

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590155
 研究課題名（和文）糖尿病性腎症の増悪因子であるアポE 2 遺伝子・高レムナント血症と薬剤介入
 研究課題名（英文）Risk factors for diabetic nephropathy (apolipoprotein E2 allele and remnant lipoproteins) and drug intervention
 研究代表者
 衛藤 雅昭 (ETO MASAOKI)
 奥羽大学・薬学部・教授
 研究者番号：90133818

研究成果の概要：目的はわれわれの見出したアポE 2 遺伝子、高中性脂肪血症／高レムナント血症が糖尿病性腎症を増悪させる機序を、また薬物の効果を検討することである。アポE 2 遺伝型を有する糖尿病患者由来レムナントリポ蛋白が培養ヒト腎メサンギウム細胞に対して TGF- β および細胞外基質の mRNA を増加させることを明らかにした。さらに PPAR α のリガンドであるフィブラート薬がレムナントリポ蛋白による TGF- β および細胞外基質の mRNA の増加を抑制することが判明した。フィブラート薬は糖尿病患者において血中レムナントを低下させ、また腎メサンギウム細胞に直接作用して糖尿病性腎症を防御する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：糖尿病性腎症、レムナントリポ蛋白、高レムナント血症、高脂血症、
腎メサンギウム細胞、アポ E2 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症の危険因子は高血糖と高血圧といわれていたが、高脂血症とくに高中性脂肪血症/高レムナント血症も一部関与することを、われわれは「糖尿病とアポ E 遺伝子多型に関する研究」により発見し

た (1994, 1995)。アポ E2 遺伝子とそれをもたらす高中性脂肪血症/高レムナント血症が腎症の増悪因子であることが明らかになった。この発見がアポ E 遺伝型と糖尿病性腎症に関する研究の世界的発端となったといえる。その後の国内外の追試によ

り、これは確立されたといえる状況にある。

2. 研究の目的

アポ E 2 遺伝子は高脂血症関連遺伝子であり、血中レムナントリポ蛋白や中性脂肪 (TG) を増加させる遺伝子である。レムナントリポ蛋白は TG-rich、コレステロール rich、アポ E-rich で動脈硬化惹起性リポ蛋白として知られていた。したがってアポ E 2 遺伝子が糖尿病性腎症を増悪させる機序として、レムナントリポ蛋白が増加し、これが腎障害を起こしている可能性が考えられる。本研究の目的はアポ E 2 遺伝子、高中性脂肪血症/高レムナント血症と糖尿病性腎症の関連を III 型高脂血症患者において証明すること、そしてアポ E 2 遺伝子、高中性脂肪血症/高レムナント血症が糖尿病性腎症を増悪させる機序を明らかにすること、さらにそれに対する薬物効果を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病を有する III 型高脂血症患者 15 名を対象とし、糖尿病性腎症の発症頻度、腎症発症までの糖尿病罹病期間を検討した。

(2) 超遠心法により、アポ E 2 遺伝子を有する糖尿病患者から得たレムナントリポ蛋白を、培養ヒト腎メサンギウム細胞と incubation し、腎メサンギウム細胞へのレムナントリポ蛋白の取り込み能を検討した。さらにこの系において脂質関連受容体であるスカベンジャー受容体、LDL 受容体、VLDL 受容体の関与について RNA interference 法により検討した。

(3) アポ E 2 遺伝子を有する糖尿病患者由来レムナントリポ蛋白を、培養ヒト腎メサンギウム細胞と incubation し、レムナントリポ蛋白の培養ヒト腎メサンギウム細

胞に対する TGF- β および細胞外基質の mRNA 発現を RT-PCR 法により検討した。さらにレムナント・中性脂肪低下剤であるフィブラート薬 (ベザフィブラート) をこの系に添加し、レムナントリポ蛋白による TGF- β および細胞外基質の mRNA 発現へのフィブラート薬の効果を検討した。

