

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591317

研究課題名(和文) 加齢指標蛋白質SMP30の糖尿病合併症発症における役割

研究課題名(英文) The role of senescence marker protein-30 (SMP30) in the progression of diabetic nephropathy

研究代表者

長谷川 剛二 (Hasegawa, Goji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00295643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：加齢指標蛋白質30は加齢とともに発現が減少し、老化病態の形成に関与する。本研究では、SMP30の糖尿病腎症発症における役割について、ストレプトゾシン誘発糖尿病SMP30ノックアウトマウスを用いて検討した。非糖尿病ノックアウトマウスにおいて尿細管間質の線維化を伴う尿細管障害を認め、糖尿病はそれを増悪させた。一方、糸球体病変に変化はなかった。SMP30の減少によるHIF-1 蛋白の増加、酸化ストレス上昇、尿細管の炎症反応が尿細管障害に関与した。以上の結果より、加齢によるSMP30の減少が尿細管障害を通して糖尿病腎症を進展させる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Senescence marker protein-30 (SMP30) decreases with age and contributes to the symptoms of aging. In this study, we investigated the effect of SMP30 deficiency on the pathogenesis of diabetic nephropathy using streptozocin induced diabetic SMP30 knockout (KO) mice. Tubular damages with tubulointerstitial fibrosis were observed in non-diabetic KO mice, and diabetes exacerbated these changes. On the other hand, SMP30 deletion did not affect glomerular changes. The accumulation of HIF-1 $\alpha$ , the increase of oxidative stress, and tubular inflammation were associated with tubular injuries. In conclusion, decreased SMP30 with age may contribute to the progression of diabetic nephropathy through tubular damages.

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：糖尿病 糖尿病腎症 尿細管障害 SMP30

1. 研究開始当初の背景

高齢者の2型糖尿病が増加しており、その健康を守ることは医療における重要課題である。心臓、腎臓の機能は加齢とともに低下する。この加齢因子は糖尿病性心筋症、腎症による臓器不全の進展因子となる。したがって、高齢糖尿病患者における心不全、腎不全進展機序を明らかにし、その予防・治療法を探索することは重要である。

SMP30は肝臓での発現量が加齢に伴い減少することからプロテオーム解析により発見された。SMP30は、肝、腎、心臓、脳、肺、副腎、胃、膵など多臓器に発現し、その減少が酸化ストレスなどによる臓器傷害の閾値を低下させ老化病態を引き起こすと考えられている。

2. 研究の目的

糖尿病合併症の発症・進展におけるSMP30減少の関与を検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物と実験計画

・雄SMP30ノックアウトマウス(KO)を研究分担者より供与。対照の野生型マウス(WT)は雄C57BL/6マウス。ビタミンC欠乏を避けるためSMP30ノックアウトマウスはビタミンC補充条件下(飲水ビタミンC1.5g/l)で飼育。

・7週令マウスにストレプトゾシンを腹腔内投与、7日後、随時血糖300mg/dlとなったものを糖尿病(DM)とした。対照(Cont)はバッファのみ投与。

・4群を作成し、糖尿病誘発12週間後に実験に供した: WT-Cont、KO-Cont、WT-DM、KO-DM群。

(2) 腎組織学的検討、計測

・PAS染色: メサングウム領域の面積、糸球体面積、尿細管細胞傷害の定量(尿細管細胞傷害スコア)、尿細管間質炎症の定量(尿細管間質炎症スコア)。

・Sirius Red染色: 尿細管間質線維化面積

(3) 免疫組織学的検討、定量

・4-hydroxynonenal(4HNE)

・Hypoxia-inducible factor(HIF)-1 $\alpha$

(4) TUNEL染色: 全腎組織

・HIF-1、p67-phox、SMP30、

connective tissue growth factor (CTGF)、monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)、peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1)。  
・Thermal Cycler Dice Real Time System II (TaKaRa Bio Inc.)を使用。

(6) 生化学的測定項目(20週令)

・空腹時血糖、HbA1c、クレアチニン

・尿アルブミン排泄量

・尿細管傷害マーカー: 尿中 neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)、kidney injury molecule 1 (KIM-1)、N-acetyl-d-glucosaminidase (NAG)

・肝臓ビタミンC含有量

4. 研究成果

(1) 血糖値、HbA1cはWT-DMとKO-DM間で差がなかった。肝臓ビタミンC含量はWTとKO間で有意な差がなかった。SMP30の欠乏は糖尿病による腎重量増加に影響を及ぼさなかった。近位尿細管傷害マーカーであるNAG、NGAL、KIM-1はWT-Contに比しKO-Contで有意に増加した。SMP30の欠乏は糖尿病によるこれら近位尿細管傷害マーカーの増加を増強した。尿アルブミン排泄も同様のパターンを示した。血清クレアチン値に変化はなかった(Table1)。

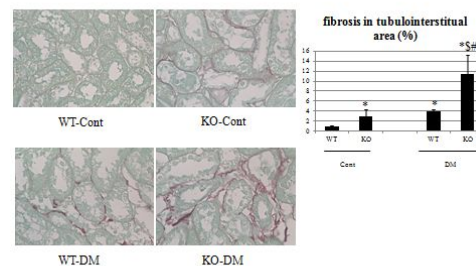
Table 1. Characteristics of the experimental groups of mice at 20 weeks age

	WT-Cont	KO-Cont	WT-DM	KO-DM
n	10	8	10	8
Body weight (g)	30.3±0.5	26.5±1.2	19.3±0.9 <sup>†*</sup>	18.0±1.0 <sup>†*</sup>
Blood glucose (mmol/L)	6.4±0.2	7.7±0.5	33.2±1.3 <sup>†*</sup>	30.2±1.6 <sup>†*</sup>
HbA1c (%)	5.0±0.1	4.4±0.2	11.6±0.3 <sup>†*</sup>	9.9±0.1 <sup>†*</sup>
Creatinine ( $\mu$ mol/L)	15.0±1.8	13.3±0.9	11.5±0.9	10.6±0.9
Kidney weight ( $\mu$ g/Bkg)	6.0±0.1	6.7±0.2	9.9±0.4 <sup>†*</sup>	10.8±0.8 <sup>†*</sup>
UAE ( $\mu$ g/day)	7.6±1.4	23.6±1.4 <sup>†</sup>	94.6±21.3 <sup>†*</sup>	168.7±24.6 <sup>†**</sup>
NAG (ml/day)	30.9±2.0	53.5±15.7 <sup>†</sup>	57.0±9.8 <sup>†</sup>	116±30.8 <sup>†**</sup>
NGAL (pg/day)	21.9±2.2	61.5±15.2 <sup>†</sup>	302.8±25.0 <sup>†*</sup>	1400.4±385.6 <sup>†**</sup>
KIM-1 (ng/day)	0.9±0.07	2.6±0.2 <sup>†</sup>	3.7±0.5 <sup>†*</sup>	15.3±2.0 <sup>†**</sup>
VC content (ng/g tissue)	140.2±2.6	111.8±0.5	132.6±3.1	115.0±3.1

<sup>†</sup>P < 0.05 versus WT-Cont, <sup>\*</sup>P < 0.05 versus KO-Cont, <sup>\*\*</sup>P < 0.05 versus WT-DM

(2) 尿細管間質線維化面積はKO-Cont群においてWT-Contに比して有意に増加した(P<0.05)。さらにSMP30欠乏は糖尿病による線維化面積増加を増強させた(WT-DM vs. KO-DM, P < 0.05)(Figure 1)。SMP30欠乏はメサングウム領域の拡大、糸球体肥大には影響を及ぼさなかった。

Figure 1



<sup>\*</sup>P < 0.05 versus WT-Cont, <sup>\*\*</sup>P < 0.05 versus KO-Cont, <sup>†</sup>P < 0.05 versus WT-DM

(3) 尿細管傷害スコアはKO-Cont群においてWT-Contに比して有意に増加した(P<0.05)。さらにSMP30欠乏は糖尿病による尿細管傷害を増悪させた(WT-DM vs. KO-DM, P < 0.05)。一方、尿細管間質炎症スコアはSMP30の欠乏だけでは上昇せず、糖尿病による炎症を増強した(KO-DM vs WT-DM, P<0.05)。

(4) TUNEL染色によるアポトーシスの評価で

は、糖尿病によりアポトーシス細胞の増加は認めるものの SMP30 欠乏の影響は検出されなかった。

(5) HIF-1 $\alpha$  は尿細管細胞の低酸素反応および尿細管間質線維化に重要な役割を持つことが知られている。免疫組織学的検討において、腎皮質尿細管領域における HIF-1 $\alpha$  の染色強度は KO-Cont 群において WT-Cont に比して有意に増加した ( $P < 0.05$ )。SMP30 欠乏は糖尿病による HIF-1 $\alpha$  蛋白発現増加をさらに増強した (WT-DM vs. KO-DM,  $P < 0.05$ ) (Figure 2A)。これらの変化は尿細管間質線維化面積の変化と同様であった。糸球体における HIF-1 $\alpha$  蛋白発現は糖尿病における増加を示すのみで SMP30 の影響はなかった (Figure 2B)。

全腎組織における HIF-1 $\alpha$  mRNA 発現は KO-Cont 群において WT-Cont に比して有意に増加した ( $P < 0.05$ )。しかし、糖尿病群での比較では WT と DM 間で差がなかった。この結果より KO-DM における HIF-1 $\alpha$  蛋白発現増加はポストトランスレショナルな HIF-1 $\alpha$  蛋白の安定化によると推察された (Figure 2C)。

Figure 2A

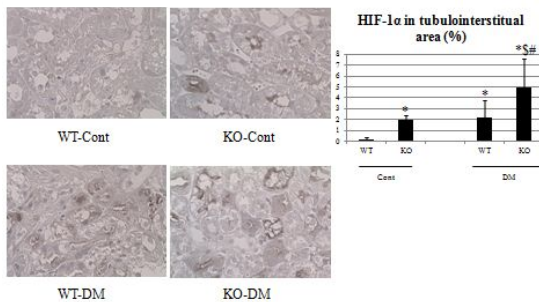


Figure 2B

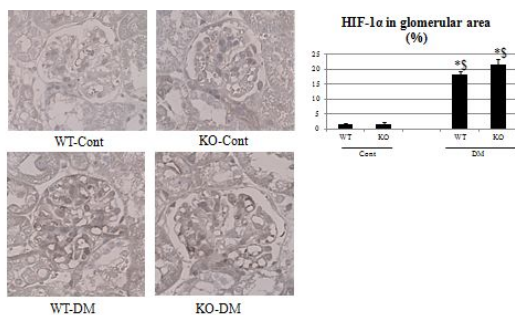
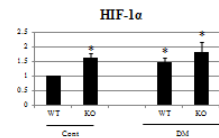


Figure 2C



\* $P < 0.05$  versus WT-Cont, # $P < 0.05$  versus KO-Cont, \$ $P < 0.05$  versus WT-DM

(6) 4HNE 免疫染色により酸化ストレスを評価した。腎皮質尿細管領域における 4HNE の染色強度は KO-Cont 群において WT-Cont に比して有意に増加した ( $P < 0.05$ )。糖尿病では 4HNE 染色強度は増強したが SMP30 欠乏による変化はなかった。高血糖による誘発された酸化ストレス増強が SMP30 欠乏による影響を凌駕した結果と推測された。糸球体における酸化ストレスは SMP30 欠乏の影響を受けなかった。p67-phox mRNA 発現は 4HNE 染色の結果と同様であった。

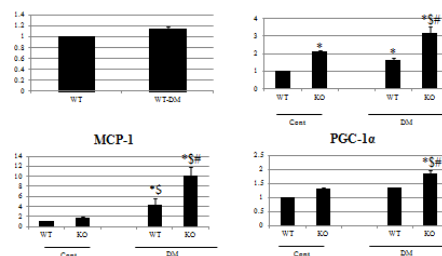
(7) WT における腎臓での SMP30 mRNA の発現は糖尿病により影響を受けなかった (Figure 3)。

(8) HIF-1 $\alpha$  の標的分子であり線維化にも関与する CTGF mRNA の腎臓での発現は尿細管間質線維化、HIF-1 $\alpha$  蛋白発現と同じパターンを示した (Figure 3 ; WT-Cont vs. KO-Cont, WT-DM vs. KO-DM,  $P < 0.05$ )。

(9) Pro-inflammatory である MCP-1 mRNA の発現は糖尿病群においてのみ SMP30 欠乏で増加した (Figure 3 ; WT-DM vs. KO-DM,  $P < 0.05$ )。

(10) ミトコンドリア生成、機能に関わり細胞の生存に寄与する転写コアクチベーターである PGC-1 の発現は糖尿病群においてのみ SMP30 欠乏で増加した (Figure 3 ; WT-DM vs. KO-DM,  $P < 0.05$ )。

Figure 3



\* $P < 0.05$  versus WT-Cont, # $P < 0.05$  versus KO-Cont, \$ $P < 0.05$  versus WT-DM

## まとめと考察

ストレプトゾシン誘発糖尿病モデルマウスにおいて、SMP30 欠乏は腎尿細管上皮傷害、間質の炎症・線維化を増悪させた。この変化は非糖尿病マウスにおいても観察された。機序として SMP30 欠乏によるミトコンドリア機能障害が細胞傷害、酸化ストレス亢進、HIF-1 $\alpha$  経路活性化を引き起こすことが推察された。

加齢による SMP30 減少が、腎尿細管傷害を通して糖尿病腎症を含む慢性腎臓病の増悪因子になる可能性が示唆された。SMP30 減少による尿細管傷害の分子機構を明らかにすることは新規の治療方法の発見につながると思われた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Senmaru T, Yamazaki M, Okada H, Asano M, Fukui M, Nakamura N, Obayashi H, Kondo Y, Maruyama N, Ishigami A, Hasegawa G. Pancreatic insulin release in vitamin C-deficient senescence marker protein-30/gluconolactonase knockout mice. *J Clin Biochem Nutr.* 50 : 114-118, 2012 査読あり

Kondo Y, Hasegawa G, Okada H, Senmaru T, Fukui M, Nakamura N, Sawada M, Kitawaki J, Okanou T, Kishimoto Y, Amano A, Maruyama N, Obayashi H, Ishigami A. Lepr(db/db) Mice with Senescence Marker Protein-30 Knockout (Lepr(db/db)Smp30(Y/-) ) Exhibit increases in small dense-LDL and severe fatty liver despite being fed a standard diet. *PLoS One.* 2013 Jun 3;8(6):e65698. doi: 10.1371/journal.pone.0065698. 査読あり

Okada H, Senmaru T, Fukui M, Kondo Y, Ishigami A, Maruyama N, Obayashi H, Yamazaki M, Nakamura N, Hasegawa G. Senescence marker protein-30 / gluconolactonase deficiency exacerbates diabetic nephropathy through tubular injury in a mouse model of type 1 diabetes. *J Diabetes Invest.* 2014 ( 受理、印刷中) . 査読有

〔学会発表〕(計6件)

Senmaru T, Hasegawa G, Ishigami A, Kondo Y, Okada H, Asano M, Yamazaki M, Fukui M, Nakamura N. Insulin Release from Pancreatic Islet in Vitamin C-Deficient Senescence Marker Protein-30/Gluconolactonase Knockout Mice. 71th annual meeting and scientific sessions of American Diabetes Association. 2011 June 24-28; SanDiego, USA

岡田博史、千丸貴史、石神昭人、近藤嘉高、尾林博、浅野麻衣、山崎真裕、福井道明、長谷川剛二、中村直登. ビタミンC 欠乏は糖尿病性腎症の尿細管病変の発症に關与する : SMP30 KO マウスを用いての検討 .第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 . 2012 年 5 月 17-19 日 ; 横浜

Okada H, Senmaru T, Kondo Y, Ishigami A, Obayashi H, Asano M, Yamazaki M, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N. Differential effect of vitamin C deficiency on the pathogenesis of diabetic nephropathy. 72th annual meeting and scientific sessions of American Diabetes Association. 2012 June 8-12; Philadelphia, USA

岡田博史、千丸貴史、石神昭人、近藤嘉高、尾林博、浅野麻衣、山崎真裕、福井道明、長谷川剛二、中村直登. Senescence Marker Protein-30 欠乏は尿細管間質線維化により糖尿病腎症進展に關与する . 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 . 2013 年 5 月 16-18 日 ; 熊本

Okada H, Senmaru T, Kondo Y, Ishigami A, Obayashi H, Asano M, Yamazaki M, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N. Senescence marker protein-30 deficiency accelerates diabetic renal injury through tubulointerstitial fibrosis in a mouse model of type 1 diabetes. 73th annual meeting and scientific sessions of American Diabetes Association. 2013 June 21-25 ; Chicago, USA

Okada H, Senmaru T, Asano M, Yamazaki M, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N. Senescence marker protein-30 deficiency accelerates diabetic renal injury through tubulointerstitial fibrosis in a mouse model of type 1 diabetes. 49th annual meeting of the European Association for the study of Diabetes. 2013 Sept 24-27 ; Barcellona, Spain

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

長谷川 剛二 (HASEGAWA GOJI)  
京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号 : 00295643

### (2)研究分担者

石神 昭人 (ISHIGAMI AKIHITO)  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長  
研究者番号 : 60270658

福井 道明 (FUKUI MICHIAKI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：30247829

(3)連携研究者

山崎 真裕 (YAMAZAKI MASAHIRO)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：50309134