

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：87403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461340

研究課題名(和文) グルカゴンとmtPKAを介した活性酸素発現機序の解明と糖尿病合併症治療への応用

研究課題名(英文) Role of mitochondrial ROS generation in the development of diabetic complications

研究代表者

西川 武志 (Nishikawa, Takeshi)

独立行政法人国立病院機構熊本医療センター(臨床研究部)・独立行政法人国立病院機構熊本医療センター(臨床研究部)・診療科医長

研究者番号：70336212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは糖尿病合併症発症機序として「高血糖によるミトコンドリア由来活性酸素過剰産生(mtROS)」説を提唱している。この仮説をさらに発展させた本研究において、1)高グルコース培養血管内皮細胞、または糖尿病マウス腎系球体において、細胞内低酸素が生じることを新規に確認した。2)細胞内低酸素誘導の機序として、mtROSおよび水チャネルであるaquaporin-1 (AQP1)が関与していることを確認した。3) AQP1の過剰発現により、高グルコース培養で認められた代謝異常が改善することを確認した。以上より、mtROSと細胞内低酸素が相互に作用しながら糖尿病合併症発症が進行するものと考えた。

研究成果の概要(英文)：We previously proposed that hyperglycemia-induced mitochondrial ROS (mtROS) generation is a key event in the development of diabetic complications. Interestingly, some common aspects exist between hyperglycemia and hypoxia-induced phenomena. Thus, hyperglycemia may induce cellular hypoxia, and this phenomenon may also be involved in the pathogenesis of diabetic complications. In endothelial cells (ECs), cellular hypoxia increased after incubation with high glucose (HG). A similar phenomenon was observed in glomeruli of diabetic mice. HG-induced cellular hypoxia was suppressed by manganese superoxide dismutase (MnSOD) overexpression. Overexpression of MnSOD also increased the expression of aquaporin-1 (AQP1), a water and oxygen channel. AQP1 overexpression suppressed hyperglycemia-induced cellular hypoxia, endothelin-1 and fibronectin overproduction, and apoptosis. Thus, hyperglycemia-induced cellular hypoxia and mtROS generation may promote hyperglycemic damage in a coordinated manner.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病 糖尿病合併症 活性酸素

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病治療の目的は、糖尿病患者が健常人と変わらない良質な人生を送れるようサポートすることであり、そのためには患者の予後に大きな影響を与える糖尿病合併症の発症および進展阻止が重要である。

糖尿病合併症に対する治療戦略を構築するためには合併症発症機構の解明し、機序に基づく治療法を開発することが必要である。

申請者らはこれまでに糖尿病合併症の発症機序として「高血糖によるミトコンドリア由来活性酸素 (mtROS) 過剰産生」(Nature, 404: 787, 2000)を世界に先駆けて提唱し、その後も関連する多くの研究を行ってきた。

一方で、高血糖はエンドセリン-1発現増加、ファイブロネクチン発現増加、アポトーシス誘導なども引き起こし、合併症発症に関与することが報告されている。ところで、これらの異常現象は細胞内低酸素によっても誘導される。しかし、糖尿病が細胞内低酸素を誘導する可能性についてはまだ検討されていない。

### 2. 研究の目的

これまでの研究を踏まえ、今回の研究では、高血糖により細胞内低酸素状態が発現していないかをまず検討した。またその発現メカニズムとして高血糖による mtROS 過剰産生の関与について、検討を加えた。さらに細胞内低酸素状態を改善させることが、糖尿病合併症の抑制に役立つのか検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培養細胞および試薬など

培養細胞はウシ大動脈血管内皮細胞を東洋紡 (大阪)より購入し、2-6継代の細胞を実験に使用した。培養液はDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 和光, 大阪)に10%ウシ血清と antibiotic-antimycotic mixed stock solution (ナカライテスク, 京都)を加えて用いた。

Bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES)、ロテノン、アンチマイシンはシグマアルドリッチ (東京)から購入した。

manganese superoxide dismutase (MnSOD) アデノウイルスは M. Brownlee 教授 (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY) から供与いただいた。human aquaporin-1 (AQP1) アデノウイルスは Applied Biological Materials (Richmond, BC, Canada)から購入した。

#### (2) 細胞内低酸素の検出

低酸素プローブ Pimonidazole hydrochloride (Hypoxyprobe, Inc., Burlington, MA, USA) を培養細胞に添加した。その後、Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled mouse monoclonal hypoxyprobe-1 antibody (Hypoxyprobe,

Inc.) と Alexa Fluor 488 conjugated goat-anti-mouse immunoglobulin antibody (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用いた蛍光染色で検出した。

また別の低酸素プローブ LOX-1 (サイヴァクス株式会社, 神奈川) を用いたリン光染色法でも検討した。

#### (3) mtROS および酸化ストレスの測定

細胞培養実験においては、還元型 MitoTracker Red probe (CM-H2XROS) (Molecular Probes) を用いた蛍光顕微鏡観察で mtROS の測定を行った。また動物実験においては 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) mouse monoclonal antibody 15A3 clone (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) を用いた免疫組織染色で酸化ストレスを評価した。

#### (4) aquaporin-1 (AQP1) 発現量の検討

Anti-AQP1 rabbit polyclonal antibody H-55 clone (Santa Cruz Biotechnology Inc.) を用いたウエスタンブロット法で AQP1 発現量の検討を行った。

#### (5) エンドセリン-1測定

エンドセリン-1 mRNA に対する特異的プライマーを作成し、定量的 RT-PCR を用いて、エンドセリン-1 mRNA 発現量の検討を行った。またエンドセリン-1 ELISA kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) を用いて、エンドセリン-1 蛋白発現量の検討も行った。

#### (6) ファイブロネクチン測定

ファイブロネクチン mRNA に対する特異的プライマーを作成し、定量的 RT-PCR を用いて、ファイibroネクチン mRNA 発現量の検討を行った。

#### (7) アポトーシス検出

Apoptosis In Situ Detection Kit (和光) を用いた terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL) 法で、アポトーシス検出を行った。

#### (8) 糖尿病マウス作成

血管内非特異的 MnSOD 発現トランスジェニックマウス (eMnSOD-Tg) および野生マウス (C57BL/6) にストレプトゾトシン (和光) を腹腔内投与し、糖尿病マウスを作成した。

### 4. 研究成果

(1) 高グルコース培養血管内皮細胞および糖尿病マウス腎臓における細胞内低酸素の観察

5.5 mM グルコース培養 + 1% 酸素及び 25 mM グルコース + 21% 酸素培養において、5.5 mM グルコース + 21% 酸素培養培養に比し、低酸素プローブ Pimonidazole HCl 蛍光染色で染

色増強が確認された。また低酸素プローブ LOX-1 を用いたリン光染色法による検討も行い、同様の結果を得た。さらに、糖尿病マウス腎臓において、Pimonidazole HCl の免疫染色を行ったところ、コントロール野生マウス腎臓に比し、Pimonidazole HCl 免疫染色増強が確認された。

即ち、高グルコース培養および糖尿病による細胞内低酸素状態発現誘導の可能性が示唆された。

### (2) ミトコンドリア呼吸鎖阻害および mtROS 阻害による高グルコース誘導性細胞内低酸素状態への影響の検討

ミトコンドリア呼吸鎖阻害薬であるロテノンまたはアンチマイシン A の投与、または mtROS 除去酵素である MnSOD 過剰発現は 25 mM グルコース培養で認められた Pimonidazole HCl 蛍光染色での染色増強を減弱することが確認された。次に、野生マウスおよび eMnSOD-Tg マウスを用いた検討を行った。野生マウスに糖尿病を導入すると、腎臓で酸化ストレス増加を示唆する 8-OHdG の染色増強を認めた。一方で、eMnSOD-Tg マウスでは糖尿病を導入しても、腎臓で 8-OHdG の染色増強は認めなかった。さらに細胞内低酸素も検討すると、糖尿病野生マウス腎臓で、コントロール野生マウス腎臓に比し、Pimonidazole HCl 免疫染色増強を認めたが、糖尿病 eMnSOD-Tg マウス腎臓では Pimonidazole HCl 免疫染色増強を認めなかった。

即ち、高グルコース培養または糖尿病による細胞内低酸素状態発現誘導の機序として、高グルコースによりミトコンドリア呼吸鎖での酸素消費が亢進することによる 2 次的低酸素誘導の可能性と高グルコースによる mtROS 過剰産生が何らかの機序で細胞内低産を誘導する可能性が示唆された。

### (3) AQP1 発現の検討

25 mM グルコース培養において、5 mM グルコース培養に比し、AQP1 発現増加を認め、MnSOD 過剰発現した 25 mM グルコース培養においては、さらなる AQP1 発現増加を認めた。過酸化水素の添加は AQP1 発現を抑制した。次に、野生マウスおよび eMnSOD-Tg マウスを用いた検討を行った。糖尿病野生マウス腎臓において、コントロール野生マウス腎臓に比し、AQP1 発現増加を認めた。MnSOD 過剰発現した 25 mM グルコース培養においては、さらなる AQP1 発現増加を認めた。そして糖尿病 eMnSOD-Tg マウス腎臓ではさらなる AQP1 発現増加を認めた。

即ち、高グルコース培養は AQP1 発現を増加させるが、高グルコース培養による mtROS 過剰産生は AQP1 発現を抑制し、そのために低酸素が増強する可能性が示唆された。

### (4) AQP1 過剰発現の病態への影響の検討

25 mM グルコース培養において認められた

Pimonidazole HCl 蛍光染色増強は AQP1 過剰発現により、抑制された。

25 mM グルコース培養において、5 mM グルコース培養に比し、エンドセリン-1 発現増加、ファイブロネクチン発現増加、アポトーシス誘導を認めたが、これらの異常は AQP1 過剰発現により抑制された。

3 時間の 25 mM グルコース培養において認められた mtROS 産生増加に対して、AQP1 過剰発現は影響を与えなかった。一方で、24 時間または 96 時間の 25 mM グルコース培養において認められた mtROS 産生増加に対して、AQP1 過剰発現は部分的抑制した。

即ち、AQP1 発現誘導により、高グルコース培養による細胞内低酸素は改善し、糖尿病で認められる種々の代謝異常も改善する可能性が示唆された。

以上の研究より、mtROS と細胞内低酸素が相互に作用しながら糖尿病合併症発症が進行するものと考えた。高グルコース培養および糖尿病による細胞内低酸素の制御により、糖尿病性合併症に対する新規治療法および新規治療薬開発につながる可能性があると考えた。

## 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 8 件)

- Kajihara N, Kukidome D, Sada K, Motoshima H, Furukawa N, Matsumura T, Nishikawa T, Araki E: Low glucose induces mitochondrial reactive oxygen species via fatty acid oxidation in bovine aortic endothelial cells. *Journal of diabetes investigation in press*, 査読有
- Araki E, Haneda M, Kasuga M, Nishikawa T, Kondo T, Ueki K, Kadowaki T. New glycemic targets for patients with diabetes from the Japan Diabetes Society. *Journal of diabetes investigation* 8:123-5, 2017, DOI: 10.1111/jdi.12600, 査読有
- Sada K, Nishikawa T, Kukidome D, Yoshinaga T, Kajihara N, Sonoda K, Senokuchi T, Motoshima H, Matsumura T, Araki E: Hyperglycemia Induces Cellular Hypoxia through Production of Mitochondrial ROS Followed by Suppression of Aquaporin-1. *PLoS ONE* 11: e0158619, 2016, DOI: 10.1371/journal.pone.0158619, 査読有
- Nishikawa T, Araki E: Involvement of advanced glycation end products in "hyperglycemic memory". *J Diabetes Invest*, 7: 297-299, 2016, DOI: 10.1111/jdi.12405, 査読有

Hanatan S, Motoshima H, Takaki Y, Kawasaki S, Igata M, Matsumura T, Kondo T, Senokuchi T, Ishii N, Kawashima J, Kukidome D, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E. Acetate alters expression of genes involved in beige adipogenesis in 3T3-L1 cells and obese KK-Ay mice. Journal of clinical biochemistry and nutrition 59:207-14, 2016, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27895388>. 査読有

Igata M, Tsuruzoe K, Kawashima J, Kukidome D, Kondo T, Motoshima H, Shimoda S, Furukawa N, Nishikawa T, Miyamura N, Araki E. Coexistence of resistance to thyroid hormone and papillary thyroid carcinoma. Endocrinology, diabetes & metabolism case reports 2016:160003, 2016, DOI: 10.1530/EDM-16-0003, 査読有

Kukidome D, Nishikawa T, Sato M, Igata M, Kawashima J, Shimoda S, Matsui K, Obayashi K, Ando Y, Araki E: Measurement of small fibre pain threshold values for the early detection of diabetic polyneuropathy. Diabetic Medicine 33:62-69, 2016, DOI: 10.1111/dme.12797, 査読有

Nishikawa T, Brownlee M, Araki E: Mitochondrial reactive oxygen species in the pathogenesis of early diabetic nephropathy. J Diabetes Invest 6:137-139, 2015, DOI: 10.1111/jdi.12258, 査読有

〔学会発表〕(計 30件)

吉永礼香, 小野恵子, 荒木裕貴, 木下博之, 橋本章子, 西川武志, 西晋輔, 浅尾千秋: 糖尿病発症時に可逆性の脳梁膨大部病変を認めた1型糖尿病の1例. 第315回日本内科学会九州地方会, 2016/11/20, ホテル日航熊本(熊本市).

木下博之, 小野恵子, 木下翔太郎, 荒木裕貴, 橋本章子, 西川武志, 高橋毅, 荒木栄一: 高齢発症の劇症1型糖尿病に非閉塞性腸間膜虚血を合併した1例. 第54回日本糖尿病学会九州地方会, 2016/10/14-2016/10/15, かごしま県民交流センター(鹿児島).

八木喜崇, 西川武志, 小野恵子, 富田正郎, 高橋毅, 荒木栄一: ビグアナイド薬による乳酸アシドーシスに対し緊急透析し救命しえた一例. 第54回日本糖尿病学会九州地方会, 2016/10/14-2016/10/15, かごしま県民交流センター(鹿児島).

大塚康弘, 西川武志, 荒木裕貴, 木下博之, 橋本章子, 小野恵子, 高橋毅, 荒木栄一: 高度な糖毒性により著明な高血糖を呈したソフトドリンクケトアシドーシスの1例. 第54回日本糖尿病学会九州地

方会, 2016/10/14-2016/10/15, かごしま県民交流センター(鹿児島).

梶原伸宏, 久木留大介, 佐田公範, 本島寛之, 松村剛, 西川武志, 荒木栄一: 低血糖による糖尿病合併症増悪機序 - 低血糖誘導ミトコンドリア由来活性酸素(mtROS)の関与 -. 第54回日本糖尿病学会九州地方会, 2016/10/14-2016/10/15, かごしま県民交流センター(鹿児島).

西川武志: 合併症予防におけるヘモグロビンA1cの意義と限界. 第31回日本糖尿病合併症学会, 2016/10/7-2016/10/8, 仙台国際センター(仙台市).

久木留大介, 梶原伸宏, 佐田公範, 本島寛之, 松村剛, 西川武志, 荒木栄一: 急激な血糖是正による糖尿病網膜症増悪の機序解明 - ミトコンドリアROSの関与 -. 第31回日本糖尿病合併症学会, 2016/10/7-2016/10/8, 仙台国際センター(仙台市).

Kajihara N, Kukidome D, Sada K, Motoshima H, Matsumura T, Nishikawa T, Araki E: Hypoglycaemia-induced retinal neurodegeneration is associated with mitochondrial ROS production caused by fatty acid oxidation. the 52nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, 2016/9/12-2016/9/16, Munich, Germany.

梶原伸宏, 久木留大介, 佐田公範, 本島寛之, 松村剛, 西川武志, 荒木栄一: 低血糖による糖尿病合併症発症増悪機序におけるミトコンドリア由来活性酸素(mtROS)の関与. 第66回日本内科学会総会, 2016/9/3-2016/9/4, 和歌山県JAビル(和歌山市).

高橋毅, 大津可絵, 坂本和香奈, 松山利奈, 橋本章子, 小野恵子, 西川武志, 荒木栄一, 御手洗頼太: 救急救命士による「意識障害患者への血糖測定と低血糖時のブドウ糖注射」熊本県における取り組み. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016/5/19-2016/5/21, 国立京都国際会館(京都市).

久木留大介, 佐藤美希, 本島寛之, 松村剛, 下田誠也, 西川武志, 荒木栄一: 糖尿病患者におけるバランス能力の検討 壮年期にも転倒リスクあり. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016/5/19-2016/5/21, 国立京都国際会館(京都市).

梶原伸宏, 久木留大介, 佐田公範, 本島寛之, 松村剛, 西川武志, 荒木栄一: 糖尿病合併症の機序解明 低血糖による糖尿病合併症増悪におけるミトコンドリア由来活性酸素(mtROS)の関与. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会,

2016/5/19-2016/5/21, 国立京都国際会館(京都市).

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: 高血糖は細胞内低酸素とミトコンドリア由来活性酸素種(mtROS)産生を誘導し、両者の相互作用が糖尿病合併症を進展する. 第27回分子糖尿病学シンポジウム, 2015/12/5, 丸ビルホール&コンファレンススクエア(東京都).

西川武志: 合併症予防における血糖管理の意義と展望. 第30回日本糖尿病合併症学会, 2015/11/27-2015/11/28, 愛知県産業労働センター ウィンクあいち(名古屋).

西川武志: 大血管合併症の発症・進展予防の戦略. 第53回日本糖尿病学会九州地方会, 2015/11/27-2015/11/28, アクロス福岡(福岡), 教育講演.

瀬ノ口隆文, 山田沙梨恵, 松村剛, 本島寛之, 石井規夫, 福田一起, 村上彩子, 守田雄太郎, 西川武志, 荒木栄一: インスリン抵抗性および動脈硬化症発症・進展におけるマクロファージ増殖の意義の検討. 第53回日本糖尿病学会九州地方会, 2015/11/27-2015/11/28, アクロス福岡(福岡).

松村剛, 木下博之, 山中幹宏, 福田一起, 石井規夫, 瀬ノ口隆文, 西川武志, 大野礼一, 永井竜児, 荒木栄一: 非侵襲指先部経皮蛍光AGEs測定による糖尿病細小血管合併症スクリーニング法の臨床的意義. 第53回日本糖尿病学会九州地方会, 2015/11/27-2015/11/28, アクロス福岡(福岡).

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: 糖尿病合併症発症へのAquaporin-1の関与とその発現亢進による合併症治療の可能性. 第53回日本糖尿病学会九州地方会, 2015/11/27-2015/11/28, アクロス福岡(福岡).

Kukidome D, Sato M, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E: Impaired balance ability, particularly one-leg stand evaluation, is associated with diabetic complications even in younger adults with type 2 diabetes. the 51st Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, 2015/9/14-2015/9/18, Stockholm, Sweden

Kiminori S, Nishikawa T, Kukidome D, Kajiwara N, Motoshima H, Matsumura T, Araki E: Cellular hypoxia and mitochondrial reactive oxygen species may promote hyperglycemic damage in a coordinated manner. the 51st Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes,

2015/9/14-2015/9/18, Stockholm, Sweden.

21 松村剛, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 木下博之, 福田一起, 山田沙梨恵, 村上彩子, 西川武志, 荒木栄一: 肥満・メタボリックシンドロームにおける血清脂質値へのコレステロール合成・吸収能の影響. 第47回日本動脈硬化学会総会, 2015/7/9-2015/7/10, 仙台国際センター(仙台市).

22 松村剛, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 木下博之, 福田一起, 山田沙梨恵, 村上彩子, 本島寛之, 近藤龍也, 西川武志, 荒木栄一: 肥満2型糖尿病におけるHDL亜分画とインスリン抵抗性との関連性の検討. 第65回日本体質医学会, 2015/7/4-2015/7/5, 札幌コンベンションセンター(札幌市).

23 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: 細胞内低酸素誘導及びミトコンドリア由来活性酸素のHyperglycemic memoryへの関与. 第65回日本体質医学会, 2015/7/4-2015/7/5, 札幌コンベンションセンター(札幌市).

24 久木留大介, 佐藤美希, 本島寛之, 松村剛, 西川武志, 荒木栄一: 2型糖尿病患者における転倒リスクの検討. 第65回日本体質医学会, 2015/7/4-2015/7/5, 札幌コンベンションセンター(札幌市).

25 Yamada S, Senokuchi T, Matsumura T, Nishikawa T, Araki E: Impacts of Local Macrophage Proliferation on Atherosclerotic Plaque Progression and Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. The 75th ADA scientific meeting, 2015/6/5-2015/6/9, Boston, MA.

26 西川武志: 糖尿病性大血管障害と酸化ストレス. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015/5/21-2015/5/24, 海峡メッセ下関(下関市).

27 西川武志: 糖尿病合併症と酸化ストレス. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015/5/21-2015/5/24, 海峡メッセ下関(下関市).

28 山田沙梨恵, 瀬ノ口隆文, 松村剛, 村上彩子, 木下博之, 福田一起, 石井規夫, 本島寛之, 西川武志, 荒木栄一: インスリン抵抗性及び動脈硬化の発症・進展に対する組織浸潤マクロファージ増殖の生理学的意義の検討. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015/5/21-2015/5/24, 海峡メッセ下関(下関市).

29 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: Hyperglycemic memoryの機序解明 糖尿病合併症発症における細胞内低酸素誘導とミトコンドリア由来活性酸素の関与. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会,

- 2015/5/21-2015/5/24, 海峡メッセ下関  
(下関市).
- 30 松村剛, 木下博之, 本島寛之, 近藤龍也,  
瀬ノ口隆文, 石井規夫, 松嶋和美, 杉内  
博幸, 西川武志, 荒木栄一: 2型糖尿病  
におけるHDL亜分画とインスリン抵抗性  
との関連. 第112回日本内科学会,  
2015/4/10-2015/4/12, みやこめっせ(京  
都市).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

西川 武志(Nishikawa Takeshi)  
国立病院機構熊本医療センター 糖尿病  
内分泌内科・部長  
研究者番号: 70336212

### (2)研究分担者

荒木 栄一(Eiichi Araki)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号: 10253733

久木留 大介(Kukidome Daisuke)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 10555759

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし