

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 3 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23790942

研究課題名（和文） 糖尿病性腎症における核内受容体 PPAR δ の分子機構の解明と臨床応用研究課題名（英文） The role of nuclear hormone receptor PPAR δ on the pathogenesis of diabetic nephropathy

研究代表者

小川 大輔（OGAWA DAISUKE）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70535195

研究成果の概要（和文）：これまで核内受容体 PPAR γ や PPAR α の腎臓における機能とそのアゴニストによる腎保護効果は知られていたが、PPAR δ についてはまったく不明であった。本研究において、PPAR δ アゴニストが糖尿病性腎症の進展を抑制する可能性を示した。糖尿病性腎症モデルにおいて、PPAR δ の活性化によりケモカインである MCP-1 の発現が低下し、糸球体および間質のマクロファージ数が減少した。したがって、PPAR δ アゴニストは糖尿病性腎症の成因の一つである慢性炎症を主に是正することにより治療効果を発揮することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Activation of the nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ) has been shown to improve insulin resistance, adiposity, and plasma HDL levels. Recently, several studies reported that activation of PPAR δ is atheroprotective, however, the effect for the renal function remains unclear. Here we report the renoprotective effects of PPAR δ activation in a model of streptozotocin-induced diabetic nephropathy.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

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：糖尿病性腎症、核内受容体

1. 研究開始当初の背景

わが国における 2008 年末の透析患者数は 283,421 人であり、現在なお増加傾向が続いている。とりわけ糖尿病性腎症は透析導入原疾患の第 1 位であり、糖尿病性腎症を原疾患として透析導入となった場合、心筋梗塞・脳梗塞等の動脈硬化症や感染症のため、5 年生存率は約 50% と予後は不良である。現在糖尿病性腎症の進展予防のために、厳格な血糖コントロールおよび血圧コントロール、renin-angiotensin system (RAS) 抑制薬の投与、

脂質異常症の是正、食塩制限と低たんぱく食などを組み合わせた集約的治療が推奨され、ある程度の効果はあるものの、糖尿病性腎症の増加を阻止するに至っていない。

ヒトゲノム上には 48 種類の核内受容体が同定され、そのなかでも PPARs (PPAR α , PPAR γ , PPAR δ)、LXR (LXR α , LXR β)、レチノイド X 受容体 (RXR)、レチノイン酸受容体 (RAR)、ファルネソイド X 受容体 (FXR) は、ある種の脂肪酸、ヒドロキシコレステロール、胆汁酸などの内因性リガンドの存在が判

明している。さらにこれらの核内受容体の薬理的なアゴニストやアンタゴニストは、メタボリックシンドロームや2型糖尿病に認められるエネルギー代謝・糖代謝・脂質代謝異常を是正することが判明している。

我々は以前より、糖尿病性腎症の進展過程において慢性炎症や細胞周期異常が関与していることを報告してきた。さらに、最近 PPAR γ アゴニストであるチアゾリジン誘導体が糖尿病性腎症に対して、①腎組織に浸潤したマクロファージに直接作用し、炎症性サイトカインを抑制する (*Am J Physiol* 292:F1141-1150, 2007)、②腎糸球体上皮細胞の細胞周期停止を解除し、腎肥大を抑制する (*Diabetes* 55:1666-1677, 2006) という機序により治療効果を発揮することを報告した。

我々の報告を含め、PPAR γ の糖尿病性腎症に対する作用機構に関する知見は徐々に集積されつつあるが、一方 PPAR δ に関しては未だまったく解明されていない。動脈硬化症に対しては PPAR δ アゴニストが動脈硬化巣における炎症性サイトカイン発現やマクロファージなどの炎症細胞浸潤を抑制したとの報告があり、糖尿病性腎症に対しても動脈硬化症と同様に慢性炎症や細胞周期異常を是正することにより治療効果を発揮するのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

核内受容体である PPAR には、 α 、 γ 、 δ の3種類のサブタイプが存在する。PPAR α アゴニストは脂質異常症治療薬のフィブラート系薬剤、PPAR γ アゴニストは糖尿病治療薬のチアゾリジン誘導体として臨床応用されており、どちらも糖尿病性腎症に対して治療効果があることが報告されている。PPAR δ アゴニストは、抗炎症作用や抗動脈硬化作用があることが報告されているが、PPAR δ の腎臓における機能やそのアゴニストの糖尿病性腎症への治療効果は不明である。我々は糖尿病動物モデル(ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウス)を用いて、核内受容体 PPAR δ アゴニスト(GW0742)の糖尿病性腎症への治療効果を検討した。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウス(雄、8週齢)を①非糖尿病群(以下 C 群)、②糖尿病群(以下 D 群)、③糖尿病+GW0742 投与群(以下 G 群)の3群に振り分けた。D 群、G 群のマウスは 200 mg/kg のストレプトゾトシンを腹腔内に注射することで糖尿病を誘発し、随時血糖:300 mg/dl 以上のマウスのみを使用した。G 群のマウスは糖尿病誘発後に GW0742 を 1 mg/kg/日 で 8 週間連日経口投与した。糖尿病誘発前、糖尿病誘発後 4 週、8 週の時点で体重測定、血圧測定、蓄尿検査を行い、糖尿病誘発後 8 週で

sacrifice を行い、腎臓を摘出した。

腎症の治療効果は、尿中アルブミン量、クレアチニンクリアランスを用いて評価した。これらを測定するための蓄尿検査はマウスを個別の代謝ケージに移して 24 時間経過した時点で溜まった尿を回収し各項目を測定した。

腎組織の観察では、まず PAM 染色標本を作成し、1 検体中 10 個の糸球体において全糸球体面積におけるメサンギウム基質の面積率(Mesangial matrix index; MMI)をパソコンソフトを用いて測定し平均値を算出した。また F4/80 抗体を用いて糸球体と間質に浸潤したマクロファージを染色し、糸球体においては 1 検体あたり 10 個の糸球体に浸潤したマクロファージを数え、その平均値を算出した。間質においては 1 mm²あたりの平均個数を算出した。さらに免疫蛍光染色法を用いて糸球体の IV 型コラーゲンを染色し、1 検体あたり 10 個の糸球体において全糸球体面積における IV 型コラーゲン陽性領域の面積率をパソコンソフトを用いて測定し平均値を算出した。定量 PCR 法にて腎皮質における CD14、CD11c、MCP-1、chemokine CC motif receptor 2 (CCR2)、TGF- β 、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、osteopontin (OPN)、ICAM-1 の遺伝子発現を検討した。

次に細胞実験を行った。マウスマクロファージ細胞(RAW264.7)を 1000 mg/L の通常ブドウ糖濃度培地、4500 mg/L の高糖濃度培地、高糖濃度培地に 10 μ M の GW0742 を添加した培地でそれぞれ 24 時間刺激したのち mRNA と核蛋白を抽出した。定量 PCR 法にて MCP-1、その転写抑制因子である B cell lymphoma-6 (Bcl-6)、OPN の遺伝子発現を検討した。またウエスタンブロット法を用いて核内における PPAR δ と Bcl-6 の蛋白発現を検討した。さらに PPAR δ 抗体を用いて免疫沈降を行った後に Bcl-6 抗体を用いてウエスタンブロットを行い、PPAR δ と Bcl-6 の関連について検討した。

4. 研究成果

GW0742 の投与により、糖尿病誘発 8 週の時点で G 群マウスは D 群マウスと比較し尿中アルブミンの有意な減少をみとめた (D 群:86.09 \pm 12.67 μ g/day、G 群:40.91 \pm 3.94 μ g/day; P<0.01)。収縮期血圧は 3 つの群に差はなかった。HbA1c、腎重量、相対的腎重量は C 群に比べ D 群で有意に増加した。体重は C 群に比べ D 群、G 群で有意に減少したが、D 群と比べると G 群は有意に増加した。3 つの群でクレアチニンクリアランス、血中トリグリセリドに有意差はなかった。

腎組織において、まず定量 PCR 法と PPAR δ 抗体を用いた免疫染色法を用いて PPAR δ 発現を検討したところ C 群と比較し D 群におい

て PPAR δ の発現増加がみられたが、GW0742 の投与により PPAR δ の発現に変化はみられなかった。一方 Bcl-6 の発現を免疫染色法にて検討したところ D 群で発現が減少し、G 群で改善がみられた。D 群にみられる MMI の増加は GW0742 投与により抑制された(D 群:12.34 \pm 0.49%, G 群:9.05 \pm 0.30%; P<0.001)。IV型コラーゲンの発現に関しても同様の結果であった(D 群 :12.33 \pm 0.49%、G 群:9.57 \pm 0.18%; P<0.001)。糸球体へ浸潤したマクロファージの数はC群に比べD群で有意に多かったが、D 群に比べG 群では有意に少なかった(D 群 :2.69 \pm 0.05、G 群 :1.80 \pm 0.08; P<0.001)。間質へのマクロファージの浸潤も同様の結果であった(D 群 :13.79 \pm 0.53、G 群:7.75 \pm 0.77; P<0.001)。

定量 PCR 法によりマクロファージのマーカーである CD14、CD11c の遺伝子発現を検討したところC群に比べD群で有意に増加していたがGW0742の投与によりそれらの遺伝子発現が減少した。また炎症関連の MCP-1、CCR2、TGF- β 、TNF- α 、OPN、ICAM-1 の遺伝子発現について検討したところ、GW0742 の投与により MCP-1、CCR2、TGF- β 、OPN の遺伝子発現は減少したが、TNF- α 、ICAM-1 の遺伝子発現に影響はなかった。またマウスマクロファージ細胞においては高糖濃度刺激により Bcl-6 発現が減少し、GW0742 の添加により改善した。さらに PPAR δ 抗体を用いた免疫沈降法を用いて核内における PPAR δ と Bcl-6 の関係を検討したところ、高糖濃度刺激により PPAR δ に結合する Bcl-6 が増加し free Bcl-6 が減少していたが、GW0742 添加によりそれらが改善した。MCP-1、OPN の遺伝子発現は高糖濃度刺激で増加し、GW0742 添加で減少した。

本研究により我々は PPAR δ アゴニスト GW0742 が糖尿病マウスにおいて血糖値に影響を及ぼすことなく尿中アルブミンを減少させ、糸球体のメサンギウム基質の拡大と IV 型コラーゲン発現増加を抑制することを証明した。GW0742 は腎組織において MCP-1、TGF- β 、OPN を含む炎症に関連した遺伝子の発現とマクロファージの浸潤を減少させた。さらにマウスマクロファージ細胞を用いた実験で、高糖濃度刺激が free Bcl-6 を減少させ、GW0742 がそれを改善させること明らかにした。これらは PPAR δ の活性化がストロプトゾトシン誘発糖尿病マウスにおいて抗炎症効果により糖尿病性腎症の進展を抑制することを示唆している。糖尿病性腎症の進展においては MCP-1 が重要な役割を果たしていることが報告されているおり、我々の研究では GW0742 の投与により腎における MCP-1 の遺伝子発現が抑制された。これは PPAR δ の活性化が MCP-1 の発現を抑制し、糸球体や間質のマクロファージ浸潤を抑制

したと考えられる。そのメカニズムとしては免疫沈降法を用いた実験から、リガンドが結合していない PPAR δ には Bcl-6 が結合しており MCP-1 の転写を抑制していないが、PPAR δ アゴニストが結合することで、Bcl-6 が遊離し、MCP-1 の転写抑制因子として働くと考えられる。また OPN も MCP-1 と同様に糖尿病性腎症の進展に関与しているとする報告があるが、本研究においてもマクロファージの高糖濃度刺激で OPN の遺伝子発現が増加していた。さらに PPAR δ アゴニスト投与で OPN の発現が抑制されていることから、PPAR δ の活性化による OPN の発現抑制が糖尿病性腎症の進展の抑制に関与している可能性も示唆された。

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 12 件)

論文はすべて査読あり。

- ① Nakamura A, Shikata K, Nakatou T, Kitamura T, Kajitani N, Ogawa D, Makino H. Combination therapy with an angiotensin converting enzyme inhibitor and an angiotensin II receptor antagonist ameliorates microinflammation and oxidative stress in patients with diabetic nephropathy. *J Diabetes Invest* 2013;4:195-201.
- ② Sato-Horiguchi C, Ogawa D, Wada J, Tachibana H, Koderu R, Eguchi J, Nakatsuka A, Terami N, Shikata K, Makino H. Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress in db/db mice. *Nephron Exp Nephrol* 2013;121:e97-108.
- ③ Murakami K, Wada J, Ogawa D, Horiguchi CS, Miyoshi T, Sasaki M, Uchida HA, Nakamura Y, Makino H. The effects of telmisartan treatment on the abdominal fat depot in patients with metabolic syndrome and essential hypertension: Abdominal fat Depot Intervention Program of Okayama (ADIPO). *Diab Vasc Dis Res* 2013;10:93-6.
- ④ Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Bruemmer D, Wada J, Teshibawara S, Eguchi J, Uchida HA, Shikata K, Makino H. Liver x receptor agonist suppresses osteopontin expression in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:1835-46.
- ⑤ Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y,

