

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09372

研究課題名(和文) Metallothionein3の糖尿病性腎症における役割の解明

研究課題名(英文) Metallothionein 3: A New Player in Diabetic Nephropathy

研究代表者

滝山 由美 (TAKIYAMA, YUMI)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00396350

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)：本研究は、抗酸化物質メタロチオネイン3(MT3)に着目して、糖尿病腎尿細管細胞における高血糖により惹起される低酸素状態が、低酸素誘導転写因子(Hypoxia inducible factor-1; HIF-1)の発現誘導とともに、新規HIF-1標的遺伝子MT3の過剰発現を介し、逆行性に糸球体結節性病変形成するという仮説のもと、その意義と制御手段を、MT3ゲノムを含むBAC cloneをtransgeneしたヒト化トランスジェニックマウス(BACTGMT3)を用いて解明した。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that metallothionein 3 (MT3), a novel target gene of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), could be involved in the diabetic glomerular injury in a retrograde fashion, via hyperglycemia-induced hypoxia in renal proximal tubules accompanied with overexpression of MT3. To clarify the role of MT3 in diabetic kidney, we generated transgenic mice, harboring a 40-kb bacterial artificial chromosome (BAC) expressing human MT3 mRNA and protein to generate humanized BAC transgenic mice (BACTGMT3). Aging-, diabetes- and high fat-induced hypoxia induced overexpression of MT3 in tubular cells in BACTGMT3 mice, resulting in narrowing the vascular lumen of peritubular capillaries by the endothelial swelling, which could retrogradely cause glomerular hypertension, leading to the glomerular injury.

研究分野：糖尿病、糖尿病腎症

キーワード：メタロチオネイン3 糖尿病腎症 HIF-1

### 1. 研究開始当初の背景

腎症における重要な病態として「慢性的低酸素状態」がある。申請者らは、メサンギウム細胞における低酸素誘導転写因子 Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) 発現機序 (Ise T, et al. *Kidney Int* 2010)、抗糖尿病薬 Metformin による尿細管細胞内酸素再分布を介した治療学的効果について明らかとした (Takiyama Y, et al. *Diabetes* 2011)。

近年、病理学的検討より、尿細管間質病変が腎症予後に重要とされており、慢性低酸素状態における重要な転写因子である HIF-1 は、その標的遺伝子として VEGF、Glut-1 などの腎臓の造血作用、糖代謝に関与する重要な分子を持つことが知られている。

申請者は、2 型糖尿病モデルラットである ZDF ラット腎臓のホルマリン固定パラフィン包埋切片より、HIF-1 発現が増強している尿細管細胞を microdissection し、total RNA を抽出し、DNA microarray を施行した結果、Metallothionein (MT) 1 の発現増強を認めた。MT は、システイン残基を多く有することから、抗酸化物質として知られており、その isoform には 1~4 がある。MT isoform 3 (MT3) は、マウスにおいて脳特異的に発現する神経抑制因子 growth inhibitory factor (GIF) として同定された低分子蛋白である。ヒトでは、糖尿病患者での発症率が高いアルツハイマー病患者脳における発現減少とアミロイド蛋白代謝への MT3 の関与が報告されているが、MT3 の発現制御機構とヒト糖尿病との関連性についての報告は皆無である。申請者は、本研究の予備的研究結果において、MT3 が HIF-1 の新規標的遺伝子であることを見出したことから、MT3 の糖尿病腎症病態構成因子としての可能性を考えるに至った。

### 2. 研究の目的

本研究は、MT3 に注目し、糖尿病腎症における HIF-1 と MT3 の糖尿病腎症における役割を解明するとともに、糖尿病腎症の病態仮説「尿細管-糸球体 interaction 仮説: 抗酸化物質 MT3 の役割」を検証するのが目的である。

