

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06801

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症の発症・進展に凝集アルブミンによるミトコンドリア不全は関与するのか？

研究課題名(英文) Involvement of mitochondria dysfunction induced by AGE-aggregated albumin in development of diabetic nephropathy

研究代表者

永松 正 (Nagamatsu, Tadashi)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：70103265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病マウス血中からHPLCにより、MCsにアポトーシスやネクローシスを生るAGE化凝集アルブミン様分画を得た。AGE-コレステロール凝集アルブミン(ACAA)処置MCs(MCs)においてミトコンドリア(Mito)膜電位およびATP産生は低下した。ACAA処置MCsでMitoの凝縮が生じた。ACAA処置MCsでMitoのチトクロームCの発現増加、細胞質へ漏出、Bcl-2 mRNAの発現低下、Bax mRNA発現増加、マイトファジーが認められた。HPLCにより健康ヒト血清中にACAA様タンパク質は存在しなかった。ACAA除去したACAA処置MCs培養液でポドシンのネフリンmRNA発現は低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究から、AGE化凝集アルブミンが糖尿病患者においてメサンギウム細胞のミトコンドリアに障害を起こし、腎症を引き起こすという概念を確立できた。さらに、AGE化凝集アルブミンがメサンギウム細胞を介してポドサイトに障害を起こす分子を産生する引き金になるかもしれない可能性が明らかになった。また、HPLCを用いて糖尿病患者の血液サンプルをモニタリングして、腎症を起こすか否かのバイオマーカーとしてAGE化凝集アルブミン様タンパク質を検出できる方法を確立できた。このことは、糖尿病性腎症による血液透析導入患者を大幅に減らすことができるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：AGE-cholesterol-aggregated albumin (ACAA) induced decrease in membrane potential of mitochondria and ATP production in mesangial cells (MCs). We observed the condensation of mitochondria, increase in cytochrome C expression, leakage of cytochrome C into cytosol, and mitophagy in ACAA-treated MCs using a fluorescence microscope. Real time RT-PCR revealed that ACAA induced increase in Bcl-2 mRNA and decrease in Bax mRNA in MCs. We obtained the fraction of ACAA-like proteins by HPLC in plasma of STZ-diabetic mice, but not in healthy adult individuals.

研究分野：医療薬学

キーワード：糖尿病 腎症 凝集アルブミン 最終糖化産物 ミトコンドリア マイトソーム アポトーシス ネクローシス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国際糖尿病連合 (IDH) によると、糖尿病患者の約1/3が糖尿病性腎症を発症している。糖尿病と診断された約10年後から微量アルブミン尿が出現し、20年経過後から腎不全となり血液透析療法が導入される。糖尿病性腎症を有する患者血中において、AGEs (advanced glycation end products) 化LDL (低比重リポタンパク質) が免疫原性を獲得し、抗体が産生されることが示されている。一方、AGEsが糖尿病の発症・進展に係っているという研究は、培養メサンギウム細胞 (MCs) やAGE受容体 transgenic マウスや糖尿病マウスを用いて多数行われている (Yamamoto et al. J Clin Invest. 2001)。AGEsで惹起されたMCs障害にアポトーシスが関係することが示されている (Chiang et al. Sci. Rep. 2016)。また、高脂血症が糖尿病性腎症の発症・進展のリスク因子であることも前臨床・臨床研究で明らかにされている (Carney. Nat Rev Nephrol. 2013)。さらに、腎尿細管細胞でミトコンドリアやmitophagyの機能不全が糖尿病性腎症に関係があるのではないかと考えられている (Higgins et al. Bri J pharmacol. 2013) が、糸球体細胞での研究は少ない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メサンギウム細胞 (MCs) や糸球体上皮細胞において凝集糖化アルブミンによりミトコンドリアの機能亢進及び機能不全が起こり、アポトーシスやネクローシスが生じることを明らかにし、創薬につなげることである。糖尿病マウスや糖尿病患者の血中から凝集糖化アルブミンを検出し、臨床経過として比較することで糖尿病性腎症の危険因子であることを示すとともに、血中バイオマーカーとしての可能性を提示することである。

3. 研究の方法

(1) 凝集糖化アルブミンによりミトコンドリア分布の変化や減少することをミトトラッカーと蛍光顕微鏡で、ミトコンドリアの活性化、不活性化することをミトコンドリア膜電位プローブとIncuCyte™で明らかにする。ATP量を測定キットで定量する。

(2) 糖化凝集アルブミンの量に依存して、スーパーオキシドが増加することをELISAで定量することにより明らかにする。アポトーシスが生じることを、活性化Caspase 7を蛍光染色してIncuCyte™で、また断片化DNAをTUNEL法で染色して、image analyzerで陽性細胞数・率を割り出す。また、糸球体細胞からRNAをPOWER SYBRCell-to-CT kit™で抽出し、Real TimePCRを用いてBCL-2, BaxのmRNA発現を解析し、また、Cytc量を測定キットで定量する。

(3) 糖尿病患者血液サンプル (藤田医科大学病院) から抗アルブミン抗体・HiTrap™ affinity columnsとサイズ排除カラムを用いて凝集アルブミンを採取し、LC-MS/MS (名城大学、藤田医科大学) によって、AGE化と脂質について解析する。糸球体細胞で障害性を検討し、その結果と糖尿病患者のカルテとの照合から凝集糖化アルブミンが腎症のバイオマーカーとして適していることを明らかにする。

4. 研究成果

STZ糖尿病マウスの血中からゲルろ過により凝集アルブミンと思われる8MDaの分画を得ることができた。分離したタンパク質がアルブミンであることを、抗マウスアルブミン抗体を用いてELISA法、およびLC-MS/MSで確認し、この分画中にIgGや補体が含まれること、アルブミン438番目のリジンがCML (カルボキシメチルリジン) 化されていることを明らかにした。この分画のタンパク質がメサンギウム細胞のCaspase 3/7を活性化させること、TUNEL陽性細胞を増加させる、すなわちメサンギウム細胞にアポトーシスを生じることを明らかにした。in vitroで調

製したAGE-コレステロール凝集アルブミン (ACAA)でヒトメサンギウム細胞を刺激すると、ミトコンドリア膜電位およびATP産生が初期には増加し、その後、次第に低下した。メサンギウム細胞に、ACAA取り込み後にアポトーシスを思わせる、凝縮が生じることをアクチン染色で確認した。ミトコンドリアの凝縮をMitotrackerで確認した。このようなメサンギウム細胞の形態、ミトコンドリア形態変化が、ミトコンドリア障害薬であるOligomycin ComplexやAntimycin-Aでメサンギウム細胞を処置したときに起きることからACAAがミトコンドリアを障害することが示唆された。細胞内酵素カスパーゼの触媒部位に不可逆的に結合し活性を阻害するQ-VD-OPHでメサンギウム細胞を前処置するとACAAによるメサンギウム細胞のアポトーシスが阻害された。また、ACAAを取り込んだメサンギウム細胞中に、異常ミトコンドリアを処理するマイトファジーが生じることを確認した。また、ACAA処置24時間後のMCsでCytC放出抑制タンパク質のBcl-2 mRNAは著明に低下し、逆にCytC放出経路タンパク質のBaxのmRNAの発現は増加した。

培養メサンギウム細胞にコレステロール存在下で最終糖化産物 (AGE) 化した凝集アルブミン (ACAA)を取り込ませ24時間培養すると、MCsのミトコンドリアにおけるチトクロームC (CytC)の発現が増加し、細胞質へ漏出することを明らかにした。このことは、これまでにACAAによりメサンギウム細胞でアポトーシスを起こすメサンギウム細胞が増加することを支持している。さらに、ACAA処置後のMCsにおけるCytCの放出機構について検討した。ACAA処置6時間後、メサンギウム細胞のCytC放出促進タンパク質のBid, Bad, Noxa mRNAは増加したが、CytC放出抑制タンパク質のBcl-2及びCytC放出経路タンパク質のBakのmRNA発現は低下した。この結果は、ACAA処置6時間目でのアポトーシスを起こした細胞はわずかであった以前の結果を支持している。また、ACAA処置24時間後のメサンギウム細胞でCytC放出抑制タンパク質のBcl-2 mRNAは著明に低下し、逆にCytC放出経路タンパク質のBaxのmRNAの発現は増加した。これらの結果は24時間目においてアポトーシスを起こすメサンギウム細胞数の割合が増加することと一致している。次にACAAが糖尿病性腎症の微量アルブミン尿の発症と関係するかをポドサイト (糸球体上皮細胞)を用いて検討した。メサンギウム細胞にACAAを取り込ませて、24時間培養した時のACAA除去培養液でポドサイトを18時間培養したところ、ポドサイトのアクチンフィラメントが凝縮した。また、ポドサイト特異的なタンパク質であるネフリンのmRNAの発現が低下した。このことは、ACAAが微量アルブミン尿発症の原因となりうることを示唆している。

