

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790931

研究課題名(和文) 低血糖による網膜症増悪の機序解明：ミトコンドリアROSと虚血・低酸素の寄与解析

研究課題名(英文) Contribution analysis of mitochondria reactive oxygen species (mtROS) and hypoxia in the molecular mechanism of retinopathy progression by hypoglycemia.

研究代表者

久木留 大介 (KUKIDOME, DAISUKE)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：10555759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らはミトコンドリア由来活性酸素(mtROS)が糖尿病血管合併症発症の主要因子であることを報告している。今回の研究では低血糖の糖尿病網膜症増悪へのmtROSの関与について、培養血管内皮細胞およびmtROSの特異的除去酵素であるManganese superoxide dismutase(MnSOD)の血管内皮特異的発現トランスジェニックマウスを用い、in vitro、in vivoの両面から解析を行った。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) is one of the major factors in the pathogenesis of diabetic vascular complications. In this study, we examined the impact of mtROS in the pathogenesis of diabetic retinopathy by hypoglycemia using endothelial cells and transgenic mice, which specifically express manganese superoxide dismutase (MnSOD) in vascular endothelial cells.

研究分野：糖尿病

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：活性酸素 低血糖 糖尿病合併症

1. 研究開始当初の背景

わが国において、「糖尿病が強く疑われる人」や「糖尿病の可能性が否定できない人」が計 2210 万人 (H19 年度) と増加一途を認めており、同時に糖尿病合併症併発患者数の増加も報告されている。申請者らのグループではこれまでに、(1) 高血糖が培養血管内皮細胞において mtROS の過剰産生を引き起こし、さらにこの mtROS がこれまで糖尿病合併症の成因と考えられていた細胞内代謝異常を引き起こすこと (Nature, 404: 787, 2000)、(2) 尿中 8-OHdG (mtROS のマーカー) が 2 型糖尿病患者で増加し、尿中 8-OHdG の増加が糖尿病合併症の重症度と相関すること (Diabetes Care, 26:1507, 2003)、(3) 血管内皮細胞に特異的に MnSOD (mtROS 除去酵素) を発現させたトランスジェニックマウス (eMnSODTg マウス) の開発に成功し、in vivo で mtROS の制御により、糖尿病網膜症の発症抑制が認められたこと (Biochem Biophys Res Commun 366(3): 814-20, 2008)、等を報告している。

申請者自身も (4) 糖尿病治療薬メトホルミンが AMPK-PGC-1⁻-MnSOD 経路の亢進により、mtROS を抑制すること (Diabetes 55:120-127, 2006)、(5) TNF⁻ によるインスリン作用障害機序において mtROS の産生増加および ASK1 の活性化が関与していること (Diabetes 55:1197-1204, 2006)、(6) 糖尿病治療薬のチアゾリジン誘導体が PGC-1⁻-MnSOD 経路の亢進により、mtROS を抑制すること (Biochem Biophys Res Commun 379: 43-48, 2009)、など糖尿病およびその合併症発症において mtROS の意義を研究してきたが、まだ不明な点も多い。

2 型糖尿病患者を対象とした Kumamoto Study のサブ解析 (糖尿病合併症 7:62, 1994) および 1 型糖尿病を対象とした The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) (NEJM 329:977-986, 1993) の報告では、血糖是正開始後 1 年間以内の網膜症進展症例が通常血糖コントロール群より厳格血糖コントロール群に多いという結果が得られている。さらに、長期罹病糖尿病患者において、急速な血糖是正を契機に、一過性に網膜症が進展することが知られている。これらの結果は、網膜症を有する糖尿病患者においては、血糖是正を緩徐に行った方が少なくとも 1-2 年後の期間においては、網膜症の進展予防に効果的であると考えられる。また近年では、複数の心血管リスクを有する 2 型糖尿病患者を対象とした ACCORD study (NEJM 358: 2545, 2008) において、厳格血糖コントロール群で死亡率が有意に上昇することが報告され、重症低血糖の頻度が多いことに関連性を有している可能性が示唆された。

一方、申請者らが高血糖により産生されることを報告している mtROS が、低酸素状態下でも産生され、Hypoxia-Inducible

Factor-1 (HIF-1) の安定化を誘導するなど、低酸素のセンサーとしても働いていることが報告された (Cell Metab 1: 401, 2005)。糖尿病合併症の標的組織で低酸素状態が生じているのかは不明であるが、以前より Williamson JR らは高血糖状態では低酸素状態と類似した細胞内代謝異常が生じており、この状態を "pseudohypoxia" と呼んでいる (Diabetes 42: 801, 1993)。糖尿病では VEGF の発現増加または組織的低酸素状態を誘導する凝固線溶系因子の亢進や白血球の網膜血管内皮への接着増加 (retinal leukostasis) が糖尿病網膜症の発現に関与していると報告されている。

申請者は、(1) 高血糖状態において凝固線溶系の亢進や白血球の網膜血管内皮への接着増加などにより網膜の虚血、低酸素状態が生じること。(2) それを代償するために増加していた網膜循環血液量が、急速な血糖是正で減少することで更に組織的低酸素状態になること。(3) この低酸素状態により mtROS 産生が増加されることが、急速な血糖是正による網膜症進展の主因と推測している。

2. 研究の目的

申請者らは糖尿病細小血管合併症発症仮説として「高血糖によるミトコンドリア由来活性酸素 (mtROS) 過剰産生」説を提唱している。一方、Kumamoto Study や DCCT では、通常血糖コントロール群に比し厳格血糖コントロール群において血糖是正開始後 1 年間以内に網膜症が進展する症例が多いと報告されているが、その機序は不明である。また、低酸素状態下培養細胞では、mtROS が増加すると報告されたが、その糖尿病合併症における意義は不明である。本研究では、急激な血糖是正や低血糖で糖尿病合併症の標的組織で低酸素状態が誘導され、この低酸素状態から産生される mtROS が、さらに糖尿病合併症を進展させるという仮説を検証する事を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では (1) 高血糖により増加した内皮細胞の mtROS が内皮細胞における抗血栓性の障害を生じ、網膜の虚血、低酸素状態を引き起こす。(2) 急速な血糖是正が更に低酸素状態を誘導する。(3) そして悪化した組織的低酸素状態が更なる mtROS を産生し、細胞内代謝異常を引き起こす、という仮説を証明することを目的に、下記の I. *in vitro* 研究、II. *in vivo* 研究を行う。

I. *in vitro* 研究: 血管内皮細胞または mtROS 除去酵素である MnSOD をアデノウイルスで強制発現させた血管内皮細胞を低グルコース (2.5mM) 下または、低酸素状態 (1% O₂) で培養し、(1) 細胞内 ROS を蛍光プローブ H2DCF-DA にて定量し、また、mtROS を還元型 Mito Tracker Red を使用し共焦点レーザー顕微鏡で検討、(2) HIF-1 蛋白、VEGF 蛋白の発現を蛍光免疫染色法で、VEGF mRNA 量を real time RT-PCR 法で検討、(3) 細胞外フラ

ックスアナライザーを用いて低血糖時のエネルギー代謝経路（解糖・TCA サイクル・ミトコンドリアにおける好気呼吸）および脂肪酸酸化、ミトコンドリア機能を検討し、評価する。

：in vivo 研究 (eMnSODTg マウスを用いた研究)：WT マウス、eMnSODTg マウスにストレプトゾトシン投与により糖尿病を導入する。その後、生食投与群、インスリン投与群とインスリン+グルコース投与群に分ける(1)適度な低血糖刺激が得られるインスリン投与量の条件を検討、(2)網膜組織切片を用い免疫組織法で HIF-1 発現、VEGF 発現を検討し評価する。

4. 研究成果

：in vitro 研究

(1) 低血糖による活性酸素への影響

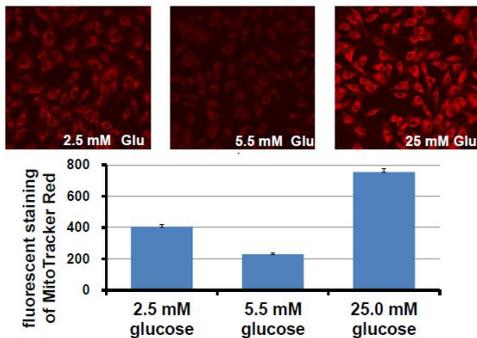
低糖濃度培養による細胞内活性酸素の検討

これまでの報告のように 25mM 糖濃度培養下では細胞内 ROS 産生が 5mM 糖濃度培養下と比較して $218 \pm 3.6\%$ と著明に増加を認めた。一方、2.5mM 糖濃度培養下では $69.7 \pm 2.6\%$ と低下を認めた。

低糖濃度培養によるミトコンドリア由来活性酸素(mtROS)の検討

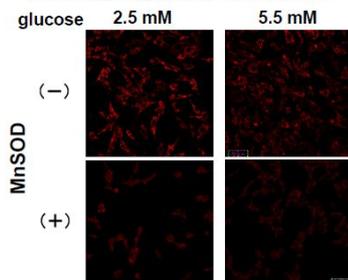
2.5mM 糖濃度培養下では、mtROS は 5mM 糖濃度培養下と比較して $177.6 \pm 27.8\%$ と著明に増加を認めた(図 1)。この結果は、における細胞内 ROS 産生低下と反しており、その機序については今後も検討が必要である。

図1: 培養グルコース濃度の差異によるmtROS産生の変化



一方、MnSOD 過剰発現細胞では、低糖濃度培養による mtROS 産生増加抑制を認めた(図 2)。

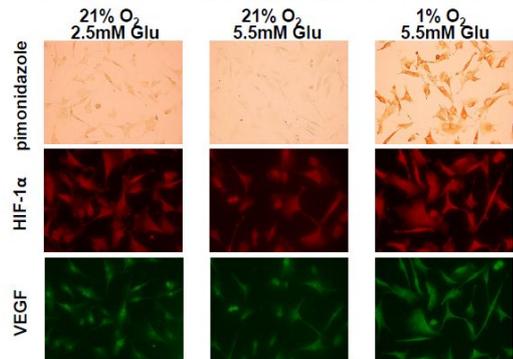
図2: 低糖濃度培養によるmtROS産生増加はMnSOD過剰発現細胞で抑制された



(2) 低血糖による細胞内低酸素状態への影響

低糖濃度培養による細胞内低酸素状態を pimonidazole、HIF-1 抗体、VEGF 抗体を用いて免疫染色で評価した。2.5mM 糖濃度培養細胞は、5mM 糖濃度培養細胞に比し pimonidazole、HIF-1、VEGF の高発現を認

図3: 低血糖による細胞内低酸素状態への影響



め、細胞内低酸素状態であることを認めた(図 3)。

また、VEGF mRNA に関しても 2.5mM 糖濃度培養細胞で 5mM 糖濃度培養細胞に比し 1.34 倍の増加を認めた。

一方、MnSOD 過剰発現細胞では、低糖濃度培養による VEGF mRNA 増加抑制を認めた。

(3) 低血糖時のミトコンドリア機能評価

細胞外フラックスアナライザーを用いて低血糖時の酸素消費速度(OCR)測定でのミトコンドリア機能評価を検討した。2.5mM 糖濃度培養下でも著大な変化は認めなかった。今後、脂肪酸酸化やグルタミン代謝についても検討する必要がある。

：in vivo 研究(eMnSODTg マウスを用いた研究)

(1) 低血糖刺激条件の確立

ストレプトゾトシン(STZ)誘導糖尿病マウスと非糖尿病マウスに対しインスリン腹腔内投与(i.p.)により、低血糖誘発実験を行った。また、インスリンと glucose(50%ブドウ糖液)を併用することで低血糖誘発を回避させ、非低血糖誘発群とした。とし、STZ 誘導糖尿病マウス：低血糖刺激群は、インスリン(IR) 7 単位/kgBW i.p.、非低血糖刺激群は、IR 7 単位/kgBW + Glu7.0g/kgBW i.p. 非糖尿病マウス：低血糖刺激群は、IR 2 単位/kgBW i.p. 非低血糖刺激群は、IR 2 単位/kgBW + Glu3.5 g/kgBW i.p. +60 分後に Glu1 g/kgBW で目標血糖値 45 mg/dL 程度が得られることを確認できた。

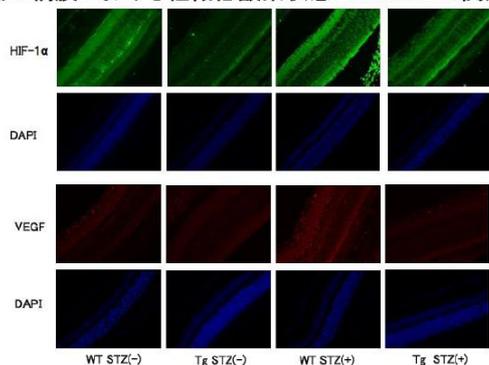
(2) 高血糖による組織低酸素状態への影響

STZ 誘導糖尿病 WT マウスでは、網膜組織で HIF-1 発現、VEGF 発現増加を認めたが、STZ 誘導糖尿病 eMnSODTg マウスにおいて HIF-1

発現、VEGF 発現増加抑制を認めた(図4)。

今後、低血糖刺激による組織低酸素状態への影響も合わせて検討する必要がある。

図4: 網膜における組織低酸素状態とmtROSとの関連



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 2件)

1. Matsumura T, Taketa K, Motoshima H, Senokuchi T, Ishii N, Kinoshita H, Fukuda K, Yamada S, Kukidome D, Kondo T, Hisada A, Katoh T, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E: Association between circulating leukocyte subtype counts and carotid intima-media thickness in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. (査読あり) Dec 27;12(1):177. 2013
2. Kukidome D, Miyamura N, Sakakida K, Shimoda S, Shigematu Y, Nishi K, Yamashita Y, Eto M, Sasano H, Araki E: A Case of Cortisol Producing Adrenal Adenoma Associated with a Latent Aldosteronoma: Usefulness of the ACTH Loading Test for the Detection of Covert Aldosteronism in Overt Cushing Syndrome. *Int Med* (査読あり) 51:395-400, 2012

[学会発表](計 19件)

1. 池田知栄子, 河島淳司, 本島寛之, 久木留大介, 後藤理英子, 高木優樹, 柿村葉子, 下村登貴子, 猪原淑子, 村岡まき子, 内田珠美, 澤田真治, 吉村栄, 荒木栄一: カロリー600 kcal 未満、塩分3g 未満の外食メニュー「ブルーサークルメニュー(BCM)」の認知度調査. 第17回日本病態栄養学会年次学術集会, 2014/1/11-2014/1/12, 大阪, 大阪国際会議場, 口演
2. 宮川展和, 古賀荒太郎, 久木留大介, 古庄正嗣, 守田雄太郎, 泉香織, 河島淳司, 近藤龍也, 下田誠也, 荒木栄一: プロモクリプチン投与後にインスリン必要量を著減出来た糖尿病合併先端巨大症の1例: 第303回日本内科学会九州

地方会, 2013/11/16, 沖縄, ロワジールホテル&スパタワー那覇, 口演

3. 久木留大介, 河島淳司, 井形元維, 近藤龍也, 西川武志, 荒木栄一: 各甲状腺ホルモン測定試薬の反応性の相違から FT3 偽高値を呈した1例. 第56回日本甲状腺学会学術集会, 2013/11/14-2013/11/16, 和歌山, 和歌山県民文化会館, ポスター
4. 河島淳司, 久木留大介, 井形元維, 近藤龍也, 水流添覚, 下田誠也, 荒木栄一: クローン病に対する抗 TNF 抗体療法開始後に発症した亜急性甲状腺炎の一例. 第56回日本甲状腺学会学術集会, 2013/11/14-2013/11/16, 和歌山, 和歌山県民文化会館, ポスター
5. 佐田公範, 西川武志, 久木留大介, 梶原伸宏, 本島寛之, 松村剛, 荒木栄一: 高血糖によるミトコンドリア由来活性酸素種(mtROS)と組織内低酸素との関連性. 第51回日本糖尿病学会九州地方会, 2013/11/8-2013/11/9, 沖縄, 沖縄コンベンションセンター, 口演
6. 守田雄太郎, 佐藤明子, 古庄正嗣, 狩場宏美, 古賀荒太郎, 木下博之, 川崎修二, 小野恵子, 久木留大介, 河島淳司, 下田誠也, 西川武志, 荒木栄一: 非機能性膵神経内分泌腫瘍(NET)とインスリン自己免疫症候群(IAS)類似の病態を合併した2型糖尿病の一例. 第51回日本糖尿病学会九州地方会, 2013/11/8-2013/11/9, 沖縄, 沖縄コンベンションセンター, 口演
7. 池田知栄子, 河島淳司, 本島寛之, 久木留大介, 後藤理英子, 高木優樹, 柿村葉子, 下村登貴子, 猪原淑子, 村岡まき子, 内田珠美, 澤田真治, 吉村栄, 荒木栄一: 600 kcal 未満、塩分3g 未満の外食メニュー「ブルーサークルメニュー(BCM)」の認知度に関する調査. 第51回日本糖尿病学会九州地方会, 2013/11/8-2013/11/9, 沖縄, 沖縄コンベンションセンター, 口演
8. 泉香織, 深川三希子, 荒木裕貴, 石井規夫, 川崎修二, 井形元維, 久木留大介, 河島淳司, 西川武志, 下田誠也, 荒木栄一: インスリンデグルデクの使用により注射回数を減じることが出来た1型糖尿病の2例. 第51回日本糖尿病学会九州地方会, 2013/11/8-2013/11/9, 沖縄, 沖縄コンベンションセンター, 口演
9. 佐藤美希, 久木留大介, 泉香織, 狩場宏美, 古庄正嗣, 守田雄太郎, 河島淳司, 下田誠也, 西川武志, 荒木栄一: 糖尿病合併症進展度と小径繊維神経における痛覚閾値との関連性. 第51回日本糖尿病学会九州地方会, 2013/11/8-2013/11/9, 沖縄, 沖縄コンベンションセンター, 口演

10. 松永和代, 久木留大介, 出口隆志: DPP4 阻害剤 (DPP4i) による療養病棟入院後 期高齢 2 型糖尿病患者への感染症リスク 検討. 第 51 回日本糖尿病学会九州地方 会, 2013/11/8-2013/11/9, 沖縄, 沖縄 コンベンションセンター, 口演
11. Kukidome D, Sato M, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E: Pain threshold values of small fibers are associated with the severity of diabetic complications. 49th EASD Annual Meeting, 2013/9/23-2013/9/27, Barcelona, Spain, Barcelona's Gran Via exhibition centre, Poster
12. 久木留大介, 佐藤美希, 下田誠也, 西川武志, 荒木栄一: 小径線維神経にお ける痛覚閾値と糖尿病合併症進展度と の関連性. 第 28 回日本糖尿病合併症学 会, 2013/9/13-2013/9/14, 旭川, 旭川 グランドホテル, ワークショップ
13. 楊淑恵, 井形元維, 佐藤明子, 田中里 奈, 守田雄太郎, 久木留大介, 河島淳 司, 下田誠也, 荒木栄一: タクロリム スにより隣萎縮と高血糖を呈したと考 えられた生体肝移植後の一例. 第 301 回 日本内科学会九州地方会, 2013/5/26, 長崎, 長崎大学ポンペ会館, 口演
14. 久木留大介, 本島寛之, 古川昇, 大柿 悟, 水足秀一郎, 八木剛志, 土亀直俊, 竹田晴生, 下村登貴子, 松山則幸, 佐 藤克之, 柿村葉子, 田上大輔, 中村公 俊, 平島義彰, 西田健朗, 矢野智彦, 坂本不出夫, 福田稔, 荒木栄一: 熊本 県における糖尿病医療連携について. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013/5/16-2013/5/18, 熊本, ホテル日 航熊本, シンポジウム
15. 西川武志, 佐田公範, 久木留大介, 荒 木栄一: 酸化ストレスからみた合併症 治療の展望. 第 56 回日本糖尿病学会年 次学術集会, 2013/5/16-2013/5/18, 熊 本, ホテル日航熊本, シンポジウム
16. 高木優樹, 本島寛之, 柿村葉子, 下村 登貴子, 猪原淑子, 村岡まき子, 前田 貴子, 後藤理英子, 内田珠美, 久木留 大介, 澤田真治, 吉村栄, 荒木栄一: 熊本県における「ブルーサークルメニ ュー」(おいしくて 600kcal 以下, 添加塩 分 3g 以下の外食メニュー) 開発の試み. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013/5/16-2013/5/18, 熊本, ホテル日 航熊本, 口演
17. 坂本和香奈, 前田貴子, 久木留大介, 河島淳司, 本島寛之, 松村剛, 下田誠 也, 荒木栄一: 血糖悪化を契機に診断 し得た無症候性ガストリノーマ合併緩 徐進行 1 型糖尿病の 1 例. 第 300 回日本 内科学会九州地方会, 2013/1/12, 福岡, 九州大学医学部百年講堂, 口演

18. 本島寛之, 柿村葉子, 下村登貴子, 猪 原淑子, 村岡まき子, 前田貴子, 後藤 理英子, 内田珠美, 高木優樹, 久木留 大介, 澤田真治, 吉村栄, 荒木栄一: 熊本県における「ブルーサークルメニ ュー」(おいしくて 600kcal 以下の外食メ ニュー) 開発の試み. 第 16 回日本病態 栄養学会年次学術集会. 2013/1/12-2013/1/13, 京都, 国立京都 国際会館, 口演
〔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
久木留 大介 (KUKIDOME DAISUKE)
熊本大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 10555759

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: