

機関番号：24303

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390071

研究課題名 (和文) 生活習慣病の病態形成における新規活性酸素産生酵素の
役割解明と治療戦略への応用研究課題名 (英文) Study on roles of a novel NADPH oxidase isoform in the development
of lifestyle related diseases

研究代表者

矢部 千尋 (YABE CHIHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：70150571

研究成果の概要 (和文)：ストレプトゾトシンで高血糖を誘発した I 型糖尿病モデルにおいて腎臓の活性酸素 (ROS) 産生酵素の新規分子種 NOX1 の発現が有意に上昇する。NOX1 由来の ROS は腎臓の酸化ストレスの亢進と p38MAPK の活性化に寄与していることが明らかとなり、高血糖に伴う腎臓の細胞老化やアポトーシスに関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Induction of hyperglycemia with streptozotocin up-regulated the expression of NOX1, a novel isoform of superoxide-generating NADPH oxidase in the kidney. NOX1 derived ROS were shown to increase oxidative stress and to activate p38 MAPK, thereby stimulating renal redox-sensitive signaling under diabetic conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：病態分子薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：糖尿病

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の中で糖尿病・高脂血症・高血圧は相互に関連する病態であり、高頻度に合併する。本病態には酸化ストレスの亢進が関与するとされるが、既存の抗酸化薬の有効性は確立されていない。現在主にレニン・アンギオテンシン (RA) 系阻害薬と HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) がよく用いられるが、病変の進展を完全に阻止することが出来ない現状である。RA 系阻害薬は本来降圧薬であるが、糖尿病腎症の予防・治療にも効果が認められている。このことは糖尿病腎症の発症・進展に RA 系の亢進が関与していることを示している。

RA 系においてアンギオテンシン II (AngII) の受容体下流には活性酸素種 (ROS) がシグナル分子として介在することが知られ、近年その産生源として NADPH オキシダーゼが注目されている。本酵素の触媒サブユニット NOX には複数のアイソフォームが存在するが、この中で NOX1 は AngII により誘導され、高血圧症の発症に関与する。

一方、スタチンは NADPH オキシダーゼの構成サブユニット Rac1 のイソプレニル化を阻害することにより糖尿病の血管病変を改善することが報告されている。

すなわち、高血圧や高脂血症治療薬はいず

れも NADPH オキシダーゼ活性を抑制し、糖尿病合併症の予防・治療に有効である。このことは本酵素がこれら生活習慣病の病態形成に関わっている可能性を示している。

2. 研究の目的

NOX1 遺伝子欠損マウスに実験的糖尿病を誘発し、血管および腎病変における NADPH オキシダーゼの役割を明らかにする。さらに本酵素由来の活性酸素種 (ROS) がどのような分子機構でこれらの病態に関わっているかを明らかにする。

3. 研究の方法

ストレプトゾトシン投与による I 型糖尿病モデルを作製し腎臓における NADPH オキシダーゼの発現を検討する。I 型モデルの実験には NOX1 遺伝子欠損マウス (KO) と同腹野生型マウス (LM) を用いる。合わせて II 型糖尿病のモデル db/db マウスにて同様の解析を行う。

高血糖による腎機能障害の指標として、尿中アルブミン、血清 BUN、糸球体ろ過率 (GFR)、尿中 Na⁺/K⁺/Cl⁻ 排出を測定する。尿の採取には代謝ケージを用いる。また尿細管障害の指標として尿中 N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) を、酸化ストレス亢進の指標として尿中 8-OHdG および組織中の TBARS を測定する。腎組織のアポトーシスについては cleaved caspase-3 とその基質である poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) の検出および TUNEL 染色にて検討する。さらに腎組織のリモデリング・線維化に関わる諸種の炎症関連分子、サイトカインの発現動態を解析して NOX1 由来の ROS の標的分子を明らかにする。

4. 研究成果

II 型糖尿病モデル db/db マウスの腎臓における NADPH オキシダーゼの発現を各 NOX 分子種について検討したところ、血糖値上昇後 3~8 週では NOX1 については特に変動を認めなかった (図 1)。他方、NOX2 の発現は 3~8 週で低下し、NOX4 の発現は 3 週目の時点で有意に上昇していた。

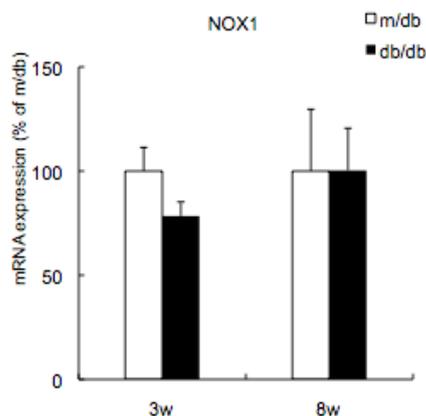


図 1. II 型モデルにおける NOX1 の発

次にストレプトゾトシンで高血糖を誘発した I 型モデルにおける腎臓 NOX の発現動態を検討したところ、NOX1 分子種のみ発現が 3~8 週目の時点において有意に上昇することがわかった (図 2)。また NOX1 遺伝子の発現誘導は髄質尿細管で最も高いことがわかった。

腎臓の ROS 生成について LM と KO で比較したところ、KO では LM でみられた

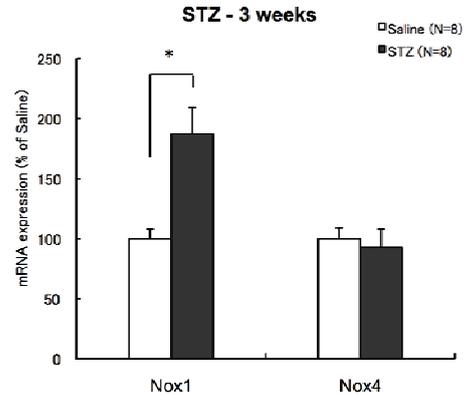


図 2. I 型モデルにおける NOX1 の発現

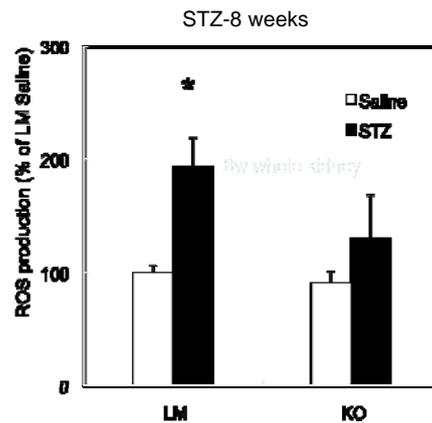


図 3. 両遺伝子型マウス腎臓における ROS

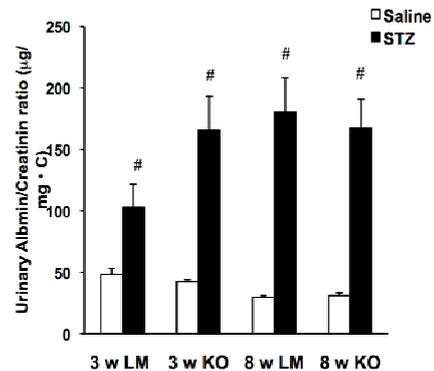


図 4. 尿中アルブミン量

高血糖に伴う ROS 生成の上昇が認められなかった (図3)。

高血糖誘発により腎機能の指標である尿中アルブミン量は増加したが、3-8週目の時点において両遺伝子型マウスで差を認めなかった (図4)。

血清 BUN およびクレアチニン、糸球体ろ過率(GFR)、尿中 Na⁺/K⁺/Cl⁻ 排出についても両遺伝子型マウスで差をみとめなかった。他方、尿中 NAG はこの期間中有意の変化を示さなかったことから、尿細管の機能は保持されていると考えられた (図5)。

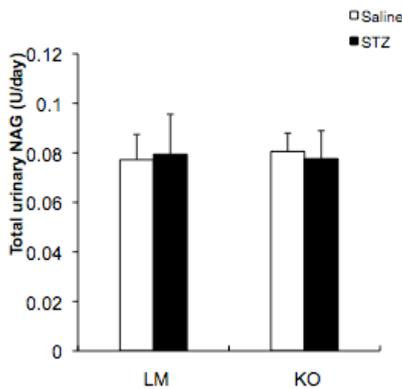


図5. 高血糖8週目における尿中 NAG

一方、酸化ストレスの指標として測定した尿中 8-OHDG および組織中の TBARS については図6と図7に示すごとく、高血糖に伴う両指標の上昇が WT に比し KO において抑制されていた。すなわち、NOX1 由来の ROS は組織の酸化ストレス亢進に寄与していることが示された。

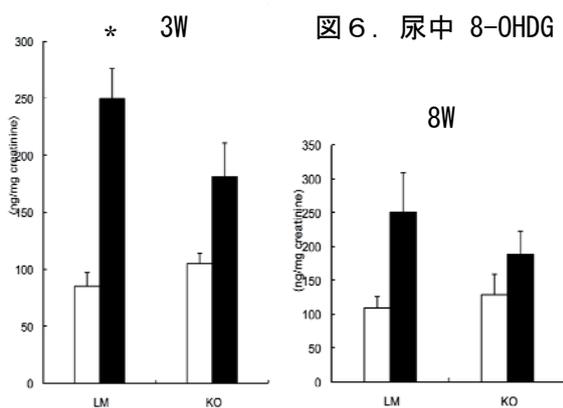


図6. 尿中 8-OHDG

次に腎組織のアポトーシスについて検討を行った。両遺伝子型マウスの高血糖誘発群において TUNEL 染色では明らかな差を検出できなかったが、8週目の時点において caspase-3 の活性化 (cleaved caspase-3 の上昇) が KO では有意に抑制されていた (図

8)。他方、PARP は両遺伝子型とも同程度の減少を認めた。これらの結果から NOX1 由来の ROS は腎臓組織における細胞アポトーシスに関与する可能性が示唆された。

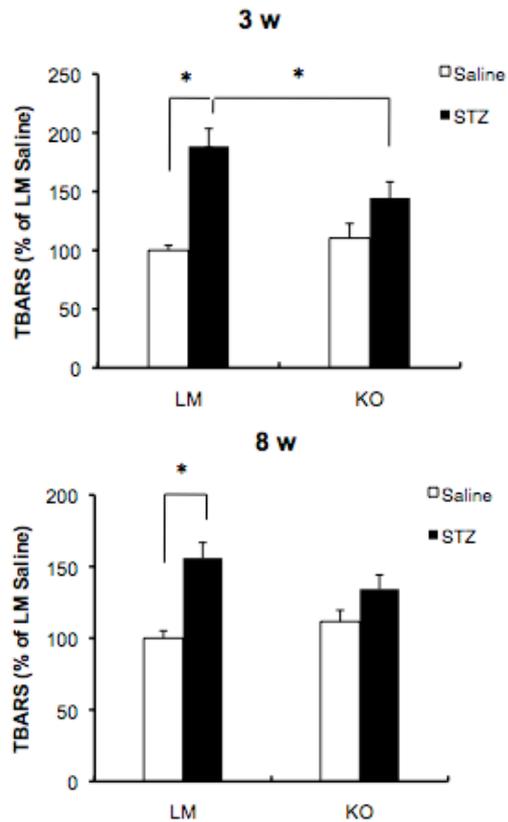


図7. 腎組織 TBARS

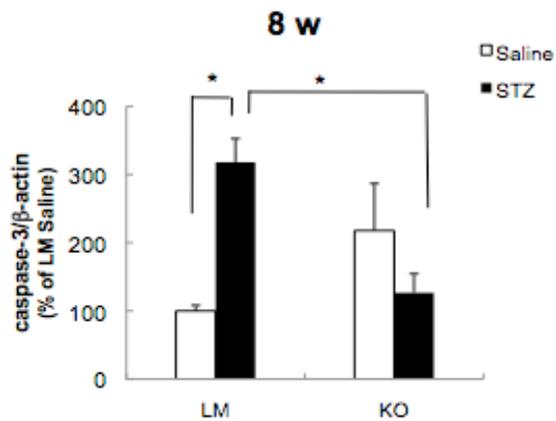


図8. Caspase-3 の活性化 (8W)

また、LM において認められる腎組織の p38MAPK の活性化が KO では有意に抑制されていることが示された。

続いて腎臓の線維化に関わる TGF-β および CTGF の遺伝子発現を検討したところ、3週および8週目の時点における発現上昇について両遺伝子型に差を認めなかった (図

9)。組織リモデリングに関わる TIMP-1 についても同様であった (図 10)。

そのほか組織炎症に関わるケモカイン MCP-1 や オステオポンチン、PAI-1、ICAM-1 などの遺伝子発現について検討を行ったが、いずれも高血糖下に上昇しており、両遺伝子型で差が見られなかった (図 11)。

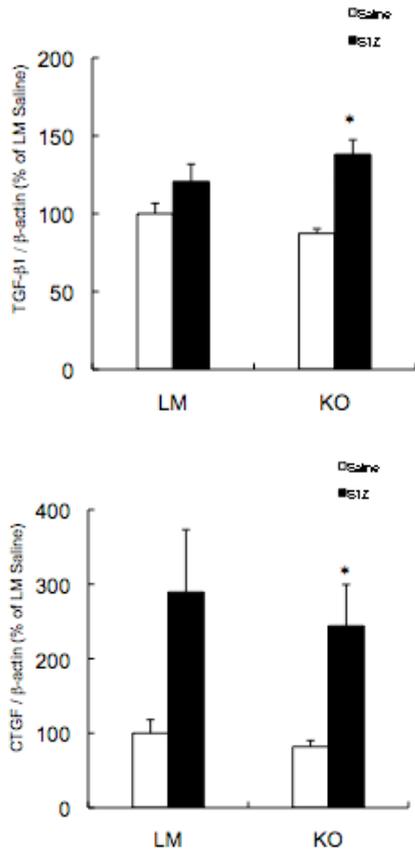


図 9. TGF-β1 と CTGF mRNA の発現 (8W)

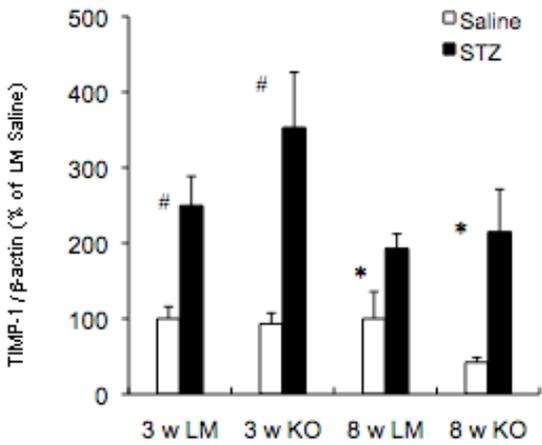


図 10. 腎組織 TIMP-1 の発現

以上の解析から、高血糖下で NOX1 由来の ROS は腎臓の酸化ストレスの充進に

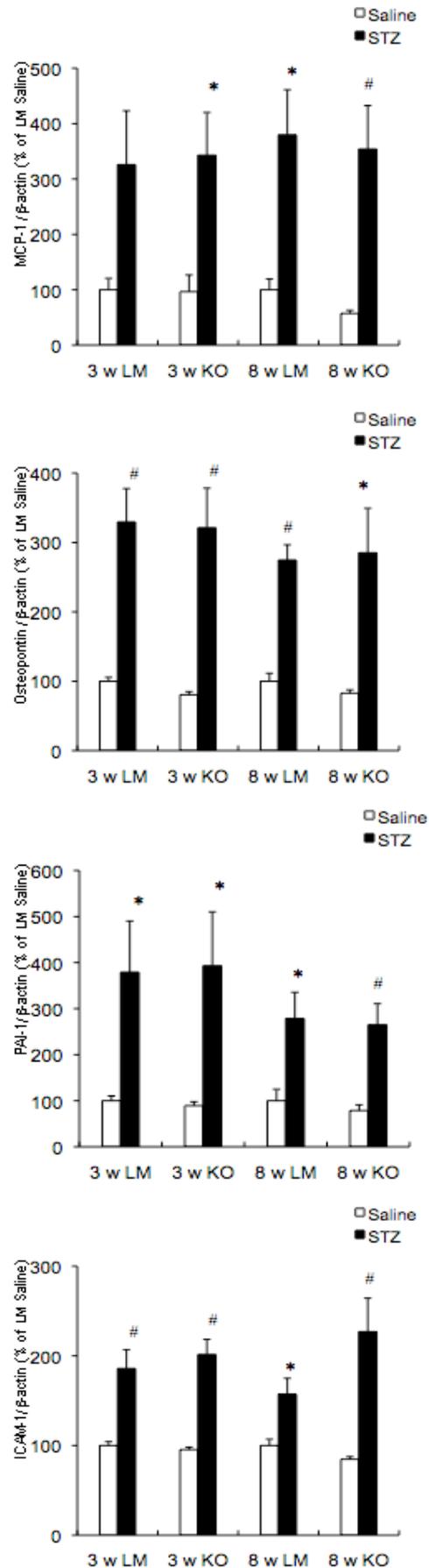


図 11. 組織炎症に関わる諸因子の発現

寄与していることが明らかとなった。今回の解析では NOX1 による酸化ストレスの亢進と、腎臓組織の慢性炎症やリモデリング・線維化との関係は認められなかった。しかし高血糖に伴う腎臓組織の caspase-3 および p38MAPK の活性化が KO では有意に抑制されていたことから、NOX1 由来の ROS は腎臓の細胞老化やアポトーシスに関与している可能性が示唆された。今後、より長期の高血糖モデルや、腎メサンギウムおよび尿細管の培養細胞を用いてさらなる解析を進める。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Kakehi T, Yabe-Nishimura C. NOX enzymes and diabetic complications. *Semin Immunopathol* 30:301-314, 2008.
- ② Cevik MO, Katsuyama M, Kanda S, Kaneko T, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Kakehi T, Cui W, Sasaki M, Yabe-Nishimura C. The AP-1 site is essential for the promoter activity of NOX1/NADPH oxidase, a vascular superoxide-producing enzyme: Possible involvement of the ERK1/2-JunB pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 374:351-355, 2008.
- ③ Cui W, Matsuno K, Iwata K, Ibi M, Katsuyama M, Kakehi T, Sasaki M, Ikami K, Zhu K, Yabe-Nishimura C. NADPH oxidase isoforms and anti-hypertensive effects of atorvastatin demonstrated in two animal models. *J Pharmacol Sci.* 111:260-268, 2009.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 寛朋子、岩田和実、Taye Ashraf、松野邦晴、矢部千尋. 糖尿病性腎症モデルにおける活性酸素産生酵素Nox1 の解析. 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2008 年 5 月 22 日 ; 東京.
- ② 寛朋子、岩田和実、Taye Ashraf、松野邦晴、矢部千尋. 腎臓における活性酸素産生酵素Nox1 の発現と腎症モデルを用いた解析. 第 23 回日本糖尿病合併症学会. 2008 年 10 月 3 日 ; 東京.
- ③ 寛朋子、松野邦晴、岩田和実、Taye Ashraf、矢部千尋. 腎臓における活性酸素産生酵素 Nox1/NADPH oxidase の発現の解析. 第 114 回日本薬理学会近畿部会. 2008 年 11 月 14 日 ; 神戸.
- ④ 矢部千尋、松野邦晴、衣斐督和、岩田和実. 活性酸素産生酵素NADPHオキシダーゼの関わる疾患と病態. 第 82 回日本薬理学会年会. 2009 年 3 月 16 日 ; 横浜.

⑤ 寛朋子、岩田和実、Taye Ashraf、松野邦晴、矢部千尋. 糖尿病性腎症モデルにおける活性酸素産生酵素NOX1 の発現と酸化ストレス. 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2009 年 5 月 22 日 ; 大阪.

⑥ Zhu K, Matsumoto M, Iwata K, Yabe-Nishimura C. Renal redox-sensitive signaling in type 1 diabetes is suppressed in Nox1-deficient mice. 第 83 回日本薬理学会年会. 2011 年 3 月 17 日 ; 横浜.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○ 取得状況 (計 0 件)

[その他] (計 2 件)

*研究会

寛朋子、岩田和実、Taye Ashraf、松野邦晴、矢部千尋. 糖尿病性腎症モデルにおける活性酸素産生酵素NOX1 の解析. 第 34 回代謝内分泌研究会. 2008 年 11 月 28 日 ; 京都.

*講演会

矢部千尋. NADPH オキシダーゼの関わる多様な病態. 日本薬学会関東支部講演会「メタボリックシンドローム研究の最前線」. 2009 年 11 月 7 日 ; 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表

矢部 千尋 (YABE CHIHIRO)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 70150571

(2) 研究分担者

平山 暁 (HIRAYAMA AKI)

筑波技術大学・保健科学部・特任教授
研究者番号 : 20323298

岩田 和実 (IWATA KAZUMI)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号 : 60305571

勝山 真人 (KATSUYAMA MASATO)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号 : 60315934

松野 邦晴

京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号 : 50420708

寛 朋子 (KAKEHI TOMOKO)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・プロジェクト研究員
研究者番号 : 20433279

(3) 連携研究者

なし