健常者2名、腎症を発症していない糖尿病患者1名の血清をゲル濾過カラムを用いて解析した。いずれの血清も280nmの吸収パターンにおいてT70~90分でのピークは認められなかった。抗HSA抗体を用いたELISAでの検討でもACAA様凝集タンパクはバックグラウンド程度であった。さらに、HPLCを用いて測定時間の短縮を行うことができた。STA糖尿病マウスでは11.9分にACAA様の凝集タンパク質の存在が示され、ELISAにおいて抗アルブミン抗体に反応することが示された。また、健常ヒト血清(n=4)では、HPLC及びELISAで11.9分にACAA様タンパク質は存在しないことが明らかとなった。これまでに採取した腎症に罹患、非罹患の糖尿病患者血清で検討できる状態となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizokami F, Mizuno T, Nagamatsu T, Lee JK, Kobayasi T et al.	4. 巻 19
2. 論文標題 Clinical medication review type III of polypharmacy reduced unplanned hospitalizations in older adults: A meta analysis of randomized clinical trials	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Geriatrics & Gerontology International	6. 最初と最後の頁 1275-1281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ggi.13796	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishimoto S, Mizuno T, Nagamatsu T. et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 CD140b and CD73 are markers for human induced pluripotent stem cell derived erythropoietin producing cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 427-433
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12800	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永松 正、中山亮太、越野僚太、水野智博、吉田颯人
2. 発表標題 Advanced Glycation End product(AGE)-cholesterol-aggregated albuminはメサングウム細胞においてミトコンドリア機能障害を引き起こす。
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 越野僚太、中山亮太、西本将悟、水野智博、永松 正
2. 発表標題 メサングウム細胞におけるAGE-凝集アルブミンによる炎症性サイトカインの発現へのミトコンドリアの関与
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松村奈佑、杉本真里、藤川裕介、越野僚太、中山亮太、西本将吾、水野智久、永松正
2. 発表標題 メサングウム細胞におけるAGE-コレステロール-凝集アルブミンによるアポトーシス誘発機序
3. 学会等名 第65回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 正木遙、中嶋和紀、中尾静羽、早川伸樹、永松 正
2. 発表標題 AGE-凝集アルブミンに含まれるコレステロールの検出
3. 学会等名 第65回 日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長野文彦、水野智博、横江優貴、唐澤宗稔、竹内悠馬、永松 正、丸山彰一、坪井直毅
2. 発表標題 致死性血栓症における補体3型受容体の関与
3. 学会等名 第56回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋和晃、水野智博、長野文彦、今井優樹、丸山彰一、永松 正、水野正司
2. 発表標題 C3a受容体アンタゴニストはヒストンにより惹起された急性肺障害を改善した。
3. 学会等名 第56回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永松 正、越野僚太、杉本真里、水野智博、鈴木敦詩、早川伸樹
2. 発表標題 ACAAによるメサンギウム細胞のアポトーシス誘発機構
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永松 正、吉田颯人、酒井美里、鈴木晴香、水野智博
2. 発表標題 糖尿病性腎症の発症・進展機構-凝集糖化アルブミンは腎系球体メサンギウム細胞のミトコンドリアに障害を与える
3. 学会等名 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永松 正、吉田颯人、鈴木晴香、酒井美里、水野智博
2. 発表標題 糖化アルブミンによる系球体細胞のミトコンドリア障害が糖尿病性腎臓病に関与しているかもしれない
3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 社本 悠、吉田颯人、今西 進、水本秀二、山田修平、永松 正
2. 発表標題 糖尿病マウスの血液中における糖化アルブミン凝集体の検出
3. 学会等名 第64回東海支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田颯人、酒井裕司、今西 進、中山亮太、永松 正
2. 発表標題 糖尿病性腎症に関する走化性因子の探索
3. 学会等名 第64回東海支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山亮太、越野僚太、水野智博、永松 正
2. 発表標題 Advanced Glycation End product(AGE)-cholesterol-aggregated albumin induces dysfunction of mitochondria in mesangial cells
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	早川 伸樹 (Hayakawa Nobuki) (40340252)	名城大学・薬学部・教授 (33919)	
研究 分担者	水野 智博 (Mizuno Tomohiro) (40711669)	藤田医科大学・医学部・准教 (33919)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------