

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650278

研究課題名（和文） 早期糖尿病における糸球体濾過障害の分子生物学的解明

研究課題名（英文） Biomolecular analysis on disturbance of glomerular filtration at the early stage of diabetes

研究代表者

仲本 博 (NAKAMOTO HIROSHI)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：10299183

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、早期糖尿病の過剰濾過を分子レベルで可視化し、スリット膜の構造から C-peptide の作用をメカニズムを含めて解明することである。コントロールラットと対照的に糖尿病ラットではスリット膜構成蛋白の染色が不均一となっており、糖尿病の罹病期間が長くなるにつれて不均一性が増加した。このことは、糖尿病による糸球体スリット膜の構造上の変化を指し示し、早期糖尿病における糸球体レベルでの高分子量物質の漏出の原因と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We have visualised the early augmented glomerular filtration in-vivo that may be related to the development of diabetic nephropathy with albuminuria by multi-photon microscopy. We hypothesised that there are structural and component protein distributional changes, which may be associated with albuminuria. We used control rats and diabetic Wistar rats. After kidneys were extracted, slit membrane component proteins. Stained images of each component were binarised and the distributions of slit membrane proteins were analysed by area ratio. Area ratio was found decreasing linearly with diabetic duration. Amongst pair combinations of 3 proteins, the best correlation was between the diabetic duration and the area ratio of nephrin and podocin ($r=0.871$). This means discrepancy of slit membrane protein distribution deteriorates progressively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：糖尿病、糸球体濾過、C-peptide、ポドサイト、スリット膜蛋白、ネフリン、ポドシン、CD2AP

1. 研究開始当初の背景

Ido 等が Science 誌に 1997 年糖尿病における C-peptide の蛋白漏出調節作用・血流調節作用等を報告するまで C-peptide の生理的活性は、注目を浴びていなかった。しかしその後、その生理的活性に関する報告が相次いだため申請者は、糖尿病において腎、神経や網膜などで調節作用があるなら、心臓においても同様の作用があるとの仮説を立て、摘出灌

流心を用いて検討したところ、C-peptide がインスリンとともに協調作用を示し冠血流を調節することを見出した。さらに、C-peptide の心臓自律神経系の改善作用を見出した (Peptides, 2005)。また申請者は、以前から腎微小循環の研究にも従事している。共焦点レーザー顕微鏡は、蛍光抗体法を用いることが出来るため、これを応用し濾過の可視化に成功した (Circulation

Journal,2006,2008)。最近では2008年のAHA (Circulation Vol.118 PP.1495、於 New Orleans)、2009年の生体医工学世界大会 (於 Munich, IFMBE Proceeding, Vol. 25,pp1109) において発表を行なった。申請者はこの手法で腎糸球体のスリット膜を調べれば、過剰濾過の原因の解明が可能であることに気づいた。

早期糖尿病の過剰濾過と蛋白漏出については、われわれのパイロットスタディからその是正が C-peptide によって可能だと予想される。これは、糖尿病の合併症である腎症の発症を防ぐことが可能であることを意味しており、社会的な波及効果は重大で、糖尿病の治療が今後一変する。C-peptide は、Ido 等が1997年 Science 誌上で糖尿病における C-peptide の腎、神経や網膜での蛋白漏出の調節および血流の調節作用等を報告してから、その生理的作用についての報告は年々増加しつつある。申請者は糖尿病の早期に着目し、生理的作用を示さない低濃度のインスリンと協調して C-peptide が1型糖尿病の初期で、増加していた冠血流を是正することを見出した(Metabolism, 2004)。また、最近われわれは、C-peptide の心臓自律神経系の改善作用を報告している (Peptides, 2005)。糖尿病性腎症の予防は、マルチフォトン共焦点レーザー顕微鏡は、蛍光抗体法を用いることが出来るため、スリット膜の篩構造の構成要素であるネフリンを可視化し、その構造、分布の変化を調べる。分子量の大きなものが、通過するには、篩の目が大きくなるなど何らかの変化がある筈であるからである。そこで、スリット膜の構成蛋白であるネフリン、ポドシン、ZO-1などを蛍光抗体法で染色することで、その構造変化も解析する。蛋白尿が顕在化する前に構造変化を捉えることが可能ではないかと推測する。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの重要な要因である糖尿病は、今や社会的に我が国の医療における最重要課題の一つである。長期に渡る糖尿病が腎不全を誘発し、透析導入の第一原因であることは良く知られている。ところが早期糖尿病の腎臓においては、われわれの in-vivo 動物実験系で、過剰な濾過が生じており、それだけでなく、アルブミン程度の大きな分子量の物質も漏出していることが判明した。われわれは最近のパイロットスタディにて、これまで生理学的活性をもたないとされていた C-peptide が、この過剰濾過と蛋白漏出を是正することも確認した。

本研究の目的は、生理的な条件下での、早

期糖尿病の過剰濾過を分子レベルで可視化するだけでなく、スリット膜に蛍光抗体法を適用しそのメカニズムから C-peptide の作用も含めて解明することである。本研究では、この糸球体からの高分子量物質の漏出の理由を明確にするために、通常のコントロールラットと早期糖尿病ラットを対象として、nephrin、CD2APのようなスリット膜を構成する蛋白質を蛍光抗体法により染色し、共焦点顕微鏡を用いてそれぞれの蛋白分布と局在を調べることで早期糖尿病における濾過膜の変化を検討した。

3. 研究の方法

まず予備実験で腎糸球体のネフリンを蛍光抗体法にて染色出来るようにする。糸球体濾過を可視化する。可視化には、分子量の違うデキストランをテキサスレッドで標識し、ボラスでラットの静脈内に投与し、濾過を多光子共焦点レーザー顕微鏡で可視化し撮像する。このようにして、C-peptide が糖尿病早期に認められる過剰濾過と蛋白漏出を是正することを実証する。

次に、ネフリンを蛍光抗体法で染色して、スリット膜の変化の有無を検証する。短期効果を調べるために1年目は実験の1時間前より C-peptide の持続投与を開始する。長期効果を調べるために2年目は、12週目で埋め込みマイクロポンプにて1日間持続で C-peptide を投与する。これで、スリット膜の変化が機能的なのか構造的なのかが判明すると考えている。

糖尿病ラットは、Wister ラットに STZ を投与し作成した。糸球体濾過構造の変化の比較では、コントロールラット、糖尿病ラットの両群から得られた nephrin、CD2AP の染色画像を数値化することで評価した。数値化としては、二値化処理を行い、構造の変化を調べる指標としては、各蛋白質の染色部の一致する面積率(area ratio)を論理計算で算出した。これによって、構造の保たれている部位の割合が測定出来ることになる。何故なら、スリット膜構成蛋白の分布は、同じ場所であるので、本来一致せねばならず、コントロールの状態では、一致しており、どの構成蛋白も同様に分布し、その分布の違いは見られないからである。

4. 研究成果

その結果、コントロールラットと対照的に糖尿病ラットでは染色が不均一となっており、罹病期間が長くなるにつれて不均一性が増加した(Figure 1)。染色の対象として選んだ、蛋白は、ネフリン、ポドシン、CD2APであった。そのうちの2つずつの

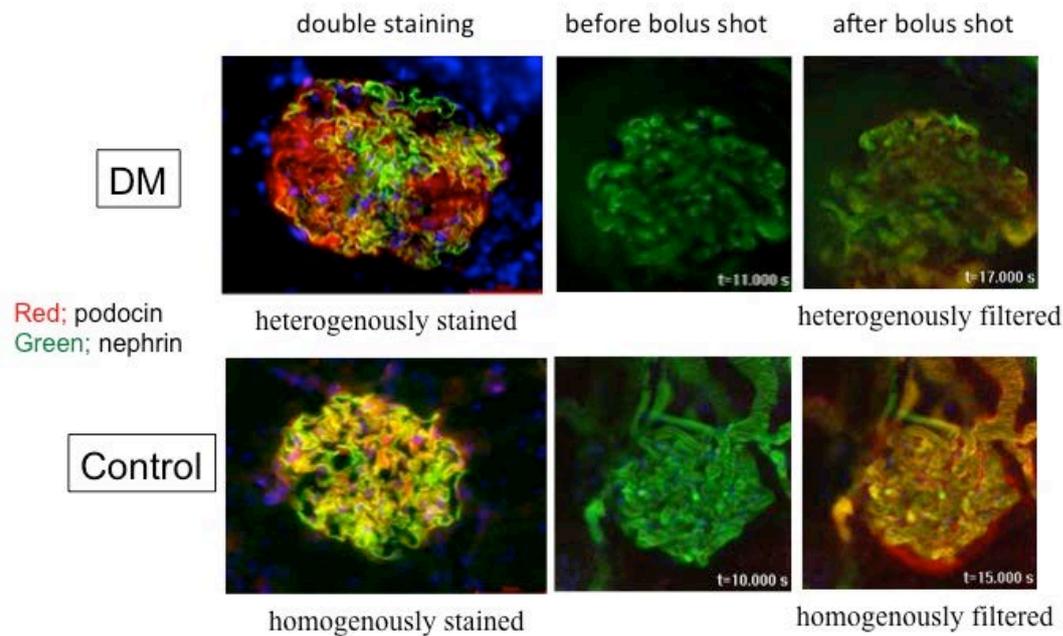


Figure 1 Double staining of slit membrane proteins

構成蛋白の組み合わせでは、ネフリンとポドシンの場合が最も相関係数が高く、直線近似した時のその値は 0.871 であった (Figure 2)。

このことは、糖尿病による糸球体スリット膜の構造上の変化を指し示し、早期糖尿病における糸球体レベルでの高分子量物質の漏出の原因と考えられた。しかし、その漏出を是正する、C-peptide は構造そのものには関与しないことが分かった。

DM: diabetes mellitus, 糖尿病

control: 対照(群)

nephrin: ネフリン

podocin: ポドシン

bolus: ボーラスで、一塊で、一度に

homogeneously: 均一に

heterogeneously: 不均一に

stain: 染色

filter: 濾過 (する)

slit membrane protein: スリット膜蛋白

regression: 回帰

area ratio: 面積 (一致) 率

duration of diabetes: 糖尿病罹病期間

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Hiroshi Nakamoto, Fumihiko Kajiya

In Vivo Quantitative Visualization Analysis of the Effect of C-Peptide on Glomerular Hyperfiltration in Diabetic Rats by Using Multiphoton Microscopy, Microcirculation, 査読有り、2013、E-publication, DOI: 10.1111/micc.12043, URL:http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/micc.12043

[学会発表] (計 7 件)

① Hiroshi Nakamoto, Widening of Interfoot-process Spaces in Early Diabetic Rats and C-peptide Effect on It, 2013/03/16 第 77 回日本循環器学会学術集会, 横浜

② Hiroshi Nakamoto, Wide inter-footprocess area in a rat at the early stage of diabetes, 日本微小循環学会, 2013/02/09, 東京

③ Hiroshi Nakamoto, Distributional Changes of Glomerular Slit Membrane Components and Widening of Inter-foot Process Spaces in Early Diabetic Rats, American Heart Association, 2012/11/07, Los angeles, USA

④ Hiroshi Nakamoto, Quantitative analysis on structural change of slit membrane proteins, 第 51 回日本生体医工学会, 2012/05/12, 福岡

⑤ Hiroshi Nakamoto, Progressive

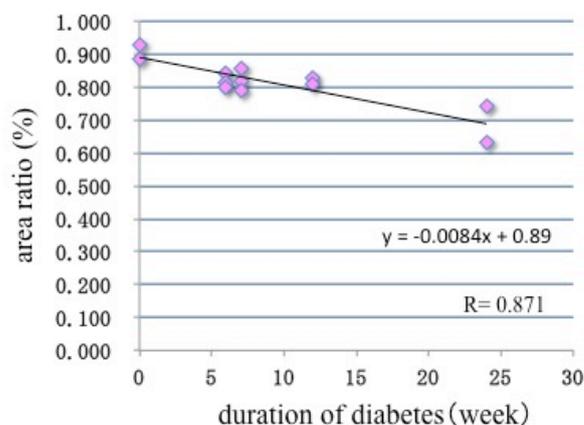


Figure 2 Regression line of area ratio

dissociation of nephrin and podocin, glomerular slit membrane proteins, in distribution at the early stage of diabetes, 第 37 回日本微小循環学会, 2012/03/17, 盛岡

⑥ Hiroshi Nakamoto, Structural Change? On Glomerular Filtration of Early Diabetic Rats, 第 76 回日本循環器学会学術集会, 2012/03/16, 福岡

⑦ Hiroshi Nakamoto, Glomerular Hyperfiltration and Slit Membrane Proteins, 第 50 回日本生体医工学会大会, 2011/04/29, 東京

[その他]

ホームページ

http://www.kawasaki-m.ac.jp/mw/call/teacher/08_nakamoto.php

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲本 博 (NAKAMOTO HIROSHI)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：10299183

(2) 研究分担者

矢田 豊隆 (YADA TOYOTAKA)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：00210279

(3) 連携研究者

小笠原 康夫 (OGASAWARA YASUO)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10152365