- Makino H. Vaspin is an adipokine ameliorating ER Stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex. *Diabetes* 2012; 61: 2823-2832.
- ⑥ Ogawa A, Shikata K, Uchida HA, Shinoura S, Yokomichi N, Ogawa D, Sato-Horiguchi C, Yagi T, Wada J, Makino H: A case of emphysematous cholecystitis in the patient with type 2 diabetes mellitus associated with schizophrenia. *J Diabetes Invest* 2012; 3: 534-535.
- ⑦ Nagase R, Kajitani N, Shikata K, Ogawa D, Kodera R, Okada S, Kido Y, Makino H. Phenotypic change of macrophages in the progression of diabetic nephropathy; sialoadhesin-positive activated macrophages are increased in diabetic kidney. *Clin Exp Nephrol* 2012; 16: 739-748.
- ⑧ Miyamoto S, Shikata K, Miyasaka K, Okada S, Sasaki M, Kodera R, Hirota D, Kajitani N, Takatsuka T, Kataoka HU, Nishishita S, Sato C, Funakoshi A, Nishimori H, Uchida HA, Ogawa D, Makino H. Cholecystokinin plays a novel protective role in diabetic kidney through anti-inflammatory actions on macrophage: anti-inflammatory effect of cholecystokinin. *Diabetes* 2012; 61: 897-907.
- ⑨ Nakatsuka A, Wada J, Hida K, Hida A, Eguchi J, Teshigawara S, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Ogawa D, Kagechika H, Makino H. RXR antagonism induces G0/G1 cell cycle arrest and ameliorates obesity by up-regulating the p53-p21 (Clip1) pathway in adipocytes. *J Pathol* 2012; 226: 784-95.
- ⑩ Ogawa D, Asanuma M, Miyazaki I, Tachibana H, Wada J, Sogawa N, Sugaya T, Kitamura S, Maeshima Y, Shikata K, Makino H. High glucose increases metallothionein expression in renal proximal tubular epithelial cells. *Exp Diabetes Res* 2011;2011:534872.
- ⑪ Sasaki M, Shikata K, Okada S, Miyamoto S, Nishishita S, Usui HK, Sato C, Wada J, Ogawa D, Makino H. The macrophage is a key factor in renal injuries caused by glomerular hyperfiltration. *Acta Med Okayama* 2011;65:81-9.
- ⑫ Kido Y, Ogawa D, Shikata K, Sasaki M, Nagase R, Okada S, Usui-Kataoka H, Wada J, Makino H. Intercellular adhesion molecule-1 plays a critical role for glomerulosclerosis after subtotal nephrectomy. *Clin Exp Nephrol* 2011;15:212-9.
- [学会発表] (計 3 件)
- ① 佐藤千景、小川大輔、松下裕一、橘洋美、小寺亮、廣田大昌、宮本聡、梶谷展生、和田淳、四方賢一、槇野博史、早期糖尿病性腎症におけるTelmisartanの抗酸化作用の検討、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月 17 日、横浜
- ② 小川大輔、松下裕一、四方賢一、和田淳、佐藤千景、橘洋美、豊田智子、槇野博史、糖尿病性腎症におけるPPARδアゴニストの腎保護効果、第 54 回日本腎臓学会学術総会、2011 年 6 月 16 日、横浜
- ③ 松下裕一、小川大輔、橘洋美、豊田智子、佐藤千景、和田淳、四方賢一、槇野博史、PPARδアゴニストは抗炎症効果により糖尿病性腎症の進展を抑制する、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月 19 日、札幌
- [図書] (計 3 件)
- ① 小川大輔、槇野博史、日本臨床社、日本臨床増刊 最新臨床糖尿病学 下、2012、pp. 389-392
- ② 小川大輔、中山書店、糖尿病腎症のすべて、2012、pp. 78-83
- ③ 小川大輔、南山堂、糖尿病×CKD診療ガイドQ&A、2012、pp. 43-46
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
小川 大輔 (OGAWA DAISUKE)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：70535195
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし