

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860651

研究課題名(和文)ミトコンドリアの恒常性維持を基盤としたサーチュインの糖尿病腎症に対する意義の解明

研究課題名(英文)The role of Sirtuin on diabetic nephropathy based on maintaining mitochondrial

研究代表者

渡邊 愛(竹田愛)(WATANABE, Ai)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：70625722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病腎症(以下腎症)の病態形成に重要なミトコンドリア(Mt)酸化ストレスは活性酸素種産生/抗酸化バランスとMt機能低下・恒常性維持の破綻により生じるが、NAD+依存性脱アセチル化酵素(Sirt3)は、Mt酸化還元の制御とMt恒常性維持に重要な役割を果たしている。糖尿病Zucker diabetic fatty ラット腎近位尿細管細胞ではNAD+分解酵素(CD38)の発現増加に起因するNAD+消費の亢進とSirt3機能低下がMt酸化ストレスの増強に寄与していること、さらにオートファジー機能の低下による異常Mtの蓄積の結果、Mt恒常性の破綻が生じ、腎症の発症・進展に関与している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial (Mt) oxidative stress, which is important for the pathogenesis of diabetic nephropathy, is caused by the breakdown of active oxygen species production / antioxidant balance and Mt function decline / homeostatic maintenance. The NAD + dependent deacetylase (Sirt 3) plays an important role in controlling Mt redox and Mt homeostasis. In renal proximal tubular cells of Zucker Diabetic fatty rats, the increase in NAD + consumption possibly due to the increased expression of CD38, which is known as NAD+ degrading enzyme, and the decrease in Sirt 3 function contributed to the enhancement of Mt oxidative stress. And then, the autophagy function is impaired in the kidney of diabetic rats, resulting in the accumulation of abnormal Mt and the breakdown of Mt homeostasis, which is involved in the initiation and progression of diabetic nephropathy.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病腎症 Sirt3 ミトコンドリア 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

糖尿病腎症(以下腎症)は、網膜症・末梢神経障害を含む糖尿病最小血管合併症の1つであるが、末期腎不全へ進展する慢性腎臓病であり、わが国における新規透析療法導入の原疾患の第一位となっている。さらに、腎症を有する患者は心血管疾患の発症リスクが高く、患者の生活の質(QOL)の低下および健康寿命の短縮に寄与しているため、その管理は重要である。現在のところ、腎症に対する治療は、末期腎不全への進展の抑制および、心血管疾患の発症抑制を目指して、血糖・血圧・脂質を含む代謝異常の是正を中心とした包括的治療が推奨されている。しかしながら、その効果は未だ十分ではないため、腎症の発症・進展機序の更なる解明と新規治療標的の探索が必要である。

腎は加齢に伴い機能障害・低下を呈する臓器であり、加齢は腎症進展の危険因子の一つと認識されている。老化腎の特徴の一つである尿細管細胞萎縮は、ミトコンドリア酸化ストレスに起因する尿細管細胞死が関与していると考えられている。ミトコンドリア酸化ストレスは、活性酸素種(ROS)の産生亢進と抗酸化システムの低下およびMt機能低下・恒常性維持機構の破綻により生じる。NAD⁺依存性脱アセチル化酵素であるサーチュインは、Sirt1-7のサブタイプが存在することが知られているが、その中でSirt3は、主にミトコンドリアに存在し、ミトコンドリアにおける酸化還元の制御、ミトコンドリア機能、さらにミトコンドリアの恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、糖尿病腎尿細管細胞のミトコンドリア酸化ストレス増強機構の詳細、特にSirt3の機能低下と、そのミトコンドリアにおける酸化還元およびミトコンドリアの恒常性維持に及ぼす影響は未だ明らかではない。

2. 研究の目的

糖尿病腎尿細管細胞におけるミトコンドリア酸化ストレス増強機構の詳細を、Sirt3の機能低下と、Sirt3機能低下に起因するミトコンドリア酸化還元および恒常性維持の破綻の観点から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

糖尿病腎尿細管細胞のミトコンドリア酸化ストレス増強機構の詳細、特にSirt3の機能低下のミトコンドリア酸化還元およびミトコンドリア恒常性維持に及ぼす影響を明らかにするため、糖尿病動物モデルとして2型糖尿病(Zucker diabetic fatty (fa/fa)ラットを、培養細胞はヒト近位尿細管細胞株(HK2細胞)を用い、以下の実験的検証を行った。

1) 動物実験：2型糖尿病(Zucker diabetic fatty (fa/fa) : ZDF)ラット(糖尿病群)と非糖尿病対照(Zucker Lean : ZL)ラット(コントロール群)(27週齢雄)について、HbA1c値、腎重量、尿中アルブミン排泄量(UALB)・L-FABP排泄量(LFAB)(尿中Cr補正)、血漿シスタチンC値(CysC)、腎線維化：マッソントリクローム染色、3型コラーゲンmRNA発現(腎皮質)(RT-PCR)、尿細管細胞障害：Kim1(Kidney injury molecule 1)免疫組織化学(IHC)およびmRNA発現(腎皮質)(RT-PCR)、炎症性変異：CD68 IHCおよびmRNA発現(腎皮質)(RT-PCR)、IL6(interleukin 6)・TNF(tumor necrosis factor)mRNA発現((腎皮質)RT-PCR)、ミトコンドリア酸化ストレスおよびSirt3関連：8-OHdG(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)(尿中排泄量、ミトコンドリアDNA中含有量)、アセチル化Mn-SOD(manganese superoxide dismutase)、IDH2(Isocitrate dehydrogenase2)発現(腎皮質サンプルからの抽出ミトコンドリア)(ウエスタンブロット)、Sirt3・CD38(NAD⁺分解酵素)・PARP1(Poly(ADP-ribose) polymerase 1)発現(腎皮質)

(ウエスタンブロット)、オートファジーおよびミトコンドリア恒常性関連：p62、DRP1(dynamain-related protein 1)発現(腎皮質)(ウエスタンブロット)、電子顕微鏡下、近位尿細管細胞(PTEC)におけるミトコンドリアの形態的観察による評価を行った。

2)培養細胞実験：高ブドウ糖(30mM)培養下ヒト尿細管細胞(HK2)におけるアセチル化 Mn-SOD および IDH2、Sirt3、PRAP1、CD38、DRP1、p62 発現(ウエスタンブロット)の評価を行った。

4. 研究成果

HbA1c 値、腎重量、尿中アルブミン/Cr 比、尿中 L-FABP/Cr 比、尿中 8-OHdG 排泄量、血漿シスタチン C 値、腎線維化(マッソントリクローム染色、3 型コラーゲン mRNA 発現)、尿細管障害(Kim-1 免疫組織染色強度および mRNA 発現)、炎症性変化(CD68 免疫組織染色強度、CD68/IL-6/TNF- mRNA 発現)は、コントロール群と比べて、糖尿病群において有意な上昇・増強を示した(HbA1c: $2.95 \pm 0.34\%$ (コントロール群), $8.8 \pm 0.9\%$ (糖尿病群), コントロール群 vs. 糖尿病群, $p < 0.001$) (腎重量: $3.24 \pm 0.34\text{g}$ (コントロール群), $2.53 \pm 0.14\text{g}$ (DM), コントロール群 vs. 糖尿病群, $p < 0.001$) (血漿シスタチン C 値: $0.74 \pm 0.12\text{ng/ml}$ (コントロール群), $0.97 \pm 0.039\text{ng/ml}$ (糖尿病群), Cont vs. DM, $p < 0.01$) (尿中アルブミン/Cr: $0.035 \pm 0.023\text{mg/gCr}$ (コントロール群), $0.66 \pm 0.34\text{mg/gCr}$ (糖尿病群), Cont vs. 糖尿病群, $p < 0.001$) (尿中 L-FABP/Cr $2.17 \pm 0.99 \mu\text{g/gCr}$ (コントロール群), $29.7 \pm 21.8 \mu\text{g/gCr}$ (糖尿病群), コントロール群 vs. DM, $p < 0.001$)。また DM 群ではコントロール群と比べ、酸化ストレスの増強(ミトコンドリア DNA 中 8-OHdG 含有量、(尿中 8-OHdG/Cr $15.6 \pm 5.3\text{ng/mgCr}$ (コントロール群), $35.0 \pm 15.7 \mu\text{g/mgCr}$ (糖尿

病群), コントロール群 vs. 糖尿病群, $p < 0.05$) (ミトコンドリア DNA 中 8-OHdG $7.61 \pm 1.27\text{ng/mgDNA}$ (コントロール群), $11.4 \pm 0.48\text{ng/mgDNA}$ (糖尿病群), コントロール群 vs. 糖尿病群, $p < 0.01$) (糖尿病群におけるアセチル化 Mn-SOD および IDH2 発現の増加)、オートファジーの低下(糖尿病群における p62 発現の増加)とミトコンドリア分裂・融合バランスの不均衡(糖尿病群における DRP1 発現の増加、ミトコンドリア膨化・断片化(電顕下近位尿細管細胞)の増加)を認めた。さらに、糖尿病群では CD38 および PARP1 発現増加がみられ、NAD+消費の亢進から Sirt3 活性低下をきたし、Sirt3 の標的蛋白質である抗酸化酵素 Mn-SOD および IDH2 のアセチル化の亢進に関連し、ミトコンドリア酸化ストレスの増強の結果を招いている可能性が示唆された。

また高ブドウ糖培養下 HK2 細胞においても、糖尿病ラット腎と同様にアセチル化 Mn-SOD および IDH2 発現の増加、さらに CD38、PARP1、p62、DRP1 発現の増加が認められた。

以上より、糖尿病腎近位尿細管細胞では NAD+消費の亢進(CD38 および PARP1 の増加)に起因する Sirt3 機能の低下がミトコンドリア酸化ストレスの増強に寄与していること、さらに障害を受けたミトコンドリアの分裂増加とオートファジー機能の低下の結果、ミトコンドリア恒常性の破綻が生じていること、それらが腎症の発症・進展に関与している可能性が考えられた。今後、NAD+消費系である CD38 および PARP1 の抑制による Sirt3 の活性化が腎症に対する新たな治療標的になり得ると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3件)

小倉慶雄、北田宗弘、鈴木妙子、門野至、
渡邊愛、古家大祐 糖尿病腎近位尿細管にお
けるミトコンドリア酸化ストレスの増強は
Sirt3機能の低下が関与する 第17回日本抗
加齢学会学術集会 2017年6月2日(東京
国際フォーラム 東京都)

小倉慶雄、北田宗弘、鈴木妙子、門野至、
渡邊愛、古家大祐 Sirt3機能低下は糖尿病腎
近位尿細管におけるミトコンドリア酸化ス
トレスの増強に寄与する第60回日本糖尿病
学会学術集会 2017年5月19日(名古屋国
際会議場 愛知県名古屋市)

小倉慶雄、北田宗弘、鈴木妙子、渡邊愛、
金崎啓造、中川淳、古家大祐 糖尿病腎症の
発症・進展にはSirt3の活性低下に関連した
ミトコンドリア酸化ストレスが関与する
第31回日本糖尿病合併症学会学術集会
2016年10月7日(仙台国際会議場 宮城県
仙台市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 愛 (WATANABE, Ai)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号: 70625722

(4)研究協力者

北田 宗弘 (KITADA, Munehiro)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40434469

古家 大祐 (KOYA, Daisuke)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号: 470242980