

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591203

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症における鉄代謝異常の分子機序と鉄制御に基づく新規治療法の開発

研究課題名(英文) Clarification of the mechanism of iron metabolism in diabetic nephropathy and search of therapeutic factor for anti-diabetic nephropathy

研究代表者

池田 康将 (IKEDA, Yasumasa)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：60432754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖尿病性腎症における腎鉄代謝変化と鉄除去の効果について検討した。糖尿病腎症モデルdb/dbマウスを用いて正常食(ND)と鉄制限食(LID)と比較した。db/dbマウスにおける尿中微量アルブミン排泄量増加はLIDで抑制され、病理学的所見での糸球体肥大、メサンギウム領域の拡大、細胞外基質増殖もLIDで軽減された。db/dbマウス腎で酸化ストレス増加はLIDにて抑制された。db/dbマウスでは血清鉄と尿中鉄排泄の増加がみられ、フェロポルチンとフェリチンの発現増加を認めた。以上から、糖尿病腎症では鉄代謝異常があり、鉄制限食は酸化ストレスを軽減することで糖尿病性腎症の進展を抑制できた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we analyzed the protective effects of dietary iron restriction against diabetic nephropathy. Male db/db mice were divided into 2 groups and fed a normal diet (ND) or a low iron diet (LID), and male db/m mice with ND were employed as control. Increased urinary albumin excretion was observed in db/db mice with ND, and this was suppressed in db/db mice with LID. The db/db mice with ND had increased glomerular size, mesangial expansion and extracellular matrixes deposition compared to the LID group, which were decreased by LID. Increased renal oxidative stress observed in the ND db/db mice were diminished in the LID group. Renal expression of ferroportin and ferritin heavy chain, as well as serum iron concentration and urinary iron excretion, were increased in db/db mice compared to db/m mice. Taken together, iron reduction exerts a preventive action against diabetic nephropathy, and abnormal iron metabolism was observed in diabetic kidney.

研究分野：循環器内科、薬理学

キーワード：鉄 糖尿病腎症 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

鉄は生体内に最も多く存在する、生命機能維持に必須の微量金属元素である一方、Fenton/Haber-Weiss 反応を触媒して酸化ストレス産生にも関わる二面性を有する。近年、ウイルス性肝炎、発癌、アルツハイマー病、パーキンソン病、急性腎障害など様々な疾患において鉄蓄積がそれらの病態に関与すること、鉄除去が疾患の改善につながる事が明らかにされている。申請者も、鉄除去が酸化ストレス抑制により脂肪肥大の進展を抑制すること(Tajima and Ikeda et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011)、アンジオテンシン II は鉄輸送体発現の変化を介して細胞内鉄量を増加させ、酸化ストレス生成に関与すること(Tajima, Ikeda et al. *Hypertens Res* 2010)、虚血後血管新生において鉄除去は酸化ストレス抑制して内皮細胞アポトーシス減少させること(Ikeda et al. *Atherosclerosis* 2011)を明らかにした。このように、肥満、高血圧など生活習慣病においても、鉄は増悪因子として病態と密接に関連すること可能性がある。

2. 研究の目的

糖尿病は大・小血管障害・網膜症・神経障害など、さまざまな臓器合併症を発症する予後不良の疾患である。なかでも糖尿病性腎症は進行すると末期腎不全に至り透析が必要となる、我が国の透析導入原因疾患の第一位である。さらに近年、脳・心・血管・腎連関といわれる、全身臓器合併症の悪循環を招くことで予後を著しく悪化させる。よって糖尿病性腎症の病態の解明ならびにその予防・治療法の開発は重要な課題である。糖尿病性腎症の発症・進展には様々な要因が複合的に関与すると推察されており、酸化ストレスもその一つである。鉄は Fenton/Haber-Weiss 反応により酸化ストレス産生を触媒するために、鉄は酸化ストレスのソースとして糖尿病性腎症の病態にも関与している可能性がある。本研究では、糖尿病性腎症における鉄代謝と酸化ストレスとの関連性、鉄制御による治療法の可能性について解析を行った。

3. 研究の方法

糖尿病性腎症発症モデルとして 2 型肥満糖尿病モデルホモ db/db マウスとコントロールとしてヘテロ db/m マウスを解析に使用した。鉄が酸化ストレスのソースとなる仮説から、生体内鉄量を減じるため、普通飼料(ND)と組成が同じであるが、鉄量が 10 分の 1 である低鉄飼料(LID)を作成した。db/db マウスを ND 群、LID 群に分けて検討した。db/m マウスは ND を与えた。

(1) 尿中微量アルブミン排泄量の評価

代謝ケージにて 24 時間採尿を行った。早期腎症マーカーである尿中微量アルブミンを測定し、尿中クレアチニン値で補正して、鉄摂取制限による効果を比較した。

(2) 糖尿病性腎症の病理学的変化の解析

摘出腎臓を、ホルマリン固定後のパラフィン切片もしくは新鮮凍結切片を用いた。PAS 染色によるメサンギウム基質増生の評価、デスマン染色による糸球体上皮細胞障害の評価、コラーゲン IV とフィブロネクチン染色による細胞外基質沈着の評価を行い、鉄摂取制限による改善効果を解析した。

(3) 酸化ストレス評価

組織ライセートを用いて、TBARS 法により過酸化脂質(MDA)を測定して、組織重量で補正した。また新鮮凍結切片を用いて、Dihydroethidium 染色による腎臓のスーパーオキシド産生を評価した。また NADPH oxidase コンポーネントの発現について、リアルタイム PCR とウエスタンブロットにて評価した。NADPH oxidase activity についても luciferase アッセイにて検討した。

(4) 腎組織鉄量ならびに血清・尿中鉄濃度の測定

鉄濃度はメタロアッセイキット (Metallogenics) にて測定した。組織鉄量はクルードライセートを用いて測定し、組織重量で補正した。

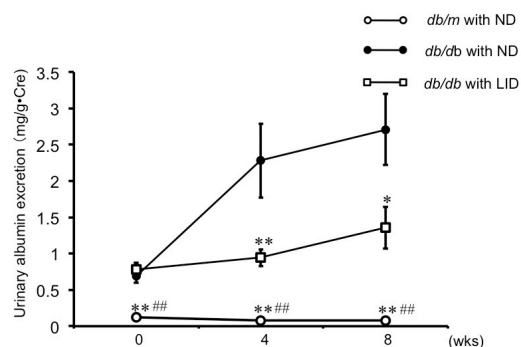
(5) 鉄代謝関連輸送体の発現と組織内局在評価

鉄代謝に関わる輸送体(鉄吸収に関わるトランスフェリン受容体と divalent metal transporter 1(DMT1)、鉄汲出に関わるフェロポルチン)、鉄保持タンパクフェリチンの発現について、ウエスタンブロットと免疫組織化学を用いて検討した。

4. 研究成果

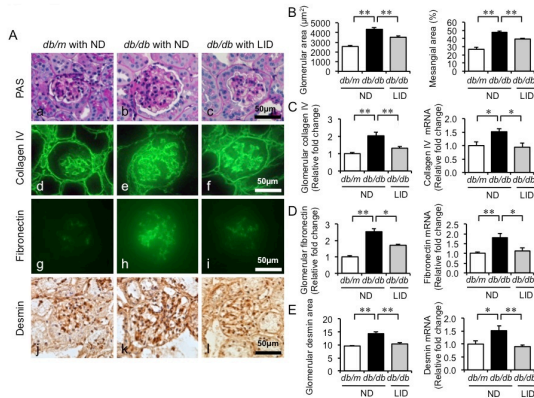
db/m マウスと比べて db/db マウスは実験開始時において、既に尿中微量アルブミン排泄量は増加しており、4 週、8 週経過後にさらなる増加を認めた。db/db マウス LID 群では微量アルブミン排泄量の経時的増加は実験開始時程度に抑制された(図 1)。

(図 1) 尿中アルブミン排泄量の推移



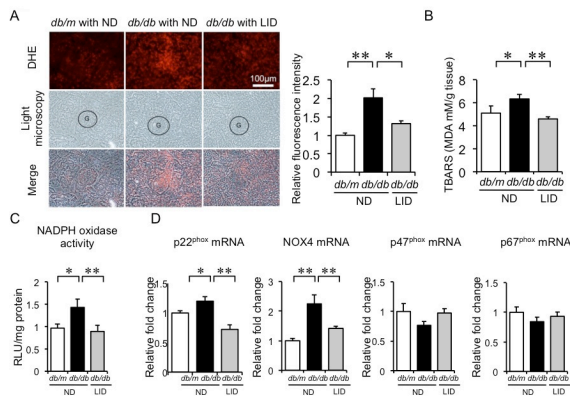
db/db マウス ND 群では、糸球体肥大、メサンギウム領域の増加、コラーゲン IV やフィブロネクチンの細胞外基質の増生がみられたが、これらの変化は LID によって抑制された。またデスマン遺伝子発現・染色から、糸球体上皮細胞障害も LID で軽減された(図 2)。

(図2) 腎糸球体、メサンギウム領域、細胞外基質、デスミン発現の検討



酸化ストレスについて、db/db マウス ND 群の腎臓では、TBARS 法による過酸化脂質ならびにジヒドロエチジウム染色によるスーパーオキシドが増加していたが、LID 群ではそれらは抑制された。また db/db マウス正常食群の腎臓では、NADPH oxidase 活性、NADPH oxidase コンポーネントである p22phox と NOX4 の発現が増加していたが、LID によって抑制された (図3)。

(図3) 酸化ストレス評価



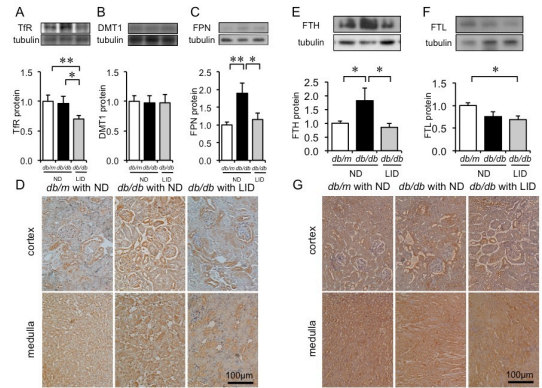
鉄代謝について、腎組織鉄量は db/m マウス ND 群と db/db マウス ND 群で差は認められなかったものの、血清鉄濃度、尿中鉄排泄量は db/db マウスで高値であった。腎臓におけるトランスフェリン受容体と DMT1 の発現は db/m マウスと db/db マウス ND 群で差は認められなかったものの、フェロポルチンの発現は db/db マウスの腎臓で増加していた。db/db マウス腎では、フェリチン重鎖発現は上昇、エリチン軽鎖発現は変化がみられなかった。フェロポルチンとフェリチン重鎖の発現は、尿細管優位であった (図4)。

db/db マウス LID 群において血圧低下が認められ、大動脈ならびに腎臓のウエスタンブロットにて、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) リン酸化は db/db マウス ND 群で低下し、LID で回復を認めた。鉄摂取制限による糖尿病性腎症進展抑制に内皮非依存的な血圧低下作用が関与するか、ヒドララジンをを用いて検討した。ヒドララジン投与群は LID 群

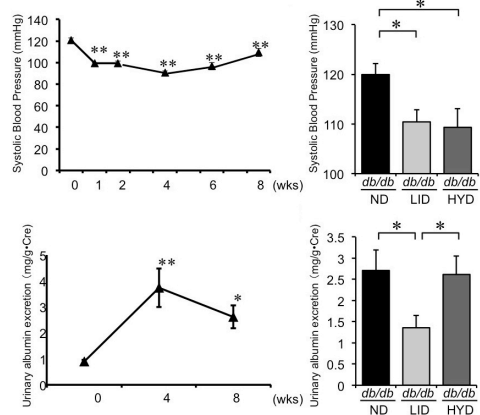
程度に血圧は低下したが、尿中アルブミン排泄量低下は認められなかった (図5)。よって鉄摂取制限による糖尿病性腎症進展抑制には血圧低下と独立した血管内皮機能改善効果が一部関与していることが示唆された。

また腎線維化は腎臓病の病態において重要な役割を担っている。腎線維化モデルである一側尿管結紮閉塞マウスへの鉄キレート薬投与は、酸化ストレスとマクロファージ浸潤を抑制して、線維化を軽減することも明らかにした。

(図4) 腎臓における鉄代謝関連因子の発現



(図5) 血圧とヒドララジンによる腎症への効果の検討



以上から、鉄摂取制限は、酸化ストレスを軽減することで糖尿病性腎症の進展抑制効果を発揮することと、糖尿病腎では鉄代謝調節機構が変化しており、鉄は腎臓病の病態に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

1. Soichiro Tajima, Yasumasa Ikeda, Hideaki Enomoto, Mizuki Imao, Yuya Horinouchi, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Rihito Miyamoto, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya and Toshiaki Tamaki: Angiotensin II

- alters the expression of duodenal iron transporters, hepatic hepcidin, and body iron distribution in mice, *European Journal of Nutrition*, 2014. DOI: 10.1007/s00394-014-0749-1 (査読あり)
2. Yasumasa Ikeda, Iori Ozono, Soichiro Tajima, Mizuki Imao, Yuya Horinouchi, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Rihito Miyamoto, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya and Toshiaki Tamaki : Iron chelation by deferoxamine prevents renal interstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction, *PLoS ONE*, Vol.9, No.2, p.e89355, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0089355 (査読あり)
 3. Sumiko Yoshida, Ken-ichi Aihara, Yasumasa Ikeda, Yuka Sumitomo-Ueda, Ryoko Uemoto, Kazue Ishikawa, Takayuki Ise, Shusuke Yagi, Takashi Iwase, Yasuhiro Mouri, Matomo Sakari, Takahiro Matsumoto, Ken-ichi Takeyama, Masashi Akaike, Mitsuru Matsumoto, Masataka Sata, Kenneth Walsh, Shigeaki Kato and Toshio Matsumoto : Androgen receptor promotes sex-independent angiogenesis in response to ischemia and is required for activation of vascular endothelial growth factor receptor signaling., *Circulation*, Vol.128, No.1, pp.60-71, 2013. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001533 (査読あり)
 4. Yasumasa Ikeda, Hideaki Enomoto, Soichiro Tajima, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Shuhei Tomita, Koichiro Tsuchiya and Toshiaki Tamaki : Dietary iron restriction inhibits progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, Vol.304, No.7, pp.F1028-F1036, 2013. DOI: 10.1152/ajprenal.00473.2012 (査読あり)
 5. Yasumasa Ikeda, Soichiro Tajima, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Sumiko Yoshida, Ken-ichi Aihara, Koichiro Tsuchiya and Toshiaki Tamaki : Bovine milk-derived lactoferrin exerts proangiogenic effects in an Src-Akt-eNOS-dependent manner in response to ischemia, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, Vol.61, No.5, pp.423-429, 2013. DOI: 10.1097/FJC.0b013e318287d526 (査読あり)
 6. Yasumasa Ikeda, Ken-ichi Aihara, Sumiko Yoshida, Takashi Iwase, Soichiro Tajima, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Shuhei Tomita, Koichiro Tsuchiya, Masataka Sata, Masashi Akaike, Shigeaki Kato, Toshio Matsumoto and Toshiaki Tamaki : Heparin cofactor II, a serine protease inhibitor, promotes angiogenesis via activation of the AMP-activated protein kinase-endothelial nitric-oxide synthase signaling pathway, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.287, No.41, pp.34256-34263, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M112.353532 (査読あり)
 7. Yasumasa Ikeda, Soichiro Tajima, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Shuhei Tomita, Koichiro Tsuchiya and Toshiaki Tamaki : Estrogen regulates hepcidin expression via GPR30-BMP6-dependent signaling in hepatocytes, *PLoS ONE*, Vol.7, No.7, p.e40465, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0040465 (査読あり)
 8. Yasumasa Ikeda, Ken-ichi Aihara, Sumiko Yoshida, Masashi Akaike and Toshio Matsumoto : Effects of androgens on cardiovascular remodeling. *The Journal of Endocrinology*, 214 (1) 1-10, 2012. DOI: 10.1530/JOE-12-0126. (査読あり)
- [学会発表] (計9件)
1. 池田 康将, 今尾 瑞季, 佐藤 明徳, 堀ノ内 裕也, 石澤 有紀, 木平 孝高, 宮本 理人, 石澤 啓介, 土屋 浩一郎, 玉置 俊晃 : 鉄による骨格筋萎縮メカニズムの検討, 日本鉄バイオサイエンス学会 第38回学術集会, 2014年9月7日. 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
 2. 池田 康将, 田島 壮一郎, 堀ノ内 裕也, 石澤 有紀, 木平 孝高, 宮本 理人, 石澤 啓介, 土屋 浩一郎, 玉置 俊晃 : アンジオテンシン II は鉄吸収制御と生体内鉄分布変化に関与する, 第125回日本薬理学会近畿部会, 2014年6月20日. 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)
 3. Yasumasa Ikeda, Soichiro Tajima, Mizuki Imao, Yuya Horinouchi, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya and Toshiaki Tamaki : Ferritin induces IL-1 production through inflammasome activation via NF- κ B-dependent manner in

macrophages,
Experimental Biology 2014, Apr. 26 2014.
SanDiego, CA.

4. 池田 康将 :鉄除去・鉄制限による肥満・糖尿病とその合併症の改善効果, 第 87 回日本薬理学会年会 シンポジウム「疾患における鉄の意義と鉄制御による治療の可能性ー鉄研究のパラダイムシフト」, 2014 年 3 月 20 日.仙台国際センター (宮城県・仙台市)

5. Yasumasa Ikeda, Enomoto Hideaki, Tajima Soichiro, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Shuhei Tomita, Koichiro Tsuchiya and Toshiaki Tamaki : The effect of dietary iron restriction against diabetic nephropathy in db/db mice, Experimental Biology 2013, Apr.22 2013. Boston, MA.

6. 池田 康将, 田島 壮一郎, 石澤 有紀, 木平 孝高, 石澤 啓介, 土屋 浩一郎, 玉置 俊晃 : Bovine lactoferrin stimulated angiogenesis in response to ischemic hindlimb, 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 3 月 23 日.福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

7. Yasumasa Ikeda, Hideaki Enomoto, Soichiro Tajima, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Shuhei Tomita, Koichiro Tsuchiya and Toshiaki Tamaki : Iron Restriction Prevents the Progression of Diabetic Nephropathy in db/db Mice, American Heart Association Scientific Sessions 2012, Nov. 7 2012. Los Angeles, CA.

8. Yasumasa Ikeda, Ken-ichi Aihara, Sumiko Yoshida, Masataka Sata, Masashi Akaike, Toshio Matsumoto and Toshiaki Tamaki : Heparin Cofactor II Promotes Angiogenesis in Response to Ischemic Hindlimb via an AMPK-eNOS-dependent Manner, American Heart Association Scientific Sessions 2012, Nov.4 2012. Los Angeles, CA.

9. 池田 康将, 田島 壮一郎, 土屋 浩一郎, 玉置 俊晃 : 肥満進展における鉄と酸化ストレス, 第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会 シンポジウム「金属と酸化ストレスの関係を探る:基礎から臨床研究へ」, 2012 年 6 月 8 日.あわぎんホール (徳島県・徳島市)
〔図書〕 (計 2 件)

1. 池田 康将, 玉置 俊晃 : Annual Review2015 腎臓---腎疾患と鉄代謝異常---, 株式会社 中外医学社, 2015 年 1 月. 230 (10-18)

2. 池田 康将, 田島 壮一郎, 木平 孝高, 石澤 有紀, 石澤 啓介, 富田 修平, 土屋 浩一郎, 玉置 俊晃 : 腎とフリーラジカル 第 11 集, --- 脂肪組織肥大進展における鉄キレート剤の効果 ---, 株式会社 東京医学社, 東京, 2013 年 1 月. 178 (155-159)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 :

<http://www.tuyakuri.umin.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 康将 (IKEDA Yasumasa)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部 (医学系)・准教授

研究者番号 : 60432754

(2) 連携研究者

田島 壮一郎 (TAJIMA Soichiro)

徳島大学・病院・薬剤師

研究者番号 : 10579460

