

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19590970

研究課題名 (和文) MMP-2 ノックアウトによる糖尿病性腎症進展抑制とその機序の解明

研究課題名 (英文) **Tubulointerstitial injury is exacerbated in streptozotocin-induced diabetic matrix metalloproteinase-2 knockout mice**

研究代表者 深水 圭 (FUKAMI KEI)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：80309781

研究成果の概要 (和文)：[背景]糖尿病性腎症における細胞外マトリックス増加のメカニズムには、Matrix metalloproteinases (MMPs)が重要な役割を担っているが、その詳細な検討は未だない。そこで我々は MMP-2 knockout mouse (MMP-2 KO) を使用し、糖尿病性腎症における MMP-2 の役割について検討した。[方法]6 週令の MMP-2 KO マウス、C57BL/6J (Ctrl) マウスに streptozotocin (STZ) 50mg/Kg を腹腔内に投与し、糖尿病モデルを作成した。投与後 16 週に尿中アルブミン、NAG 排泄量、MMP-2 活性、組織変化、 α -SMA 発現を検討した。[結果]Ctrl-DM、MMP-2 KO-DM 群では、plasma glucose、HbA1c、収縮期血圧の上昇を認めたが、DM 両群間では差はなかった。MMP-2 KO-DM では、Ctrl-DM と比較し有意に BUN、Cr が上昇していた。尿中アルブミン排泄量は、DM で有意に増加していたが、MMP-2 KO-DM では DM と比しさらに増加していた。尿中 NAG は DM で有意に増加していたが、MMP-2 KO-DM 群で増加傾向にあった。腎内 MMP-2 の発現、活性は Ctrl と比較し DM 群で有意に上昇していた。組織学的検討では、DM でメサンギウム領域の基質の増加を認めたが、MMP-2 KO-DM では著明な尿細管の拡張、細胞の脱落、間質の線維化を認め、それらは α -SMA 発現の亢進を伴っていた。[結語]MMP-2 の knockout が糖尿病性腎症進展に関与することから、MMP-2 を調節することが腎症の新たな治療戦略になりうる可能性が示唆される。

研究成果の概要 (英文)：**Background and Aims:** Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is one of the potent metalloproteinases which can degrade various types of extracellular matrix (ECM) such as collagen IV, V and laminin. It has been suggested that diabetes-induced accumulation of ECM are, at least in part, by down-regulation of MMP-2. However there is no data whether MMP-2 activity and expression affect diabetes-induced renal damage in vivo. Therefore, we investigated the effects of MMP-2 deficiency on tubulointerstitial injury in diabetic animals.

Materials and Methods: Diabetes was induced by streptozotocin (STZ)(50mg/kg) in male MMP-2 knockout mice (MMP-2 KO) and C57BL/6J mice (Ctrl). After 16 weeks, cortical MMP-2 expression and activity were measured by zymography and real-time PCR, respectively. Urinary

albumin excretion (UAE) and N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Alfa-smooth muscle actin (α-SMA) was evaluated by western blots and immnohistochemistry. Tubulointerstitial injury and fibrosis were evaluated by hematoxylin and eosin staining (HE) and Masson-trichrome staining, respectively.

Results: Plasma levels of glucose and HbA1c were increased by about 2-3-folds in 16-week diabetic mice compared with non-diabetic Ctrl mice (plasma glucose; 490.3+/-7.5 mg/dl, HbA1c; 9.91+/-0.22 % in 16-week diabetic mice). MMP-2 expression and activity in the total kidney cortex of diabetic mice were increased in zymography and RT-PCR analysis. Serum levels of BUN, creatinine (Cr) and UAE were significantly increased in MMP-2 KO DM mice compared with Ctrl DM mice (BUN; 23.2+/-1.7 vs 39.8+/-6.0 mg/dl, p<0.01, Cr; 0.07+/-0.01 vs 0.17+/-0.04 mg/dl, p<0.01, UAE; 0.08+/-0.01 vs 0.16+/-0.03 mg/mgCr, p<0.05). Further, tubulointerstitial injury and cortical α-SMA expression were enhanced in DM mice, which were further increased in MMP-2 KO DM mice.

Conclusions: We demonstrate for the first time that tubulointerstitial injury and fibrosis were exacerbated in diabetic MMP-2 knockout mice, even though MMP-2 levels were increased in diabetic mice. The present study suggests that the decrease in other matrix-degrading enzymes may be involved in the tubulointerstitial injury and fibrosis in diabetic nephropathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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：糖尿病性腎症 細胞外基質 MMP-2 尿細管間質 尿蛋白

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の罹患率は著明に増加しており、糖尿病による合併症が現在問題となってきた。その合併症の中でも特に糖尿病性腎症は患者の予後を左右するものであり、糖尿病性腎症発症予防、進行阻止が急務の課題である。腎機能低下の誘因のひとつである細胞外マトリックス増加のメカニズムには、細胞外蛋白分解酵素 Matrix metalloproteinases (MMPs)

とその抑制蛋白 tissue inhibitor of MMP (TIMP)が重要な働きを担っており、正常ではマトリックスの分解、産生がバランスよく調節されているが、糖尿病性腎症において、特にメサンギウム領域はその MMPs のバランスの不均衡が生じ、マトリックス蓄積をきたしていることが示唆されている。しかしながら、近位尿細管上皮細胞の形質転換 Epithelial-Mesenchymal Transition

(EMT) が、尿細管間質の線維化に重要な働きをしており、EMT 発症に MMP-2 の発現亢進を伴っていることが発見された。実際に我々は、尿細管間質の肥大、線維化などの特徴をもつ糖尿病性腎症に関わる、特に近位尿細管細胞における MMP-2 の発現が、1 型糖尿病モデルである STZ ラットにおいて著明に上昇し、逆に TIMP の発現が減少していることを発見した (Fukami et al. *Nephrology* 10:A20, 2005)。以上のことから、初期糖尿病性腎症の発症進展に MMP-2 の発現増加が重要である。しかしながら MMP-2 が本当に糖尿病性腎症進展に関与しているかは定かではない。

2. 研究の目的

糖尿病性腎症初期の MMP-2, TIMP 等の発現が糸球体にどのような変化をもたらすのか (尿蛋白が増加する原因となりうるものかどうか)、もしそうであれば、MMP-2 をノックアウトすることにより尿蛋白を含む糖尿病性腎症発症進展が改善するか否かを目的とした。

3. 研究の方法

6 週令の MMP-2 KO マウス C57BL/6J (Ctrl) マウスに streptozotocin (STZ) 50mg/Kg を腹腔内に投与し、糖尿病モデルを作成した。投与後 16 週に尿中アルブミン、NAG 排泄量、MMP-2 活性、組織変化、 α -SMA 発現を検討した。

4. 研究成果

Ctrl-DM、MMP-2 KO-DM 群では、plasma glucose、HbA1c、収縮期血圧の上昇を認めたが、DM 両群間では差はなかった。MMP-2 KO-DM では、Ctrl-DM と比較し有意に BUN、Cr が上昇していた。尿中アルブミン排泄量は、DM で有意に増加していたが、MMP-2 KO-DM では DM と比しさらに増加していた。尿中 NAG は DM で有意に増加していたが、MMP-2 KO-DM 群で増加傾向にあった。腎内 MMP-2 の発現、活性は Ctrl と比較し DM 群で有意に上昇していた。組織学的検討では、DM でメサンギウム領域の基質の増加を認めたが、MMP-2 KO-DM では著明な尿細管の拡張、細胞の脱落、間質の線維化を認め、それらは α -SMA 発現の亢進を伴っていた。MMP-2 の knockout が糖尿病性腎症進展に関与することから、MMP-2 を調節することが腎症の新たな治療戦略になりうる可能性が示唆される。

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 19 件)

(1) Development of enzyme-linked immunosorbent assay system for PEDF and its clinical utility.

Kei Fukami, Sho-ichi Yamagishi, Seiya Okuda. *Curr Mol Med.* (査読有)10(3):317-20. 2010

(2) Protective role of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in early phase of experimental diabetic retinopathy. Yoshida Y, Yamagishi S, Matsui T, Jinnouchi Y, **Fukami K**, Imaizumi T, Yamakawa R. *Diabetes Metab Res Rev*(査読有) 25:678-86, 2009

(3) Circulating matrix metalloproteinase-2 is an independent correlate of proteinuria in patients with chronic kidney disease. 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*(査読有);29:109-15. 2009

(4) Irbesartan inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced proximal tubular cell injury in vitro by suppressing receptor for AGEs (RAGE) expression. Matsui T, Yamagishi SI, Takeuchi M, Ueda S, **Fukami K**, Okuda S. *Pharmacol Res.* (査読有) 25. 2009

(5) 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. 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. *Metabolism.* (査読有)3. 2009.

(6) IL-1RI deficiency ameliorates early experimental renal interstitial fibrosis. Jones LK, O'Sullivan KM, Semple T, Kuligowski MP, Fukami K, Ma FY, Nikolic-Paterson DJ, Holdsworth SR, Kitching AR. *Nephrol Dial Transplant.* (査読有) 24:3024-32. 2009.

(7) RAGE-Induced Cytosolic ROS Promote Mitochondrial Superoxide Generation in Diabetes. 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. *J Am Soc Nephrol.* (査読有) 20:742-52, 2009.

(8) 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. Matsui T, Yamagishi S, Takeuchi M, Ueda S, **Fukami K**, Okuda S. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有)385:269-72. 2009

(9) Involvement of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in glomerular capillary loss and sclerosis in a rat model of chronic kidney disease (CKD). Ueda S, Yamagishi SI, Matsumoto Y, Kaida Y, Fujimi-Hayashida A, Koike K, Tanaka H, **Fukami K**, Okuda S. *Life Sci.* (査読有) 84:853-6. 2009

(10) A case of acute kidney injury related to intravenous Zoledronic acid in a patient with multiple myeloma. Kiyomi Koike, **Kei Fukami**, Satoshi Morishige, Takuma Hazama, Kensei Taguchi, Ryotaro Ando, Makio Nagano, Jyunko Yoshimura, Seiji Ueda, Michitoshi Hashiguchi, Kiyoshi Tamaki, Hidemi Nishida, Seiya Okuda. *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* (査読有)51:557-62, 2009.

(11) Clinical Utility of Acarbose, an alpha-Glucosidase Inhibitor in Cardiometabolic Disorders. Yamagishi S, Matsui T, Ueda S, **Fukami K**, Okuda S. *Curr Drug Metab.* (査読有) 10:159-63. 2009.

(12) Administration of pigment epithelium-derived factor (PEDF) reduces proteinuria by suppressing decreased nephrin and increased VEGF expression in the glomeruli of adriamycin-injected rats. Fujimura T, Yamagishi SI, Ueda S, **Fukami K**, Shibata R, Matsumoto Y, Kaida Y, Hayashida A, Koike K, Matsui T, Nakamura KI, Okuda S. *Nephrol Dial Transplant.* (査読有)24:1397-406, 2009.

(13) Involvement of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in tubulointerstitial ischaemia in the early phase of diabetic nephropathy. Shibata R, Ueda S, Yamagishi SI, Kaida Y, Matsumoto Y, **Fukami K**, Hayashida A, Matsuoka H, Kato S, Kimoto M, Okuda S. *Nephrol Dial Transplant.* (査読有)24:1162-9, 2009.

(14) **Fukami K**, Yamagishi S, Ueda S, Okuda S. Role of AGEs in diabetic nephropathy. *Curr Pharm Des.* (査読有)14:946-52. 2008.

(15) Agents that block advanced glycation end product (AGE)-RAGE (receptor for AGEs)-oxidative stress system: a novel therapeutic strategy for diabetic vascular complications. Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Ueda S, **Fukami K**, Okuda S. *Expert Opin Investig Drugs.* (査読有)17, 2008.

(16) Inhibition of NADPH oxidase prevents

advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C-alpha-dependent pathway. Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, **Fukami K**, Yap FY, Sourris KC, Penfold SA, Bach LA, Cooper ME, Forbes JM. *Diabetes.* (査読有)57:460-9. 2008.

(17) Olmesartan blocks advanced glycation end products (AGEs)-induced angiogenesis in vitro by suppressing receptor for AGEs (RAGE) expression. Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K, Inoue H, Takeuchi M, Ueda S, **Fukami K**, Okuda S, Imaizumi T. *Microvasc Res.* (査読有) 75:130-4. 2008.

(18) Olmesartan blocks advanced glycation end products (AGEs)-induced angiogenesis in vitro by suppressing receptor for AGEs (RAGE) expression. Yamagishi SI, Matsui T, Nakamura K, Inoue H, Takeuchi M, Ueda S, **Fukami K**, Okuda S, Imaizumi T. *Microvasc Res.* (査読有)75:130-4, 2008.

(19) M. Lassila, **K. Fukami**, Jandeleit-Dahm, T. Semple, P. Carmeliet, M. E. Cooper, A. R. Kitching: Plasminogen activator inhibitor-1 expression is pathogenetic in experimental murine diabetic renal disease *Diabetologia* (査読有)50:1315-26, 2007

〔学会発表〕(計 5 件)

1) 第 52 回日本腎臓学会学術集会 2009 年 6 月 3 日-5 日

2) 第 51 回日本腎臓学会学術集会 2008 年 5 月 30 日-6 月 1 日

3) 第 50 回日本腎臓学会学術集会 2007 年 5 月 25 日-27 日

4) **Fukami K**, Takamiya Y, Yamagishi S, Ueda S, Takeuchi M, Okuda S

Possible involvement of AGE and MMP-2 in podocyte detachment and loss. Roma. *Diabetologia* 2008 EASD

5) **Fukami K**, Takamiya Y, Yamagishi S, Ueda S, Takeuchi M, Okuda S

Possible involvement of AGE and MMP-2 in podocyte detachment and loss. Amsterdam. *Diabetologia* 2007 EASD

〔図書〕(計 3 件)

1 糖尿病と酸化ストレス

糖尿病患者の酸化ストレスマーカー・AGEs/PEDF

深水 圭、山岸昌一、奥田誠也

in press

2 エビデンスが不十分な年齢層への降圧目標と降圧薬選択のポイント

深水 圭、山岸昌一、奥田誠也

薬局 第 60 卷 NO.13、(60 頁～63 頁)平成
21 年

3 糖尿病合併高血圧における RA 系の
関わりとテルミサルタンの降圧効果と
その有用性. Pharma Medica. Vol.26 No.4,
2008

羽田勝計、山岸昌一、深水 圭、Mark Cooper

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深水 圭 (FUKAMI KEI)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号 : 80309781

(2) 研究分担者

上田 誠二 (UEDA SEIJI)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号 : 80322593

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :