

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03012

研究課題名(和文) 早期糖尿病における蛋白漏出の機能的かつ遺伝子を含めた構造的解明

研究課題名(英文) Functional and genetical study on protein leakage from glomeruli at the early stage of diabetes

研究代表者

仲本 博(Nakamoto, Hiroshi)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：10299183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は生理的な条件下でC-peptideが早期糖尿病の過剰濾過や蛋白漏出を是正する機序を機能と遺伝子から解明することである。スリット膜の構成タンパクの一つであるネフリンとラット早期糖尿病との関連について検討した。ネフリンの発現に対するC-peptideの影響は認められなかった。ラットの血漿中における、iNOS, IL-6, CRP, EPO, VEGFをELISAによって検討した。差が認められたのはiNOSの場合のみで、C-peptideにより、iNOSの濃度が低下することが判明した。早期糖尿病においてC-peptideは構造には寄与しないが、機能的補正作用があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the mechanism how C-peptide correct the hyperfiltration and protein leakage from the glomerulus at the early stage of diabetes in a rat. C-peptide did not affect the expression of nephrin, one of the component proteins of slit membrane. The effect of C-peptide towards iNOS, IL-6, CRP, EPO and VEGF was also examined. The only difference we found was that iNOS concentration was decreased by C-peptide administration. The reduction of iNOS may have contributed to correcting the hyperfiltration and protein leakage from the glomerulus. C-peptide, is considered, affects the rodent glomeruli functionally but not structurally.

研究分野：微小循環生理

キーワード：糖尿病 糸球体濾過 スリット膜 NO ネフリン

1. 研究開始当初の背景

Ido 等が Science 誌に 1997 年、糖尿病における C-peptide の蛋白漏出調節作用・血流調節作用等を報告するまで C-peptide の生理的活性は、知られていなかった。その後、その生理的活性に関する報告が相次いだため、糖尿病において腎や網膜などで調節作用があるなら、心臓においても同様の作用があると申請者は仮説を立て、摘出灌流心を用いて検討したところ、C-peptide がインスリンとともに協調作用を示し冠血流を調節することを見出した(Nakamoto et al., Metabolism, 2004)。後年、C-peptide の心臓自律神経系の改善作用を見出した (Kimura & Nakamoto et al., Peptides, 2005)。また申請者は、以前から腎微小循環の研究にも従事しており、蛍光プローブを応用し濾過の可視化に成功した(図 1、Circulation Journal, 2006, 2008)。2008 年の AHA(米国心臓学会 Circulation Vol.118 PP.1495、) 2009 年の生体医工学世界大会 (Munich, IFMBE Proceeding, Vol. 25, pp.1109) において発表した。申請者はこれより蛍光抗体法で糖尿病の腎系球体のスリット膜を調べれば、過剰濾過の原因の解明が可能であることに気づいた。足細胞は糖尿病早期から濾過障壁の最外側に存在し、毛細管を取り囲むように位置しており、その足突起は篩となって比較的大きな粒子の尿中への漏出を妨げている。

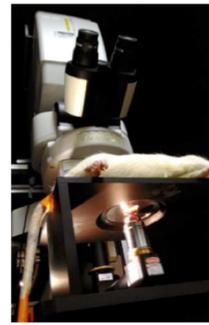
2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの主要因である糖尿病は、今や我が国の医療における社会的最重要課題である。糖尿病は腎不全を来とし、透析導入の第一原因となっている。しかし我々の研究では、実は早期糖尿病の腎臓において過剰な濾過が生じており、アルブミン程度の大きな分子量のタンパク質も漏出していることが判明した。C-peptide はインスリンと共に分泌され、かつては生理的作用がないとされたが、この漏出を是正した。本研究の目的は、生理的な条件下で、C-peptide が早期糖尿病の過剰濾過や蛋白漏出を急性期に是正する機序を、機能と形態と遺伝子から解明することである。

3. 研究の方法

腎微小循環の可視化には、標本を倒立状態で、すなわち下側から観察することを可能にするオブジェクティブインバータを導入した。これにより、ラットの自重によって、腎を観察窓に軽く押し付けることで、呼吸運動による対象の位置変動を取り除く事が可能となり、長時間安定した画像を記録し、簡便に尿細管での数値的解析が可能となった。

倒立顕微鏡による観察



正立型顕微鏡の光路をオブジェクティブインバータによって変更し、倒立型にして対象の下方から観察する。この場合、ラットの自重により呼吸運動による腎の動きが極力少なくなり、精密な数値解析が可能になった。



Objective inverter, InverterScope®

- (1) 実験 1：一つ目の実験には Wistar ラットを用いた。ストレプトゾトシン (STZ: Streptozotocin) 50mg/kg を尾静脈に投与し、糖尿病を誘発させた糖尿病ラットと、正常ラットを使用した。麻酔下の Wistar ラットの腎臓を露出し、血管内腔を染色するために、Texas Red で標識した Albumin を投与した。また、DAPI を投与し、細胞核を染色した。多光子共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon A1R MP) とオブジェクティブインバータを使用し倒立型で尿細管を可視化した。測定した Control ラットと糖尿病ラットの尿細管の径の変化を検証した。
- (2) 実験 2：二つ目の実験には Wistar ラットを用いた。ストレプトゾトシン (STZ: Streptozotocin) を 50mg/kg を尾静脈に投与することで誘発した DM ラットと Control ラットを使用した。麻酔下の Wistar ラットの腎を露出し、血管内腔を染色するために、Texas Red で標識した Albumin を投与した。また、DAPI を投与し、細胞核を染色した。全量が濾過される Lucifer yellow を尾静脈から投与し、原尿を染色した。多光子共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon A1R MP) とオブジェクティブインバータを使用し倒立型で尿細管を可視化した。SNGFR (単一ネフロン系球体濾過率) は撮像したビデオを解析することで求めることができる。従来のマクロパンクチャー法では、顕微鏡下に生体腎のネフロンに 3 箇所穿刺して、血液や尿サンプルを採取して、分析せねばならず、3 から 5 日ほど測定に要した。次に、尿細管を 1 本の円柱に見立て測定した半径と長さから体積、尿細管内上流と下流の 2 点間を染色された原尿が通る時間差から、その体積を SNGFR として算出した。また、C-peptide を投与し、上記の実験と同様に SNGFR を算出した。

- (3) 実験3：三つの目の実験には4群のWistarラットを用いた。ストレプトゾトシン(STZ)を50mg/kgで誘発したI型糖尿病の2ヶ月のDMラット(n=3)、Controlラット(n=3)を使用した。また、DMラットとControlラットの双方にC-peptideを24時間微量投与を施した群も設けた(それぞれ、n=3)。麻酔下のWistarラットの腎をメスで摘出し、その腎をホモジェネートし試料とした。RT-PCR法ではDNA構造変化の解析を行い、Western Blotting法では蛋白質podocinの解析を行った。
- (4) 実験4：四つ目の実験では、上記三つ目の実験と同様に4群のWistarラットを用いた。ストレプトゾトシン(STZ)を50mg/kgで誘発したI型糖尿病の2ヶ月のDMラット(n=3)、Controlラット(n=3)を使用した。また、DMラットとControlラットの双方にC-peptideを24時間微量投与を施した群も設けた(それぞれ、n=3)。麻酔下のラットから6ml採血し、遠心分離して血漿をサンプルとした。ラットの血漿中における、iNOS, IL-6, CRP, EPO, VEGFをELISAによって検討した。これらは、血管拡張、炎症や貧血や血管新生に関わるタンパク質である。

4. 研究の成果

- (5) 実験1：ControlラットとDMラットの尿細管の径の平均値はそれぞれ $21.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (n=40)、 $26.1 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (n=43)となり、ControlラットよりDMラットの方が有意に高値であることが判明した(p<0.05)。我々は、これが糖尿病性腎症における最初の不可逆な現象と推測している。
- ラットの腎皮質に存在する尿細管を下方から観察する倒立型顕微鏡を導入し、安定した観察を可能にした。ControlラットとDMラットにおける尿細管の径を比較したところ、早期の糖尿病性腎症では管径が増加していた。尿細管は、早期糖尿病における腎症の新たな治療標的となり得るだろう。
- (6) 実験2：ControlラットとDMラットとC-peptideを投与したDMラットのSNGFRの平均値は、それぞれ 4.4 ± 0.4 (nL/min)(n=42)、 7.0 ± 0.6 (nL/min) (n=22)、 5.0 ± 0.6 (nL/min)(n=18)となった。SNGFRはDMラットにおいて有意に高値となり、C-peptideの投与により減少したが、Controlラットのレベルまでは、回復しなかった(p<0.05)。標本を下側から観察する倒立型を導入し、安定した長時間観測で、簡易法としてのSNGFR測定が可能となった。また、早期の糖尿病

性腎症ではSNGFRの増加と、C-peptideの過剰濾過是正作用を実証することが出来た。

- (7) 実験3：C-peptideによる変化は、DMラット、Controlラットのいずれでも認められなかった。RT-PCR法では、遺伝子レベルでの蛋白質podocin、nephrin、CD2APの差異がみられず、Western Blotting法によって、C-peptideの有無に関わらず糖尿病に罹患することでpodocinの蛋白量に差異がみられた。

これらのことから、C-peptideが糸球体スリット膜の構造変化を惹起し、遺伝子のレベルからスリット膜を構成する蛋白質に変化をもたらしているのではなく、単に糖尿病そのものによって蛋白質の変化が生じており、C-peptideの関与は構造的では無いと考えられた。C-peptideの過剰濾過の是正は、機能的なものであろう。糖尿病によるスリット膜構成蛋白の減少が、スリット膜構造変化となり、糖尿病による蛋白漏出の原因の一つと推測される。

- (8) 実験4：差が認められたのは、血管拡張に関わるiNOSの場合のみで、C-peptideにより、DMのあるなしに関わらず、iNOSの濃度が低下することが判明した。ARBとNOの関連は、既に報告されているから、ARBの作用を推測することが出来る。ARBは、NO濃度の維持に関与するから、C-peptideとは反対の作用を有することになる。これにより、早期糖尿病においてC-peptideの過剰濾過の是正は、構造変化によるものでなく、機能的補正と考えられ、一つの原因はC-peptideがiNOS抑制によって血管拡張を抑制しているからであろうと推定できる。

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 2件)

Hiroshi Nakamoto MD, PhD
Visualisation studies and glomerular filtration in early diabetic rats
Journal of Biomechanics
Volume 50, 4 January 2017, Pages 138-143
DOI: 10.1016/j.jbiomech.2016.11.034.
査読有

Hiroshi Nakamoto MD, PhD
Transitions in the in-vivo visualisation of renal physiology

Journal of Biorheology
31(2):40-43 2017 Dec.
DOI 10.17106/jbr.31.40
査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

Hiroshi Nakamoto

C-peptide and Early Glomerular Abnormalities in Diabetes
European Association for the Study of Diabetes, Non-Commercial Symposium, C-Peptide and the Pathophysiology of Microvascular Complications of Diabetes
Stockholm, Sweden
2015/09/14

Hiroshi Nakamoto, Toyotaka Yada

Diabetes and Glomerular Filtration Barrier
10th World Congress for Microcirculation
Kyoto, Japan
2015/09/25

Hiroshi Nakamoto, Toyotaka Yada, Yasuo Ogasawara

Functional and structural changes of glomerular filtration in early diabetic rats
The 8th Int. Bio-Fluid Symposium
Pasadena, California, USA
2016/02/14

Hiroshi Nakamoto

Deterioration of slit diaphragm in an early diabetic rat
The 41st Annual Meeting of Japanese Microcirculation Society
Tokyo, Japan
2016/09/23

Hiroshi Nakamoto

Single nephron glomerular filtration rate in a mouse
The 42nd Annual Meeting of Japanese Society for Microcirculation
Toyama, Japan
2017/03/25

仲本 博

単一ネフロン系球体濾過量の早期糖尿病ラット生体での測定
第 56 回日本生体医工学会大会
仙台、日本
2017/05/05

Hiroshi Nakamoto

Discovery of Tubular Dilatation in Early Diabetic Rats
The 82nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society

Osaka, Japan

2018/03/25

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

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

仲本 博 (Nakamoto, Hiroshi)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号：10299183

(2) 研究分担者

矢田 豊隆 (Yada, Toyotaka)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：00210279

(3) 研究分担者

小笠原 康夫 (Ogasawara, Yasuo)
川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授
研究者番号：10152365

(4) 連携研究者

梶谷 文彦 (Kajiya, Fumihiko)
川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授
研究者番号：70029114

(5) 研究協力者 なし

()