も低下していた。

12. 精製 SeP タンパク 1 mg/kgBW を C57BL マウスに静脈投与し、6 時間後に肝臓を摘出しタンパク発現を検討したところ、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。

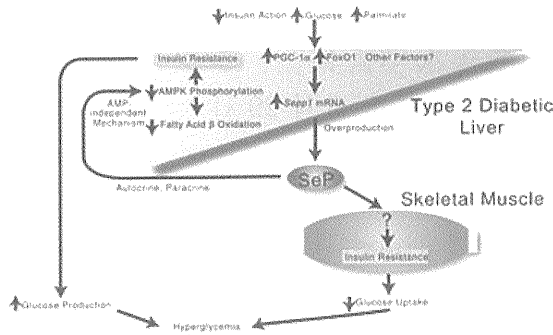
D. 考察

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. 研究発表

1. 論文発表

- Iwakami S, Misu H, Takeda T, Sugimori M, Matsugo S, Kaneko S, Takamura T. Concentration-dependent Dual Effects of Hydrogen Peroxide on Insulin Signal Transduction in H4IIEC Hepatocytes. PLoS One

6:e27401, 2011. Epub 2011 Nov 15.

- Yusuke Nakade, Toshinari Takamura, Masaru Sakurai, Hirofumi Misu, Mitsuko Nagata, Yuko Nanbu, Hiroyasu Oe, Toshiji Takamura, Yoshio Sakai, Shuichi Kaneko, Takashi Wada. Association between coefficients of variation of the R-R intervals on electrocardiograms and post-challenge hyperglycemia in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. J Diabetes Invest 2:324-327, 2011
- 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
- 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
- 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
6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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 (講演・シンポジウム、筆頭のみ)
 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 Otsuda, 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

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

- ① 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)

総合研究報告書

高脂血症による腎障害進展に着目した糖尿病性腎症の新規バイオマーカーの探索

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

向山政志 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

研究要旨

高脂血症は糖尿病性腎症を増悪させる危険因子のひとつであるので、今回そのメカニズムを検討した。野生型の誘発糖尿病マウスに高脂肪食を負荷して高脂血症を惹起すると、血清中性脂肪濃度の増加、腎脂肪沈着の著しい増加を認めると共に、糸球体ではメサンギウム領域の拡大、マクロファージ浸潤の増大、炎症・線維化マーカーの遺伝子発現増強、さらにアルブミン尿の増加を認めた。一方、toll-like receptor 4 (TLR4) 欠損マウスでは、同程度の高中性脂肪血症と腎脂肪沈着を認めるものの、高脂肪食追加による糸球体病変やアルブミン尿の悪化はほぼ完全にキャンセルされており、高脂血症による糖尿病性腎症の進展において TLR4 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

A. 研究目的

1 型及び 2 型糖尿病患者の疫学的観察研究より、高 LDL 血症あるいは高 TG 血症などの脂質代謝異常症が糖尿病性腎症悪化の独立した危険因子であることが明らかとなっているが、その分子機構は明らかではない。これまで、マウスに高脂肪食を与えて高脂血症を誘発すると、腎尿細管での脂肪合成、脂肪沈着が亢進し、尿細管細胞において炎症が惹起されて腎障害が進行すると考えられてきたが、今回我々は高脂血症による新しい腎障害のメカニズムを報告すると共に、糖尿病性腎症の新規バイオマーカーを提案する。

我々は、糖尿病性腎症の新規バイオマーカーを探索するために、マウス糖尿病性腎

症の糸球体で強く発現誘導されるリガンド（分泌蛋白）/受容体のペアをスクリーニングした。次に高脂肪食負荷による高脂血症にて悪化させたマウス糖尿病性腎症において、このリガンド/受容体の発現変化を検討した。さらに受容体 knockout (KO) マウスにおける糖尿病性腎症の評価を行った。またヒト腎生検組織におけるリガンドの発現を解析し、新規バイオマーカーとしての有用性を検討した。

B. 研究方法

(1) ストレプトゾトシン (STZ) 誘発 1 型糖尿病及び db/db 2 型糖尿病のマウスから糸球体を単離、total RNA を抽出、逆転写を行い、コントロールよりも共通して発現

増強が見られる遺伝子をスクリーニングした。

(2) その一つとしてリガンド/受容体のペアである S100A8 (myeloid-related protein 8)/toll-like receptor 4 (TLR4) を同定した。

(3) STZ 誘発 1 型糖尿病及び db/db 2 型糖尿病のマウスに高脂肪食を負荷し、腎症に及ぼす高脂血症の影響を検討した。

(4) 高脂血症による糖尿病性腎症悪化における TLR4 の役割を明らかにするために TLR4 KO マウスを用いた検討を行った。

(5) ヒト糖尿病性腎症における S100A8 の発現を腎生検標本を用いて検討した。

(6) 野生型及び TLR4 KO マウスの骨髄からマクロファージを誘導し、高糖濃度及び遊離脂肪酸が S100A8 遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

