

平成 21年 1月 24日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790297  
 研究課題名（和文） 脂質代謝と硬化関連サイトカインからみた糖尿病性腎症における内皮細胞障害機序の検討  
 研究課題名（英文） Research of lipid metabolism and glomerulosclerosis-associated cytokines on diabetic glomerular endothelial injury  
 研究代表者  
 種田 積子 (TANEDA SEKIKO)  
 東京女子医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：40408472

## 研究成果の概要：

高血糖による糸球体内皮細胞および尿細管細胞障害を、脂質および硬化関連因子の観点から検討した。糖尿病を発症したマウス腎では、糸球体内皮細胞での PPAR $\gamma$  の減弱とメサンギウム細胞での TGF- $\beta$ 1 蛋白の増加がみられた。また尿細管細胞では脂質過酸化物の増加がみられた。Methylglyoxal で培養した内皮細胞では PPAR $\gamma$  は減弱し、TGF- $\beta$ 1 は有意に高値を示した。また尿細管細胞では、活性酸素種の増加とアポトーシス細胞の増加を認めた。以上より、糖尿病性腎症の発症機序に、脂質および硬化関連因子が強く関連していると示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：糖尿病、脂質、病理学、細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は糖尿病患者の死因の原因になりうる重大な合併症である。その病理学的特徴は、初期変化としての糸球体病変（基底膜の肥厚化、内皮細胞腫大・変性など）と、腎病変の進行に従って顕著になるメサンギウム基質の増加といわれている。それらの成因として、慢性高血糖による糖代謝異常や脂質代謝異常（動脈硬化や血栓）、細胞内高グルコースによる、蛋白質の非酵素的糖化など

複数の因子により惹起されることが一要因と考えられていた。更に、最近では高血糖に起因する尿細管障害が糸球体病変を増悪させている可能性も示唆されている。メサンギウム基質の増加は成長因子やサイトカインが関与していると考えられ、その中でも transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) は VI 型膠原線維等を増加させることで糸球体基底膜や基質を増加させる。一方で、糖尿病性腎症のもうひとつの初期糸球体変化である内皮細胞腫大・変性などの内皮細胞障害

は、TGF- $\beta$ 1のサイトカイン・ネットワークが活性化されることにより惹起されることが一要因と考えられているが、その機序は依然不明である。ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) は糖・脂質代謝に関与する種々の標的遺伝子を調節している転写因子で、糖尿病の糸球体硬化進展に関与しているのが知られている。PPAR はステロイドホルモン受容体ファミリーに属し、その isoform である PPAR $\alpha$  がやはり内皮細胞障害の一つである動脈硬化および炎症性病変の病態生理学的変化に関与していることも報告されている。また、 $\omega$ -3 脂肪酸である eicosapentaenoic acid (EPA) は、そのコレステロール低下作用により高脂血症等、主に atherosclerosis 関連疾患に対して投与されている。しかし、糖尿病腎症の糸球体内皮細胞障害や尿細管障害に対する EPA 投与の影響や、PPAR の機序についての詳細な報告は少ない。本研究を着想するに至った経由は、これらの検討を行うことで、糖尿病性腎症の初期病変である、内皮細胞障害や尿細管傷害を解明し、それにより糖尿病性腎症の進展を予防することが可能になりうるのではないかと考えたからである。

## 2. 研究の目的

糖尿病性腎硬化症において、糸球体メサンギウム細胞における脂質代謝や硬化関連因子の関与は明らかにされつつあるが、糖尿病性腎症の初期病変である糸球体内皮細胞障害の進展と修復におけるそれらの関与は依然不明である。腎臓においては、PPAR $\gamma$  はラットの正常糸球体内皮細胞に発現しており、ラットの腎虚血モデルでは PPAR $\gamma$  の RNA レベルでの上昇がマイクロアレイにより確認されている。最近では、PPAR $\gamma$  のリガンドがメサンギウム細胞において TGF- $\beta$ 1 産生を抑制することも明らかになっている。このように PPAR $\gamma$  と TGF- $\beta$ 1 の糸球体病変への関与は明らかにされつつあるものの、糸球体内皮細胞障害の進展と修復においての報告はわずかに過ぎない。申請者は糖尿病の腎病変の進展機序に関し、PPAR $\gamma$  と TGF- $\beta$ 1 に注目し、糖尿病性腎症の初期症状である糸球体内皮細胞障害においてこれらの関与を明らかにしたい。また、糖尿病性腎症でのアルブミン尿増加の一因としてその関与が示唆されている尿細管上皮傷害において、その進展予防に脂質代謝や脂質代謝改善薬 (EPA) がどのように影響するかはほとんど検討されていない。申請者は糖尿病の腎病変の進展機序

に関し、PPAR $\gamma$  と TGF- $\beta$ 1、また低酸素状態で誘発される Hypoxia inducible factor (HIF) -1 $\alpha$  に注目し、糖尿病性腎症の初期症状である糸球体内皮細胞障害や尿細管傷害においてこれらの関与を明らかにしたいと考えた。またこれらの解明が、この初期変化が進展した病変としてのメサンギウム基質の増加や糸球体硬化病変にもつながると考えた。今回申請しているこの研究によって、糸球体内皮細胞や尿細管傷害におけるこれらの因子が明らかになることで、糸球体内皮細胞障害や尿細管間質傷害の進展を抑制し、その後進行する糸球体硬化による腎機能低下を阻止できれば、糖尿病性腎症の治療に長足の進歩がもたらされると思われる。

## 3. 研究の方法

高血糖による糸球体内皮細胞および尿細管細胞障害を in Vivo と in Vitro の両面より検討した。

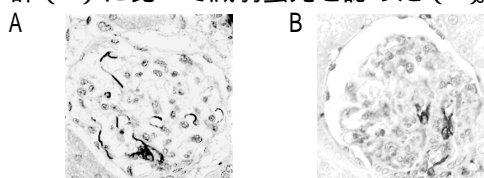
(1) In vivo 実験: 8 週齢雄性 CD1 マウスに STZ (Sigma1:200mgSTZ/kgBW x2 回) を投与する群 (DM 群: n=6) と、上記に加え投薬群 (EPA) を同時に投与する群 (EPA 投与群: n=6) に割付けた。1 匹あたり 1 日量 EPA を食餌中に薬剤を添加して (5% 濃度) 2 週間観察し、糸球体内皮細胞傷害と尿細管上皮細胞障害を分子病理学的に検討した。また、糖尿病性腎症では、低酸素状態になりやすいため、Hypoxiprobe を屠殺 2 時間前に腹腔内注射し、低酸素マーカーである Pimonidazole を検討した。更に Hypoxia inducible factor (HIF) や脂質過酸化物質、TGF- $\beta$ 1、PPAR $\gamma$  の蛋白レベルでの変化を western blotting や免疫組織学的手法を用いて検討した。

(2) In vitro 実験: ラットの糸球体内皮細胞および尿細管上皮細胞を高血糖 (5mM, 30mM, 50mM の糖濃度で、各 1 日、3 日、5 日間培養) あるいは glycation end product である methylglyoxal (MG) (5mM で 3 時間) 投与下で培養した。糸球体内皮細胞において、RT-PCR で PPAR $\gamma$  と TGF- $\beta$ 1 の mRNA 発現を比較した。また尿細管上皮細胞において、reactive oxygen species (ROS) とアポトーシスの発現を Flow cytometry 手技を用いて検討した。

## 4. 研究成果

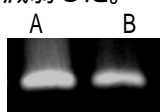
(1) in vivo 実験: STZ により高血糖を発

症させたマウスは、経過中の血糖値は 400mg/dl 台、尿糖は定性で 4+ を呈し、対象群に比べ 15% 程度の体重減少を認めた。尿中アルブミンも 2 週の時点で対象群に比べて高値を示した。組織学的に、軽度の糸球体の腫大と高度の尿細管上皮傷害が見られた。電子顕微鏡的には、明らかな内皮細胞障害はみられなかったが、尿細管のミトコンドリアの腫大や変性が認められた。免疫組織学的に、DM 群での糸球体内皮細胞における PPAR $\gamma$  は対象群 (A) に比べて減弱蛍光を認めた (B)。



一方、TGF- $\beta$ 1 染色は対象群に比べて軽度メサンギウム領域での増加を認めたものの、内皮細胞では著変を認めなかった。また、尿細管上皮細胞では、脂質過酸化物が対象群に比べ有意に上昇していた。EPA を投与したマウス群では、経過中の血糖値、尿糖 (定性)、体重減少の程度は、DM 群と比べて、有意な差は認められなかった。尿中アルブミンが 2 週の時点で有意に減少していた。腎機能 (Cr) に関しては、対象群、DM 群、投薬群の中で、有意な差は認めなかった。組織学的には、DM 群と比べて糸球体には明らかな差は見られなかったものの、明らかな尿細管傷害の改善が投薬群では見られた。免疫組織学的には、糸球体内皮細胞における PPAR $\gamma$  は DM 群に比べてわずかに増加していた。またメサンギウム領域での TGF- $\beta$ 1 染色は軽度に減少を認めた。さらに、尿細管上皮における脂質過酸化物の有意な減少やアポトーシス細胞の減少が、投薬群において認められた。また、高血糖を発症させたマウスでは、腎皮質における低酸素の状況が進行していた (Pimonidazole 染色) しか、DM 群と投薬群において、その程度に有意な差は認められなかった。一方で、DM 群に比べて、投薬群における HIF-1 $\alpha$  蛋白の有意な上昇が、Western blotting 法により確認された。

(2) invitro 実験 : ラットの糸球体内皮細胞と尿細管上皮細胞を高血糖下で培養し、糸球体内皮細胞での PPAR $\gamma$  と TGF- $\beta$ 1 の mRNA 発現を RT-PCR で比較したところ、高血糖下では、両者はほとんど変わらなかった。一方で糸球体内皮細胞での PPAR $\gamma$  mRNA 発現は、MG 投与下 (50mM で 3 時間) (B) では、非投与下 (A) に比べて減弱した。



また糸球体内皮細胞での TGF- $\beta$ 1 mRNA 発現は、MG 投与により有意に高値を示した。また、尿細管上皮細胞では MG 投与によりアポトーシスや ROS が亢進した。EPA 投与によりアポトーシスや ROS が有意に減弱し、Vivo で得られた結果と一致する結果が Vitro でも得られた。以上の結果を現在投稿準備中である。

## 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 4 件 )

種田 積子, 本田 一穂, 小田 秀明 ( 他 6 名、1 番目 ), Proximal tubule cytoplasmic fibrillary inclusions following kidney transplantation in a patient with a paraproteinemia. American Journal of Kidney Disease. 2008 ( 掲載予定 )、査読 有

種田 積子, 本田 一穂, 小田 秀明 ( 他 4 名、1 番目 ), Light chain deposition disease after renal transplantation. American Journal of Kidney Disease. 52 巻 621-5、2008 査読 有

種田 積子, Hudkins KL, Mühlfeld AS ( 他 4 名、1 番目 ). Protease nexin-1, tPA, and PAI-1 are upregulated in cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis. Journal of American Society of Nephrology. 19 巻 243-51、2008 査読 有

種田 積子、本田 一穂 ( 1 番目 )、病理診断アトラス ( 11 ) 泌尿生殖器 2 : 糸球体腎炎、東京女子医科大学雑誌、78 巻 213-217、2008、査読 無

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

種田 積子、本田 一穂、内田 啓子、新田 孝作、湯村 和子、小田 秀明、長田 道夫 ( 標題 ) FSGS の新分類法の提唱とその臨床的有用性の検討、第 51 回日本腎臓学会、2008.6.1、福岡

種田 積子、本田 一穂、宇都 健太、金井 佐恵子、石川 文隆、堀田 茂、徳本直彦、田辺 一成、山口 裕、小田 秀明 ( 標題 ) 移植後 2 ヶ月目の腎生検で近位尿細管上皮内に多量の細胞質内封入体がみられ骨髄腫が疑われた一例、第 97 回日本病理学会、2008. 5.17、金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

種田 積子 (TANEDA SEIKO)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：40408432

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし