

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590617

研究課題名（和文） 糖尿病モデルマウスにおける低酸素環境とポドサイト障害

研究課題名（英文） Podocyte injury induced by chronic hypoxia in diabetic db/db mice

研究代表者

高橋 直生 (TAKAHASHI NAOKI)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30377460

研究成果の概要（和文）：

糖尿病自然発症系 db/db マウスを用いて、長期に低酸素環境で飼育することにより引き起こされるヒトの糖尿病性糸球体硬化症に酷似した病変について解析した。低酸素関連性腎障害は、vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)ではなく、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)を介したマクロファージの浸潤や transforming growth factor-beta1 (TGF-β1)、connective tissue growth factor (CTGF) などの因子の発現亢進の結果である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the glomerular lesion induced by chronic hypoxia in db/db mice. Hypoxia-associated glomerular injury may result from the increased macrophage infiltration via monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), but not from vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
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：境界医学・病態検査学

キーワード：糖尿病、糖尿病性腎症、低酸素、ポドサイト

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病性腎症をはじめとする慢性腎臓病においては、アンジオテンシンⅡ受容体阻害薬が腎病変の進行を阻止することが世界的疫学研究で知られている。その機序には腎虚

血の改善が根底にあることから、虚血性低酸素の細胞障害機構について、最近関心が持たれるようになってきた。

(2) 我々は、重症心不全患者において低酸素状態が強いほど糸球体の腫大とメサンギオ

リーシスが強くなっていることを報告 (Kidney Int. 53:880-891, 1998) して以来、低酸素性腎障害の研究を進めている。最近我々は、ヒト近位尿細管細胞の培養実験で硬化促進因子プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター1 (PAI-1) が、炎症性サイトカイン(TNF α) および低酸素性 (1% 酸素濃度) 刺激いずれにても産生誘導され、両刺激で相乗的に誘導亢進されることを見出した (Kidney Int.68: 569-583, 2005)。また、血管透過性および血管新生性因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) は低酸素刺激により産生誘導されるが、炎症性刺激では誘導されないことも見出している (Biochem. Biophys. Res. Commun.335: 1026-1034, 2005)。

(3) 糖尿病性腎症モデルマウスにおいて内皮細胞性 NO 合成酵素の異常と VEGF の発現亢進が糸球体硬化の進展に関与していることが報告されている。また、大量の蛋白尿の成因として糸球体基底膜側上皮細胞 (ポドサイト) の異常が注目されている。これらの知見から、慢性低酸素環境がポドサイトにどのような影響与えるのか、さらには、糖尿病性糸球体硬化の進行にどのように関わっているかを検討するため、本研究を開始した。

2. 研究の目的

糖尿病自然発症系 db/db マウスを用いて、長期に低酸素環境で飼育することにより引き起こされるヒトの糖尿病性糸球体硬化症に酷似した糸球体腫大と硬化病変を、低酸素関連性ポドサイト異常を中心に、免疫組織学的、及び、分子生物学的に解析した。

3. 研究の方法

正常圧性低酸素 (11-12 %O₂ 濃度) 飼育装

置を用い、8週齢の雄 db/db マウスを16週間低酸素で飼育した群 (H 群: n=8)、正常酸素で飼育した群 (N 群: n=8) に分け、12、24 週齢の腎組織学的解析に加え、laser microdissection 法による単離糸球体の mRNA (VEGF-A、VEGF-R1、VEGF-R2、PAI-1、MCP-1、TGF- β 1、CTGF、Angiopoietin-1、Angiopoietin-2、CD34、Nephrin) を real time PCR 法で定量した。また、血液データ、尿アルブミン、尿 NAG、尿 VEGF-A 濃度なども合わせて検討した。

