

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007 ~ 2008

課題番号:19590938

研究課題名(和文) 内因性NO阻害物質ADMAの代謝酵素DDAHの糖尿病性腎症における役割と治療応用

研究課題名(英文) Role of DDAH, a metabolizing enzyme for endogenous NO inhibitor ADMA, in diabetic nephropathy: its therapeutic application

研究代表者

藤乗 嗣泰 (TOJO AKIHIRO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号:50292917

## 研究成果の概要:

DDAHにはDDAH とDDAH の2つのisoformsが存在するが、血管内皮および平滑筋にはDDAH が発現し、DDAH のsiRNAにより血管拡張反応が抑制された。一方、DDAH はほとんど発現がみられず、DDAH siRNAの血管反応に及ぼす効果はみられなかった。腎皮質ではDDAH がDDAH より発現が多く、DDAH siRNAにより血中ADMA濃度が増加したが、DDAH siRNAは血中ADMAには影響しなかった。腎臓ではDDAH Iは近位尿細管に、DDAH IIはmacula densa,遠位尿細管,血管平滑筋,内皮に存在した。糖尿病性腎症ではDDAH Iが減少し、血中ADMAが増加した。Angiotensin receptor blocker(ARB)はDDAH Iを増加し、ADMAを抑制し、NO bioavailabilityを改善した。ARBなどによるDDAH発現調節はADMA濃度を減少し、腎血流量が増加し、糖尿病性腎症の治療戦略となる。またARBはADMA産生に關与するPRMTを抑制した。研究の過程でアルブミンがendocytosisにより細胞内に取り込まれ、eNOS, DDAHなどの内皮機能やpodocyte障害に關与することが分かり、アルブミンendocytosisへ研究が派生した。

## 交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,100,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード: 糖尿病性腎症, ADMA, DDAH, nitric oxide, eNOS, 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

Asymmetric dimethylarginine (ADMA)は内因性 nitric oxide synthase (NOS)の阻害物質であり、心血管系疾患のリスクファクターで

ある。ADMAはDimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH)により代謝され、慢性腎不全では血中ADMAの増加がNO抑制により腎血流量の減少、血圧上昇、腎障

害進展に關与している。DDAH には2つの isoforms が存在するが、腎臓での局在、その病態における役割は分かっていない。

## 2. 研究の目的

内因性 NO 阻害物質 ADMA の代謝酵素 DDAH の2つの isoforms の血管、腎における発現と生理機能を明らかにして、糖尿病性腎症における役割とその調節による腎保護効果を検討する。

## 3. 研究の方法

DDAH の isoforms の血管内皮、平滑筋における役割の違いを DDAH I, DDAH II の siRNA により抑制し検討した。

糖尿病性腎症モデルで DDAH isoforms の腎臓内局在を免疫染色、免疫電顕、Western blot で調べ、ADMA 産生量、腎機能、組織障害などを評価。

## 4. 研究成果

DDAH1siRNA の投与により血清 ADMA 値は有意に上昇し、DDAH2siRNA を投与したラットから単離した腸間膜動脈では、アセチルコリンによる血管弛緩反応の減弱が認められ、これは NO ドナーであるアルギニンの投与により改善した。この結果、ADMA の血中濃度を規定するのは DDAH 1 であり、血管局所における NO 作用を調節するのが DDAH2 であることが示唆された。DDAH II が主に血管平滑筋、内皮細胞に発現し、血管拡張反応に寄与している。正常ラット腎組織での DDAH1 の発現は近位尿細管(特に S3 セグメント)に認められ、DDAH2 の発現は糸球体・ヘンレ上行脚太い部分・遠位曲尿細管、皮質および内側髓質集合管、マクラデンサ、輸入細動脈、血管平滑筋および内皮細胞で認められた。DM ラットでは腎組織内のアンジオテンシン 濃度は有意に上昇

しており、この状況下で DDAH1 の発現は低下し、DDAH2 の発現は上昇していた。これらの発現変化は ARB の投与により回復した。

protein arginine methyltransferase (PRMT) -1 および5の発現はコントロール群と DM 群の間で差が無かったが、ARB 投与により有意に低下した。糖尿病モデルラットの腎組織において、DDAH および PRMT の発現変化がアンジオテンシン の AT1 受容体を介した経路で調節されていることが明らかとなった。糖尿病性腎症では DDAH I の減少により ADMA が増加し、血圧上昇、腎障害に關与しているが、ARB により、DDAH I の増加と PRMT の増加により ADMA が抑制され、NO bioavailability が増加し腎保護に働くと考えられる。

## 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14件)

1. Wang D, Gill PS, Chabrashvili T, Onozato ML, Raggio J, Mendonca M, Dennehy K, Li M, Modlinger P, Leiper J, Vallance P, Adler O, Leone A, Tojo A, Welch WJ, Wilcox CS. Isoform-Specific Regulation by AG-AG-Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase of Rat Serum Asymmetric Dimethylarginine and Vascular Endothelium-Derived Relaxing Factor/NO. *Circ Res* 101(6):627-635, 2007. 査読有
2. Onozato ML, Tojo A, Leiper J, Fujita T, Palm F, Wilcox CS. Expression of DDAH and PRMT isoforms in the diabetic rat kidney; effects of angiotensin II receptor blocker. *Diabetes* 57:172-180, 2008. 査

- 読有
3. Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Fujita T. Double edged action of SOD mimetic in diabetic nephropathy. *J Cardiovasc Pharmacol* 49(1):13-19, 2007. 査読有
  4. Onozato ML, Tojo A, Kobayashi N, Goto A, Matsuoka H, Fujita T. Dual blockade of aldosterone and angiotensin II additively suppresses TGF- $\beta$  and NADPH oxidase in the hypertensive kidney. *Nephrol Dial Transplant* 22:1314-1322, 2007. 査読有
  5. Tojo A, Asaba K, Onozato ML. Suppressing renal NADPH oxidase to treat diabetic nephropathy. *Expert Opin Ther Targets* 11(8):1011-1018, 2007. 査読有
  6. Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Kinugasa S, Fukuda S, Sakai T, Fujita T. Glomerular albumin filtration through podocyte cell body in puromycin aminonucleoside nephritic rat. *Medical Molecular Morphology* 41 (2) 92-98, 2008. 査読有
  7. Nishi H, Tojo A, Onozato ML, Jimbo R, Nangaku M, Uozaki H, Hirano K, Isayama H, Omata M, Kaname S, Fujita T. Anti-carbonic anhydrase II antibody in autoimmune pancreatitis and tubulointerstitial nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 22(4):1273-1275, 2007. 査読有
  8. Nilwarangkoon S, Anzai N, Shiraya K, Yu E, Islam R, Cha SH, Onozato ML, Miura D, Jutabha P, Tojo A, Kanai Y, Endou H. Role of Mouse Organic Anion Transporter 3 (mOat3) as a Basolateral Prostaglandin E(2) Transport Pathway. *J Pharmacol Sci.* 103(1):48-55, 2007. 査読有
  9. Mimura I, Tojo A, Uozaki H, Fujita T. Erythrophagocytosis by renal tubular cells. *Kidney Int* 74, 398, 2008. 査読有
  10. Kido M, Ando K, Onozato ML, Tojo A, Yoshikawa M, Ogita T, Fujita T. Protective effect of dietary potassium against vascular injury in salt-sensitive hypertension. *Hypertension*. 51(2):225-31, 2008. 査読有
  11. Yokoyama H, Anzai N, Ljubojevic M, Ohtsu N, Sakata T, Miyazaki H, Nonoguchi H, Islam R, Onozato M, Tojo A, Tomita K, Kanai Y, Igarashi T, Sabolic I, Endou H. Functional and Immunochemical Characterization of a Novel Organic Anion Transporter Oat8 (Slc22a9) in Rat Renal Collecting Duct. *Cell Physiol Biochem*. 21(4):269-278, 2008. 査読有
  12. Mimura I, Hori Y, Matsukawa H, Uozaki H, Tojo A, Fujita T. Noncrescentic ANCA-associated renal crisis in systemic sclerosis. *Clin Nephrol* 70:183-185, 2008. 査読有
  13. Tojo A, Maristela L. Onozato, Kensuke Asaba, and Toshiro Fujita. How to optimize the treatment of a hypertensive patient with multiple cardiovascular risk factors. *Renin Angiotensin System in Cardiovascular Medicine* 4(2):16-18, 2008. 査読有
  14. 宮崎博喜、藤乗嗣泰. 腎疾患における内皮機能障害.DDAH-ADMA-NOS系の役割. *Nephrology Frontier* 7:363-368, 2008 査読無

〔学会発表〕(計6件)

1. The World Congress of Nephrology 2007, April 21 -25, 2007 (Rio de Janeiro, Brazil) M-P0761 Expression of DDAH and PRMT isoforms in diabetic rat kidney; effects of ARB.

Onozato ML, Tojo A, Leiper J, Fujita T, Wilcox CS.

2. The American Society of Nephrology 40th Annual Meeting

Nov. 2-5, 2007 (San Francisco, CA, U.S.A) [SA-P0277] Role of Podocyte NADPH Oxidase in Proteinuria in Experimental and Human Nephrotic Syndrome.

Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Chalermpanyakorn P, Karnsombut P, Pinpradap K, Wilcox CS, Fujita T.

3. The American Society of Nephrology 40th Annual Meeting

Nov. 2-5, 2007 (San Francisco, CA, U.S.A) [SA-P0988] Comparison of Effects of Angiotensin Blockade, Prednisolone or Anti-Platelet Drugs in IgA Nephropathy. Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Kimura K, Goto A, Fujita T.

4. The 9<sup>th</sup> Asian Pacific Microscopy Conference

Nov. 2-7, 2008 (Jeju, Korea)

L-07) Recent Progress of Functional Morphology of the Kidney.

Albumin handling along the nephron: Mechanism of proteinuria.

Tojo A, Kinugasa S, Onozato ML, Miyazaki H, Asaba K, Fujita T.

5. 第51回日本腎臓学会学術総会

2008.5.31-6.1 福岡

金粒子標識アルブミンとFITC標識アルブミンを用いた糸球体蛋白濾過の検討

藤乗嗣泰, 小野里マリステラリカ, 浅羽研介, 衣笠哲史, 藤田敏郎

6. 第40回日本臨床分子形態学会総会

平成20年10月3日~4日(福岡国際会議場)

ラット糸球体における2nm gold標識アルブミンの濾過経路の検討

衣笠哲史, 藤乗嗣泰, 小野里マリステラリカ, 藤田敏郎

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤乗嗣泰 (TOJO AKIHIRO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 50292917

(2)研究分担者

(3)連携研究者