

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461224

研究課題名(和文) 炎症を標的とした糖尿病性腎症の新規治療薬のシーズ探索と創薬を目指した研究

研究課題名(英文) Investigation of the novel therapeutic targets for diabetic nephropathy.

研究代表者

四方 賢一(Shikata, Kenichi)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：00243452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、糖尿病性腎症の発症・進展過程で起こる炎症の全体像を明らかにして、創薬のシーズを得るとともに、炎症を標的とした腎症の新しい治療薬を開発することである。1型および2型糖尿病モデルマウスの糸球体からRNAを抽出し、糖尿病マウスに共通して発現が増加する複数のmicroRNAを同定した。この中で発現レベルの高いmicroRNAの発現の機能解析を行った結果、当該microRNAは糖尿病発症早期から持続的に発現が増加しており、糸球体内皮細胞とメサンギウム細胞において、eNOSとSIRT-1の発現の減少、TGF- β の発現亢進を惹起することが明らかとなり、腎症の有望な治療標的であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chronic low grade inflammation, "microinflammation", is one of the major mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy. The aim of this study is to clarify the role of microinflammation in the pathogenesis of diabetic nephropathy and find the novel therapeutic target for diabetic nephropathy. We investigated the change of expression of micro RNA in the glomeruli of the two types of mouse model using streptozotocin-induced type 1 diabetes and db/db mice. We performed Micro RNA array using RNA from diabetic mice and found several micro RNAs which up-regulated in the glomeruli of both diabetic mouse models. Moreover, these microRNA upregulated in the glomeruli for long period from the early phase of diabetes. One of these microRNA induced up-regulation of TGF-beta and down-regulation of eNOS and SIRT-1 after transfection in glomerular endothelial cells and mesangial cells. These results suggest that micro RNA might be one of the new therapeutic target for diabetic nephropathy.

研究分野：糖尿病学、腎臓病学

キーワード：糖尿病性腎症 炎症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は、わが国における末期腎不全の最大の原因疾患であり、糖尿病性腎症の成因を解明して新しい治療手段を開発することは喫緊の課題である。我々は以下に述べる一連の研究によって、糖尿病性腎症の成因に炎症が関与していることを明らかにしてきた。我々はさらに、炎症が動脈硬化および内臓肥満に伴うインスリン抵抗性（メタボリック症候群）に共通の進展メカニズムの一つであることを明らかにした。これらの疾患に共通して見られる「炎症」は、関節リウマチなどの炎症性疾患に見られる炎症とは異なる「血管を主座とする軽微な慢性炎症」であることから、この病態をmicroinflammationと呼んでいる。

(1) 研究経過

- 1) 糖尿病性腎症患者の腎生検組織において、ICAM-1やセレクチンなどの接着分子の発現亢進と著明なマクロファージの浸潤が見られる (Hirata K. Diabetologia 41, 1998)。
- 2) 糖尿病発症後きわめて早期に糸球体内にICAM-1の発現がおこり、マクロファージの浸潤を誘導している (Sugimoto H. Diabetes 46, 1997)。5/6腎摘出モデルにおいても、糸球体内にICAM-1の発現が亢進してマクロファージの浸潤を誘導する (Miyatake M et al. Nephron 79, 1998)。ICAM-1 KOマウスでは、糖尿病発症6ヶ月後のアルブミン尿、腎肥大、糸球体肥大、メサンギウム基質の増加が抑制され、さらに糸球体内のTGF- β とIV型コラーゲンの発現が抑制される (Okada S. Diabetes 52, 2003)。
- 3) DNAマイクロアレイを用いて、糖尿病発症後のICAM-1 KOマウスとwild type マウスの腎組織における遺伝子発現プロファイルを比較することにより、マクロファージの細胞表面に発現するMacrophage scavenger receptor-A(SR-A)や、osteopontin、

cholecystokinin, RANTES, IP-10, Platelet factor-4, selectinなどの分子が、腎症の成因に関与していることが示唆され、SR-A KOマウスに糖尿病を誘発すると、腎障害の進展が抑制された。Invitroの実験結果より、SR-Aはマクロファージと細胞外基質への接着を誘導する接着分子として機能していることが明らかとなった (Usui HK. Diabetes 56, 2007)。

