

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460635

研究課題名(和文)糖化凝集タンパク質による糸球体細胞の酸性化は糖尿病性腎症の発症に関係するか？

研究課題名(英文) Involvement of acidification of glomerular cells by AGE-cholesterol-aggregated proteins in development of diabetic nephropathy

研究代表者

永松 正 (NAGAMATSU, TADASHI)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：70103265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究の結果は、糖尿病患者血中で形成されたコレステロール含有糖化凝集アルブミン(ACAA)が腎系球体に沈着し、メサンギウム細胞に取り込まれ、Lysosomeで分解される。また、ミトコンドリアが活性化して細胞内が酸性化し、種々のサイトカインの発現が上昇する。その結果、微小環境において炎症が惹起されて糖尿病性腎症が発症・進展するという仮説を支持するものであった。また、ACAAや細胞外液のH⁺によるMCsの酸性化を防御する機構を明らかにした。さらに、ACAAによりMCsのミトコンドリアに障害が生じてアポトーシスが惹起される可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated the validity of our hypothesis regarding the development of diabetic nephropathy, which was as follows: AGE-cholesterol-aggregated albumin (ACAA) is formed in the blood flow of diabetic patients, and taken up in glomerular mesangial cells to achieve the breakdown of ACAA in lysosome. Simultaneously, mitochondria of mesangial cells are activated, and mesangial cells are acidified followed by an increase in pro-inflammatory cytokine expression. The cytokines induce inflammation in the glomeruli repeatedly, resulting in diabetic nephropathy. We also clarified the mechanisms for protecting mesangial cells from acidification due to ACAA or an acidic environment. Additionally, our results suggested that ACAA causes damage in mesangial mitochondria followed by apoptosis.

研究分野：腎薬理学

キーワード：糖尿病性腎症 糖化凝集タンパク質 コレステロール

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は、血液透析導入原因疾患のうち最も患者数が多い疾患である。糖尿病性腎症が発症した場合、その治療法はなく多くの患者で血液透析が導入される。透析療法に至った糖尿病患者の QOL や生命予後は不良である。透析患者数は 2012 年度で約 30 万人を超え、毎年 1 万人ずつ増加して医療費増加の一因となっている。それゆえ、糖尿病性腎症の発症・進展機構を解明することは医療費の点からも喫緊の課題である。糖尿病性腎症を持つ患者において血中の LDL (低比重リポ蛋白) は、AGEs (advanced glycation end-products 最終糖化産物) 化や酸化により変性をうけて免疫原性を獲得し、変性 LDL に対する抗体が産生される。糖尿病患者の血液から単離した免疫複合体中に糖化 LDL や酸化 LDL が含まれることが示されている。また、変性 LDL や免疫グロブリンは、糖尿病性腎症の糸球体硬化症病変部位に局在している。しかし、このような分子が、腎症の発症・進展とどのように関係するか明確にされていない。申請者は、糖尿病性腎症の発症・進展について以下に示す実験結果から次のような作業仮説を立てた。すなわち、糖尿病患者では、糖化タンパク質や抗変性 LDL 抗体あるいは感染症により形成された糖化凝集タンパク質が高コレステロール血症により分解されにくいものになり、糸球体に長期沈着する。その結果、糸球体(メサンギウム細胞)の酸性化や炎症が起きる。この過程が反復されることで腎症が徐々に形成される。

これまでに申請者は(1)ストレプトゾトン誘発(STZ)糖尿病マウスや 2 型糖尿病マウス(KK-A^yおよび db/db マウス)に凝集ウシ血清アルブミン(a-BSA)を静脈投与すると、a-BSA が糸球体に沈着して糸球体病変の発症・進展が促進した(Nagamatsu et al. 2005, Hirasawa et al. 2008)。(2) *in vitro* の実験において a-BSA は BSA と比較して短時間で advanced glycation end-products (AGEs) を産生した。腎糸球体への a-BSA の沈着量は血糖値に依存した(Hirasawa et al. 2008)。(3) 2 型糖尿病マウスの実験結果から、糖化 a-BSA の性質がコレステロールにより変化したと考えた。*in vitro* 実験において a-BSA をコレステロール存在下で糖化したところ多くの AGEs が生成した。さらに、正常マウスにコレステロール存在下で糖化した a-BSA (AGE-cholesterol-a-BSA) を静脈投与すると、AGE-cholesterol-a-BSA は腎糸球体に大量に沈着した。培養マウスメサンギウム細胞に取り込まれた AGE-cholesterol-a-BSA

は AGE-a-BSA より長時間メサンギウム細胞に存在した(Hirasawa 2011)。(4) コレステロール存在下で生成した糖化凝集タンパク質が、糖尿病性腎症の発症・進展に關与する可能性を検討した。AGE-cholesterol-a-BSA を静脈投与すると、アルブミン尿が出現し、病理組織学的な腎糸球体障害が起きた。マウスメサンギウム細胞を AGE-cholesterol-a-BSA で処置すると、AGE-a-BSA と比較して、メサンギウム細胞の増加が促進し、成長因子および細胞外基質の mRNA 発現が増加した。AGE-cholesterol-a-BSA により生じたメサンギウム細胞の増殖は、TGF- β receptor 1 kinase inhibitor で阻害された。これらの結果から、AGE-cholesterol-a-BSA はメサンギウム細胞で AGE 受容体を介して、成長因子や細胞外基質の mRNA 発現を増加し、細胞増殖の促進を引き起こす可能性があることがわかった(Hirasawa et al. 2011)。(5) 培養メサンギウム細胞への AGE-cholesterol-a-BSA の取り込みが、siRNA や阻害剤を使った実験から、AGE 受容体 IGF-1-LOX-1 の経路により取り込まれることを見出した。(6) Alexa ラベル AGE-cholesterol-a-BSA 用いて LysoTracker により、AGE-lysosome に取り込まれることを明らかにした。各種の lysosomal enzyme 阻害剤を使った実験から、AGE-cholesterol-a-BSA が、Cystein protease (カテプシン L, カテプシン B) で分解されることを見出した。この実験において、AGE-cholesterol-a-BSA の分解過程においてメサンギウム細胞が酸性化する可能性が示唆された。(7) 糖尿病性腎症で重篤な感染症に罹患した場合、血液透析導入までの期間が短くなることを見出した。このことは、糖尿病患者が感染症に罹患することで、免疫複合体が形成され、その時に高コレステロール血症となっていた場合に難分解性の凝集タンパクを形成して、糖尿病性腎症の進展が促進される可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、高コレステロール血症を伴う糖尿病患者において形成された糖化凝集タンパク質の腎糸球体への沈着とそれに続く糖尿病性腎症の発症機序を解明することを目指している。糖とコレステロールの存在下で調製した糖化凝集タンパク質を取りこむことにより、メサンギウム細胞が酸性化を引き起こし、炎症性サイトカインの産生増加や、ネクローシスを生じて周囲の糸球体細胞に障害を及ぼし、その後の修復の結果として線維化するという仮説を実証する。糖尿病患者の血液や尿から糖化コレステロール凝集

タンパク質を単離して、その成分の探索や糸球体メサンジアル細胞障害性を実証する。この研究により、糖尿病性腎症治療薬のための新規評価系や、糖尿病性腎症の発症・進展を抑制する方法論を確立し、透析導入患者数を減少ことが目的である。

3. 研究の方法

正常及び糖尿病マウスで AGE-cho-凝集マウスアルブミン (ACM) の腎障害惹起性を調べる。

メサンギウム細胞に ACM を負荷した後の細胞質の酸性化や活性酸素の経時的変化を調べる。

メサンギウム細胞で ACM 負荷後に酸性化した細胞の割合を共焦点顕微鏡で調べる。

メサンギウム細胞で、ACM 負荷や酸性化により炎症性サイトカイン産生が増加するか調べる。

正常及び糖尿病マウスから AGE-cho-凝集タンパク質を抽出する。

腎症の患者血液・尿の酸性度を調べ、凝集タンパク質を抽出する。

メサンギウム細胞で糖尿病性腎症患者から得た凝集タンパク質に腎障害性があるかを調べる。

4. 研究成果

1. マウス血清からアルブミンを抽出して AGE-cholesterol-aggregated mouse albumin (ACM) を調製し、正常マウスに週 1 回または 2 回 i.v. すると、3 週間後にアルブミン尿が出現した。しかし、AGE-cholesterol-aggregated bovine albumin の正常マウスにへの頻回 i.v. 投与で認められたアナフィラキシー様反応は認められなかった。このことはコレステロール含有 AGE 化凝集アルブミンに糸球体障害性があることを示唆している。

2. 培養メサンギウム細胞 (MCs) に AGE-cholesterol-aggregated human albumin (ACH) を取り込ませると、前炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, MCP-1) mRNA の発現が時間及び ACH 濃度に依存して増加した。また、ACH を取り込んだ MCs の培養上清中の IL-1 β タンパク質の濃度が増加した。このことは、ACAA が沈着した糸球体メサンギウム領域で炎症が惹起されうること示唆している。

3. メサンギウム細胞に ACH を取り込ませると、細胞内 pH (pHi) は、3 時間後をボトムとして軽度ではあるが有意に低下し (pHi7.45 pHi7.31) 48 時間後までもとのレベルまで回復した。酸性溶液 (pH5.5) を内包するリポソームを MCs に取り込ませると pHi は低下し (pHi7.4 pHi7.1)、IL-1 β

mRNA の発現量は 3 倍増加した。K⁺イオノフォアであるニジリシンで処理した MCs を pH5.5 酸性溶液に暴露すると、IL-1 β mRNA の発現量は 3 倍増加した。また、ニジリシンで処理せずに MCs を pH5.5 酸性溶液に暴露しても、IL-1 β mRNA の発現量は 1.5 倍増加した。pH5.5 酸性溶液中で MCs を培養 (30 分間) すると、直ちに pHi は低下 (pHi7.4 pHi6.8) した。MCs を pH5.5 酸性溶液に 2 分間暴露後 4 時間で IL-1 β , IL-6, TGF- β , MCP-1 mRNA の発現は 2 倍に増加した。MCs において IL-6 mRNA の発現量は細胞外液の pH の低下に依存して増加した。このことは酸性溶液あるいは H⁺ がチャネルをとって細胞内に流入することを示唆している。MCs を EIPA (Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor) で処置して、ACH を取り込ませると 1 時間後に pHi は著明に低下 (pHi7.2 pHi6.7) した。このことは、ACH を取り込んだ MCs では Na⁺/H⁺ exchanger が活性化して細胞内酸性化を防ぐように作用していることを示唆している。

pH5.5 酸性溶液暴露で増加する IL-1 β mRNA の発現は、NF- κ B 阻害薬 (BAY11-7085) の前処置により濃度依存的に抑制された。

4. MCs にアクアポリン (AQP)1 と AQP3 mRNA が発現していて、AQP1 のタンパクの発現をタンパク質レベルで確認した。MCs において AQP1, AQP3 mRNA をそれぞれの siRNA で処置して pH5.5 酸性溶液に暴露すると、pH5.5 酸性溶液による pHi の低下及び IL-1 β , IL-6, MCP-1, TGF- β の mRNA の増加が抑制された。このことは、MCs において AQP1, AQP3 を介して外部の H⁺ (酸性溶液) が細胞内に流入してサイトカイン mRNA の発現が増加することを示唆している。一方、Na⁺/H⁺ exchanger 阻害剤である EIPA で MCs を処理すると ACH による pHi の低下は増強された。しかし、H⁺/K⁺ATPase や Vacuolar H⁺ATPase は ACH による MCs の pHi の低下には関係していなかった。MCs を EIPA で前処置して pH5.5 酸性溶液に暴露すると pHi は対照 MCs より高値であった。また、MCs の OGR1 pH 感受性受容体 (Na⁺/H⁺ exchanger activating receptor) を siRNA で阻害すると、IL-1 β mRNA の発現が低下した。このことは、OGR1 が H⁺ で活性化すると Na⁺/H⁺ exchanger が活性化されて細胞内の pHi の低下を抑制するという報告と一致している。すなわち、ACH や細胞外液の H⁺ による MCs の pHi の低下を Na⁺/H⁺ exchanger が防御するように関与していることを示唆している。

5. MCs を pH5.5 酸性緩衝液に 60 分間暴露すると、暴露 15 分後でアクチンフィラメントの脱重合が生じ、60 分後は focal adhesion を先端とした星状形態となった。MCs を

pH5.5 酸性緩衝液に 5 分間暴露した後に、pH7.5 の中性緩衝液入れ換え培養すると、60 分後でアクチンフィラメントの軽度の脱重合と細胞質の広がりが減少した。MCs のミトコンドリアの電子伝達系の ATP 合成酵素をオリゴマイシンで阻害した後に、ACH を取り込ませると、ACH 単独群と比較して、pHi の低下は増強された。このことは ACH による pHi の低下にミトコンドリアが関係していることを示唆している。しかし、アクチンフィラメントの脱重合や細胞質の縮小程度は、処置 24 時間後において ACH 単独処置 MCs の方がオリゴマイシン前処置後に ACH を取り込ませた MCs よりも強かった。このことは ACH による MCs の形態の変化は単に pHi に依存するだけではないことを示唆している。アポトーシス惹起物質であるスタウロスポリン(250 nM)で MCs を処置すると、1 時間後でアクチンフィラメントに異常が生じ、4 時間後で MCs の pHi が低下した。また、スタウロスポリンにより MCs において TUNEL 陽性細胞率は、18 時間後から増加し、カスパーゼ 3/7 陽性細胞率も 12 時間後から増加した。一方、ACH により 18 時間後以降 TUNEL 陽性細胞率は上昇した。ACH によるカスパーゼ 3/7 陽性細胞率は 12 時間後から上昇し、36 時間後で約 10%の MCs が陽性であった。このことは、MCs が ACH 処置による pHi の低下から回復する時期にアポトーシスが生じることを示唆している。

6 . 正常及び糖尿病マウスからアルブミン分画を抽出して質量分析計で検討した結果、糖尿病マウスのアルブミン分画でリシン残基が糖化されていた。糖尿病マウスのアルブミン分画は、MCs にアポトーシスを引き起こすこと、酸性化することを予備実験で確認した。しかし、糖尿病患者サンプルを用いた検討に着手することはできなかった。今後の課題である。

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 6 件)

Tomohiro Mizuno, Kengo Yoshioka, Masashi Mizuno, Mie Shimizu, Fumihiko Nagano, Tomoyuki Okuda, Naotake Tsuboi, Shoichi Maruyama, Tadashi Nagamatsu, Masaki Imai. Complement component 5 promotes lethal thrombosis. Scientific Reports, 査読あり, Vol.16, 2017, 42714

Tomohiro Mizuno, Nobuko Nabetani, Natsuki Yamashita, Chizuru Matsumoto, Yoshinari Yasuda, Nagamatsu Tadashi, Norimasa Umemura, Pharmacist blood pressure

management programs using telemonitoring systems are useful for monitoring side effects of antihypertensive drugs in a community pharmacy. Clinical Case Reports, 査読あり, Vol.27, 2016, 1041-1044

Ayako Kondo, Kazuo Takahashi, Tomohiro Mizuno, Akihiro Kato, Daisuke Hirano, Naoki Yamamoto, Hiroki Hayashi, Shigehisa Koide, Hiroshi Takahashi, Midori Hasegawa, Yoshiyuki Hiki, Shunji Yoshida, Keiji Miura, Yukio Yuzawa. The Level of IgA Antibodies to Endothelial Cells Correlates with Histological Evidence of Disease Activity in Patients with Lupus Nephritis. PLoS One, 査読あり, Vol.27, 2016, e0163085

Tomohiro Mizuno, Waichi Sato, Kazuhiro Ishikawa, Yuki Terao, Kazuo Takahashi, Yukihiko Noda, Yukio Yuzawa, Tadashi Nagamatsu, Significance of downregulation of renal organic cation transporter (SLC47A1) in cisplatin-induced proximal tubular injury. OncoTargets and Therapy, 査読あり, Vol.8, 2015, 1701-1706

Tomohiro Mizuno, Takahiro Hayashi, Syayo Hikosaka, Yuka Shimabukuro, Maho Murase, Kazuo Takahashi, Hiroki Hayashi, Yukio Yuzawa, Tadashi Nagamatsu and Shigeki Yamada, Efficacy and safety of febusostat in elderly female patients, Clin. Interv. 査読あり, Aging, Vol.9, 2015, 1489-1493

Ning Wang, Yibin Feng, Hor-YueTan, Fan Cheung, Ming Hong, Lixing Lao, Tadashi Nagamatsu, Inhibition of eukaryotic elongation factor-2 confers to tumor suppression by a herbal formulation Huanglian-Jiedu decoction in human hepatocellular carcinoma. J. Ethnopharmacology, 査読あり, Vol.164, 2015, 309-318

[学会発表](計 11 件)

糖化凝集タンパク質によるメサンギウム細胞の酸性化は、細胞形態変化とアポトーシスを引き起こす。日本薬学会第 137 回年会、平成 29 年 3 月 25 日 (仙台)

酸性溶液はメサンギウム細胞の接着斑とアクチン細胞骨格に異常を起こす。第 90 回日本薬理学会年会、平成 29 年 3 月 15 日 (長崎)

AGE-Cholesterol-凝集タンパク質はマウスにアルブミン尿を引き起こす。第 62 回日本薬学会東海支部総会・大会、平成 28

年7月9日(名古屋)
腎メサングウム細胞はRAGE・IGF-1・LOX-1を介してAGE-Cholesterol-凝集タンパク質の取込みを促進する。第62回日本薬学会東海支部総会・大会、平成28年7月9日(名古屋)

糖尿病性腎症の発症進展にアクアポリンは関係しているか?第59回日本糖尿病学会年次学術集会、平成28年5月9日(京都)

酸性溶液による腎メサングウム細胞での炎症性サイトカインの発現におけるアクアポリン(水チャネル)の関与。第89回日本薬理学会年会 平成28年3月11日(横浜)

腎糸球体メサングウム細胞は酸性化により前炎症性サイトカインmRNAの発現を増加する。第61回日本薬学会東海支部総会・大会、平成27年7月4日(名古屋)

糖化コレステロール凝集タンパク質はメサングウム細胞を酸性化して前炎症性サイトカインの発現を増加させる。第88回日本薬理学会年会、平成27年3月20日(名古屋)

糖尿病性腎症の発症進展機構-メサングウム細胞に取り込まれた糖化コレステロール凝集アルブミンはカテプシンによって分解される。第60回日本薬学会東海支部大会2014、平成26年7月5日(鈴鹿市)
糖尿病性腎症の発症進展機構-糖化コレステロール凝集アルブミンによる前炎症性サイトカインの発現増加。第60回日本薬学会東海支部大会2014、平成26年7月5日(鈴鹿市)

AGE-コレステロール-凝集タンパク質によるメサングウム細胞での前炎症性サイトカイン酸性の増加。第57回日本糖尿病学会年次学術集会、平成26年5月22日(大阪)

〔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

永松 正 (NAGAMATSU Tadashi)
名城大学・薬学部・教授
研究者番号：70103265

(2)研究分担者

水野 智博 (MIZUNO Tomohiro)
名城大学・薬学部・助教
研究者番号：40711669

(3)連携研究者

高橋 和男 (TAKAHASHI Kazuo)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号：90631391

(4)研究協力者

山田 茂樹 (YAMADA Shigeki)
林 高弘 (HAYASHI Takahiro)
平澤 康史 (HIRASAWA Yasushi)
Feng Yibin (FENG Yibin)
秋山 真一 (AKIYAMA Shinichi)
湯澤 由紀夫 (YUZAWA Yukio)
打矢 恵一 (UCHIYA Keiichi)