

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591065

研究課題名(和文) mtROS の血管内皮細胞-Mφ相互作用への関与とその制御による
糖尿病性腎症の抑制研究課題名(英文) Impact of mitochondrial reactive oxygen species in the pathogenesis
of diabetic nephropathy

研究代表者

西川 武志 (NISHIKAWA TAKESHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・特任准教授

研究者番号：70336212

研究成果の概要(和文)：

申請者らはミトコンドリア由来活性酸素(mtROS)が糖尿病血管合併症発症の主要因子であることを報告している。今回の研究ではmtROSの糖尿病性腎症発症への関与について、培養血管内皮細胞およびmtROSの特異的除去酵素であるManganese superoxide dismutase(MnSOD)の血管内皮特異的発現トランスジェニックマウスを用い、*in vitro*、*in vivo*の両面から解析を行った。

研究成果の概要(英文)：

We previously reported that mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) is one of the major factors in the pathogenesis of diabetic vascular complications. In this study, we examined the impact of mtROS in the pathogenesis of diabetic nephropathy using endothelial cells and transgenic mice, which specifically express manganese superoxide dismutase (MnSOD) in vascular endothelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖代謝異常

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は新規透析導入の原因1位の疾患であり、その発症阻止は患者のQOLの維持のみならず医療経済上も重要である。現在、糖尿病性腎症の発症阻止のため、糖尿病専門医による厳格な血糖・血圧管理が行われているが、いまだ腎症発症の増加には歯止めがかかっておらず、血糖・血圧管理を補

完するための新たな治療法の開発が模索されている。腎症の発症機構を明らかにすることは腎症に対する新規治療法の開発に直結すると思われるが、腎症の発症機構にはまだ不明な点が多い。

一方、申請者らはこれまでに、1)高血糖が培養血管内皮細胞においてmtROSの過剰産生を引き起こし、さらにこのmtROSがこれ

まで糖尿病合併症の成因と考えられていたポリオール経路の亢進、protein kinase C 活性化、糖化蛋白蓄積亢進などの細胞内代謝異常を引き起こすことを世界で初めて証明した(Nature, 404: 787, 2000)。また、2)尿中 8-OHdG (mtROS のマーカー)が 2 型糖尿病患者で増加し、尿中 8-OHdG の増加が糖尿病合併症の重症度と相関すること(Diabetes Care, 26:1507, 2003)、3)世界で初めて血管内皮細胞に特異的に MnSOD を発現させたトランスジェニックマウス(eMnSODTg マウス)の開発に成功し、*in vivo* で mtROS の制御により、糖尿病網膜症の発症抑制が認められたこと(BBRC, 366:814, 2008)、4)糖尿病治療薬メトホルミンが AMPK-PGC-1 α -MnSOD 経路の亢進により、mtROS を抑制すること(Diabetes 55:120, 2006)など *in vitro*、*in vivo* の両面から mtROS が糖尿病合併症の発症に重要であることを証明してきた。

さらに以前より、高血糖状態は、低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor-1 : HIF-1) や VEGF (vascular endothelial growth factor) の発現誘導など、低酸素状態と類似した細胞内代謝異常を起こしていることが報告されている。しかし、低酸素状態と類似した細胞内代謝異常の発症メカニズムやその腎症発症における意義についてはまだ十分に検討されていない。

2. 研究の目的

これまでの研究を踏まえ、今回の研究では、糖尿病性腎症の発症機序としてミトコンドリア由来活性酸素の関与について、さらには酸素状態と類似した細胞内代謝異常発現の可能性とその意義について *in vitro*、*in vivo* の両面から検討を行う。

3. 研究の方法

(1) HIF-1 α 蛋白発現の *in vitro* での検討

培養血管内皮細胞を 5.5mM グルコース及び 25mM グルコース濃度下で 3 時間または 24 時間培養した。

その後、低酸素状態と類似した細胞内代謝異常の存在を評価するため、細胞質内蛋白を抽出し、HIF-1 α 蛋白の発現量をウエスタンブロット法により検討した。

(2) mtROS 産生の *in vitro* での検討

培養血管内皮細胞を 5.5mM グルコース及

び 25mM グルコース濃度下で 3 時間培養した。

その後、mtROS 産生増加について、蛍光プローブ MitoTracker Red CM-H₂XROS を使用した共焦点レーザー顕微鏡により検討した。

(3) 糖尿病マウスの作成

8~10 週齢の雄の eMnSOD-Tg マウスおよび野生型 (WT) マウスに対し、buffer および 10 μ M クエン酸ナトリウム buffer (pH 4.5) に溶解したストレプトゾトシン (STZ) を 150 mg/kg \cdot BW (Wako Co, Japan) 腹腔内注射し、非糖尿病 WT マウス、非糖尿病 eMnSOD-Tg マウス、糖尿病 WT マウス、および糖尿病 eMnSOD-Tg マウスの 4 群を作製した。

(4) 腎糸球体における HIF-1 α 蛋白および VEGF 蛋白発現の検討

(3) で作成されたマウス群を 4 週間飼育した。

その後、これらマウスの腎糸球体での低酸素状態と類似した細胞内代謝異常の発現を評価するため、HIF-1 α 蛋白、VEGF 蛋白、細胞核マーカーである DAPI の発現について免疫組織化学的染色を行った。

(5) mtROS 産生の *in vivo* での検討

(3) で作成されたマウス群を 4 週間飼育した。

その後、酸化ストレスの変化を評価するため、これらマウスの腎糸球体に対して、8-OHdG 抗体を使用した免疫組織化学的染色を行った。

4. 研究成果

(1) HIF-1 α 蛋白発現の *in vitro* での検討

培養血管内皮細胞において、21%酸素濃度環境下では 3 時間培養、24 時間培養のいずれにおいても、グルコース濃度の違いによる HIF-1 α 蛋白の発現に差異を確認できなかった(図 1A)。

しかし、1%酸素濃度環境下では 3 時間および 24 時間のいずれにおいても、5.5 mM グルコース培養と比較して 25 mM グルコース培養の HIF-1 α の蛋白量が増加することが確認された(図 1B)。

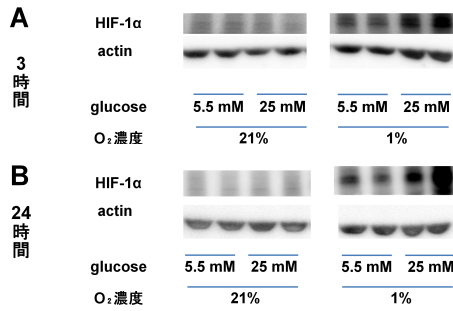


図1: 培養グルコース濃度と培養酸素濃度の差異によるHIF-1 α 発現の変化

(2) mtROS 産生の *in vitro* での検討

培養血管内皮細胞において、21%酸素濃度環境下では、5.5 mM グルコース培養と比較して 25 mM グルコース培養で蛍光強度が強くなり、mtROS 産生の増加が確認された。

また、1%酸素濃度環境下では 21%酸素濃度環境下と比較して、いずれのグルコース濃度培養においても蛍光強度が強くなり、mtROS 産生が増加することを確認した。

さらに 21%酸素濃度環境下と同様に 1%酸素濃度環境下においても、25 mM グルコース培養下で 5.5 mM グルコース培養と比較して mtROS 産生が増加することが確認された (図 2)。

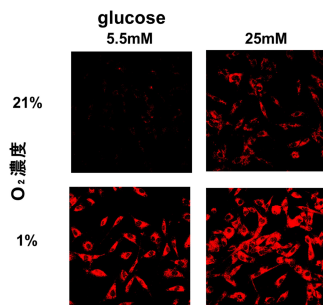


図2: 培養グルコース濃度と培養酸素濃度の差異によるmtROS産生の変化

(3) 糖尿病マウスの作成

STZ または buffer をそれぞれ WT マウスおよび eMnSOD-Tg マウスに投与することによって、糖尿病群と非糖尿病群を作製し、随時血糖値、および体重についてその推移を観察した。

WT マウスおよび eMnSOD-Tg マウスにおいて、糖尿病群では非糖尿病群と比較して実験開始時には随時血糖値および体重に有意な差は認められなかった (図 3A)。

しかし、薬剤投与後 1 週間経過以後は WT

マウスおよび eMnSOD-Tg マウスの糖尿病群と非糖尿病群の随時血糖値に関して有意な差が認められ、その差は薬剤投与 4 週間後まで徐々に拡大した。

一方で、WT マウスおよび eMnSOD-Tg マウスの糖尿病群同士、または非糖尿病群同士においては血糖値に有意な差はなかった。

体重については WT マウスにおいては、薬剤投与後一週間経過以後は糖尿病群において非糖尿病群と比較して有意な増加抑制が認められた。

eMnSOD-Tg マウスにおいては薬剤投与後 3 週間時点でのみ糖尿病群と非糖尿病群に関して有意な増加抑制が認められた(図 3B)。

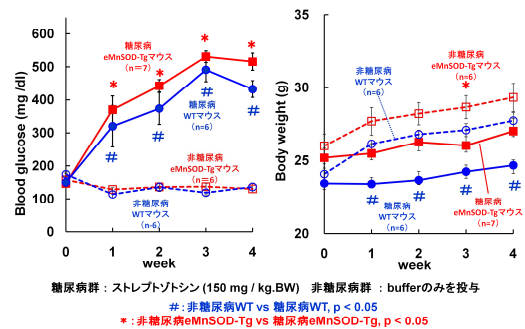


図3: ストレプトゾチン投与後のマウスの血糖値および体重の変化

(4) 腎糸球体における HIF-1 α 蛋白および VEGF 蛋白発現の検討

非糖尿病 eMnSOD-Tg マウスでは、非糖尿病 WT マウスと比較して HIF-1 α 蛋白および VEGF 蛋白発現に変化は認められなかった。

一方、糖尿病 WT マウスでは、非糖尿病 WT マウスと比較して HIF-1 α 蛋白および VEGF 蛋白発現の増加を認めた。

しかし、糖尿病 eMnSOD-Tg マウスでは糖尿病により増加する HIF-1 α 蛋白および VEGF 蛋白発現増加は抑制されていることが確認された (図 4)。

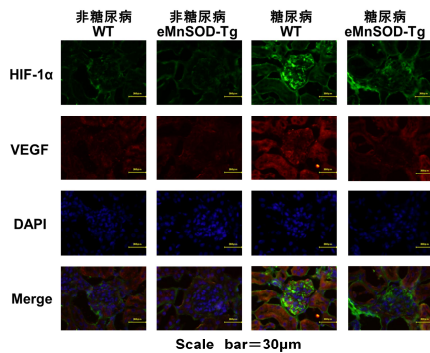


図4:腎糸球体における糖尿病導入およびMnSOD発現のHIF-1 α 蛋白およびVEGF蛋白発現への影響

(5) mtROS 産生の *in vivo* での検討

非糖尿病 eMnSOD-Tg マウスと非糖尿病 WT マウスとを比較した時、8-OHdG 発現に変化は認められなかった。

しかし、糖尿病 WT マウスでは、非糖尿病 WT マウスと比較して著明な8-OHdG発現増加を認めた。

さらに、糖尿病 eMnSOD-Tg マウスでは、糖尿病 WT マウスと比較して8-OHdG発現が抑制されることが確認された(図5)。

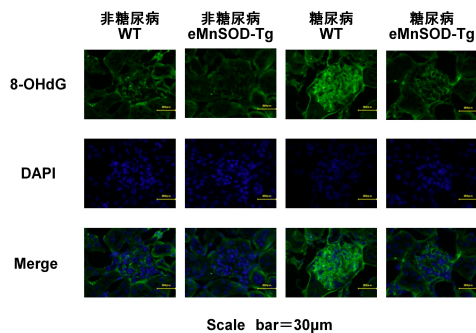


図5:腎糸球体における糖尿病導入およびMnSOD発現の酸化ストレスへの影響

以上の研究より、高血糖により低酸素状態と類似した細胞内代謝異常が誘導されること、また *in vivo* の検討からは、その腎糸球体での低酸素類似状態の発現と mtROS の関与が示唆された。今後、そのメカニズムの詳細をさらに検討していく予定である。この研究を進めていくことで、糖尿病性腎症の発症・進展を制御しうる新規治療法および新規治療薬開発につながる可能性が示されたものと思われる。

謝辞

研究遂行にあたりご指導いただいた熊本大学大学院生命科学研究部代謝内科学 荒木栄一教授、ならびに共同研究者の宮村信博准教授に深謝いたします。

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10件)

1. Fukumoto K, Wei CN, Matsuo H, Harada K, Zhang SC, Kalay L, Yamashiro T, Nishikawa T, Araki E, Ueda A: An intervention study to promote self-improvement of lifestyle in a Japanese community: a new health support program. *Environ Health Prev Med* (査読あり) 2011 in press
2. Matsumura T, Kinoshita H, Ishii N, Fukuda K, Motoshima H, Senokuchi T, Taketa K, Kawasaki S, Nishimaki-Mogami T, Kawada T, Nishikawa T, Araki E: Telmisartan Exerts Antiatherosclerotic Effects by Activating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ in Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (査読あり) 2011 in press
3. Tsutsumi A, Motoshima H, Kondo T, Kawasaki S, Matsumura T, Hanatani S, Igata M, Ishii N, Kinoshita H, Kawashima J, Taketa K, Furukawa N, Tsuruzoe K, Nishikawa T, Araki E: Caloric restriction decreases ER stress in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Biochem Biophys Res Commun* (査読あり) 404:339-344, 2011
4. Araki E, Nishikawa T: Oxidative stress: A cause and therapeutic target of diabetic complications. *Journal of Diabetes Investigation* (査読あり) 1:90-96, 2010
5. Yamashiro T, Nishikawa T, Isami S, Wei C, Fukumoto K, Matsuo H, Yoshinaga T, Kukidom D, Motoshima H, Matsumura T, Ueda A, Araki E: The effect of group-based lifestyle interventions on risk factors and insulin resistance in subjects at risk for metabolic syndrome: The Tabaruzaka Study 1.

- Diabetes Obes. Metab.* (査読あり) 12: 790-797, 2010
6. Ishii N, Matsumura T, Kinoshita H, Fukuda K, Motoshima H, Senokuchi T, Nakao S, Tsutsumi A, Kim-Mitsuyama S, Kawada T, Takeya M, Miyamura N, Nishikawa T, Araki E: Nifedipine induces peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation in macrophages and suppresses the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (査読あり) 30:1598-1605, 2010
 7. Fujisawa K, Nishikawa T, Kukidome D, Imoto K, Yamashiro T, Motoshima H, Matsumura T, Araki E: TZDs reduce mitochondrial ROS production and enhance mitochondrial biogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* (査読あり) 379:43-48, 2009
 8. Adachi H, Fujiwara Y, Kondo T, Nishikawa T, Ogawa R, Matsumura T, Ishii N, Nagai R, Miyata K, Tabata M, Motoshima H, Furukawa N, Tsuruzoe K, Kawashima J, Takeya M, Yamashita S, Koh GY, Nagy A, Suda T, Oike Y, Araki E: Angptl 4 deficiency improves lipid metabolism, suppresses foam cell formation and protects against atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* (査読あり) 379:806-811, 2009
 9. Ishii N, Matsumura T, Kinoshita H, Motoshima H, Kojima K, Tsutsumi A, Kawasaki S, Yano M, Senokuchi T, Asano T, Nishikawa T, Araki E: Activation of AMP-activated protein kinase suppresses oxidised low-density lipoprotein-induced macrophage proliferation. *J Biol Chem* (査読あり) 284: 34561-34569, 2009
 10. Kojima K, Motoshima H, Tsutsumi A, Igata M, Matsumura T, Kondo T, Kawashima J, Ichinose K, Furukawa N, Inukai K, Katayama S, Goldstein BJ, Nishikawa T, Tsuruzoe K, Araki E: Rottlerin activates AMPK possibly through LKB1 in vascular cells and tissues. *Biochem Biophys Res Commun* (査読あり) 376:434-438, 2008
- [学会発表] (計 17 件)
1. 西川武志, 久木留大介, 荒木栄一: インスリンからみた糖尿病の病態, 第45回糖尿病学の進歩, 2011/2/18-2011/2/19, 福岡国際会議場
 2. 西川武志: 糖尿病神経障害, 第48回日本糖尿病九州地方会, 2010/10/29-2010/10/30, 別府ビーコンプラザ
 3. 西川武志, 久木留大介, 荒木栄一: 酸化ストレスと糖尿病網膜症, 第25回日本糖尿病合併症学会, 2010/10/22-2010/10/23, びわ湖ホール・ピアザ淡海
 4. Nishikawa T, Kukidome D, Araki E: Mitochondrial reactive oxygen species: A cause and therapeutic target of diabetic complications. The 26th Kumamoto Medical Biosciences Symposium, 2010/6/19, 熊本大学医学部山崎記念会館, Kumamoto, Japan
 5. Nishikawa T, Kukidome D, Motoshima H, Matsumura T, Araki E: Pathogenic role of mitochondrial reactive oxygen species in diabetes and its complications. 14th International Congress of Endocrinology, 2010/3/26-2010/3/30, 京都国際会議場, Kyoto, Japan
 6. 西川武志, 山城武司, 久木留大介, 吉永智昭, 本島寛之, 松村剛, 宮村信博, 荒木栄一: 熊本県における高齢者の腎機能障害の現状, 日本老年医学会 第20回九州地方会, 2010/3/13, 熊本大学医学部医学教育図書棟

7. 西川武志, 久木留大介, 荒木栄一: 糖尿病合併症発症のメカニズム, 第44回糖尿病学の進歩, 2010/3/5-2010/3/6, 大阪国際会議場
 8. 西川武志, 山城武司, 荒木栄一: メタボリックシンドローム予備群への生活習慣改善指導によるメタボリックシンドローム発症抑制とその機序の解析 (田原坂スタディ), 第13回日本病態栄養学会, 2010/1/9-2010/1/10, 京都府 国立京都国際会館
 9. Nishikawa T, Araki E: Mitochondrial ROS and diabetic complications- Effect of mitochondrial ROS amelioration by activation of an AMPK-PGC-1 α - pathway on the prevention of diabetic complications. The 15th Korea-Japan Symposium on Diabetes Mellitus, 2009/11/19-2009/11/21, International Convention Center, Jeju Island, Korea
 10. Nishikawa T, Yamashiro T, Kukidome D, Fujisawa K, Motoshima H, Matsumura T, Araki E: Impaired insulin secretion as well as insulin resistance influences the onset of metabolic syndrome and the progression of arteriosclerosis in Japanese with pre-metabolic syndrome. The 69th Annual Meeting of American Diabetes Association, 2009/6/5-2009/6/7, Morial Convention Center, New Orleans, USA
 11. 西川武志, 久木留大介, 園田和洋, 切通伸介, 藤澤和洋, 山城武司, 後藤秀生, 荒木栄一: ミトコンドリア異常と血管合併症, 第52回日本糖尿病学会総会, 2009/5/21-2009/5/24, 大阪国際会議場
 12. 西川武志: 糖尿病および糖尿病合併症の新規発症機構の解明-ミトコンドリア由来活性酸素の関与-, 第46回日本糖尿病学会関東甲信越地方会, 2009/1/24, パシフィコ横浜
 13. 西川武志: 酸化ストレスによる β 細胞障害, 第46回日本糖尿病学会九州地方会, 2008/10/10-2008/10/11, 久留米市石橋文化センター
 14. 西川武志, 山城武司, 本島寛之, 松村剛, 水流添覚, 荒木栄一: メタボリックシンドローム(MS)予備群への生活習慣指導のMS発症抑制効果とその機序の解析 (田原坂スタディ), 第58回日本体質学会総会, 2008/9/27-2008/9/28, メルパルク京都
 15. 西川武志, 山城武司, 藤澤和夫, 本島寛之, 松村剛, 荒木栄一: メタボリックシンドローム予備群における頸動脈病変と動脈硬化危険因子との関連. 第16回西日本肥満研究会, 2008/7/5-2008/7/6, フェニックス・シーガイア・リゾート
 16. 西川武志: 糖尿病および糖尿病合併症の新規発症機構の解明-ミトコンドリア由来活性酸素の関与-, 第51回日本糖尿病学会総会, 2008/5/22-2008/5/24, 東京国際フォーラム
 17. 西川武志, 後藤秀生, 園田和洋, 水流添覚, 近藤龍也, 藤澤和夫, 山城武司, 本島寛之, 松村剛, 荒木栄一: 血管内皮特異的MnSOD発現マウスでの検討-酸化ストレス・脂質異常症への効果, 第51回日本糖尿病学会総会, 2008/5/22-2008/5/24, 東京国際フォーラム
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
西川 武志 (NISHIKAWA TAKESHI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・特任准教授
研究者番号: 70336212
 - (2) 研究分担者
宮村 信博 (MIYAMURA NOBUHIRO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号: 40274716
 - (3) 連携研究者
なし