4) 糖尿病ラットにHMG-CoA還元酵素阻害薬(スタチン) (Usui H. Nephrol. Dial. Transplant. 2004)、Methotrexate (Yozai K. J. Am. Soc. Nephrol. 2005)、Erythromycin (Tone A. diabetologia, 2005)、チアゾリジン誘導体 (Ohga S. Am J Physiol. 292, 2007)、glucagon like peptide-1 (GLP-1) 受容体アゴニスト (Kodera R. Diabetologia 54, 2011) などの薬剤を投与することにより、腎臓における炎症と腎障害の進展が抑制される。

5) 糖尿病性腎症患者の血液・尿中にIL-18濃度が増加し、IL-18濃度は頸動脈IMT, PWVおよびアルブミン尿と正相関を示す (Nakamura A. 28, Diabetes Care,)。

6) 肥満マウス(高脂肪食負荷、db/dbマウス)の内臓脂肪にp-selectin glycoprotein ligand-1(PSGL-1)の発現が増加し、PSGL-1ノックアウトマウスと野生型マウスに高脂肪食負荷を行うと、PSGL-1 KOマウスでは、内臓脂肪の炎症とインスリン抵抗性および糖尿病発症が抑制された (Sato C. Diabetes 60, 2011)。

(2) 本研究の位置づけ

上記のように、我々はこれまで、糖尿病発症後早期に腎組織にICAM-1が発現してマクロファージの浸潤を誘導することを明らかにした。その後、糖尿病状態の腎組織においてMCP-1をはじめとするケモカインの発現が亢進することなど、我々の結果を支持するいくつかの報告がなされた。そこで、ICAM-1 KOマウスと野生型マウスに糖尿病を発症させた結果、ICAM-1 KOマウスでは糖尿病発症後の腎

組織の炎症と腎障害が抑制された。この結果は、後にAtkinsらのグループにより、ICAM-1 KOマウスとdb/dbマウスの交配実験により追認された (J. Am Soc Nephrol. 2005)。次に我々は、ICAM-1 KOマウスと野生型マウスに糖尿病を誘発して、DNAマイクロアレイを用いて腎臓における遺伝子発現プロファイルを比較した結果、osteopontin、RANTES、IP-10、selectinなどのケモカイン・サイトカイン・接着分子やcholecystokinin(CCK)などの発現が野生型マウスの腎臓で増加し、ICAM-1 KOマウスでは増加しないことが明らかとなった。osteopontinは、糖尿病性腎症の進展にかかわる分子であることが過去に報告されているが、これらの炎症関連分子が腎症の治療ターゲットとなることが期待される。また、我々は、最近糖尿病治療に応用されているインクレチンの一つである (GLP-1) が、抗炎症作用と腎保護作用を示すことを示した。さらに、糖尿病性腎症の病態に関与することが示唆されるmicro RNAを同定した。国内外に同様の研究は少ないが、それぞれの分子に関する最近の研究状況を以下に述べる。

Micro RNA: microRNAは、標的のmRNAに結合してRNAの分解または蛋白質の翻訳抑制を誘導する低分子RNAである。近年の研究から、microRNAは疾病発症、ウイルス感染、細胞の分化発生増殖など様々な生体機能の制御に関係していることが明らかにされ、新たな治療標的として注目されているが、糖尿病性腎症の成因におけるmicroRNAの関与については殆ど明らかにされていない。我々は糖尿病マウスの糸球体からmicro RNAを抽出してmicro RNAアレイによる予備的解析を行った結果、糖尿病マウスの糸球体において特異的に発現が変化するmicro RNAを同定した。これらのmicroRNAは、腎症の病態に関与している可能性が示唆されることから、新たな治療標的と

して期待される。

Cholecystokinin(CCK): CCKは消化管ホルモンや神経伝達物質としての機能がよく知られているが、我々はCCKが腎臓でも産生されることを発見した。さらに、CCKの2種類のレセプター (CCK-A receptor (CCK-AR) およびCCK-B receptor (CCK-BR))も腎臓に発現していることが確認された。腎臓に対する作用は未知であるが、興味深いことに、自然発症2型糖尿病モデルであり、早期より腎障害が進行するOLETFラットには、CCK-ARの遺伝子異常が存在する。我々はこれまでに、5/6腎摘出モデルを用いて、CCK-ARとBRのdouble knockout mouseでは腎障害が高度に進行すること、さらにCCK peptideがマクロファージに対して抗炎症作用を示すことを見出している。

PSGL-1: PSGL-1は細胞接着分子であるP-selectinのリガンドとして同定され、その後全てのselectin分子に共通のリガンドであることが確認された。我々は、腎組織へのマクロファージの浸潤にselectinが関与することを報告している。PSGL-1はマクロファージの細胞表面と血管内皮細胞の両者に発現し、マクロファージの浸潤に関与することから、PSGL-1を阻害することにより、組織へのマクロファージの浸潤を抑制できる可能性がある。我々は、PSGL-1が内臓肥満によって起こる内臓脂肪組織の炎症に関与する分子であることを明らかにしており、この分子がメタボリック症候群と糖尿病性腎症の共通した治療標的となる可能性がある。

GLP-1: GLP-1は消化管のL細胞から分泌され膵細胞からのインスリンの放出を促進するホルモンであり、糖尿病治療薬として応用されている。GLP-1受容体は全身の臓器に発現しており、我々は単球/マクロファージと腎臓にGLP-1受容体が発現することを明らかにするとともに、GLP-1受容体アゴニストが糖尿病

ラットに対して抗炎症作用を介した腎保護効果を示すことを明らかにした。GLP-1の抗炎症作用のメカニズムをさらに解析することにより、GLP-1受容体アゴニストを腎症治療に応用できることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病性腎症の発症・進展過程で起こる炎症(microinflammation)の過程の全体像を明らかにして、創薬のシーズを得るとともに、これに基づいてmicroinflammationを標的とした腎症の新しい治療薬を開発することである。

3. 研究の方法

(1)糖尿病性腎症の成因に関するmicroRNAの同定

動物モデルとしてstreptozotocin誘発糖尿病マウスとdb/dbマウスを用いる。

1) BL6マウスにstreptozotocin (STZ) を静脈内投与後、4週, 12週, 24週後に腎臓から糸球体を分離採取して、RNAを抽出する。対照には、クエン酸緩衝液を投与したBL6マウスを用いる。

2) db/dbマウスとdb/mマウスを飼育し、生後4週, 12週, 24週後に腎臓から糸球体を分離採取してmicro RNAを抽出する。

3) Micro RNAアレイ: Micro RNAアレイを用いて、糖尿病マウスの糸球体に特異的に増加または低下するmicroRNAを検索するとともに、microRNAデータベースにアクセスして、糸球体における様々な炎症関連遺伝子の発現変化との関連を解析する。

4) MicroRNAアレイで検出したmicroRNAについて、サンプル数を増やしてPCRにて結果の確認を行う。

5) 糸球体内皮細胞とメサンギウム細胞にmicroRNA mimicをtransfectionし、細胞の形態変化、ケモカイン、サイトカインの発現、

eNOSやSIRT-1の遺伝子および蛋白発現の変化を解析する。

(2)糖尿病性腎症の成因に関する炎症関連分子の同定と治療効果の解析

PSGL-1阻害(抗PSGL-1抗体およびフコイダン)による糖尿病性腎症に対する効果を検討する。

1) 動物モデルとしてdb/dbマウスを用いる

2) 抗PSGL-1抗体と、PSGL-1阻害活性を持つ硫酸化多糖であるフコイダンを投与する。24週間観察し、炎症関連分子の発現変化とアルブミン尿、腎組織の変化を解析する。

4. 研究成果

(1)糖尿病性腎症の成因に関するmicroRNAの同定と治療への応用

STZ誘導糖尿病マウスおよびdb/dbマウスでは、糖尿病発症3ヵ月後より正常マウスに比ベ有意にHbA1c、尿中アルブミン排泄量および腎重量比が増加していた。両マウスの腎系球体におけるmicroRNAの発現をMicro RNAアレイで網羅的に解析したところ、両マウスの糸球体に共通して発現が増加する5種類のmicro RNAを見出し、そのうちの 하나가miR-34aであった。定量PCRによる解析から、miR-34aの発現量は、糖尿病発症1ヶ月後のマウス糸球体では糖尿病群と正常群との間で大きな変化が認められなかったが、糖尿病発症3ヵ月後から糖尿病群で有意な発現増加が認められ、それは糖尿病発症6ヵ月後も持続していた。

miR-34a mimicを導入した糸球体内皮細胞およびメサンギウム細胞は、細胞が大型化する細胞肥大が誘導され、またMCP-1の発現が増強していた。糸球体内皮細胞ではさらにeNOSの発現低下が認められ、メサンギウム細胞ではコラーゲン産生の増強が観察された。

以上の結果から、miR-34aは内皮細胞の機能低下やメサンギウム細胞におけるコラーゲン産生亢進に加え、細胞の肥大化およびケモカ

イン産生増加に伴う炎症を誘導することで糖尿病性腎症の糸球体病変の形成に関与し、病態の進展に深く関連していることが示唆された。糖尿病性腎症の発症メカニズムの一つである炎症にmiR-34aが関わっていることは、過去に報告のない新しい発見である。

(2)糖尿病性腎症の成因に関与する炎症関連分子の同定と治療効果の解析

db/dbマウスに抗PSGL-1抗体を投与すると、初期に耐糖能異常とインスリン抵抗性の改善が見られたが、その後は、抗体投与群と対照群の間にHbA1c値と尿所見の差は認めなかった。

db/dbマウスにフコイダン投与することにより、体重の減少と血糖値の低下が認められた。体重の減少により、フコイダンの長期投与が出来なかったが、腎障害の軽減が示唆された。

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7件)

Kodera R, Shikata K. Renoprotective effects of incretin-based drugs: A novel pleiotropic effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor. J Diabetes Investig. 7(1):29-31, 2016. 査読あり

Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Wada J, Shikata K, Makino H, Abe K. Cognitive and affective functions in diabetic patients associated with diabetes-related factors, white matter abnormality and aging. Eur J Neurol. 313-321. 2015. 査読あり

Kodera R, Shikata K, Takatsuka T, Oda K, Hirota D, Ono T, Kataoka H, Makino H. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor ameliorates early renal injury through its anti-inflammatory action in a rat model of

type 1 diabetes. Biochem, Biophys Res Commun. 433: 823-833, 2014. 査読あり

Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T. Lifestyle Modification Is Associated with Improving Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) and Proteinuria in Japanese with Proteinuria. Acta Med. Okayama. 68. 43-46. 2014. 査読あり

Ono T, Shikata K, Obika M, Miyatake N, Kodera R, Hirota D, Wada J, Kataoka H, Ogawa D, Makino H. Factors associated with remission and/or regression of microalbuminuria in type 2 diabetes mellitus. Acta Med Okayama. 68:235-241, 2014. 査読あり

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 Investig. 18:195-201. 2013. 査読あり

Shikata K, Makino H. Microinflammation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. J Diabetes Investig. 18:142-149. 2013, Review. 査読あり

[学会発表] (計10件)

四方賢一、わが国の臨床研究から何を学べば良いか: DNETT-Japan、第50回糖尿病学の進歩シンポジウム(招待講演)、2016年2月20日、東京都。

四方賢一、腎症の成因と新たな治療標的、第30回日本糖尿病合併症学会年次学術集会、第21回日本糖尿病眼学会(招待講演)、2015年11月27日、名古屋市。

四方賢一、糖尿病性腎症診療の現状と課題、第45回日本腎臓学会西部学術集会ワークショップ(招待講演)、2015年10月24日、金沢市。

四方賢一、糖尿病腎症の診断と治療、日本内科学会北陸支部第66回生涯教育講演会(招

待講演)、2015年9月6日、金沢市。

四方賢一、腎症治療薬開発の現状、第58回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム(招待講演)、2015年5月23日、下関市。

四方賢一、腎症に対する薬物療法、日本糖尿病合併症学会第29回学術集会・シンポジウム3 糖尿病合併症から考える薬物療法。2014年10月3日、東京都。

四方賢一、糖尿病性腎症の診断と治療～新たな展開～第3回くすりと糖尿病学会学術集会 教育講演1 (招待講演)2014年12月2日、福岡市。

四方賢一、糖尿病性腎症と炎症～新規治療薬開発への道～。第57回日本腎臓学会学術総会 教育セッション2 糖尿病腎症。(招待講演)2014年7月4日 パシフィコ横浜

四方賢一、糖尿病性腎症の診断と治療、第48回糖尿病学の進歩(招待講演)、2014年3月7日、札幌市。

四方賢一、インクレチン関連薬の長期展望、第56回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム、2013年5月16日、熊本市。

〔図書〕(計2件)

四方賢一、診断と治療社、糖尿病専門医研修ガイドブック第6版、2014.125-128。

四方賢一、南江堂、科学的根拠に基づく糖尿病診療ガイドライン2013、97-113。

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

四方 賢一 (Shikata Kenichi)

岡山大学・大学病院・新医療研究開発センター・教授

研究者番号：00243452

(2)研究分担者

小寺 亮 (Kodera Ryo)

岡山大学・大学病院・新医療研究開発センター・助教

研究者番号：70610921