

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390249

研究課題名（和文） ミトコンドリア機能制御による糖尿病合併症の治療戦略

研究課題名（英文） New therapeutic approach to diabetic nephropathy by modulating mitochondrial function.

研究代表者

榎野 博史（MAKINO HIROFUMI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50165685

研究成果の概要：

生活習慣の変化により糖尿病患者は増加の一途をたどり、糖尿病性腎症により透析導入となる患者も年々増加している。糖尿病マウスへのtranslocase of inner mitochondrial membrane 44 (Tim44) 遺伝子導入によって、糸球体肥大・メサンギウム基質の増加・アルブミン尿の増加が抑制された。Tim44はミトコンドリアへのsuperoxide dismutaseやglutathione dismutaseといった抗酸化酵素をimportしてミトコンドリア由来の活性酸素の産生を抑制することにより治療効果を発揮すると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 11,200,000 | 3,360,000 | 14,560,000 |
| 2007年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 2008年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 15,800,000 | 4,740,000 | 20,540,000 |

研究分野：内科学・腎臓病学・糖尿病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：ミトコンドリア、Tim44、活性酸素、糖尿病性腎症、糖尿病慢性血管合併症

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の変化により糖尿病患者は増加の一途をたどっている。その結果、糖尿病性腎症により透析導入となる患者も年々増加しており、2007年の1年間に慢性透析に導入された36,909人のうち糖尿病性腎症による導入は全体の43.4%を占め、原疾患の第1位である。

しかも糖尿病性腎症を原疾患として透析導入となった場合、心・脳血管障害等のマクロアングリオパチーや感染症のため、5年生存率は約50%と予後は不良である。現在糖尿病性腎症の進展予防のために、厳格な血糖コントロール、厳格な血圧コントロール、renin-angiotensin system (RAS) 抑制薬の投与、脂質異常症の是

正、食塩制限と低たんぱく食などを組み合わせた集約的治療が推奨され、ある程度のエビデンスが集積しているものの、糖尿病性腎症の増加を阻止するに至っていない。

我々は高血糖状態で腎臓において発現の上昇する新規遺伝子を同定して、その機能を報告してきた。そのひとつがtranslocase of inner mitochondrial membrane 44 (Tim44) である(Wada J et al. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 144-149, 1998)。ミトコンドリア蛋白のほとんどが核DNAでコーディングされているため、ミトコンドリアは細胞質からミトコンドリア内へ蛋白質をimportする必要があるが、Tim44は蛋白を細胞質よりミトコンドリア基質内へimportするmachinery proteinであることが明らかとなってきている。

2. 研究の目的

高血糖にさらされるとミトコンドリアから活性酸素が産生されて、糖尿病合併症を引き起こすと報告されている。マウスにストレプトゾトシンを投与して糖尿病を発症させると、腎臓においてTim44の発現が上昇する。そこでTim44を遺伝子導入することによってミトコンドリアからの活性酸素を制御して糖尿病性腎症に対して治療効果を発揮するかどうかを検討した。

3. 研究の方法

ICR (CD-1)マウスに片腎摘出を施し、さらにストレプトゾトシンを投与することによって糖尿病性腎症モデルを作製した。さらにサイトメガロウイルスプロモータによって発現がコントロールされる哺乳類細胞発現ベクターである pcDNA3.1 を HVJ-E ベクターにプラスミド DNA を封入することによってさらに腎組織に遺伝子導入を行った。12 週齢の CD-1 マウスに片腎摘出施行後 2 週間の時点で、ストレプトゾトシンを投与し、糖尿

病モデルを作製した。高血糖を確認してから、Tim44 の発現ベクター (pcDNA3.1/Tim44) およびコントロールベクター (pcDNA3.1) を尾静脈から 1 週間毎に投与を行い、最終的に 8 週間まで観察を行った。さらに高糖培養下ヒト近位尿細管細胞へ pcDNA3.1/Tim44 を導入して、その影響を検討した。

4. 研究成果

従来ストレプトゾトシンのみの投与では、糸球体肥大・メサンギウム基質の増加、アルブミン尿の増加などが明らかとなるのは 6 ヶ月ほどの期間が必要であった。片腎摘出とストレプトゾトシン投与を同時に行うことによって、約 8 週間で同様の病変がもたらされた。Tim44 の遺伝子導入によって、糸球体肥大・メサンギウム基質の増加、アルブミン尿の増加が抑制された。また hydroethidine による $O_2^{\cdot-}$ の可視化 (Oxidant fluorescent microtopography)、アポトーシスアッセイ (TUNEL)、増殖アッセイなどを施行したところ、いずれのパラメータにおいても Tim44 の遺伝子導入によって改善することが判明した。

ヒト近位尿細管細胞 (HK2) を高糖培養で刺激すると細胞増殖、アポトーシスが誘導された。さらに活性酸素の産生、ATP の増加、内膜電位の一過性の増加とその後の低下が誘導された。これらの変化は Tim44 の発現ベクターの導入によって抑制された。また Tim44 siRNA と発現ベクターの検討により Tim44 はミトコンドリアへの superoxide dismutase や glutathione dismutase といった抗酸化酵素を import してミトコンドリアでの活性酸素を制御していることが示された。

これらの結果から Tim44 を用いてミトコンドリア機能を制御することによって、糖尿病によって起こる活性酸素の過剰産生を抑制

し、糖尿病血管合併症である糖尿病性腎症の治療効果を発揮することができると考えた。

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 12 件)

1. Yasuhara A, Wada J, Malakauskas SM, Zhang Y, Eguchi J, Nakatsuka A, Murakami K, Kanzaki M, Teshigawara S, Yamagata K, Le TH, Makino H: Collectrin is involved in the development of salt-sensitive hypertension by facilitating the membrane trafficking of apical membrane proteins via interaction with soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex. *Circulation* 118:2146-2155, 2008
2. Morimoto H, Wada J, Font B, Mott JD, Hulmes DJ, Ookoshi T, Naiki H, Yasuhara A, Nakatsuka A, Fukuoka K, Takatori Y, Ichikawa H, Akagi S, Nakao K, Makino H: Procollagen C-proteinase enhancer-1 (PCPE-1) interacts with $\alpha 2$ -microglobulin ($\alpha 2$ -m) and may help initiate $\alpha 2$ -m amyloid fibril formation in connective tissues. *Matrix Biol* 27:211-219, 2008
3. Zhang Y, Wada J, Yasuhara A, Iseda I, Eguchi J, Fukui K, Yang Q, Yamagata K, Hiesberger T, Igarashi P, Zhang H, Wang H, Akagi S, Kanwar YS, Makino H: The role for HNF-1 β -targeted collectrin in maintenance of primary cilia and cell polarity in collecting duct cells. *PLoS ONE* 2:e414, 2007
4. Usui HK, Shikata K, Sasaki M, Okada S, Matsuda M, Shikata Y, Ogawa D, Kido Y, Nagase R, Yozai K, Ohga S, Tone A, Wada J, Takeya M, Horiuchi S, Kodama T, Makino H: Macrophage scavenger receptor-a-deficient mice are resistant against diabetic nephropathy through amelioration of microinflammation. *Diabetes* 56:363-372, 2007
5. Tabuchi M, Inoue K, Usui-Kataoka H, Kobayashi K, Teramoto M, Takasugi K, Shikata K, Yamamura M, Ando K, Nishida K, Kasahara J, Kume N, Lopez LR, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Yasuda T, Kita T, Makino H, Matsuura E: The association of C-reactive protein with an oxidative metabolite of LDL and its implication in atherosclerosis. *J Lipid Res* 48:768-781, 2007
6. Omori K, Shikata Y, Sarai K, Watanabe N, Wada J, Goda N, Kataoka N, Shikata K, Makino H: Edaravone mimics sphingosine-1-phosphate-induced endothelial barrier enhancement in human microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C1523-1531, 2007
7. Ohga S, Shikata K, Yozai K, Okada S, Ogawa D, Usui H, Wada J, Shikata Y, Makino H: Thiazolidinedione ameliorates renal injury in experimental diabetic rats through anti-inflammatory effects mediated by inhibition of NF- κ B activation. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F1141-1150, 2007
8. Makino H, Haneda M, Babazono T, Moriya T, Ito S, Iwamoto Y, Kawamori R, Takeuchi M, Katayama S: Prevention of transition from incipient to overt nephropathy with telmisartan in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 30:1577-1578, 2007
9. Zhang Y, Wada J, Hashimoto I, Eguchi J, Yasuhara A, Kanwar YS, Shikata K, Makino H: Therapeutic approach for diabetic nephropathy using gene delivery of translocase of inner mitochondrial membrane 44 by reducing mitochondrial superoxide production. *J Am Soc Nephrol* 17:1090-1101, 2006
10. Okada T, Wada J, Hida K, Eguchi J, Hashimoto I, Baba M, Yasuhara A, Shikata K, Makino H: Thiazolidinediones Ameliorate Diabetic Nephropathy via Cell Cycle-Dependent Mechanisms. *Diabetes* 55:1666-1677, 2006
11. Ichinose K, Maeshima Y, Yamamoto Y, Kinomura M, Hirokoshi K, Kitayama H, Takazawa Y, Sugiyama H, Yamasaki Y, Agata N, Makino H: 2-(8-hydroxy-6-methoxy-1-oxo-1h-2-benzopyran-3-yl) propionic acid, an inhibitor of angiogenesis, ameliorates renal alterations in obese type 2 diabetic mice. *Diabetes* 55:1232-1242, 2006
12. Hashimoto I, Wada J, Hida A, Baba M, Miyatake N, Eguchi J, Shikata K, Makino H: Elevated serum monocyte chemoattractant protein-4 and chronic inflammation in overweight subjects.

Obesity (Silver Spring) 14:799-811,
2006

なし

〔学会発表〕（計6件）

1. 榎野博史・会長講演 動物モデルを用いた糖尿病性腎症の研究・第23回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会・平成21年2月13日・岡山
2. Makino H: CKD initiative and diabetic nephropathy in Japan. The Korean Society of Nephrology Meeting, Oct 18, 2008, Seoul, Korea
3. 榎野博史・Expert Investigator Award 受賞講演 糖尿病性腎症の発症・進展機序の解明と治療・第23回日本糖尿病合併症学会・平成20年10月3日・東京
4. Makino H: The new therapeutic strategy of diabetic nephropathy based on microinflammation mechanism. The Chronic Kidney Disease in Northwest Asia: The present and the Future. Oct 17, 2008, Seoul, Korea
5. Makino H: CKD initiative and diabetic nephropathy in Japan. Diabetic Nephropathy-CKD symposium. July 13, 2008, Taipei, Taiwan
6. 榎野博史・糖尿病性腎症とチーム医療: DNETT-Japanの取り組み・第50回日本糖尿病学会年次学術集会・平成19年5月24日・仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎野 博史 (MAKINO HIROFUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 50165685

(2) 研究分担者

和田 淳 (WADA JUN)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 30294408

四方 賢一 (SHIKATA KENICHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 00243452

(3) 連携研究者