

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 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591034

研究課題名（和文）

グリコーゲン産生酵素キナーゼ 3 阻害による糖尿病性腎症の新規治療法の開発

研究課題名（英文）

New approach for the diabetic nephropathy using the inhibition by GSK3

研究代表者

中山 裕史 (NAKAYAMA YUSHI)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00363531

研究成果の概要（和文）：STZ 投与により糖尿病を発症させ、GSK-3 β 阻害薬である 2 Z, 3 E-6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) の腹腔内投与を行なった。BIO 投与群では蛋白尿の有意な低下を認めた。糸球体における TGF- β 1 mRNA 発現量を測定したところ、BIO 投与群での有意な低下を認めた。これにより BIO 投与による TGF- β 1 発現量の低下が糖尿病性腎症の抑制に働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Diabetes mellitus was induced by STZ administration to the SD rat. The 2 Z, 3 E-6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO), a GSK-3 β inhibitor, was administrated peritoneally. In diabetic rat the urinary protein excretion was reduced by BIO administration. The TGF- β 1 mRNA expression of glomeruli was suppressed by BIO treatment. It was suggested that the suppression of TGF- β 1 by BIO could be involved the amelioration of diabetic nephropathy.

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：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：糖尿病、糖尿病性腎症、GSK-3 β 、BIO、TGF- β 1、バルプロ酸、STZ、NRK-52E cells

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病性腎症は現在透析導入原因疾患の第一位である。今後の増加も確実と考えられ、現在最も注目すべき疾患の一つである。現在の薬物治療の中心は、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の抑制を中心とする降圧療法が中心であるが、未だその効果は十分とは言えない。

(2) glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) は、

glycogen synthase をリン酸化し、その作用を抑制することでグリコーゲン産生を低下させる因子として発見されたが (Embi N., et al. Eur J Biochem. 1980)、近年 GSK-3 がさまざまな蛋白質の転写制御や蛋白合成の調節、また細胞内骨格の remodeling など、数多くの細胞機能に重要な役割を演じていることが明らかとなっている (Richard J., et al. Neurochem Res. 2007)。

(3)GSK-3 が関与するとされる病態として、アルツハイマー病、発癌、また炎症への関与も注目されている。私たちは糖尿病性腎症とGSK-3 の関連に注目し、新たな角度から糖尿病性腎症の進行抑制、もしくは発症予防につながる治療法の開発が出来るものと期待している。

2. 研究の目的

(1)GSK-3 が活性化すると glycogen synthase のリン酸化が抑制され、その作用は活性化する。すなわちグリコーゲンの産生が促進されるため、血糖値は低下方向に進む。このことから、近年糖尿病患者における血糖コントロールの治療法としても注目を浴びている (Wagman AS., et al. Curr Pharm Des. 2004)。

(2)GSK-3 の糖尿病治療への応用に対する検討が進む一方で、糖尿病性腎症に対するGSK-3 抑制に関する研究はほとんど検討されていない。私たちは、GSK-3 の炎症をはじめとした多岐に渡る作用、及び糖代謝への良好な影響から、GSK-3 を阻害することが糖尿病性腎症の発症及び進展抑制に繋がると考えている。

(3)現時点では GSK-3 の糖尿病性腎症への直接効果は分かっていない。本研究では、GSK-3 の糖尿病性腎症を中心に、各種腎臓疾患の発症・進展に演じる役割を明らかにし、新たな治療法を確立することを目的としている。

3. 研究の方法

(1)まず糖尿病性腎症モデルを作成し、GSK-3 阻害の尿蛋白減少効果を検討する。ストレプトゾトシン (STZ) 投与にて糖尿病ラットモデルを作成し、尿検査及び血液の採取を行い腎症の発症を確認する。その後腎臓を単離し、GSK-3 の発現を検討する。また TGF β 1 をはじめとした糖尿病性腎症の進展に重要な役割を果たすことが証明されているサイトカインを、糸球体内での局在とともに検討する。次に STZ 糖尿病モデルに GSK-3 阻害薬である 2 Z, 3 E-6-bromoindirubin-3 -oxime (BIO) を投与し、腎障害の進行抑制効果の検討を行う。さらに腎糸球体を単離し、各種メディエーターの発現を mRNA や蛋白レベルで検討し、BIO の作用機序について検討を行う。

(2)さらにメサンギウム細胞や、NRK などの腎臓由来細胞を用いて、GSK3 阻害のシグナル伝達の詳細な検討を行う。GSK-3 の阻害がどのような機序により腎保護作用を発揮するのかを証明し、新たな治療戦略の手がかりとする。またこれらの培養細胞を用いて、その阻

害物質となりうるペプチドを GSK-3 の活性化 (脱リン酸化) をターゲットとしてスクリーニングを行う。

(3)DM マウス (KK-Ay/TaJcl: II 型糖尿病モデル; Suzuki S., et al. Exp Anim. 1999) を用いて、早期腎症の発症、進展に対する GSK-3 阻害効果を検討する。KK-Ay/TaJcl を 4 週齢より飼育し、GSK-3 阻害作用が認められているバルプロ酸を投与開始する。その後血糖、血圧、尿検査を継続し、腎機能保護作用について検討を行う。通常 KK-Ay/TaJcl マウスと BALB マウスでは血圧に差は認められないが、KK-Ay/TaJcl マウスでは 8~12 週より尿中アルブミン排泄増加が認められるとされており、その変化を詳細に検討する。またバルプロ酸の血糖値への影響も検討する。さらに飼育後 20 週で腎臓を摘出し、NF κ B、MCP-1、TGF β 1、PA-I 1、VEGF、typeIV collagen の発現を比較検討する。また腎臓を還流固定し、組織変化も比較する。

(4)GSK-3 のメサンギウム細胞での発現や、糸球体腎炎モデルを使った GSK-3 のメサンギウム細胞肥大や糸球体硬化におよぼす影響についてはまだ検討されていない。また、GSK-3 によるリン酸化が NF κ B の活性化に与える影響については相反する報告が見られる。本研究においてメサンギウム細胞における作用を明らかにすることによって、GSK-3 と NF κ B の普遍的な相互作用にせまられる可能性がある。

4. 研究成果

(1)SD ラットを用いて、STZ を経静脈的に投与することにより糖尿病を発症させた。血糖値の推移から糖尿病の発症を確認した後にメタボリックケージを用いて蛋白尿の測定を開始した。DM 発症ラットとコントロールラットに各々 GSK-3 阻害薬である BIO を腹腔内投与することにより糖尿病性腎症の発症への影響を検討した。

①DM ラットにおいて 1 日尿量は有意に増加した。BIO 投与群とコントロール群で、血圧及び血糖値に差はみられなかった。

②BIO 投与群では蛋白尿が有意に低下しており、BIO による糖尿病性腎症の発症抑制効果が確認された。

③腎糸球体を採取し、糸球体での GSK-3 mRNA 発現量を real-time RT-PCR で測定した。コントロール群と BIO 投与群では GSK-3 α と GSK-3 β mRNA 発現量に差は認められなかった。同様に糸球体における TGF- β 1 mRNA 発現量を

測定したところ、DM ラット糸球体で増強していた TGF- β 1 蛋白は BIO 投与で有意に抑制された。これらにより BIO 投与による TGF- β 1 発現量の低下が糖尿病性腎症の抑制に働いている可能性が示唆された。

(2)次に NRK-52E cell line を用いて、高血糖による影響を in vivo にて検討した。

①高血糖により細胞内 GSK-3 α 及び GSK-3 β mRNA 発現量が上昇したが、いずれも BIO 投与により低下した。

②また高濃度のブドウ糖に暴露した細胞では TGF- β 1 mRNA の発現が有意に増強した。高血糖と同時に BIO を投与することにより、TGF- β 1 mRNA は著明に低下した。これらの結果により、BIO による腎障害抑制効果には高血糖により惹起された TGF- β 1 の上昇抑制が関与することが示唆された。

(3)実験動物に 2 型糖尿病モデルの KK-Ay/TaJcl マウスを用いて検討を行った。

①低容量のバルプロ酸投与では血糖値や蛋白尿に有意な変化は認められなかった。

②BIO と異なり、バルプロ酸においては大きな効果は得られず、薬剤特異的な効果が示唆された。現在高容量のバルプロ酸での効果を検討中である。

これらの研究結果より、GSK-3 阻害による腎糸球体での TGF- β 1 の抑制が糖尿病性腎症の進展抑制に働く可能性が示唆された。今後は臨床の場で使用されているバルプロ酸を用いた効果についての検討が重要と考えられる。

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 6 件)

①Izumi, Y., Nakayama, Y., Tomita, K. et al. Aldosterone requires vasopressin V1a receptors on intercalated cells to mediate acid-base homeostasis. J Am Soc Nephrol. 22(4):673-680. 2011. 査読有り

② Memetimin, H., Nakayama, Y., Tomita, K. et al. Low pH stimulates vasopressin V2 receptor promoter activity and enhances downregulation induced by V1a receptor stimulation. Am J Physiol Renal Physiol. 297(3):F620-628, 2009. 査読有り

③Wakamatsu, S., Nakayama, Y., Tomita, K. et al. Vasopressin and hyperosmolality regulate NKCC1 expression in rat OMCD. Hypertens Res. 32(6):481-487. 2009. 査読有り

④Mouri, T., Nakayama, Y., Tomita, K. et al. Acute and chronic metabolic acidosis interferes with aquaporin-2 translocation in the rat kidney collecting ducts. Hypertens Res. 32(5):358-363, 2009. 査読有り

⑤Nakayama, Y., Nonoguchi, H., Tomita, K. et al. Different mechanisms for the progression of CKD with ACE gene polymorphisms. Nephron Clin Pract. 111(4):c240-246, 2009. 査読有り

⑥Nonoguchi, H., Nakayama, Y., Tomita, K. et al. A case with acute renal failure and subsequent nephrotic syndrome. Ren Fail. 31(2):162-166, 2009. 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

①中山裕史、QFT 陰性の CRP 高値透析患者において INH 及び RFP が著効した症例、第 43 回九州人工透析研究会総会、2011 年 12 月 12 日、かごしま県民交流センター

[図書] (計 3 件)

① 腎性貧血の管理について、若手医師のための透析診療のコツ (文光堂、2011 年、p p 135-146)
共著: 中山裕史

② 慢性腎臓病 (CKD) の栄養管理 (文光堂、2010 年、p p 41-46)
共著: 中山裕史

③ レジデントノート (輸液療法パーフェクト) (羊土社、2009 年、p p 60-69)
共著: 中山裕史

[その他]

ホームページ等

<http://www.kumadai-nephrology.com/>
熊本大学大学院生命科学研究部 腎臓内科学
熊本大学医学部附属病院 腎臓内科

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 裕史 (NAKAYAMA YUSHI)

熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00363531

(2)研究分担者

富田 公夫 (TOMITA KIMIO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：40114772