

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790866

研究課題名(和文) AGEsのエピジェネティック異常を介した糖尿病性腎症発症機序についての検討

研究課題名(英文) Advanced glycation end products could play an important role of the progression of diabetic nephropathy via epigenetic changes.

研究代表者

甲斐田 裕介(Kaida, Yusuke)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80441658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：母体への高AGE負荷が、仔の腎疾患発症に如何に関与するかを明らかにするため12週齢の雌SDラットに高脂肪食・高フルクトース水(HFF)を6週間投与し仔ラットを生後16週まで観察した。HFF出生群では出生直後に血清アディポネクチン(Adi)が低下していた。4週齢の時点で血清脂質過酸化は上昇し、8週齢には尿アルブミン排泄が増加しはじめ、16週齢まで持続した。16週齢においてHFF出生仔はクレアチニンクリアランス低下、メサンギウム基質増加、腎組織中TGF- $\beta$ 発現亢進を認めた。このことから母体への高AGE負荷は、仔のAdi低下や酸化ストレス亢進を介し、将来の腎障害を惹起する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Overnutrition during perinatal period is known to increase susceptibility to renal injury later in life. Although the precise mechanisms why overnutrition, such as high advanced glycation end products (AGEs) diet, could cause the progression of renal injury later in life remain to be elucidated. Male offspring born to high AGEs fed (high fat diet and high fructose water: HFF) mothers had decreased serum adiponectin compared with male offspring born to normal fed (NF) from day 1 after birth to week 16. HFF had increased serum MDA compared with NF from week 4 after birth. Urinary albumin was increased and enhanced extracellular matrix accumulation was observed in HFF at 16 week. Moreover, HFF significantly upregulated protein expression of TGF- $\beta$  in the kidney at 16 week. HFF had decreased creatinine clearance compared with NF. Our present data suggest that high AGEs diet could exacerbate renal injury via the oxidative stress and the decrease of adiponectin in male offspring later in life.

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 AGEs 母体 アルブミン尿 酸化ストレス アディポネクチン エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症による慢性透析患者の増加は、心血管合併症の合併頻度を上昇させ、その患者予後を極端に低下させるため、その進行阻止が急務の課題である。以前より終末糖化産物 Advanced glycation end products (AGEs) の組織障害性に着目し研究を行っている。AGEs は、糖尿病における長年の高血糖状態において、糖と蛋白が非酵素的に反応し生成される。最近 AGEs の蓄積や生物化学的反応が糖尿病性腎症の発症、進展に重要な働きを担っていることが明らかになっており、多くの論文でその傷害性が報告されている。近年 AGEs が renin-angiotensin system (RAS)、TGF- $\beta$  を介し、メサンギウム領域における細胞外基質の増加や細胞増殖抑制に働く細胞周期蛋白の過剰発現に深く関与していることを報告している。(Fukami et al. *Kidney Int.* 2004)

最近 DCCT/EDIC 研究などで過去の血糖コントロール不良が、将来の腎症を含めた合併症の発症に関与するという、いわゆる“メタボリックメモリー”という概念が提唱されてきている。この概念ともっとも符号する原因因子として AGEs が考えられている。AGEs は体内に蓄積し組織障害を来すため、その蓄積が、のちの血管合併症発症に寄与しているという考え方である。更に AGEs の細胞膜に存在する受容体 Receptor for AGEs (RAGE) がその細胞障害の一端を担っている可能性がある。この AGEs-RAGE 系がメタボリックメモリーの一端を担っている可能性が示唆される。近年エピジェネティクス制御の分子機構が、肥満や糖尿病の発症に関係していることが報告されている。エピジェネティクスとは塩基配列によらない遺伝情報の発現制御であり、このエピジェネティクス異常が癌や後天的疾患の発症に関与しており、現在種々の分野において治療ターゲットとなっている。糖尿病性血管合併症においても、メタボリック

メモリーにエピジェネティクス異常が関与している可能性が示唆されている。Cooper らは内皮細胞において一過性の high glucose 刺激を行うとその後 normal glucose レベルに戻しても 6 日間に渡り high glucose による NF- $\kappa$ B p65 の promoter 領域上の活性が亢進しており、それらは Set7/9 (ヒストンテール H3K4 メチル化酵素)、H3K4me1 のメチル化が関与していることを報告している (Assam El-Osta et al. *JEM.* 2008)。このように高血糖が酸化ストレスなどを介し Set7 などのヒストンメチル化酵素を刺激し、H3K4 のリジン残基をメチル化することで NF- $\kappa$ B を活性化し、その下流にある炎症性サイトカインである MCP-1 などを活性化することが腎症を含む血管合併症の引き金となると考えられている。しかしながらメタボリックメモリーに関する AGEs がエピジェネティクス異常に如何に影響しているかについては明らかではない。筆者らは AGEs がヒストンメチル化を介し NF- $\kappa$ B を活性化し、その下流にある MCP-1 や pro-sclerotic factor である TGF- $\beta$  を活性化することで糖尿病性腎症の発症に関与していると考えている。また近年、母親の妊娠期における環境因子が胎児に対して影響し、肥満症や糖尿病・高血圧・脂質異常症の発症に深く関わっていることが報告されている (de Rooij, S.R et al. *Am J Clin Nutr.* 2007)。また母体の環境が腎臓での糸球体数などに影響することも報告されている。母体における AGEs 暴露が胎児の後の腎症害に関与し、それらの発症に AGEs によるエピジェネティクス異常が関与していると推察している。以上のことから AGEs の新たな糖尿病性腎症発症進展メカニズムとしてのエピジェネティクス異常の機序を明らかにすることで、糖尿病性腎症の病態の解明や新たな治療戦略への足がかりを得たいと考えている。

## 2. 研究の目的

高 AGE 食を摂取したマウス母体から生まれた胎児の腎機能やアルブミン尿、また腎臓の組織学的変化を検討する。またその機序にエピジェネティクス異常が関与しているかについても検討する。

## 3. 研究の方法

12 週齢雌 SD ラットを高 AGE 食群（高脂肪食+高フルクトース水）と普通食群の 2 群にわけ 6 週間飼育し、18 週齢で交配した。離乳（生後 4 週間）まで高 AGE 食と普通食を継続し、離乳後母は sacrifice を行った。母マウスより採血、採尿を行い腎臓を摘出した。また仔ラットに関しては雄のみ離乳後は普通食で飼育した。仔ラットは生後 1 日目、4 週目、8 週目、16 週目で sacrifice を行い、採血、採尿を行い腎臓を摘出した。摘出した腎臓に関しては、高 AGE 食の腎臓組織への影響を PAS、HE、Masson trichrome 染色にて確認した。また血圧、血糖値、血清 AGE 濃度、尿中アルブミン排泄、酸化ストレスマーカーを測定し、高 AGE 食の母体への影響を検討した。また仔マウスに関しては、同様に腎臓を摘出し腎臓組織の変化を PAS、HE、Masson trichrome 染色にて確認した。採血にて血糖値、血清 AGE 濃度、尿中アルブミン排泄、酸化ストレスマーカーを測定した。母仔ともに腎臓組織での AGE、RAGE の発現について免疫染色にて確認した。生まれた仔マウスの腎臓をバイファルサイト法によりどの部位の DNA が脱メチル化されているか、またアセチル化されているかを網羅的に検索する。有力な脱メチル化、アセチル化部位が同定できれば、その遺伝子の転写因子活性を検討する。さらに、ヒストンテールの脱メチル化についてもクロマチン免疫沈降法（H3K4m1, H3K4m2, H3K4m3, Set7/9, H3K9m3）にて確認し、p65(RelA)、FOXO 等の転写活性を real-time PCR にて確認する。以上より、後の腎臓発症進展の起点

となる胎児期のエピジェネティクス異常が確認できる。

## 4. 研究成果

(1) 母ラットは、高 AGE 食群で有意に体重の増加と血糖の上昇を認めた。また血圧も有意に上昇していた。血液検査にて LDL コレステロールが有意に上昇しており、中性脂肪に関しても上昇傾向にあった。腎臓組織や尿中アルブミン排泄などに変化は認めなかった。

