

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460403

研究課題名(和文) COMT不全がもたらす健康被害の分子機構解明

研究課題名(英文) The investigation of the molecular mechanisms in COMT-deficiency-induced health problems

研究代表者

金崎 啓造 (KANASAKI, Keizo)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60589919

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)：申請者は妊娠高血圧腎症の遺伝子改変モデル動物を世界で初めて報告し、catechol-o-methyltransferase(COMT)不全を介したカテコール代謝異常がその原因であることを解明した。妊娠高血圧腎症とメタボリックシンドローム(Mets)は臨床的な共通点が多い。そこで、申請者はCOMT不全と結果としてのカテコール代謝不全が妊娠高血圧のみならず、メタボリックシンドロームの共通の分子機構と仮説し検討を行った。本検討では、Metsの主たる症状のうち、高血圧と耐糖能異常に関してはCOMT不全及び結果としての2-methoxyestradiol欠乏がその発症に寄与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This applicant reported the first genetic model of preeclampsia by showing that catechol-o-methyltransferase (COMT) deficient mice, displaying defects in catechol metabolism, exhibited preeclampsia phenotype during gestation. Preeclampsia and metabolic syndrome share some of clinical manifestation, therefore this applicant hypothesized that COMT deficiency could be relevant for the pathogenesis of both preeclampsia and metabolic syndrome. Indeed some of genetic analysis in the past supported this applicant's hypothesis. By completion of this application, this applicant revealed that at least two major clinical symptom of metabolic syndrome, hypertension and glucose intolerance, could be explained by COMT deficiency. Therefore COMT deficiency could be relevant pathomechanism in both preeclampsia and metabolic syndrome.

研究分野：メタボリックシンドローム、妊娠高血圧腎症

キーワード：COMT メタボリックシンドローム 妊娠高血圧腎症 エストロゲン代謝 アンジオテンシン PPAR-g

1. 研究開始当初の背景

ヒト catechol-o-methyltransferase(COMT) 遺伝子には mRNA・蛋白の安定性を制御する数々の遺伝子多型・haplotype が知られている。COMT 活性低下遺伝子多型と精神疾患、肥満、糖尿病、高血圧、妊娠高血圧腎症等との相関が報告されているが、分子機構は不明である。

申請者は COMT 不全およびその結果として 2-methoxyestradiol (2-ME) 欠乏の病態的意義を妊娠高血圧腎症モデルマウスである COMT ノックアウトマウスを用い報告した (Kanasaki et al. Nature 2008)。また、妊娠高血圧腎症では糖代謝異常、インスリン抵抗性の増加が報告されている。DBA-2J マウスや dahl-salt sensitive ラット、spontaneously hypertensive ラットなどメタボリックシンドローム様症状を発症する齧歯類は COMT 酵素活性が低いことが知られる。

COMT はカテコラミンを不活化する事が広く知られているが、実際はカテコール構造を有する多くの生体内物質の代謝に寄与する。Estradiol は CYP450 により中間代謝産物 hydroxyestradiol (20H-E) に代謝されるが、20H-E はカテコール構造を有するカテコールエストロゲンの一つである。20H-E は COMT により、2-methoxyestradiol (2-ME) に代謝される (図 1)。2-ME は、hypoxia-inducible factor (HIF)-1 の発現阻害因子であるとともに抗炎症物質としても知られており、正常妊娠後期にかけて血中濃度が顕著に上昇するが、妊娠高血圧腎症では低下していることを申請者は報告し、その後各国からの追試で確認された。COMT 不全の意義はカテコラミン分解不全にあるとの理解が一般的になされている。しかし、多彩な機能(抗 HIF-1 α 、抗血管新生、抗炎症、抗内皮細胞障害)を持つ 2-ME 欠乏の関与を考慮に入れると、COMT 不全惹起ヒト遺伝子多型と COMT 不全関連疾患群間の論理的説明が可能となる。

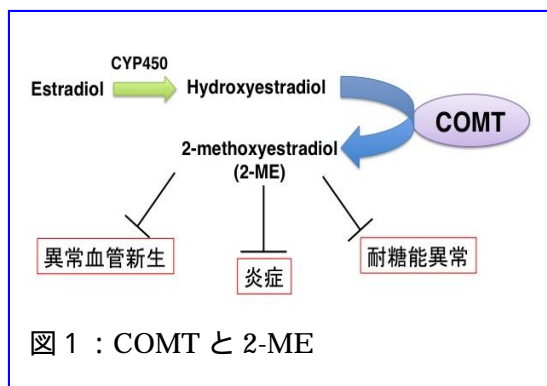


図 1 : COMT と 2-ME

2. 研究の目的

申請者は妊娠高血圧腎症の遺伝子改変モデル動物を初めて報告し、catechol-o-methyltransferase(COMT) 不全を介したカテコール代謝異常がその原因であることを解明した (Nature 2008 Kanasaki et al)。妊娠高血圧腎症とメタボリックシンドロームは病態における類似点が多い。妊娠時インスリン抵抗性を有する症例は、血糖が正常でもその後妊娠高血圧腎症発症リスクが高い、また妊娠高血圧腎症症例においてはその後の人生における糖尿病発症リスクが 2 倍程度高い。低 COMT 酵素活性遺伝子多型と妊娠高血圧腎症、高血圧、糖代謝異常、急性冠症候群との関連も報告された。そこで COMT 不全がメタボリックシンドローム・妊娠高血圧腎症に共通の分子機構であると仮説し、COMT 不全がメタボリックシンドロームの病態において演じる役割を網羅的に解析する事を試みた。

3. 研究の方法

メタボリックシンドロームモデル動物として高脂肪食(クイックファット: fat energy 32%) 投与 C57BL6 マウスを用いた。COMT 阻害薬(Ro41-0960)、COMT siRNA、metformin 投与実験に関しては短期間プロトコル(2 週間)を、2-ME 慢性投与実験に関しては 10 週間高脂肪食投与を用い、2-ME の投与は最後の 4 週間のみ行った。膵臓 β 細胞からのインスリン分泌はマウス β 細胞ライン MIN6 細胞を用いた。妊娠高血圧腎症は血管作動性物質に対する昇圧反応亢進状態である。そこで、アンジオテンシン II(AII)持続皮下注射に対する昇圧反応における COMT 不全および 2-ME 治療効果の検討も行った。

4. 研究成果

「COMT 不全が妊娠高血圧腎症-メタボリックシンドロームに共通の病態である」という仮説に関して、次の結果を得ている:

- (1) 高脂肪食投与(10 週) C57BL6 マウスにおいて、COMT 蛋白発現が有意に抑制。2-ME(高脂肪食投与 6 週後より 4 週間)は、耐糖能-脂肪肝を改善。
- (2) 2-ME による耐糖能改善効果は、肝臓 AMPK リン酸化と関連。
- (3) metformin を投与すると肝臓 COMT 蛋白が増加。metformin 投与による肝臓 AMPK リン酸化は COMT 阻害薬投与により抑制。
- (4) 2 週間高脂肪食摂取マウスにおける 2-ME による血糖低下は、インスリン分泌増加と関連; 10 週高脂肪食摂取に対

する 4 週間 2-ME 慢性投与では血中インスリンレベルは低下し、インスリン抵抗性が改善。

- (5) MIN-6 細胞を用いて行った *in vitro* 検討では、2-ME によりインスリン分泌量が増加し、2-ME はβ細胞の生存シグナルを誘導した。
- (6) 妊娠マウスでは、肝臓 COMT 蛋白発現が低下。妊娠マウスに対する COMT 阻害薬投与によりインスリン抵抗性が増加、2-ME 投与はインスリン抵抗性を改善する事により COMT 阻害薬投与による耐糖能悪化を改善。
- (7) COMT 阻害薬投与によりアンジオテンシン II に対する昇圧感受性が亢進し、2-ME 投与によりその昇圧反応は抑制。2-ME による AII-1 型受容体の発現抑制を確認。2-ME の前駆物質 (2-hydroxyestradiol: COMT の基質) 投与ではその効果は得られない。
- (8) 2-ME は内因性 PPAR γ 活性化分子である

上記結果から COMT が様々な環境因子により発現が低下する蛋白である事その是正が妊娠高血圧腎症-メタボリックシンドロームに共通の分子標的である可能性が示唆された。

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 22 件)

1. Norikazu Ueki, Keizo Kanasaki, Megumi Kanasaki, Satoru Takeda, Daisuke Koya. Catechol-O-methyltransferase deficiency leads to hypersensitivity of the pressor response against angiotensin II. **Hypertension**. 2017 In Press 査読あり
2. Yuta Takagaki, Daisuke Koya, Keizo Kanasaki, DPP-4 inhibition and renoprotection: the role of anti-fibrotic effects. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**. 2017 Jan;26(1):56-66 査読あり
3. Srivastava SP, Shi S, Kanasaki M, Nagai T, Kitada M, He J, Nakamura Y, Ishigaki Y, Kanasaki K, Koya D. Effect of Antifibrotic MicroRNAs Crosstalk on the Action of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline in Diabetes-related Kidney Fibrosis. **Sci Rep**. 2016 Jul 18;6:29884. doi: 10.1038/srep29884. 査読あり
4. Nitta K, Shi S, Nagai T, Kanasaki M, Kitada M, Srivastava SP, Haneda M, Kanasaki K, Koya D. Oral Administration of N-Acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline Ameliorates Kidney Disease in Both Type 1 and Type 2 Diabetic Mice via a Therapeutic Regimen. **Biomed Res Int**. 2016;2016:9172157. doi: 10.1155/2016/9172157. Epub 2016 Mar 20. 査読あり
5. Kitada M, Ogura Y, Suzuki T, Sen S, Lee SM, Kanasaki K, Kume S, Koya D. A very-low-protein diet ameliorates advanced diabetic nephropathy through autophagy induction by suppression of the mTORC1 pathway in Wistar fatty rats, an animal model of type 2 diabetes and obesity. **Diabetologia**. 2016 Jun;59(6):1307-17. doi: 10.1007/s00125-016-3925-4. Epub 2016 Mar 28. 査読あり
6. Shi S, Koya D, Kanasaki K, Dipeptidyl peptidase-4 and kidney fibrosis in diabetes. **Fibrogenesis Tissue Repair**. 2016 Feb 13;9:1. doi: 10.1186/s13069-016-0038-0. eCollection 2016. 査読あり
7. Sen Shi, Keizo Kanasaki, Daisuke Koya. Linagliptin but not Sitagliptin inhibited transforming growth factor- β 2-induced endothelial DPP-4 activity and the endothelial-mesenchymal transition. **Biochem Biophys Res Commun** 2016 Feb 26;471(1):184-90. 査読あり
8. Keizo Kanasaki, Concerted Efforts to Combat Diabetic Complications, **Kidney International** 2016 Feb;89(2):269-71. 査読あり
9. Norikazu Ueki, Satoru Takeda, Daisuke Koya, Keizo Kanasaki. The relevance of the renin-angiotensin system in the development of drugs to combat preeclampsia, **International Journal of Endocrinology**, 2015;2015:572713. 査読あり
10. Sen Shi, Swayam Prakash Srivastava, Megumi Kanasaki, Jianhua He, Munehiro Kitada, Takako Nagai, Kyoko Nitta, Susumu Takagi, Keizo Kanasaki, Daisuke Koya. The interaction between DPP-4 and integrin β 1 regulates the signaling responsible for induction of the endothelial to mesenchymal transition, **Kidney International** 2015 Sep;88(3):479-89. 査読あり
11. Sawako Kato, Shoichi Maruyama, Hirofumi Makino, Jun Wada, Daisuke Ogawa, Takashi Uzu, Hisazumi Araki, Daisuke Koya, Keizo Kanasaki, Yutaka Oiso, Motomitsu Goto, Akira Nishiyama, Hiroyuki Kobori, Enyu Imai, Masahiko Ando, Seichi Matsuo. Anti-albuminuric effects of spironolactone in patients with type 2 diabetic nephropathy: a multicenter, randomized clinical trial **Clin Exp Nephrol**. 2015 Dec;19(6):1098-106. 査読あり
12. Keizo Kanasaki, Akito Maeshima, Gangadhar Taduri, Ignacio Revuela. Combating Kidney Fibrosis. **Biomed Res Int**. 2014 2014;2014:679154. doi: 10.1155/2014/679154. Epub 2014 Sep 7. 査読あり
13. Swayam Prakash Srivastava, Sen Shi, Daisuke Koya, Keizo Kanasaki. Lipid mediators in Diabetic Nephropathy. **Fibrogenesis&Tissue Repair** 2014 Sep 3;7:12. doi: 10.1186/1755-1536-7-12. eCollection 2014. 査読あり
14. Gao C, Huang W, Kanasaki K, Xu Y. The Role of Ubiquitination and Sumoylation in Diabetic Nephropathy. **Biomed Res Int**. 2014;2014:160692. Epub 2014 Jun 4. 査読あり
15. Otoda T, Kanasaki K, Koya D. Low-protein diet for diabetic nephropathy. **Curr Diab Rep**. 2014

- Sep;14(9):523. doi: 10.1007/s11892-014-0523-z. 査読あり
16. Takako Nagai, Kyoko Nitta, Megumi Kanasaki, Daisuke Koya, Keizo Kanasaki The Biology of Angiotensin-Converting Enzyme in Kidney Fibrosis. **CEN invited review** 2014 Jul 1 査読あり
 17. Kitada M, Kanasaki K, Koya D. Clinical therapeutic strategies for early stage of diabetic kidney disease. **World J Diabetes**. 2014 Jun 15;5(3):342-56. doi: 10.4239/wjd.v5.i3.342. Review. 査読あり
 18. Combat diabetic nephropathy: from pathogenesis to treatment. Gohda T, Mima A, Moon JY, Kanasaki K. **J Diabetes Res**. 2014;2014:207140. doi: 10.1155/2014/207140. Epub 2014 Mar 11. 査読あり
 19. Keizo Kanasaki, Takako Nagai, Kyoko Nitta, Munehiro Kitada, Daisuke Koya. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline: A valuable endogenous anti-fibrotic peptide for combating kidney fibrosis in diabetes **Frontier Pharmacology** 査読あり
 20. Keizo Kanasaki, Francisco Ayala de la Peña, Megumi Kanasaki, Sylvia Vong, Carlota Rovira, Raghu Kalluri, Specific Activation of K-RasG12D Allele in the Bladder Urothelium Results in Lung Alveolar and Vascular Defects **Plos One** 2014 Apr 23;9(4):e95888. doi: 10.1371/journal.pone.0095888. eCollection 2014. 査読あり
 21. Keizo Kanasaki, Sen Shi, Megumi Kanasaki, Jinhua He, Takako Nagai, Yuka Nakamura, Yasuhito Ishigaki, Munehiro Kitada, Swayam Prakash Srivastava, Daisuke Koya, Linagliptin-mediated DPP-4 inhibition ameliorates kidney fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition in a therapeutic regimen. **Diabetes** 2014 Jun;63(6):2120-31. doi: 10.2337/db13-1029. Epub 2014 Feb 26. 査読あり
 22. Takako Nagai, Megumi Kanasaki, Swayam Prakash Srivastava, Yuka Nakamura, Yasuhito Ishigaki, Munehiro Kitada, Sen Shi, Keizo Kanasaki, Daisuke Koya N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline inhibits diabetes-associated kidney fibrosis and endothelial-mesenchymal transition **BioMed Research International** Volume 2014, Article ID 696475, 12 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/696475> 査読あり

〔学会発表〕(計 18 件)

計 18 件のうち、主なもの 5 件

1. Kanasaki, Keizo The pathological role of endothelial DPP=4 in Diabetic Kidney Fibrosis, 2017 Asia Islet Biology and Incretin Symposium (招待講演)、2017/03/02 ~ 2017/03/04 Seoul(Korea)
2. 金崎啓造 糖尿病性腎症の臨床の新たな見解 新たな糖尿病治療薬による人保護の可能性、第 46 回 日本腎臓学会西部大会 (招待講演) 2016/10/14 ~ 2016/10/15 シーガイアコンベンション

センター (宮崎県宮崎市)

3. 金崎啓造 メタボリックシンドロームの病態生理学 カテコール代謝異常とメタボリックシンドローム、第 26 回 日本病態生理学会 (招待講演) 2016/08/05 ~ 2016/08/07 金沢医科大学 (石川県河北郡内灘)
4. 金崎啓造 透析患者とエピジェネティクス 糖尿病腎における microRNA の役割、第 61 回 日本透析医学会学術集会(招待講演) 2016/06/09 ~ 2016/06/11 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
5. 金崎啓造 創薬を目指した糖尿病性腎症研究の展望 糖尿病における腎繊維化への取り組み 抗 TGF-βエフェクター分子を中心に、第 59 回 日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演) 2016/05/19 ~ 2016/05/21 国立京都国際会館(京都府京都市)

〔図書〕(計 11 件)

計 11 件のうち、主なもの 3 件

1. 金崎啓造 フジメディカル出版、腎高血圧の最新治療: CKD における糖尿病管理 2016 年 7 (11-17)
2. 金崎啓造 メディカルレビュー社、Pharma Media: 糖尿病性腎症の克服を目指して~up to date~ SGLT2 阻害薬と腎機能 2016 年 5 (55-59)
3. 金崎啓造 東京医学社 成人病と生活習慣病: 「腎機能を悪化させない日常診療」 糖尿病における腎機能の味方と対策 2016 年 4 (339-343)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金崎 啓造 (KANASAKI, Keizo)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 60589919

(2) 研究分担者

金崎 めぐみ (KANASAKI, Megumi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50599355

平成 28 年 3 月 17 日 研究分担者から削除