4. 研究成果

尿アルブミンは、低酸素飼育開始後2週目から有意に増加し、その後、高値が継続した (図 1)。

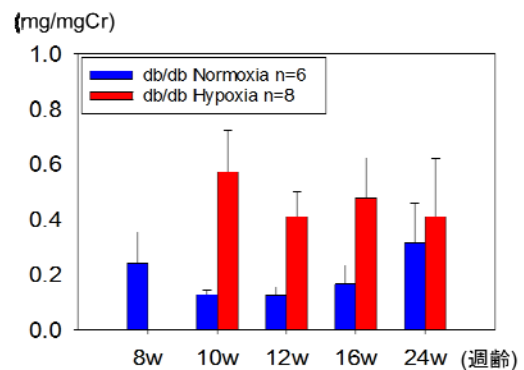


図 1 低酸素・正常酸素環境の db/db マウスの尿アルブミン濃度

しかし、糸球体 VEGF-A mRNA、尿 VEGF-A、免疫染色による糸球体 VEGF-A 陽性領域の何れも、両群間に有意な差を認めなかった。

H 群は N 群に比べ、糸球体サイズの増加、PAS 陽性領域の増加、ポドサイト数の減少、微小血管瘤の増加、糸球体 CD34 陽性領域の減少を認めた。

さらに laser microdissection 法による単離糸球体 (50-150 個) の mRNA の解析から、H 群は N 群に比べ、TGF- β 1、CTGF、Angiopoietin-1、

Angiopoietin-2 mRNA は、24 週齢で有意に増加していた。MCP-1 mRNA は、12 週齢、24 週齢共に有意に H 群で増加し (図 2)、

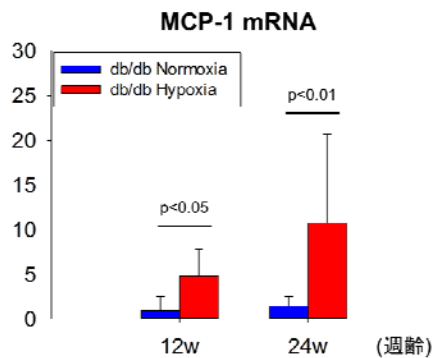


図 2 MCP-1 mRNA の経時変化

糸球体内 F4/80 陽性マクロファージ数も H 群で有意に増加していた (図 3)。

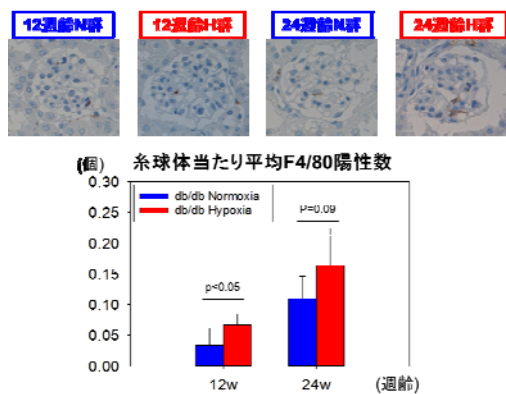


図 3 糸球体内マクロファージ数の経時変化

以上のことから、慢性低酸素環境は、糖尿病マウスにおいて尿蛋白増加や糸球体の腫大や硬化性病変を促進し、その成因には、MCP-1、TGF-β1、CTGF、Angiopoietin-1、Angiopoietin-2 などの因子の発現亢進が関与している可能性が示唆された。

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 Naoki Takahashi, Hideki Kimura, Shinichi Mizuno, Masanori Hara, Yoshiaki Hirayama, Hiroyuki Kurosawa, Shouji Tsutaya, Minoru Yasujima, Seiji Yokoi, Daisuke Mikami, Kenji Kasuno, Hironobu Naiki, Masayuki Iwano and Haruyoshi Yoshida. Severe intraglomerular detachment of podocytes in a Gitelman syndrome patient. Clin Exp Nephrol. 査読有, 16, 2012. in press. DOI 10.1007/s10157-012-0624-4
- ② 高橋直生, 木村秀樹, 内木宏延, 吉田治義. 腎障害をきたす全身疾患—最新の進歩 III. パラプロテイン血症 2. アミロイドーシス. 日本内科学会雑誌, 査読無, 100, 2011, 1282-1288.
- ③ Kimura H, Miyazaki R, Imura T, Masunaga S, Shimada A, Mikami D, Kasuno K, Takahashi N, Hirano T, Yoshida H. Smaller LDL size as a possible risk factor for the prevalence of coronary artery diseases in hemodialysis patients - Associations of CETP and the hepatic lipase gene polymorphism with LDL size. Nephrology (Carlton), 査読有, 16, 2011, 558-566. DOI 10.1111/j.1440-1797.2011.01454.x.
- ④ Kimura H, Li X, Torii K, Okada T, Kamiyama K, Mikami D, Kasuno K, Takahashi N, Yoshida H. Glucocorticoid enhances hypoxia- and/or transforming growth factor-β-induced plasminogen activator inhibitor-1 production in human proximal renal tubular cells. Clin Exp Nephrol. 査読有, 15, 2011, 34-40. DOI: 10.1007/s10157-010-0351-7

- ⑤ 高橋直生, 木村秀樹, 糟野健司, 風間順一郎, 吉田治義. 日本臨床 2010年7月20日 増刊号, 査読無, P 152-155. 特集: 広範囲 血液・尿生化学検査, 免疫学的検査(4) - その数値をどう読むか -Osteoprotegerin (OPG)
- ⑥ Masanori Yamashita, Yukio Hida, Hidehiro Sugimoto, Naoki Takahashi, Hideki Kimura, Yasuo Nakatomi, Haruyoshi Yoshida and Takeshi Ishizaki. A specific serum IgA antibody discriminates pneumonia from colonization state in patients with *Pseudomonas aeruginosa* in sputum culture. J Microbiol Methods, 査読有, 82, 2010, 198-204.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.06.002>
- ⑦ Naoki Takahashi, Hideki Kimura, Yumiko Kawajiri, Daisuke Mikami, Chie Yamamoto, Kenji Kasuno, Naofumi Imai, Takeshi Kuroda, Shinichi Nishi, Makoto Yamamoto and Haruyoshi Yoshida. Tubulointerstitial nephritis with IgM-positive plasmacytoid large lymphocyte infiltration in a patient with primary biliary cirrhosis and Sjogren's syndrome. Clin Nephrol, 査読有, 74, 2010, 74-80. DOI 10.5414/CNP74074
- ⑧ 高橋直生, 木村秀樹, 糟野健司, 三上大輔, 内木宏延, 吉田治義. ネフローゼ症候群: 診断と治療の進歩, III. 二次性ネフローゼ症候群の病態 3. その他の二次性ネフローゼ症候群. 日本内科学会雑誌, 査読無, 98, 2009, 75-81.
- ⑨ Naoki Takahashi, Hideki Kimura, Ryuhei

Kitai, Mamiko Sato, Makoto Yoneda, Chie Yamamoto, Daisuke Mikami, Masaru Kuriyama, Toshihiko Kubota, Hiroshi Itoh, and Haruyoshi Yoshida. Acute on chronic subdural hematoma as a rare complication in a microscopic polyangiitis patient receiving antithrombotic treatment. Clin Nephrol, 査読有, 72, 2009, 211-215.

- ⑩ Kimura H, Li X, Torii K, Okada T, Kamiyama K, Mikami D, Takahashi N, Yoshida H. Dexamethasone enhances basal and TNF-alpha-stimulated production of PAI-1 via the glucocorticoid receptor regardless of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 status in human proximal renal tubular cells, Nephrol Dial Transplan, 査読有, 24, 2009, 1759-1765. Doi: 10.1093/ndt/gfn756

[学会発表] (計4件)

- ① Naoki Takahashi. 44th American Society of Nephrology annual meeting (Philadelphia, Nov 8-13, 2011) Clinical and molecular-pathological effects of chronic hypoxia on diabetic nephropathy in db/db mice.
- ② 高橋直生. 第54回日本腎臓学会 (2011年6月15-17日、横浜) 慢性低酸素環境における db/db マウスの糖尿病性腎症の進展機序の解析
- ③ Naoki Takahashi. 43th American Society of Nephrology annual meeting (Denver, Nov 16-21, 2010) Acceleration of Diabetic Glomerulopathy in db/db Mice in Chronic Hypoxia.

- ④ 高橋直生. 第 53 回日本腎臓学会 (2010 年 6 月 16-18 日、神戸) 慢性低酸素環境における db/db マウスの糖尿病性糸球体硬化の進展

[その他]

ホームページ等

<http://jinnai.labos.ac/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 直生 (TAKAHASHI NAOKI)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30377460

(2) 研究分担者

木村 秀樹 (KIMURA HIDEKI)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：20283187

糟野 健司 (KASUNO KENJI)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60455243

吉田 治義 (YOSHIDA HARUYOSHI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：80135574

(平成 21-22 年度)

(3) 連携研究者

なし