4. 研究成果

(1) III 型高脂血症はアポ E2/E2 遺伝型 (アポ E2 ホモ型) を基盤として発症し、その本態は高レムナント血症である。したがって III 型高脂血症患者においてアポ E2 遺伝子やレムナントの腎症に対する影響を検討することはその意義を明らかにする上で重要である。糖尿病を有する III 型高脂血症患者 15 名において顕性腎症の発症頻度は 46.7% と高値であった。また顕性腎症発症までの糖尿病罹病期間は平均 6.3 ± 1.9 年と短期であった (通常 10 年以上)。これらの結果は、糖尿病を有する III 型高脂血症患者は腎症を早期に発症しやすいこと、すなわちアポ E2 遺伝子・高レムナント血症が腎症の増悪因子であることを確認させるものである。III 型高脂血症と腎症に関する報告はこれが世界最初である。

(2) アポ E 2 遺伝子を有する糖尿病患者由来レムナントリポ蛋白と培養ヒト腎メサンギウム細胞との incubation 実験により、腎メサンギウム細胞へのレムナントリポ蛋白の取り込み能が増加していること、さらにこの取り込みに VLDL 受容体が関与していることが明らかになった。

以上より、糖尿病患者で増加したレムナントが VLDL 受容体を介して腎メサンギウム細胞に脂質蓄積をもたらし、何らかの機序により腎メサンギウム細胞に障害性に作用していることが示唆された。

(3) アポ E 2 遺伝子を有する糖尿病患者由

来レムナントリポ蛋白と培養ヒト腎メサンギウム細胞との incubation 実験により、レムナントリポ蛋白が腎メサンギウム細胞に対して TGF- β および細胞外基質の mRNA 発現を増加させることが明らかになった。さらにフィブラート薬（ベザフィブラート）をこの系に添加する実験を行った結果、ベザフィブラート薬はメサンギウム細胞におけるレムナントリポ蛋白による TGF- β および細胞外基質 mRNA 発現の増加を抑制すること、メサンギウム細胞の PPAR α mRNA の発現を増加させることが明らかになった。

糖尿病性腎症は、糸球体メサンギウム領域での細胞外基質（type IV コラーゲンやフィブロネクチン）の増生、メサンギウム領域の増大により糸球体硬化がもたらされることを特徴とする。また糸球体硬化の進展には TGF- β の増加が関与する。これらの増加をもたらす第 1 の因子は高血糖であるといわれているが、本研究はレムナントもヒトメサンギウム細胞の type IV コラーゲンの mRNA と TGF- β の mRNA を増加させることをはじめて明らかにした。

次に、ヒト 2 型糖尿病においてフィブラート薬が糖尿病性腎症の進展を抑制することは大規模臨床試験 FIELD により明らかにされている。本研究は、レムナント負荷ヒトメサンギウム細胞において、フィブラート薬が type IV コラーゲン、TGF- β 発現の増加を抑制することを明らかにし、大規模臨床試験の結果を細胞レベルで支持した。フィブラート薬は、PPAR α のリガンドであり、PPAR α は腎臓においても発現している。本研究はフィブラート薬が直接に作用して腎メサンギウム細胞における PPAR α の発現を増加させ、type IV コラーゲンと TGF- β の発現を抑制することを示した。

フィブラート薬の腎症に対する効果は、血中中性脂肪やレムナント濃度を低下させることにより脂肪毒性を減少させたことと、また本研究で明らかになったように、腎臓に直接に作用して PPAR α を介して炎症や細胞接着、細胞外基質増生を抑制することにより説明されるであろう。

高中性脂肪血症が糖尿病性腎症の増悪因子であることが、日本における JDCS 研究、英国における UKPDS 74 研究、豪州における FIELD 研究においても明らかにされている。腎症進展阻止のために早期に高中性脂肪血症/高レムナント血症を治療することが今後重要視されるであろう。そのための治療薬として、フィブラート薬 (FIELD 研究で証明)、EPA 製剤、エゼチミブ (レムナントを 40%低下) が有力といえる。日本人において増加する糖尿病性腎症の進展阻止のため、高中性脂肪血症/高レムナント血症の是正が重要であること、薬剤介入が可能であることを本研究は示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Terasawa R, Hattori Y, Agatsuma I, Saito M, Eto M. : Bezafibrate suppresses the expression of TGF- β and type IV collagen in human mesangial cells loaded with remnant lipoproteins. Jpn Pharmacol Ther 36: 117-122, 2009
- ② Saito M, Kumanomido A, Takigami S, Eto M. : Effectiveness and safety of the combination therapy of pitavastatin and bezafibrate in type 2 diabetic patients with type IIb hyperlipidemia. Jpn Pharmacol Ther 36: 317-323, 2008
- ③ Saito M, Kumanomido A, Takigami S,

Hattori Y, Agatsuma I, Terasawa R, Eto M. : Effectiveness and safety of ezetimibe monotherapy in hyperlipidemic patients. -Ezetimibe reduces plasma remnant cholesterol-. Jpn Pharmacol Ther 36: 411-416, 2008

- ④ Okubo M, Horinishi A, Saito M, Ebara T, Endo Y, Kaku K, Murase T, Eto M. : A novel complex deletion-insertion mutation mediated by Alu repetitive elements leads to lipoprotein lipase deficiency. Molecular Genetics and Metabolism, 92: 229-233, 2007
- ⑤ Saito M, Eto M. : Accelerated nephropathy in type 2 diabetic patients with type III hyperlipoproteinemia (apo E2/2 genotype), and the detrimental effects of their remnant lipoproteins on human mesangial cells. Diabetologia (Suppl.): 31-32, 2007
- ⑥ Saito M, Takigami S, Tominaga M, Eto M. : Effectiveness and safety of rosuvastatin administration in type 2 diabetic patients with hypercholesterolemia. Jpn Pharmacol Ther 35: 1077-1083, 2007
- ⑦ Mukai J, Tada H, Watanabe Y, Miura M, Katsuyama S, Shouji T, Mori K, Eto M., Suzuki T. : Lipids behavior and adverse effects for oral antidiabetic agents in patients with type 2 diabetes treated with sulfonylureas alone based on systematic review. YAKAGAKU ZASSHI 127: 1747-1756, 2007

①から⑦すべて査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① Saito M, Eto M. : Accelerated

nephropathy in type 2 diabetic patients with type III hyperlipoproteinemia (apo E2/2 genotype), and the detrimental effects of their remnant lipoproteins on human mesangial cells. The 43rd EASD Annual Meeting (欧州糖尿病学会)、2007年9月18日(口演)、アムステルダム

- ② Saito M, Eto M. : Remnant lipoproteins and small dense LDL in patients with the metabolic syndrome. The 77th EAS congress (欧州動脈硬化学会)、2008年4月26-29日、イスタンブール
- ③ Eto M., Hattori Y, Terasawa R, Saito M. : Bezafibrate suppresses the expression of TGF- β and type IV collagen mRNA in human mesangial cells loaded with remnant lipoproteins. The 45rd EASD Annual Meeting (欧州糖尿病学会) 2009年9月29日-10月2日発表予定、ウィーン(採択済み)

[図書] (計 3 件)

- ① 衛藤雅昭、服部由香、斉藤美恵子 : 糖尿病における大規模臨床試験 スタチン系薬剤、日本臨床社、「大規模臨床試験」、2008年、p675-679
- ② 衛藤雅昭、服部由香、上妻いくえ、斉藤美恵子 : III型高脂血症、南江堂、「脂質異常症—基本を踏まえた実践」内科 103 巻、2009年、p64-68
- ③ 衛藤雅昭、服部由香、斉藤美恵子 : 糖尿病治療と脳梗塞の再発予防、メジカルビュー社、「変わる脳梗塞の再発予防～薬物療法と血圧・脂質・血糖管理」Mebio 26 巻、2009年、p58-65

[その他]

ホームページ

奥羽大学研究紹介 衛藤雅昭

<http://www.ohu-u.ac.jp/faculty/research/researchP2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

衛藤 雅昭 (ETO MASA AKI)

奥羽大学・薬学部・教授

研究者番号：90133818

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし