

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19590550
 研究課題名(和文) 糖尿病性腎症モデルマウスにおける慢性低酸素関連性の新規進行因子の研究
 研究課題名(英文) Study on chronic hypoxia-related advancement factor in a mouse model of diabetic nephropathy
 研究代表者
 吉田 治義 (YOSHIDA HARUYOSHI)
 福井大学・医学部・教授
 研究者番号：80135574

研究成果の概要：

糖尿病性腎症の主要な病理所見である進行性糸球体硬化症の成立機序を探るために、糖尿病自然発症性の db/db マウスに、弱齢期より慢性低酸素障害を加えることを試みた。最長4ヶ月の長期間常圧性低酸素飼育室で飼育することにより、ヒトの本症に酷似した進行期の糸球体硬化病変を作成することができた。糸球体内皮細胞障害からメサンギオリーシスが惹起され、さらに結節性糸球体硬化へと進行する機序が示唆された。低酸素性の内皮細胞障害の分子機序の解明に役立つ貴重な実験モデルが確立された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：腎臓病態学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：糖尿病性腎症、db/db マウス、慢性低酸素、糸球体硬化、結節性硬化、

微小血管瘤、メサンギオリーシス、CD34

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病性腎症をはじめとする慢性腎臓病においては、昇圧因子アンジオテンシンII活性の阻害薬が腎病変の進行を阻止することが世界的疫学研究で知られている。その機序には腎虚血の改善が根底にあることから、虚血性低酸素の細胞障害機構について、最近特に関心が持たれるようになってきた。

(2) 本著者は、重症心不全患者において低酸素状態が強いほど糸球体の腫大とメサンギ

オリーシスが強くなっていることを報告

(Kidney Int. 53:880-891, 1998) して以来、低酸素性腎障害の研究を進めている。最近我々は、ヒト近位尿細管細胞の培養実験で硬化促進因子プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター1 (PAI-1) が、炎症性サイトカイン(TNF α) および低酸素性(1% 酸素濃度)刺激いずれにても産生誘導され、両刺激で相乗的に誘導亢進されることを見出している (Kidney Int.68: 569-583, 2005)。

また、血管透過性および血管新生因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) は低酸素刺激により産生誘導されるが、炎症性刺激では誘導されないことを見出している (Biochem. Biophys. Res. Commun.335: 1026-1034, 2005)。

(3) 糖尿病性腎症モデルマウスにおいて内皮細胞性 NO 合成酵素の異常と VEGF の発現亢進が糸球体硬化の進展に関与していることが報告されている。これらの成績から慢性低酸素が糖尿病性糸球体硬化の進行に関わっている可能性が示唆され本研究を開始した。

2. 研究の目的

糖尿病性腎症における糸球体硬化の進展に慢性低酸素が関与している可能性を糖尿病性腎症自然発症マウスを用いて免疫病理学的に検討した。

3. 研究の方法

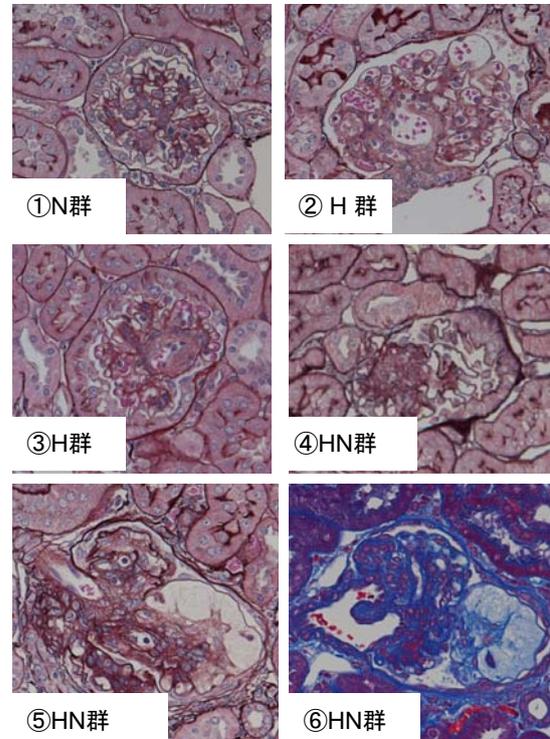
我々が開発した正常圧性低酸素 (11—12%O₂濃度) 飼育装置のなかで糖尿病性腎症自然発症マウス db/db マウスを飼育した。8 から 24 週齢の屠殺時まで低酸素hypoxiaで飼育した群 (H群: n=4) と、8 から 20 週齢まで飼育後、常酸素normoxiaで 4 週間飼育して屠殺した群 (HN群: n=3) について、8 から 24 週齢まで常酸素で飼育した対象群 (N群: n=3) と腎病変を比較検討した。腎病変は、糸球体のサイズ、メサンギオリーシス (微小血管瘤)、メサンギウム領域肥厚の程度、内皮細胞マーカーCD34 抗原の糸球体分布、糸球体上皮細胞マーカーWT-1 の分布について検討した。

4. 研究成果

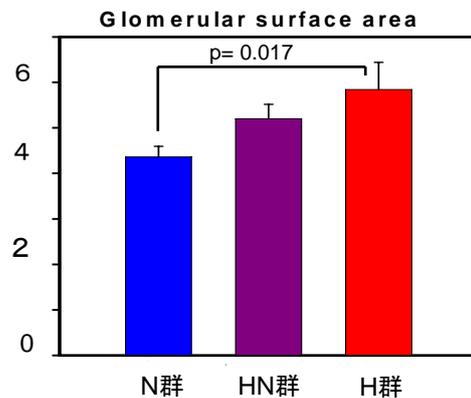
(1) 病理組織学的には、N群ではメサンジウムに中等度のびまん性硬化を認めた。一方、H群の糸球体はびまん性に腫大し、N群に比べ係蹄面積も有意に増加していた (p=0.017)。また、H群とHN群では微小血管瘤の形成が目立ったが、N群では認めなかった。HN群では、不規則な糸球体腫大があり結節性硬化糸球体を認めた (図1, 2)。

図1 (右上) の説明. 低酸素誘導性の糸球体硬化。①N群; メサンギウム硬化、②H群;

糸球体腫大とメサンギオリーシス、③H群; 高度の糸球体硬化、④HN群; 分節性の結節性硬化、⑤HN群; 高度の糸球体硬化とメサンギオリーシス、⑥HN群; ⑤と同じ糸球体のMasson-Trichrome 染色、メサンギオリーシスから線維化への移行を示す。



(図 1)

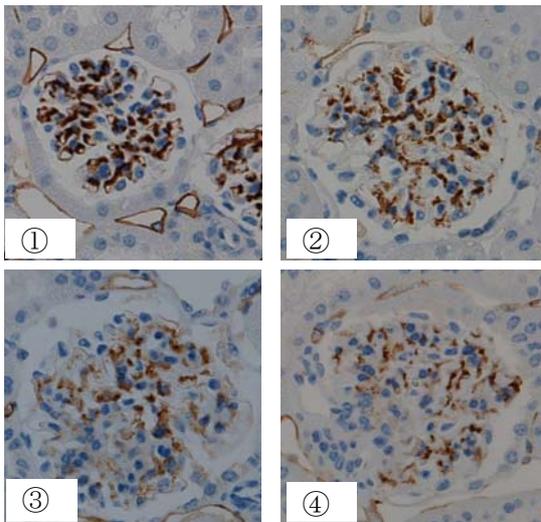


(図 2)

図2の説明. 3群間の糸球体の大きさの比較。H群ではN群に比して有意に糸球体面積が大きかった。

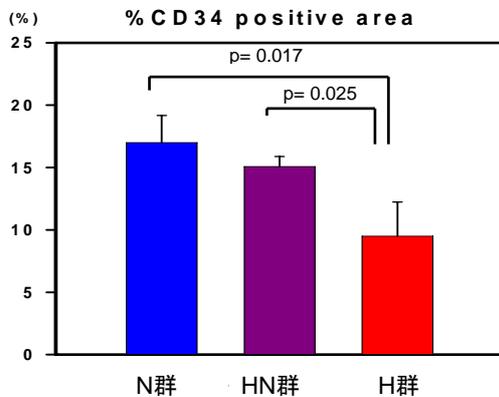
(2) 糸球体内皮細胞マーカーCD34の免疫組織学的検討では、染色陽性面積率は、8週の弱齢 db/dbマウスでは強く染まったが、24週齢のN群では軽減していた。HN群ではさらに弱く、H

群では染色性の有意な低下を認めた ($p < 0.05$) (図3、4)。



(図3)

図3の説明。内皮細胞マーカーCD34染色の比較。①；8週齢のdb/dbマウス、②；N群、③；HN群、④；H群。HN群とN群では糸球体の腫大とともにCD34染色の低下傾向がみられた。



(図4)

図4の説明。3群間での内皮細胞マーカーCD34染色の比較。H群はHN群およびN群より染色性が有意に低下していた。

(3) 糸球体上皮細胞のマーカーであるWT-1抗原の免疫染色では、糸球体当たりの陽性細胞数には3群間で有意な差は認めなかった。

(4) 以上の成績から、慢性低酸素環境が内皮細胞障害惹起し、微小血管瘤で示されるメサンギオリーシスを引き起こすこと、さらに高

血糖刺激による基質蛋白の蓄積により、結節形成を伴う進行性の糸球体硬化が生じる機序が示唆された。低酸素群で糸球体腫大が進行しても、WT-1陽性で示される糸球体上皮細胞数に変わりがないことは、糸球体上皮細胞にメカニカルなストレッチ負荷がかかっている状態が示唆された。

(5) 本研究により慢性低酸素が糸球体内皮細胞障害を惹起してメサンギオリーシスを引き起こすこと、それが結節性硬化病変の形成に関わっている可能性が示唆されたことは、糖尿病性腎症進行の病理学的機序を解明する上で非常に有益な成績であると考えられる。

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 11 件)

① 吉田治義、慢性腎臓病(CKD)とは、日本臨床検査自動化学会誌、査読無、35 巻、2010、167-170

② Takahashi N, Kimura H, Kitai R, Sato M, Yoneda M, Yamamoto C, Mikami D, Kuriyama M, Kubota T, Itoh H, Yoshida H, Acute on chronic subdural hematoma as a rare complication in a microscopic polyangiitis patient receiving antithrombotic treatment., Clin Nephrol, 査読有、72, 2009, 211-215

③ Kimura H, Li X, Torii K, Okada T, Kamiyama K, Mikami D, Takahashi N, Yoshida H, Dexamethasone enhances basal and TNF- α -stimulated production of PAI-1 via the glucocorticoid receptor regardless of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 status in human proximal renal tubular cells, Nephrol Dial Transplant 査読有、24, 2009, 1759-1765

④ 高橋直生、木村秀樹、糟野健司、三上大輔、内木宏延、吉田治義、二次性ネフローゼ症候群の病態 3. その他の二次性ネフローゼ症候群、日本内科学会雑誌、査読無、98 巻、2009 年、75-81

⑤ Shimosawa M, Sakamoto K, Tomari Y, Kamikado K, Otsuka H, Liu N, Kitamura H, Uemura K, Nogaki F, Mori N, Muso E, Yoshida H, Ono T, Lipopolysaccharide-triggered acute aggravation of mesangioproliferative glomerulonephritis through activation of coagulation in a high IgA strain of ddY mice. 査読有、112, 2009, e81-91

- ⑥糟野健司, 吉田治義, K Irani, P66 Shc の光と陰: 酸化・老化を促進するタンパク? どうして必要な? 査読無、基礎老化研究、33、2009、17-22
- ⑦ Kimura H, Li X, Torii K, Okada T, Takahashi N, Fujii H, Ishihara S, Yoshida H, A natural PPAR- γ agonist, 15-deoxy-delta 12, 14- prostaglandin J2, may act as an enhancer of PAI-1 in human proximal renal tubular cells under hypoxic and inflammatory conditions, Nephrol Dial Transplant 査読有、23, 2008, 2496-2503
- ⑧ Takahashi N, Kimura H, Nishi S, Yamamoto C, Kawajiri Y, Makino Y, Konoshita T, Miyamori I, Yoshida H, Rapid remission of minimal change disease with angiotensin II antagonist treatment in a type 1 diabetic patient with no diabetic nephropathy, Nephrol Dial Transplant Plus, 査読有、5, 2008, 375-376
- ⑨ Hasegawa K, Tsutsumi-Yasuhara S, Ohhashi Y, Kimura H, Takahashi N, Yoshida H, Miyazaki R, Goto Y, Naiki H, growth of β 2-microglobulin-related amyloid fibrils by non-esterified fatty acids at a neutral pH, Biochem J, 査読有、416, 2008, 307-315
- ⑩ Hamada T, Murata T, Narita K, Takahashi T, Wada Y, Kimura H, Yoshida H, The clinical significance of abnormal diurnal blood pressure variation in healthy late middle-aged and older adults, Blood Pressure, 査読有、17, 2008, 134-140
- ⑪ 吉田治義、尿細管間質障害の進行における低酸素機序、日本臨床検査自動化学会誌、査読無、33巻、2008年、3-8

[学会発表] (計 5 件)

- ①高橋直生、慢性低酸素環境におけるdb/db マウス糖尿病性糸球体硬化の進展 第53回日本腎臓学会学術総会、2010年6月17日、神戸。
- ② Kimura H, Pro-fibrotic and anti-angiogenic effects of glucocorticoids in human proximal renal tubular cells under hypoxic condition, 41th Annual Meeting of American Society

of Nephrology, 2008, 11, 8, Philadelphia, USA

- ③ Takahashi N, The relationship between plasma concentrations of lysophospholipids (LPLs) and dialysis-related amyloidosis in hemodialysis patients, 41th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2008, 11, 8, Philadelphia, USA
- ④ Kimura H, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) as a clinical progression marker of diabetic nephropathy is secreted by proximal tubular cells, XLV ERA-EDTA Congress, 2008, 5, 13, Stockholm, Sweden
- ⑤ Yoshida H, Chronic hypoxia induces proximal tubular expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), major progression factor of diabetic kidney disease, 12th European Meeting on Cardionephrology, 2008, 3, 14, Assisi, Italy

[図書] (計 2 件)

- ① 吉田治義、医学書院、蛋白尿、今日の診断指針 第6版、2010年、383-386。
- ② 吉田治義、宇宙堂八木書店、蛋白尿・血尿、臨床検査のガイドラインJSIM 2009、2009年、117-122

[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.med.u-fukui.ac.jp/JINNAI/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 治義 (YOSHIDA HARUYOSHI)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：80135574

(2) 研究分担者

木村 秀樹 (KIMURA HIDEKI)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：20283187
高橋 直生 (TAKAHASHI NAOKI)
福井大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30377460

(3) 連携研究者

なし