

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590952

研究課題名 (和文)

糖尿病性腎症の成因解明と新しい治療法の開発を目指した探索的研究

研究課題名 (英文) Exploratory research to development of novel therapeutic strategy for diabetic nephropathy.

研究代表者

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

## 研究成果の概要：

我々はこれまでの一連の研究によって、糖尿病性腎症の成因には、軽微な慢性炎症 (microinflammation) が関与しており、種々のケモカインや炎症性サイトカインとともに、cholecystokinin (CCK) が、腎症の病因に関連している可能性があることを報告した。本研究では、糖尿病性腎症の進展におけるCCKの役割を明らかにするために、CCK type A receptorとtype B receptorの単独ノックアウトマウスと両者のダブルノックアウトマウス (CCK-AB KOマウス) およびwild typeマウスに糖尿病を発症させることにより、CCKが糖尿病性腎症の進展に対して保護的に働く因子であることを明らかにした。さらに、CCK peptideが培養マクロファージからの炎症性サイトカイン産生を抑制すること、糖尿病ラットの腎障害の進行を抑制することを示し、この結果よりCCKが糖尿病性腎症の予防・治療に応用できる可能性があることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,200,000 | 660,000   | 2,860,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：糖尿病学 腎臓病学

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：腎臓学

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は、わが国における慢性血液透析導入の最大の原因疾患であり、腎症の成因を解明して新しい治療手段を開発することが重要な課題となっている。我々は以下に述べる一連の研究によって、糖尿病性腎症の成因に炎症が関与していることを明らかにして

きた。我々はさらに、炎症が動脈硬化と腎症の共通の進展メカニズムの一つであることを明らかにした。糖尿病性腎症で見られる「炎症」は、関節リウマチなどの炎症性疾患に見られる炎症と比較すると臨床的にも組織学的にも軽微なものであり、動脈硬化の成因に関

与するmicroinflammation (軽度の炎症) と共通した特徴を持つと考えられる。

(1) 糖尿病性腎症患者の腎生検組織において、ICAM-1やセレクチンなどの接着分子の発現亢進と著明なマクロファージの浸潤が見られる

(Hirata K et al. Diabetologia 41, 1998)。

(2) 糖尿病発症後きわめて早期に糸球体内にICAM-1の発現がおこり、マクロファージの浸潤を誘導している (Sugimoto H et

al. Diabetes 46, 1997)。

(3) 5/6腎摘出モデルにおいても、糸球体内にICAM-1の発現が亢進してマクロファージの浸潤を誘導する (Miyatake M et al. Nephron 79, 1998)。

(4) ICAM-1 KOマウスでは、糖尿病発症6ヶ月後のアルブミン尿、腎肥大、糸球体肥大、メサンギウム基質の増加が抑制され、さらに糸球体内のTGF- $\beta$ とIV型コラーゲンの発現が抑制される (Okada S. Diabetes 52, 2003)。

(5) DNAマイクロアレイを用いて、糖尿病発症後のICAM-1 KOマウスとwild type マウスの腎組織における遺伝子発現プロファイルを比較することにより、マクロファージの細胞表面に発現するMacrophage scavenger receptor-A (SR-A)や、osteopontin、**cholecystokinin**, RANTES, IP-10などのサイトカインやケモカインが、腎症の成因に関与していることが示唆された (論文投稿中)。

(6) 糖尿病ラットにHMG-CoA還元酵素阻害薬 (スタチン) (Usui H. Nephrol. Dial. Transplant. 2004)、Methotrexate (Yozai K. J. Am. Soc. Nephrol. 2005)、Erythromycin (Tone A. diabetologia, 2005)、チアゾリジン誘導体 (Am J Physiol. in revision) などの薬剤を投与することにより、腎臓におけるNF- $\kappa$ Bの活性化、ICAM-1の発現とマクロファージの浸潤が抑制される。

(7) SR-A KOマウスに糖尿病を誘発すると、腎

組織へのマクロファージの浸潤とアルブミン尿、腎組織傷害が抑制された。In vitroの実験結果より、SR-Aはマクロファージと細胞外基質への接着を誘導する接着分子として機能していることが明らかとなった (論文投稿中)。さらに、糸球体硬化に伴って進行するネフロン減少のモデルとして、5/6腎摘出モデルを用いて同様の実験を行った結果、ICAM-1 KOマウスでは5/6腎摘出モデルにおいても糸球体硬化が抑制されることが明らかになり、腎症が進行した時期の糸球体硬化と間質の線維化にも炎症メカニズムが関与することが示唆された。

(8) 日本人 2 型糖尿病患者において、血清中 IL-18 濃度は、動脈硬化の指標である頸動脈内膜肥厚度 (IMT)、baPWV と有意な正の相関を示すとともに、血清中および尿中 IL-18 濃度はアルブミン尿と有意な正の相関を示すことを明らかにした (Nakamura A. Diabetes Care 2005)

上記の結果から、糖尿病性腎症の成因にマクロファージを中心とする炎症メカニズムが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。糖尿病性腎症の発症機構には、糖化蛋白 (AGEs)、酸化ストレス、protein kinase C 活性化、糸球体血行動態異常などが関与し、これらが糸球体細胞の機能異常を引き起こすことにより糸球体硬化が進行すると想定されているが、これらの要因に加えて、炎症メカニズムが腎症進展の加速因子として関与していることが想定される。

そこで、我々は糖尿病性腎症の成因に関与する炎症 (microinflammation) に焦点を絞り、糖尿病性腎症の成因に関与する炎症関連分子を明らかにするとともに、これらをターゲットとした新しい治療法の開発を目指す研究を計画した。

## 2. 研究の目的

上述のように、糖尿病の血管合併症の成因には、microinflammationが関与していると考えられる。本研究では、腎症の成因に関与する炎症関連分子を明らかにするとともに、cholecystokininとPSGL-1をはじめとする炎症関連分子を制御することにより腎症を治療する新しい治療戦略を開発すること目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) Cholecystokinin receptor ノックアウトマウスを用いた、糖尿病性腎症の成因へのCCKの関与の検討。

①動物：8週令CCK-AR KOマウス、CCK-BR KOマウス、CCK-AR KOマウス、CCK-AR/BR double KOマウス、C57/BL6マウス (wild type) を用いる。

②糖尿病の作成：糖尿病群には streptozotocin (STZ: 300mg/kg) を腹腔内投与する。非糖尿病群には、citrate bufferのみを投与する。

③代謝データ：STZ投与後1, 4, 8, 12週に、血糖、HbA1c、尿中アルブミン排泄量、血清クレアチニン値を測定する。1, 4, 12週後に糸球体濾過値(GFR)を測定する。1, 4, 12週後にマウスを屠殺して腎組織を採取する。

④組織学的検討：12週後の腎組織からPASおよびPAM染色標本を作成して、画像解析ソフト (NIH Image) により糸球体サイズ、メサンギウム基質の面積を定量的に評価する。Masson染色により間質の線維化を評価する。

⑤免疫組織学的検討：蛍光抗体法と酵素抗体法を用いて、マクロファージの浸潤、TGF- $\beta$ の発現、細胞外基質 (I, IIIおよびIV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン) の発現を検討する。

⑥DNAマイクロアレイ：腎組織からRNAを抽出し、DNAマイクロアレイシステムを用いて、約30,000個の遺伝子の発現プロファイルを比

較する。発現の差が大きい遺伝子を選択して、Northern blot、Real time RT-PCR、免疫染色で確認する。

⑦核内転写因子活性：腎組織から核蛋白を抽出して、NF- $\kappa$ B、AP-1等の転写因子活性をELISA法で検討する。

### (2) 糖尿病性腎症に対するCCKの効果

①動物：5週令SDラット

②糖尿病の誘発：糖尿病群にはSTZ (65mg/kg) を尾静脈内投与する。非糖尿病群には、citrate bufferのみを投与する。

③薬剤投与：糖尿病ラットcholecystokinin Petide (CCK8) またはcontrol peptide (対照) を腹腔内投与する。3ヵ月後に腎組織を採取して、以下の検討を行う。

③評価項目：

1) 代謝データ：血糖、HbA1c、尿中アルブミン排泄量、血清クレアチニン値、糸球体濾過値 (GFR)。

2) 組織学的評価：PASおよびPAM染色標本を作成して、画像解析ソフト (NIH Image) により糸球体サイズ、糸球体硬化の程度 (メサンギウム基質の面積) を定量する。(四方・楨野)

3) 免疫組織学的検討：蛍光抗体法と酵素抗体法を用いて、マクロファージの浸潤、TGF- $\beta$ の発現、細胞外基質 (I, IIIおよびIV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン) の発現を評価する。

4) Northern blot、Real time RT-PCR: TGF- $\beta$ と細胞外基質 (I, IIIおよびIV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン) の遺伝子発現を評価する。

### 4. 研究成果

(1) Cholecystokinin receptor ノックアウトマウスを用いた、糖尿病性腎症の成因へのCCKの関与の検討。

CCK-AR/BR double KO マウス (ABR-KO マウス) では、wild type マウスに比較して、糖

尿病発症後の血糖とHbA1c値には差がなかったが、尿中アルブミン排泄量は有意に低く、腎組織におけるメサンギウム基質の増加が有意に抑制されていた。免疫組織学的検討により、ABR-KOマウスでは、糸球体へのマクロファージの浸潤が有意に少なく、TGF- $\beta$ とIV型コラーゲンの発現も有意に抑制されていた。腎組織からRNAを抽出し、DNAマイクロアレイシステムを用いて、約30,000個の遺伝子の発現プロファイルを比較したところ、wild typeの糖尿病マウスでは、炎症性サイトカイン遺伝子の発現が亢進していたが、ABR-KOマウスでは炎症関連遺伝子の発現亢進が抑制されていた。