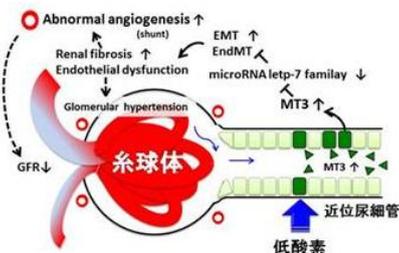


図1. MT3過剰発現による病態機序

### 3. 研究の方法

ヒト MT3 を近位尿細管細胞に過剰発現したマウス (TGMT3) とヒト MT3 ゲノムを含む bacterial artificial chromosome (BAC) clone を transgene したマウス (BACTGMT3) を作製し、①加齢、②ストレプトゾトシン誘発糖尿病、③高脂肪食負荷の 3 つの条件下にお

いて、それぞれのトランスジェニック (TG) マウスの代謝状態、腎病変、腎機能について検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) 加齢 TG マウスでは、正常血糖を呈するにも関わらず、糖尿病腎症様糸球体病変を呈し (図 2a)、特に BACTGMT3 マウスでは Kimmelstiel-Wilson lesion の電顕所見類似のメサンギウム基質に存在するデポジットの無い結節性病変であることを確認した (図 2b. 左図)。また、両 TG マウスに共通して、傍尿細管毛細血管内皮細胞の腫大と内腔狭小化を認め (図 2b. 右図)、上流の毛細血管の拡張とシャント形成異常血管増生に至る病態が考えられた。

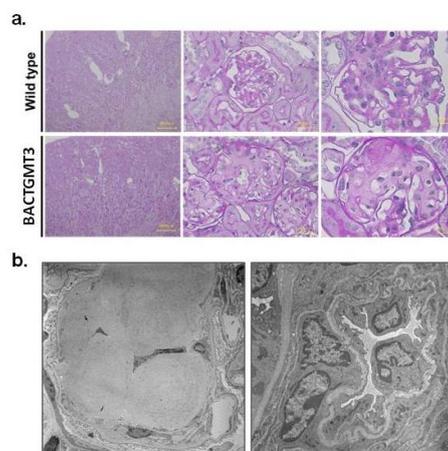


図2. 加齢によるBACTGMT3マウスにおける糖尿病腎症様糸球体病変の形成

(2) 高血糖、高脂肪食負荷による BACTGMT3 マウス腎臓は、糖尿病腎症糸球体病変の増悪 (図 3a) と尿細管細胞における自己貪食空胞増生による尿細管障害 (図 3b) を呈した。

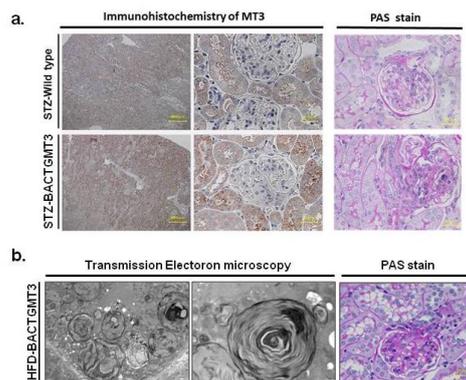


図3. BACTGMT3マウスにおける高血糖(a)と高脂肪食負荷(b)による糖尿病腎症糸球体病変増悪と尿細管細胞における自己貪食空胞増生

(3) 2 型糖尿病患者尿中 MT3/Cr は、5 年間の eGFR 変化率 ( $\Delta$ eGFR (ml/min/1.73m<sup>2</sup>/年) と強い相関を認め ( $r=0.496$ ,  $p=0.036$ )、更に MT3/Cr 4.76 $\mu$ g/g 以上である症例群は fast progressor であることが明らかとなった。微量アルブミン尿は、糖尿病腎症早期診断基準として周知のバイオマーカーであるが、 $\Delta$ eGFR との相関は認めないことから、糖尿病腎症予後予測を可能とする糖尿病腎症バイオマーカーとして MT3 の優越性が示唆された。

## 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 6 件)

- ① Tsuyoshi Yanagimachi, Yukihiro Fujita, Yasutaka Takeda, Jun Honjo, Hidemitsu Sakagami, Hiroya Kitsunai, Yumi Takiyama, Atsuko Abiko, Yuichi Makino, Timothy J Kieffer, Masakazu Haneda. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor treatment induces a greater increase in plasma levels of bioactive GIP than GLP-1 in non-diabetic subjects. **Mol Metab** 6(2): 226-231, 2016. doi: 10.1016/j.molmet.2016.12.009. 査読有
- ② Jun Watanabe, Yumi Takiyama, Jun Honjo, Yuichi Makino, Yukihiro Fujita, Masatoshi Tateno, Masakazu Haneda. Role of IGFBP7 in Diabetic Nephropathy: TGF- $\beta$ 1 Induces IGFBP7 via Smad2/4 in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. **PLOS ONE** 11(3):e0150897, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0150897. 査読有
- ③ Kuralay K. Atageldiyeva, Yukihiro Fujita, Tsuyoshi Yanagimachi, Katsutoshi Mizumoto, Yasutaka Takeda, Jun Honjo, Yumi Takiyama, Atsuko Abiko, Yuichi Makino, Masakazu Haneda. Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor and a Low Carbohydrate Diet Affect Gluconeogenesis and Glycogen Content Differently in the Kidney and the Liver of Non-Diabetic Mice. **PLOS ONE** 11(6):e0157672, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0157672. 査読有
- ④ Tsuyoshi Yanagimachi, Yukihiro Fujita, Yasutaka Takeda, Jun Honjo, Kuralay K. Atageldiyeva, Yumi Takiyama, Atsuko Abiko, Yuichi Makino, Timothy J. Kieffer, Masakazu Haneda. Pancreatic glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) (1-30) expression is upregulated in diabetes and PEGylated GIP(1 - 30) can suppress the progression of low-dose-STZ-induced hyperglycaemia in mice. **Diabetologia** 59(3): 533-541, 2016. doi: 10.1007/s00125-015-3842-y. 査読有
- ⑤ Hiroya Kitsunai, Yuichi Makino, Hidemitsu Sakagami, Katsutoshi Mizumoto, Tsuyoshi Yanagimachi, Kuralay K. Atageldiyeva, Yasutaka Takeda, Yukihiro Fujita, Atsuko Abiko, Yumi Takiyama, Masakazu Haneda. High glucose induces platelet-derived growth factor-C via carbohydrate response element-binding protein in glomerular mesangial cells. **Physiol Rep** 4(6). pii: e12730, 2016. doi: 10.14814/phy2.12730. 査読有

- ⑥ Yukihiro Fujita, Tsuyoshi Yanagimachi, Yasutaka Takeda, Jun Honjo, Yumi Takiyama, Atsuko Abiko, Yuichi Makino, Masakazu Haneda. Alternative form of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and its physiology. **J Diabetes Investig** 7 Suppl 1: 33-37, 2016. doi: 10.1111/jdi.12445. 査読有

[学会発表] (計 21 件)

- ① Yumi Takiyama, Masanori Nakamura, Toshihiro Sera, Kentaro Uesugi, Masato Hoshino, Naoto Yagi, Masakazu Haneda. A Novel Mouse Model of Maternal Overnutrition-induced Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH)/Hepatocellular Carcinoma. 53<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. 2017年9月11-15日、Lisbon (Portugal). poster presentation.
- ② Yumi Takiyama, Ryoichi Bessho, Takahiko Nakagawa, Masakazu Haneda. A New Model for Diabetic Nephropathy: A Hypoxia-Induced Antioxidant Metallothionein-3 BACTG mice. The American Society of Nephrology Annual Meeting & Scientific Exposition. 2016年11月15-20日、Chicago (USA). poster presentation.
- ③ Ryoichi Bessho, Yumi Takiyama, Manami Maeda, Kuralay K. Atageldiyeva, Yukihiro Fujita, Atsuko Abiko, Masakazu Haneda. Zinc; HIF-1 mimetic in Human Renal Proximal Tubular Cells. American Diabetes Association, 76th Scientific Sessions. 2016年6月10-14日、New Orleans (USA). poster presentation
- ④ Yumi Takiyama, Toshihiro Sera, Masanori Nakamura, Manami Maeda, Tsuyoshi Yanagimachi, Ryoichi Bessho, Kentaro Uesugi, Naoto Yagi, Masakazu Haneda. The impact of Diabetes on Total Glomerular Numbers and Size in Kidney Estimated by Synchrotron Radiation Micro-CT in Spring-8. The American Society of Nephrology Annual Meeting & Scientific Exposition. 2015年11月3-8日、San Diego (USA). poster presentation.
- ⑤ Yumi Takiyama, Masakazu Haneda. Upregulated Metallothionein (MT) 3 Expression in Human Diabetic Kidney: Hypoxia Induced MT3 Expression via HIF-1 $\alpha$  In Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. The 14th Japan-Korea Diabetic Nephropathy Seminar. 2015年10月30日-11月1日、Seoul (Korea). シンポジウム.
- ⑥ Yumi Takiyama, Manami Kobayashi, Kuralay Atageldiyeva, Tsuyoshi Yanagimachi, Jun

Honjo, Yukihiro Fujita, Masakazu Haneda. A New Player in Diabetic Nephropathy: Metallothionein 3 Is A Target For Hypoxia Inducible Factor-1 American Diabetes Association, 75th Scientific Sessions. 2015年6月5-9日. Boston, (USA). poster presentation.

名古屋工業大学・工学部・教授  
研究者番号：20448046

高橋 賢治 (TAKAHASHI, Kenji)  
旭川医科大学・大学病院・医員  
研究者番号：00736332

- ⑦ 滝山 由美、世良 俊博、中村 匡徳、上杉 健太郎、星野 正人、八木 直人、西條 泰明、羽田 勝計。Glomerular Number and Volume in Diabetic Kidney Estimated by Synchrotron Radiation Micro-Computed Tomography at SPring-8 放射光 imaging 糖尿病による腎糸球体構造評価 第61回日本糖尿病学会年次学術集会、2017年5月18-20日。名古屋。シンポジウム。
- ⑧ 滝山 由美、別所 瞭一、柳町 剛司、藤田 征弘、立野 正敏、仲川 孝彦、羽田 勝計。Metallothionein3 トランスジェニックマウスは、高血糖無しに糖尿病性腎症類似病変を呈する第27回日本糖尿病性腎症研究会。2015年12月5-6日。東京。口演。
- ⑨ 滝山 由美、別所 瞭一、柳町 剛司、本庄 潤、藤田 征弘、羽田 勝計。ヒト糖尿病性腎症近位尿細管における抗酸化物質 Metallothionein3 の発現制御機構の検討。第30回日本糖尿病合併症学会。2015年11月27-28日。名古屋。ワークショップ。
- ⑩ 滝山 由美、前田 愛実、Kuralay K. Atageldiyeva、柳町 剛司、本庄 潤、藤田 征弘、羽田 勝計。新規 HIF-1 標的遺伝子 Metallothionein-3 の糖尿病性腎症病態関与についての検討。第58回日本糖尿病学会年次学術集会。2015年5月21-23日。下関。口演。

[図書] (計7件)

- ① 滝山 由美。期待される新規糖尿病性腎症治療薬。糖尿病性腎症エキスパートブック：state of the art 監修：羽田 勝計、編集者：前川 聡、古家 大祐、牧野 雄一。南江堂。199-205、2016。
- ② 滝山 由美、羽田 勝計：糖尿病腎症の病因・病理・病態－糖尿病腎症の新展開－：日本臨床74(増刊号2)。158-163、2016。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

滝山 由美 (TAKIYAMA, Yumi)  
旭川医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00396350

### (2) 研究分担者

世良 俊博 (SERA, Toshihiro)  
九州大学・工学(系)研究科・准教授  
研究者番号：40373526

中村 匡徳 (Nakamura, Masanori)