C. 研究結果

(1) マイクロアレイを用いた解析により STZ マウス糸球体ではコントロールに比して S100A8 遺伝子発現が 2.3 倍、TLR4 発現が 1.7 倍に増加していた。A-ZIP/F-1 脂肪萎縮性糖尿病マウス糸球体でも、コントロール FVB/N マウスに比して S100A8/TLR4 の発現増加を認めた。

(2) RT-PCR により、STZ マウスへの 45% 高脂肪食負荷は、糸球体における S100A8/TLR4 の遺伝子発現を、STZ 単独と比してそれぞれ 2.0 倍/1.5 倍に増加させた。以上より、糸球体における S100A8 の発現は糖尿病性腎症の程度とよく相関することが明らかとなった。

(3) STZ マウス及び db/db マウスへの高脂肪食負荷は、それぞれアルブミン尿を 2 倍に増加させた。また STZ マウスへの高脂肪食負荷は、高中性脂肪血症及び腎脂肪蓄積を著しく増加させると共に、糸球体にお

ける炎症マーカー遺伝子 (MCP-1, TNF \cdot , PAI-1, IL-1 \cdot) \cdot 線維化マーカー遺伝子 (TGF \cdot 1, ColIVa3, CTGF) の発現を有意に増加させた。糸球体へのマクロファージ浸潤、メサンギウム領域拡大も悪化した。

(4) 野生型マウス及び TLR4 KO マウスに STZ 糖尿病を惹起すると同程度の腎病変を認めた。一方、高脂肪食負荷による腎症の悪化は、TLR4 KO マウスではほとんど認められなかった。

(5) 糖尿病性腎症において S100A8 は主に糸球体に浸潤しているマクロファージに発現していた。minor glomerular abnormality や微小変化群と比して、ヒト糖尿病性腎症の糸球体では有意な S100A8 陽性細胞の増加を認めた。

(6) 高糖濃度刺激および遊離脂肪酸 (パルミチン酸) は野生型マウス骨髄由来のマクロファージにおいて S100A8 遺伝子発現を相乗的に増加させたが、TLR4 KO マウス由来のマクロファージはパルミチン酸に反応しなかった。

D. 考察

糖尿病と高脂血症の合併はマクロファージに発現する TLR4 の活性化を介して、活性化マクロファージの糸球体内浸潤を引き起こし、腎症を悪化させると考えられた。これまで高脂血症は、腎尿細管細胞への脂肪蓄積による脂肪毒性の直接効果によって尿細管間質での炎症を惹起して腎病変を悪化させると報告されてきたが、今回、高脂血症による腎症悪化の新しい分子機構を解明した。

E. 結論

糖尿病と高脂血症の合併はマクロファージに発現する TLR4 の活性化を介して、

活性化マクロファージの糸球体内浸潤を引き起こし、腎症を悪化させると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) T. Kuwabara, K. Mori, M. Mukoyama, M. Kasahara, H. Yokoi, Y. Saito, Y. Ogawa, H. Imamaki, T. Kawanishi, A. Ishii, K. Koga, K. P. Mori, Y. Kato, A. Sugawara, K. Nakao. Hyperlipidemia exacerbates diabetic nephropathy through activation of toll-like receptor 4 in mice. (投稿中)

2) 栗原孝成、向山政志、森 潔、笠原正登、中尾一和. 糖尿病性腎症における脂質代謝異常とその役割. *Current Therapy* 29:59-63, 2011.

2. 学会発表

1) Annual meeting for World Congress of Nephrology 2011. April 8-12, 2011. Vancouver, Canada. 「Hyperlipidemia promotes diabetic renal injury via TLR4 signaling」 T. Kuwabara, K. Mori, M. Mukoyama, M. Kasahara, H. Yokoi, Y. Saito, Y. Ogawa, H. Imamaki, T. Kawanishi, A. Ishii, K. Koga, K. P. Mori, Y. Kato, A. Sugawara, K. Nakao.

2) 第84回日本内分泌学会学術総会 2011年4月21-23日、神戸

「MRP8/TLR4 シグナルを介した高脂血症による糖尿病腎症の新規悪化機序」栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、斎藤陽子、小川喜久、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和。

3) 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011年5月19-21日、札幌

「高脂血症による糖尿病腎症進展の分子機構」栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、斎藤陽子、小川喜久、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和。

4) 第54回日本腎臓学会学術総会 2011年6月15-17日、横浜

「脂質によるTLR4シグナル活性化は糖尿病腎症を進展させる」栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、斎藤陽子、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和。

5) American Diabetes Association, 71st Scientific Sessions; June 24-28, 2011, San Diego, California. 「Toll-like receptor 4-mediated, hyperinsulinemia-independent progression of diabetic Nephropathy by hyperlipidemia」Takashige Kuwabara, Kiyoshi Mori, Masashi Mukoyama, Masato Kasahara, Hideki Yokoi, Yoko Saito, Hirotaka Imamaki, Tomoko Kawanishi, Akira Ishii, Kenichi Koga, Keita Pierre Mori, Yukiko Kato, Akira Sugawara, Kazuwa Nakao

6) Annual meeting for American Society of Nephrology. Nov. 10-13, 2011. Philadelphia, PA

「Aggravation of diabetic nephropathy by hyperlipidemia is mediated by MRP8/TLR4 signaling in macrophages」 Takashige Kuwabara, Kiyoshi Mori, Masashi Mukoyama, Masato Kasahara, Hideki Yokoi, Yoko Saito, Hirotaka Imamaki, Tomoko Kawanishi, Akira Ishii, Kenichi Koga, Keita Pierre Mori, Yukiko Kato, Akira Sugawara, Kazuwa Nakao.

G. 知的所有権の出願・取得状況

特記事項なし

■ 図表

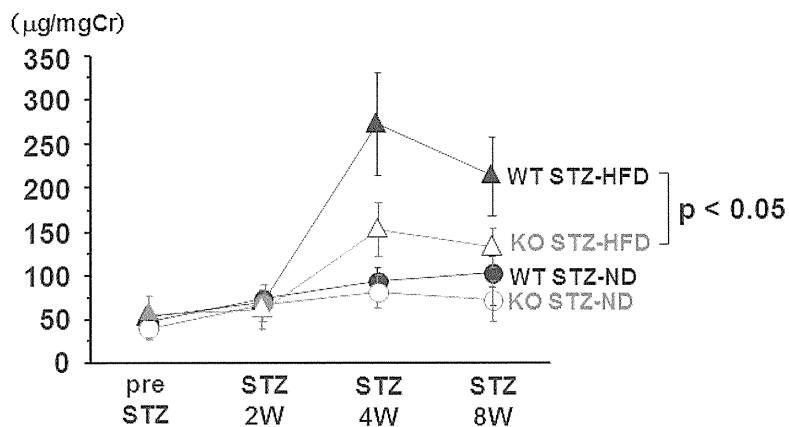


図1. 糖尿病・高脂血症合併モデルマウスの腎病変におけるTLR4の関与
野生型(WT)及びTLR4 KO (KO)マウスのアルブミン排泄に対する、ストレプトゾトシン(STZ)、高脂肪食(HFD)、通常食(ND)負荷の影響。W, 週数。

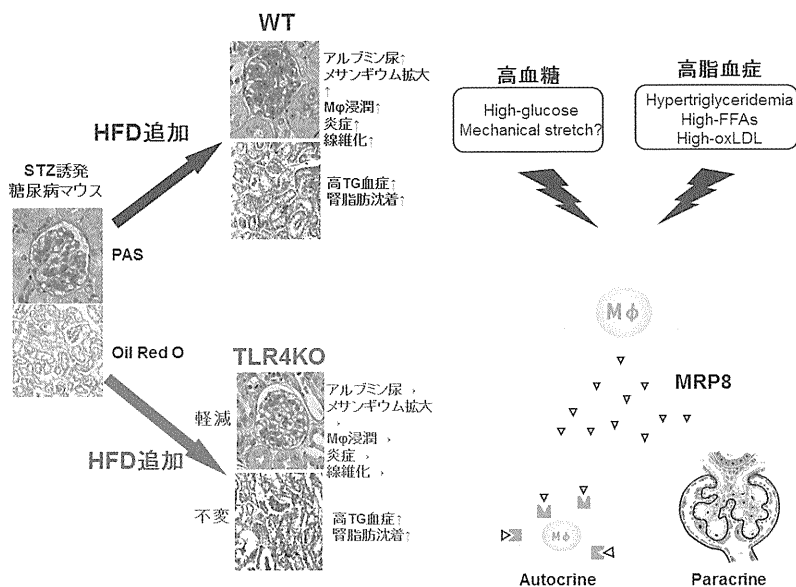


図2. 高脂血症による糖尿病性腎症悪化の分子機構 (本研究の要約)

野生型(WT)の STZ 誘発糖尿病マウスに高脂肪食(HFD)を負荷して高脂血症を惹起すると血清中性脂肪濃度の増加、腎脂肪沈着の著しい増加を認めると共に、糸球体ではメサンギウム領域の拡大、マクロファージ浸潤の増大、炎症・線維化マーカーの遺伝子発現増強、さらにアルブミン尿の増加を認めた。一方、TLR4 KO マウスでは、同程度の高中性脂肪血症と腎脂肪沈着を認めるものの、HFD 追加による糸球体病変やアルブミン尿の悪化はほぼ完全にキャンセルされており、高脂血症による糖尿病性腎症の進展において TLR4 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

高血糖の条件下では、高脂血症によって遊離脂肪酸がマクロファージ表面に発現する TLR4 を活性化し、TLR4 の内因性リガンド S100A8 の発現を誘導することでマクロファージの活性化状態を維持・増幅し、マクロファージの糸球体内への浸潤が糸球体病変を悪化させると考えられた。

【分科会：糖尿病性腎症の新規治療法の開発】

厚生労働省科学研究費補助金（腎疾患対策事業）

総合研究報告書

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

研究要旨

糖尿病性腎症発症進展阻止に向け、レスベラトロール、ケモカイン受容体(CCR2)阻害薬、GLP-1 受容体作動薬、AGEs-DNA aptamer、以上4種類の新規腎症治療薬の有用性について3年間に渡り検討した。その結果、それぞれの薬剤が、機序は異なるものの糖尿病性腎症の発症進展を阻止しうることが明らかとなり、ケモカイン受容体阻害薬に関しては、すでに臨床試験段階にまで研究が進行している。本研究は糖尿病性腎症に対する新たな創薬の実現に向け開始されたが、臨床応用という最終目標を達成するための基盤的研究として多大なる成果をもたらしたと評価している。この3年間の結果をもとに、今後個々が研究を継続し、これら新規治療薬候補が実臨床において使用可能な薬剤へと発展することに期待する。

A. 研究目的

糖尿病患者の増加に伴い糖尿病性腎症による透析導入に至る患者が急増しているものの、その発症や進行を完全に抑制することは出来ていない。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の開発が望まれる。そこで、我々は、4種類の異なる新規糖尿病性腎症治療薬の効果や、今後の臨床応用の可能性について検討した。①抗老化分子として注目されているSIRT1に着目し、SIRT1を調節しうるレスベラトロールによる腎障害進展抑制作用を検討した。②臓器線維化と密接に関連する骨髄由来細胞、CD45/typeI collagen (COL1) 二重陽性細胞がケモカイン・ケモカイン受容体を介して腎線維化に関与することから、CCR2 阻害薬を使用し、CD45/COL1 二重陽性細胞の制御による腎症

の治療の可能性を検討した。③GLP-1 受容体作動薬は、膵β細胞に対するインスリン分泌増強作用のみならず、様々な膵外作用を示すことが示唆されているが、腎臓に対する作用は解明されていないため、糖尿病性腎症に対する新規治療薬を開発する目的で、1型糖尿病モデルラットにGLP-1 受容体アゴニスト Exendin-4 を投与して、その腎保護効果を検討した。さらに、PPAR-g agonist の腎症への効果を検討した。また、糖尿病性腎症におけるメタロチオネイン発現の検討も行った。④Advanced glycation end products (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おり、AGEと特異的に、かつ強力に結合するAGEs-DNA aptamer を糖尿病モデル動物に投与して、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した。

B. 研究方法

①2 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。さらに、2 型糖尿病ラットにカロリー制限を行い、ミトコンドリア形態異常、腎障害が改善するかを検討した。

②ヒト末梢血より CD45/COL1 二重陽性細胞を分離・培養し、高血糖刺激、高血糖下における MCP-1 刺激による I 型コラーゲンおよび TGF- β 1 の mRNA 発現を検討した。さらに、CCR2 阻害薬による抑制効果についても、組織、尿中アルブミン排泄等にて検討した。

③5 週齢の雄性 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、糖尿病群には streptozotocin を投与して糖尿病を発症させて 8 週間観察し、腎保護効果とそのメカニズムを検討した。また、THP-1 細胞、ヒト糸球体血管内皮細胞を使用し、exendin-4 の抗炎症作用のメカニズムを検討した。さらに、PPAR-g agonist である GW0742 を投与し、その効果について検討した。また、糖尿病性腎症におけるメタロチオネイン発現を、免疫染色にて確認した。

④2 型糖尿病モデル KK-Ay/Ta マウスを腎障害（結節性病変）、尿中アルブミンが出現すると思われる 16 週令まで観察した。Control-aptamer、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。尿中アルブミン排泄、糸球体障害に対する AGEs-aptamer の効果を検討した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育や sacrifice の方法に関しては、各施設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

①2 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(尿中 8-OHdG)、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改善することを見出した。さらに、2 型糖尿病ラットにカロリー制限を行うと、腎臓における p62Sqsstm 過剰発現の改善とともに、ミトコンドリア機能、腎障害の改善がみられた。

②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、I 型コラーゲンおよび TGF- β 1 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、I 型コラーゲンおよび TGF- β 1 の mRNA 発現はさらに亢進した。CCR2 阻害薬を添加した結果、db/db マウスにおける尿中アルブミン排泄の増加・糸球体硬化・間質線維化・CD45+/Col1+ 細胞の増加はいずれも改善した。

③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、体重の低下を認めしたが、exendin-4 投与による影響は認めなかった。exendin-4 は糖尿病ラットにおけるアルブミン尿の増加を有意に抑制した。腎組織においては、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、ICAM-1、IV型コラーゲン発現の抑制を認めた。さらに、exendin-4は、Nox-4の糸球体内発現、8-OHdGの糸球体内発現と尿中排泄を有意に減少させるとともに、NF- κ Bの活性を有意に抑制した。in vitroの検討では、培養マクロファージ(THP-1細胞)と、培養ヒト糸球体内皮細胞にGLP-1受容体の発現を確認した。exendin-4は、高血糖刺激によるTHP-1細胞からのTNF- α 、IL-1 β の産生を有意に抑制した。また、exendin-4は、TNF- α 刺激による培養ヒト糸球体内皮細胞のICAM-1の発現を有意に抑制した。これらのexendin-4の効果は、GLP-1受容体拮抗剤の添加により消失した。さらに、PPAR- γ agonistを1型糖尿病モデルに投与すると、尿中アルブミン排泄の改善に伴い、糸球体マクロファージ数の減少、Bcl-6・MCP-1・TGF- β mRNA発現が有意に改善した。糖尿病性腎症における抗酸化作用を有するメタロチオネイン発現は、近位尿細管上皮細胞に発現が増強していた。

④AGEs-aptamerの投与により、2型糖尿病モデルであるKKAy/TaマウスにおけるAGEの糸球体への蓄積、尿中アルブミン排泄、腎機能障害は有意に改善した。さらに、PAS染色、マッソントリクローム染色における評価では、糖尿病由来メサンギウム基質の増加、糸球体肥大はAGEs-aptamerにより完全に抑制された。酸化ストレスの指標である尿中8-OHdGは糖尿病群にて増加していたが、AGEs-aptamer投与により有意に改善した。

D. 考察

抗老化薬としてのレスベラトロ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。さらに、カロリー制限がミトコンドリアの代謝を制御しているp62Sqstm発現低下を介して機能改善、腎保護に働くことが判明し、今後、カロリー制限模倣薬の臨床応用が待たれる。

ヒト末梢血より分離・培養したCD45/COLI二重陽性細胞を用いた結果、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。現在、ヒト糖尿病性腎症に対するCCR2阻害薬であるプロパゲルマニウムの有効性についての臨床研究を検討しており、平成24年には試験を開始する予定である。Exendin-4は、糖尿病ラットにおいて、血糖降下作用とは独立して、抗炎症作用を介した腎保護効果を示した。これらの結果より、GLP-1受容体作動薬の糖尿病性腎症に対する有用性が強く示唆された。また、PPAR-g agonistも今後は新たな治療戦略となりうることが証明された。さらに、AGEs-aptamerの投与が、明らかな副作用もなく糖尿病性腎症発症進展を抑制しうる可能性が示唆された。今後は代謝や容量調節を行うことで、より臨床応用にむけた検討が必要である。以上、糖尿病性腎症に対するこれら新規薬剤の臨床への応用を順次試みていく予定である。

E. 結論

今回の班研究により、4研究から5種類の糖尿病性腎症治療薬が新たに開発され、その効果が十分に示された。今後は早期に臨床応用に移行するための前段階試験を積極的に行っていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukami K, Yonemoto K, Iwatani R, Obara N, Ueda K, Toyonaga M, Ueda S, Ohara A, Takeda K, Yamagishi S, Okuda S. A new vasculitis activity score for predicting death in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis patients. Koike K, Am J Nephrol 35(1), 1-6 2011
- 2) Yamagishi SI, Maeda S, Matsui T, Ueda S, Fukami K, Okuda S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. Biochim Biophys Acta, 2011
- 3) Bekki H, Yamamoto K, Sone M, Homma T, Nakata M, Nohara M, Fukami K, Okuda S, Yamagishi S. Beneficial cardiometabolic actions of telmisartan plus amlodipine therapy in elderly patients with poorly controlled hypertension. Clin Cardiol 34(4), 261-265, 2011
- 4) 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
- 5) Fukami K, Yamagishi S, Okuda S. Development of enzyme-linked immunosorbent assay system for PEDF and its clinical utility. In press 2010
- 6) Yoshida Y, Yamagishi S, Matsui T, Jinnouchi Y, Fukami K, Imaizumi T, Yamakawa R. Protective role of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in early phase of experimental diabetic retinopathy. Diabetes Metab Res Rev 25, 678-686, 2009
- 7) Nagano M, Fukami K, Yamagishi S, Ueda S, Kaida Y, Matsumoto T, Yoshimura J, Hazama T, Takamiya Y, Kusumoto T, Gohara S, Tanaka H, Adachi H, Okuda S. Am J Nephrol. Circulating matrix metalloproteinase-2 is an independent correlate of proteinuria in patients with chronic kidney disease. 29, 109-115, 2009
- 8) Matsui T, Yamagishi SI, Takeuchi M, Ueda S, Fukami K, Okuda S. Irbesartan inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced proximal tubular cell injury in vitro by suppressing receptor for AGEs (RAGE) expression. Pharmacol Res 25, 2009
- 9) Nakamura T, Sato E, Fujiwara N, Kawagoe Y, Ueda Y, Suzuki T, Yamada S, Takeuchi M, Fukami K, Ueda S, Adachi H, Matsui T, Okuda S, Yamagishi SI. Positive association of serum levels of advanced glycation end products and high mobility group box-1 with asymmetric dimethylarginine in nondiabetic chronic kidney disease patients. Metabolism 3, 2009
- 10) Jones LK, O'Sullivan KM, Semple T, Kuligowski MP, Fukami K, Ma FY, Nikolic-Paterson DJ, Holdsworth SR, Kitching AR. IL-1RI deficiency ameliorates early experimental renal interstitial fibrosis. Nephrol Dial Transplant 24, 3024-3032, 2009
- 11) Coughlan MT, Thorburn DR, Penfold SA, Laskowski A, Harcourt BE, Sourris KC, Tan AL, Fukami K, Thallas-Bonke V, Nawroth PP, Brownlee M, Bierhaus A, Cooper ME, Forbes JM. RAGE-Induced Cytosolic ROS Promote Mitochondrial

Superoxide Generation in Diabetes.
J Am Soc Nephrol 20, 742-752, 2009

- 12) Matsui T, Yamagishi S, Takeuchi M, Ueda S, Fukami K, Okuda S. Nifedipine, a calcium channel blocker, inhibits advanced glycation end product (AGE)-elicited mesangial cell damage by suppressing AGE receptor (RAGE) expression via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. Biochem Biophys Res Commun 385, 269-272, 2009

2. 学会発表

- 1) Kaida Y, Fukami K, Ueda S, Yamagishi S, Okuda S, DNA Aptamers Raised Against AGEs improve Diabetic Nephropathy in KK/Ay-Ta mice. AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, 2011
- 2) 甲斐田裕介、深水圭、小原奈々、中山陽介、安藤亮太郎、竹内正義、上田誠二、井上浩義、東元祐一郎、山岸昌一、奥田誠也：AGEs-DNA アプタマーは糖尿病性糸球体障害を改善する。第 23 回日本糖尿病性腎症研究会
- 3) 甲斐田裕介、深水圭、上田誠二、山岸昌一、奥田誠也：AGEs-DNA アプタマーは糖尿病性腎症の糸球体硬化を改善する。第 54 回日本腎臓学会学術総会

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

AGE 特異的アプタマーの腎疾患治療用途

国内特願 2010-262341

海外特許出願中

2. 実用新案登録

3. その他

厚生労働省科学研究費補助金（腎疾患対策事業）

分担研究報告書

カロリー制限模倣薬、レスベラトロールによる糖尿病性腎症の改善効果

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

本研究では、抗老化分子として注目されているSIRT1に着目し、2型糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスにSIRT1を調節しうるレスベラトロールを投与し、腎障害進展抑制作用を検討した。さらに、カロリー制限による、ミトコンドリア形態異常、腎障害の改善を検討した。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(尿中8-OHdG)、組織所見の改善がみられた。さらに、2型糖尿病ラットにカロリー制限を行うと、ミトコンドリア機能および腎障害の改善がみられた。以上より抗老化薬としてのレスベラトロールが糖尿病性腎症モデルに対する有効性をもつことが見出された。今後、カロリー制限模倣薬の臨床応用が待たれる。

A. 研究目的

カロリー制限模倣薬、レスベラトロールによる糖尿病性腎症の改善効果を目的に、抗老化分子として注目されている SIRT1 に着目し、SIRT1 を調節しうるレスベラトロールによる腎障害進展抑制作用を検討した。

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

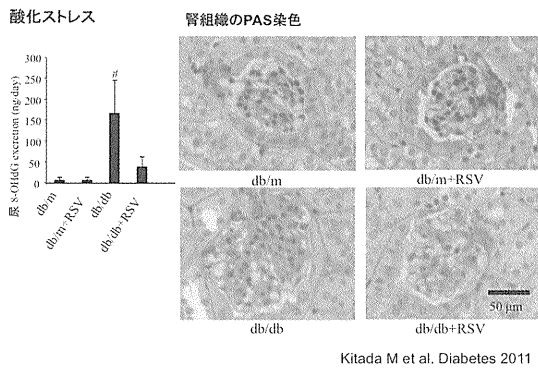
検討した。さらに、2型糖尿病ラットにカロリー制限を行い、ミトコンドリア形態異常、腎障害の改善を検討した。

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(尿中8-OHdG)、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

ルが改善することを見出した (図1)。

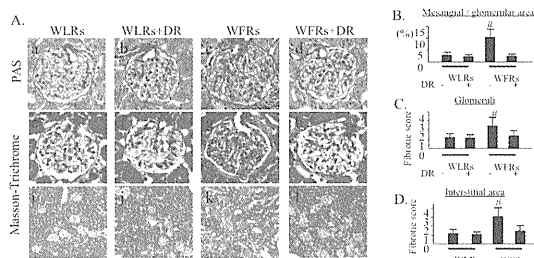
図1. レスベラトロール(RSV)によって、2型糖尿病db/dbマウスの尿中8-OHdG 排泄量とメサンギウム領域の拡大は改善される



Kitada M et al. Diabetes 2011

さらに、2型糖尿病ラットにカロリー制限を行うと、腎臓における p62Sqsstm 過剰発現の改善とともに、ミトコンドリア機能、腎障害の改善がみられた (図2)。

図2 40%カロリー制限による2型糖尿病ラットの腎障害の改善効果



(A-e through h, i through l) Representative photomicrographs of PAS-stained kidney sections from four groups of rats. Data are the results of independent experiments in each group with six rats per group. Original magnification, $\times 400$. (B) Quantitative assessment of the mesangial matrix area in the four groups of rats. Data are means \pm SD ($n=6$, $\#P<0.01$ vs other groups). (A-e through h, i through l) Representative photomicrographs of Masson-Trichrome staining in the four groups of rats. Data are the results of independent experiments in each group with six rats per group. Original magnification, $\times 400$ for glomerular fibrosis and $\times 100$ for interstitial fibrosis. (C and D) Quantitative assessment of fibrosis in the four groups of rats. Data are means \pm SD ($n=6$, $\#P<0.01$ vs other groups). Kitada M et al. Exp Diabetes Res. 2011;2011:908185.

D. 考察

抗老化薬としてのレスベラトロールが少なくとも実験糖尿病性腎症モデルに対する有効性をもつことが見出された。作用機序も徐々に明らかになってきている。レスベラトロールの分子機構は、Sirt活性化ではなく、抗酸化作用であることを見出した。さらに、カロリー制限がミトコンドリアの代謝を制御している p62Sqsstm 発現低下を介して機能改善、腎保護に働くことが判明し、今後、カロリー制限模倣薬

の臨床応用が待たれる。今後も、糖尿病性腎症に対する新規薬剤の臨床への応用を展開すべく基盤研究の継続が期待される。特に、今後は早期に臨床応用に移行するための前段階試験等を行う必要がある。

E. 結論

本研究において、新規治療の基盤研究が進行した。当初の計画に沿って、目的を達したものと考えられる。今後、これらの成果を通じて、本邦における糖尿病性腎症の病態解明、予後改善、有効な治療法開発に向けた総合的なシステム構築につながることを期待され、独創性、公共性の高い研究を展開しえた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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(8), 1805-1810, 2010.
- Shikata K, Haneda M, Koya D, Suzuki Y, Tomino Y, Yamada K, Maeda S, Kawakami N, Uzu T, Nishimura M, Sato C, Ogawa D, Makino H. DNETT-Japan Study Group. Diabetic Nephropathy Remission and Regression Team Trial in Japan (DNETT-Japan), Rationale and study design. Diabetes Res Clin Pract 87, 228-232, 2010
- Shikata K, Haneda M, Koya D, Suzuki Y, Tomino Y, Yamada K, Maeda S, Kawakami N, Uzu T, Nishimura M, Sato

C, Ogawa D, Makino H, DNETT-Japan Study Group. Diabetic Nephropathy Remission and Regression Team Trial in Japan (DNETT-Japan), Rationale and study design. Diabetes Res Clin Pract 87(2), 228-232, 2010

4. Tanaka Y, Kume S, Kitada M, Kanasaki K, Uzu T, Maegawa H, Koya D. Autophagy as a therapeutic target in diabetic nephropathy. Exp Diabetes Res 2012;2012,628978. Epub 2011 Oct 19.
5. Kitada M, Takeda A, Nagai T, Ito H, Kanasaki K, Koya D. Dietary restriction ameliorates diabetic nephropathy through anti-inflammatory effects and regulation of the autophagy via restoration of Sirt1 in diabetic Wistar fatty (fa/fa) rats, a model of type 2 diabetes. Exp Diabetes Res 2011;2011,908185. Epub 2011 Sep 22.

2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の出願・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

総合研究報告書

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

研究要旨

我々は、糖尿病性腎症の成因に、血管壁に起こる微小な慢性炎症 (microinflammation) が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。Microinflammation は糖尿病性腎症の新たな治療ターゲットなることが期待される。我々はこれまでに、スタチン、チアゾリジン誘導体、メトトレキサート、エリスロマイシン等が、抗炎症作用を介して腎保護効果を示すことを明らかにした。本研究では、新規糖尿病治療薬である GLP-1 受容体作動薬の抗炎症作用を介した腎保護効果を示すことを明らかにした。また、炎症の増悪因子である酸化ストレスも、腎症の成因に重要な役割を果たすと考えられる。我々は、腎症の進展過程において、抗酸化作用を示すメタロチオネインが腎組織に増加して、腎保護的に作用している可能性があることを明らかにした。

A. 研究目的

我々は、糖尿病性腎症の成因に、血管壁に起こる微小な慢性炎症 (microinflammation) が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。Microinflammation は糖尿病性腎症の新たな治療ターゲットなることが期待される。我々はこれまでに、スタチン、チアゾリジン誘導体、メトトレキサート、エリスロマイシン等が、抗炎症作用を介して腎保護効果を示すことを明らかにした。近年、新たな糖尿病治療薬として、インクレチン関連薬である GLP-1 受容体作動薬が開発された。GLP-1 受容体作動薬は、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。GLP-1 の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、抗炎症効果の有無は不

明である。本研究では、新規糖尿病治療薬である GLP-1 受容体作動薬の抗炎症作用を介した腎保護効果を検討した。

一方、酸化ストレスは microinflammation の原因の一つであり、腎症の成因に深く関与していると考えられる。メタロチオネイン (MT) は、1957 年に Margoshes と Vallee によってウマの腎臓からカドミウムを結合するタンパク質として発見された、金属結合性のタンパク質である。分子中に最大 7-12 個の重金属イオンを結合できることから、必須微量元素の恒常性維持あるいは重金属元素の解毒の役割を果たしていると考えられている。また、抗酸化性タンパク質としても注目されている。MT-I から -IV までの 4 種のアイソフォームが存在し、MT-I および MT -II はほとんどの臓器で発現しているが、特に肝臓、腎臓、小腸および膵臓で多く発現している。本研究では、抗酸化作用を示すメタロチオネイン (MT)

が、腎症の進展過程に果たす役割を検討した。

B. 研究方法

(1) 糖尿病性腎症に対する GLP-1 受容体アゴニストの有効性の検討
SD ラットにストレプトゾトシンを投与し、GLP-1 受容体アゴニストである exendin-4 を投与して機能的、組織学的な検討を行った。また、GLP-1 受容体がマクロファージと腎の糸球体内皮細胞に存在するが判明したため、*in vitro* において GLP-1 受容体を介した直接的な効果について検討を行った。

(2) 糖尿病性腎症におけるメタロチオネインの発現の検討
SD ラットにストレプトゾトシンを投与し、1 週、2 週、8 週の時点で腎臓を摘出し、免疫組織化学にて MT の発現変化を検討した。また腎臓における局在を明らかにするため、内皮細胞、ポドサイトや尿細管上皮細胞などに対する抗体と二重染色を行った。

C. 研究結果

(1) 糖尿病誘発群間では血糖、血圧、体重に有意な差はなかったが、exendin-4 投与によってアルブミン尿の低下、糸球体過剰濾過の改善を認め、組織学的にも糸球体肥大・メサンギウム領域の拡大の抑制を認めた。これらは炎症に重要な転写因子である NF- κ B 活性を抑制し、マクロファージの浸潤、ICAM-1、IV 型コラーゲンの発現を有意に抑制した。また、炎症の増悪因子である酸化ストレスも抑制した。*In vitro* の結果は exendin-4 によって培養マクロファージにおける高糖濃度誘発性のサイトカイン産生を抑制し、さらに糸球体内皮

細胞において、TNF α 誘導性の ICAM-1 発現を有意に抑制した。

(2) コントロールラットでは腎組織に MT の発現をほとんど認めないが、糖尿病ラットでは近位尿細管上皮細胞に MT 発現が増強することを確認した。さらに、マウス培養近位尿細管上皮細胞(mProx24)を用いた検討では、高糖濃度条件下において約 1.5 倍の MT 発現を認めた。また、ビタミン E は高糖濃度条件下において用量依存的に MT 発現を抑制した。

D. 考察

(1) GLP-1 受容体作動薬は血糖降下のみならず、抗炎症効果を介して腎臓を保護する可能性が示された。

(2) MT は糖尿病における酸化ストレスから腎臓を保護する可能性が示唆された。

E. 結論

(1) GLP-1 受容体作動薬は、新たな糖尿病性腎症治療薬となることが期待される。

(2) メタロチオネインは、糖尿病性腎症の治療に応用できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小寺 亮、四方 賢一:特集 糖尿病性腎症の克服を目指して—Microinflammation—.メディカルビューポイント, 2011
- 2) 小寺 亮、四方 賢一:糖尿病性腎症と CKD—新たな展開と治療法の選択—.糖尿病性腎症の治療 1 : 血糖コントロール. 月刊糖尿病, 2011