## (2) 糖尿病性腎症に対するCCKの効果

CCK-8投与群では、control peptide投与群(対照群)に比較して、糖尿病発症後の血糖とHbA1c値には差がなかったが、尿中アルブミン排泄量は有意に低く、腎組織におけるメサンギウム基質の増加が有意に抑制されていた。CCK-8投与群では、糸球体へのマクロファージの浸潤が有意に少なく、TGF- $\beta$ とIV型コラーゲンの発現も有意に抑制されていた。CCK-8投与群では、腎組織におけるNF- $\kappa$ Bの活性化が抑制されていた。

以上の結果より、CCKは抗炎症作用を介して糖尿病性腎症の進展に対して保護的に作用していることが明らかとなり、CCKが糖尿病性腎症の予防と治療に有用である可能性が示された。今後、CCKの臨床応用に向けた研究を進めるとともに、osteopontinなどの他の候補分子についても、同様の検討を行う予定である。

## 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 9 件)

1. Takahashi HK, Mori S, Wake H, Liu K, Yoshino T, Ohashi K, Tanaka N, Shikata

- K, Makino H, Nishibori M. Advanced glycation end products subspecies-selectively induce adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. J Pharmacol Exp Ther. 20 2009 in press. (査読あり).
2. 四方賢一. 糖尿病性腎症の治療における Microinflammation制御の意義. BioClinica 23. 52-56, 2008 (査読無し)
3. 佐々木基史, 四方賢一, 糖尿病性腎症の画像診断. Diabetes Frontier. 19, 729-731, 2008 (査読無し)
4. 四方賢一, 榎野博史. 糖尿病性腎症. 腎と透析. 64, 945-950, 2008 (査読無し)
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. (査読あり)
6. Tone A, Shikata K, Ogawa D, Sasaki S, Nagase R, Sasaki M, Yozai K, Usui HK, Okada S, Wada J, Shikata Y, Makino H. Changes of gene expression profiles in macrophages stimulated by angiotensin II--angiotensin II induces MCP-2 through AT1-receptor. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 8:45-50. 2007. (査読あり)

7. 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. (査読あり)
8. 四方賢一. 糖尿病性腎症の成因と新しい治療戦略. *Medical View Point* 28, 10, 2007 (査読無し)
9. 四方賢一. 特集：糖尿病性腎症. 糖尿病性腎症の成因としての Microinflammation. *日本腎臓学会誌* 49, 2007 (査読無し)

[学会発表] (計 5 件)

1. Satoshi Miyamoto, Kenichi Shikata, Motofumi Sasaki, Shingo Nishishita, Chikage Sato, Hitomi Kataoka, Ryo Kodera, Daisho Hirota, Nobuo Kajitani, Jun Wada, Hirofumi Makino. Protective roles of Cholecystokinin against progression of diabetic nephropathy. 44th EASD Annual Meeting, 2008年9月10日 Roma, Italy
2. Miyamoto S, Shikata K, Sasaki M, Nishishita S, Sato C, Kataoka H, Kodera R, Hirota D, Kajitani N, Makino H. Cholecystokinin plays protective roles against progression of diabetic nephropathy ISN Nexus Symposium on Diabetes and the Kidney. 2008年6月9日 Dublin, Ireland
3. 四方賢一. 糖尿病性腎症の成因と Microinflammation—新しい治療戦略の開発を目指して— 第51回日本糖尿病学

会学術総会シンポジウム3. 2008年5月22日 東京都

4. Kenichi SHIkata. Microinflammation is a common pathway in the pathogenesis of diabetic nephropathy and cardiovascular complications. The 8<sup>th</sup> Japan-China Diabetes Symposium, 2008年4月25日和歌山市.
5. Miyamoto S, Shikata K, Sasaki M, Nishishita S, Sato C, Kataoka H, Kodera R, Hirota D, Makino H. Cholecystokinin plays protective roles against progression of diabetic nephropathy The Shiga International Symposium on Diabetic Nephropathy 2008年3月20日滋賀県大津市.

[図書] (計 4 件)

1. 四方賢一. 慢性腎臓病(CKD)からみた糖尿病性腎症. *分子糖尿病学の進歩* (金原出版). 138-146, 2008
2. 四方賢一. 慢性腎臓病(CKD)とアディポネクチン. *アディポネクチンとその受容体* (フジメディカル社). 299-305, 2008
3. 四方賢一. 糖尿病性腎症の成因と Microinflammation. *糖尿病学の進歩* (第41集) 診断と治療社. 142-147, 2007
4. 四方賢一. 代謝異常に伴う腎疾患. *糖尿病性腎症. 病気から見た治療戦略. 最新の治療 2008-2010* (南江堂). p 36-40, 2007
6. 研究組織
  - (1) 研究代表者
 

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
  - (2) 研究分担者

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

和田 淳 (WADA JYUN)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：30294408

(3) 連携研究者

なし