(2) 仔ラットに関しては、出生後 1 日目では高 AGE 食群において体重、腎臓重量ともに低値であるが、成長とともに逆転しており 16 週齢では高 AGE 食群において有意に体重、腎臓重量ともに高値であった。また高 AGE 食群において 16 週齢では血圧、血糖ともに高値でありクレアチンクリアランスも低下していた。更に高 AGE 食群においては、生後 1 日目からアディポネクチンが低下しており、生後 4 週目で酸化ストレスマーカーである MDA が有意に上昇していた。尿中アルブミン排泄に関しても 8 週齢頃から高 AGE 食群において有意増加していた。組織学的にも 16 週齢では高 AGE 食群において免疫染色でポドシンの発現は低下し、Masson trichrome 染色で細胞外基質の増加を認めた。またウェスタンブロットにて腎臓における TGF- $\beta$  の発現は高 AGE 食群において有意に亢進していた。現在腎臓組織における AGE、RAGE の発現についても確認している。母体に対する高 AGE 食がアディポネクチン低下や酸化ストレス亢進を介して仔の腎臓発症に関与している可能性が示唆された。今後仔マウスの腎臓をバイファルサイト法によりどの部位の DNA が脱メチル化されているか、またアセチル化されているかを網羅的に検索していき後の腎臓発症進展の起点となる胎児期のエピジェネティクス異常を確認する

## 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9件)

1. Fukami K, Yamagishi S, Sakai K, Kaida Y, Adachi T, Ando R, Okuda S. Potential inhibitory effects of L-carnitine supplementation on tissue advanced glycation end products in patients with hemodialysis. Rejuvenation Res. 2013;16(6):460-6. (査読有)
2. Ando R, Ueda S, Yamagishi S, Miyazaki H, Kaida Y, Kaifu K, Yokoro M, Nakayama Y, Obara N, Fukami K, Takeuchi M, Okuda S. Involvement of advanced glycation end product-induced asymmetric dimethylarginine generation in endothelial dysfunction. Diab Vasc Dis Res. 2013;10(5):436-41. (査読有)
3. Fukami K, Yamagishi S, Kaifu K, Matsui T, Kaida Y, Ueda S, Takeuchi M, Asanuma K, Okuda S. Telmisartan inhibits AGE-induced podocyte damage and detachment. Microvasc Res. 2013;62(9):79-83. (査読有)
4. Kaida Y, Fukami K, Matsui T, Higashimoto Y, Nishino Y, Obara N, Nakayama Y, Ando R, Toyonaga M, Ueda S, Takeuchi M, Inoue H, Okuda S, Yamagishi S. DNA Aptamer Raised Against AGEs Blocks the Progression of Experimental Diabetic Nephropathy. Diabetes. 2013;62(9):3241-50. (査読有)
5. Manabe R, Fukami K, Ando R, Sakai K, Kusumoto T, Hazama T, Adachi T, Kaida Y, Nakayama Y, Ueda S, Kohno K, Wada Y, Yamagishi S, Okuda S. Effects of switching from calcium carbonate to lanthanum carbonate on bone mineral metabolism in hemodialysis patients. Ther Apher Dial. 2013;Suppl1:35-40. (査読有)

6. Sakai K, Fukami K, Yamagishi S, Kaida Y, Adachi T, Ando R, Manabe R, Otsuka A, Sugi K, Ueda S, Okuda S. Evidence for a positive association between serum carnitine and free testosterone levels in uremic men with hemodialysis. Rejuvenation Res. 2013;16(3):200-5. (査読有)

7. Takamiya Y, Fukami K, Yamagishi S, Kaida Y, Nakayama Y, Obara N, Iwatani R, Ando R, Koike K, Matsui T, Nishino Y, Ueda S, Cooper ME, Okuda S. Experimental diabetic nephropathy is accelerated in matrix metalloproteinase-2 knockout mice. Nephrol Dial Transplant. 2013;28(1):55-62. (査読有)

8. Adachi T, Fukami K, Yamagishi S, Kaida Y, Ando R, Sakai K, Adachi H, Otsuka A, Ueda S, Sugi K, Okuda S. Decreased serum carnitine is independently correlated with increased tissue accumulation levels of advanced glycation end products in haemodialysis patients. Nephrology (Carlton). 2012;17(8):689-94. (査読有)

9. Kaida Y, Ueda S, Yamagishi S, Nakayama Y, Ando R, Iwatani R, Fukami K, Okuda S. Proteinuria elevates asymmetric dimethylarginine levels via protein arginine methyltransferase-1 overexpression in a rat model of nephrotic syndrome. Life Sci. 2012;91(9-10):301-5. (査読有)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

甲斐田 裕介 (Kaida Yusuke)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：80441658

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：