

機関番号：11401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590943

研究課題名 (和文) 糖尿病性腎症の進展に対する SOD による防御機構の解明

研究課題名 (英文) Role of SOD in the pathogenesis of diabetic nephropathy

研究代表者

藤田 浩樹 (FUJITA HIROKI)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：30333933

研究成果の概要 (和文)：スーパーオキシド・ディスムターゼ (SOD) は生体内の活性酸素を除去する主要な抗酸化酵素である。糖尿病による腎障害 (糖尿病性腎症) が進行しやすいマウスの腎では SOD の発現および作用が著しく低下し活性酸素が増加していること、さらにはこのマウスへの SOD の補充療法が腎における活性酸素を減らし糖尿病性腎症の進行を劇的に抑制することを本研究にて明らかにした。SOD は糖尿病状態下で増加する酸化ストレスによる腎障害を防御する上で重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：Superoxide dismutase (SOD) is a major anti-oxidant enzyme which scavenges superoxide anion. In the present study, we found that SOD is down-regulated in the kidneys of diabetic mice susceptible to nephropathy, leading to renal superoxide overproduction. Furthermore, we demonstrated that SOD mimetic dramatically prevents the progression of diabetic nephropathy in these mice via reducing renal superoxide production. We conclude that SOD plays an important role in preventing renal damage by oxidative stress inducing under chronic hyperglycemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

高血糖および糖尿病に関連した advanced glycation end products (AGEs)、angiotensin II (ANG II)、oxidized LDL、炎症性サイトカインらの factor によって発生する過剰の活性酸素 (superoxide: $O_2^{\cdot-}$) いわゆる酸化ストレスは糖尿病性腎症の主要な原因と考えられている。こうした酸化ストレスに対して、生体内にはいくつかの抗酸化酵素による防

御機構が存在する。Superoxide dismutase (SOD) family は酸化ストレスに対する一つの主要な防御機構である。現在までのところ、糖尿病性腎症における SOD の正確な役割については明らかにされてはいない。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病性腎症の進展に対する防御機構に関わっていると考えられている抗

酸化酵素 SOD の役割について詳細に解明することを目的とした。具体的には、SOD による酸化ストレスに対する防御機構の破綻は糖尿病性腎症の進展をまねき、逆に SOD の作用増強は腎症の進展を抑止する効果があるのではないかという仮説を打ち立て、この仮説の検証を行った。

3. 研究の方法

(1) 腎における SOD の発現と活性

Akita マウス C57BL/6-Ins2^{Akita} (C57BL/6-Akita と略す) は非肥満型インスリン欠乏型の糖尿病マウスモデルである。しかしながら、C57BL/6 マウス系であるため、糖尿病性腎症の発症には比較的抵抗性を示す。そこで、我々は糖尿病性腎症の発症に感受性を示す KK/Ta 系に Akita マウスの糖尿病責任遺伝子 Ins2^{Akita} 変異を導入し、進行性の糖尿病性腎症を示す新しい Akita マウスモデル KK/Ta-Ins2^{Akita} (KK/Ta-Akita と略す) を確立した。これら 2 種類の Akita マウスは同程度の著しい高血糖状態 (随時血糖値 400-600mg/dl) を呈するが (図 1)、C57BL/6-Akita が腎症の発症進展に比較的抵抗性を示す一方で、KK/Ta-Akita は著しい尿中アルブミンレベルの増加 (図 2) やメサンギウム基質の増加 (図 3) など進行した糖尿病性腎症の病態を呈する。この糖尿病性腎症への感受性の異なる 2 種類の Akita マウスの腎において SOD の発現および活性に差がみられるのか Western blot、免疫組織染色および WST-1 アッセイにて調査した。

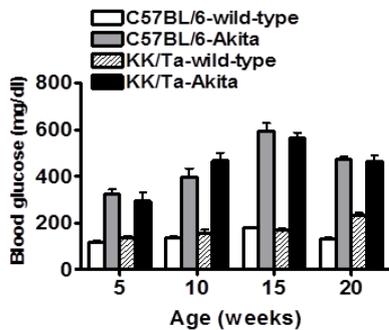


図 1 血糖値の経時的変化

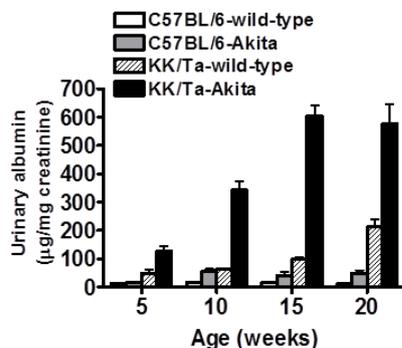


図 2 尿中アルブミンの経時的変化

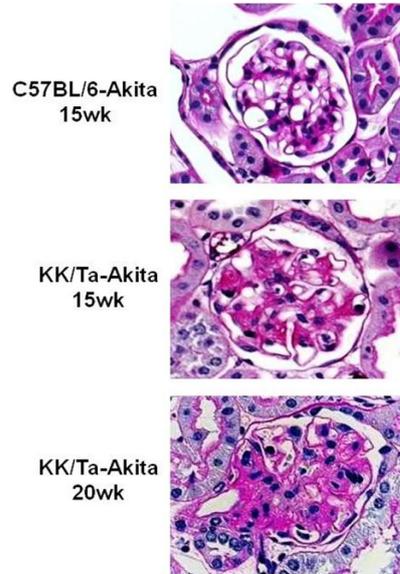


図 3 腎組織像 (PAS 染色)

(2) SOD 作用増強薬による糖尿病性腎症改善効果についての検討

進行性の糖尿病性腎症のマウスモデル KK/Ta-Akita に対して 10 週齢から 4 週間 SOD 作用増強薬 Tempol の投与を行い、尿中アルブミンなど糖尿病性腎症の臨床マーカーの変化および腎組織病変の変化について経時的に観察し、SOD により糖尿病性腎症の進行が抑制されるのか調査を行った。Tempol の投与は飲料水で 1mmol/l に調整したものを自由に与えた。

(3) SOD 欠損による糖尿病性腎症の発症進展への影響

SOD には以下の 3 つのアイソフォームが存在する。

- ① Cytosolic CuZn-SOD (SOD1)
- ② Mitochondrial Mn-SOD (SOD2)
- ③ Extracellular CuZn-SOD (SOD3)

このうち総 SOD 活性の大部分を担う中心的アイソフォームが SOD1 である。また、腎血管系では SOD3 の発現も比較的高いと報告されている。糖尿病性腎症の発症に比較的抵抗性を示す C57BL/6-Akita マウスの SOD (SOD1 および SOD3 アイソフォーム) を遺伝的に欠損させることにより、進行した糖尿病性腎症の病変がみられるようになるのか調査を行った。

4. 研究成果

(1) 腎における SOD の発現と活性

進行性の糖尿病性腎症をきたす KK/Ta-Akita マウスの腎では、SOD アイソフォームのうち、SOD1 と SOD3 の著しい発現低下が Western blot にて観察された (図 4)。免疫組織染色でも腎糸球体におけるこれら SOD アイソフォームの発現低下が認められた (図 5 D, L)。

一方、糖尿病性腎症に比較的抵抗性を示す C57BL/6-Akita の腎では SOD1 および SOD3 の発現は比較的保たれていた。SOD2 に関しては、KK/Ta-Akita および C57BL/6-Akita の腎において発現は保たれていた。また、KK/Ta-Akita では腎での SOD 活性の低下も観察された (図 6)。SOD down-regulation の結果を反映して KK/Ta-Akita の腎糸球体では Dihydroethidium (DHE) 染色にて評価された活性酸素レベルの上昇がみられた (図 7)。

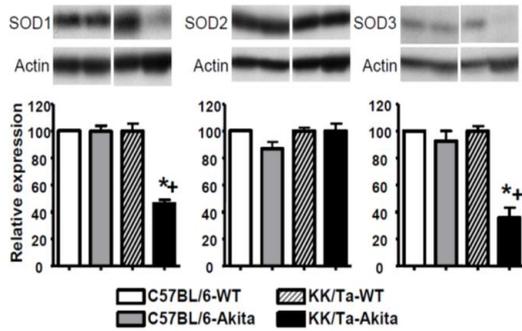


図 4 腎における SOD アイソフォームの Western blot 解析 (W, wild-type; A, Akita; * $P < 0.001$ vs C57BL/6-Akita; + $P < 0.001$ vs KK/Ta-WT)

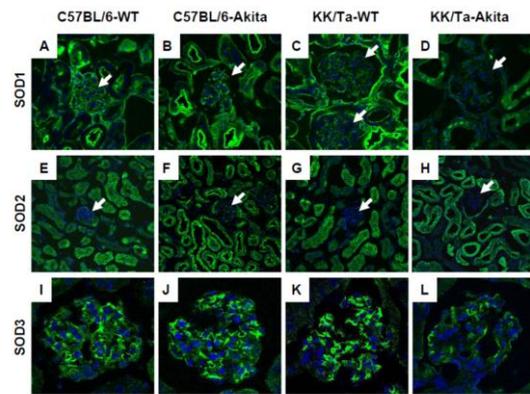


図 5 腎における SOD アイソフォームの免疫組織染色

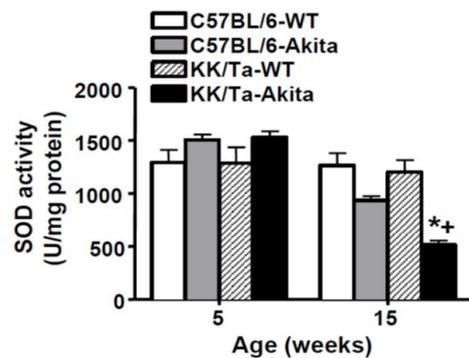


図 6 腎における SOD 活性 (* $P < 0.05$ vs C57BL/6-Akita; + $P < 0.001$ vs KK/Ta-WT)

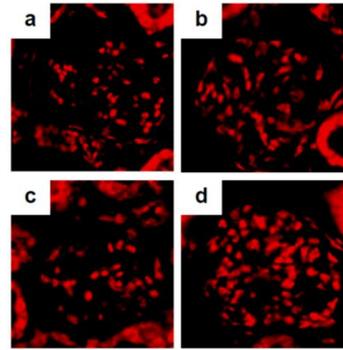


図 7 腎糸球体における活性酸素レベル (a, C57BL/6-WT; b, C57BL/6-Akita; c, KK/Ta-WT; d, KK/Ta-Akita)

(2) SOD 作用増強薬 Tempol 治療による KK/Ta-Akita マウスの糖尿病性腎症改善効果
上記の解析結果より、KK/Ta-Akita マウスでは腎において、SOD1 および SOD3 の発現低下および SOD 活性の減少から活性酸素の過剰産生すなわち酸化ストレスの増加が引き起こされていることが判明した。この結果に基づき、このマウスへの SOD 作用増強薬 Tempol の補充が腎での活性酸素レベルを低下させることで糖尿病性腎症の進行を抑止することができるのか調査を行った。10 週齢オスマウスに対して 4 週間 Tempol を投与したところ、期待していたごとく腎糸球体での活性酸素レベルは著明に低下した (図 8)。さらに、このような酸化ストレスの改善に並行して、尿中アルブミンの減少 (図 9) や腎糸球体組織病変の改善 (図 10) など糖尿病性腎症の進行抑制効果が認められた。

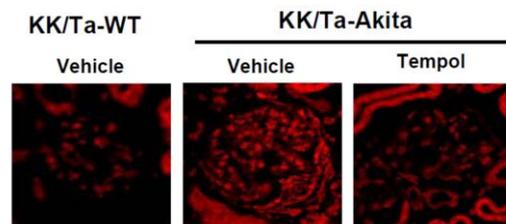


図 8 腎糸球体における活性酸素レベル

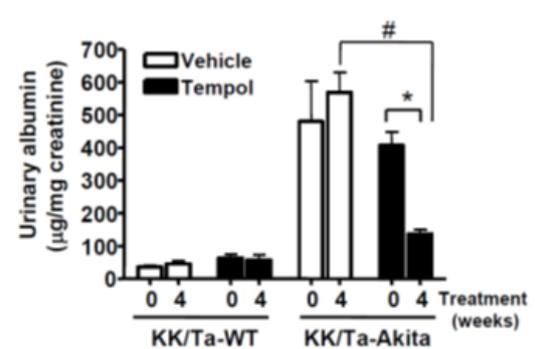


図 9 尿中アルブミンの変化 (* $P < 0.01$; # $P < 0.0001$)

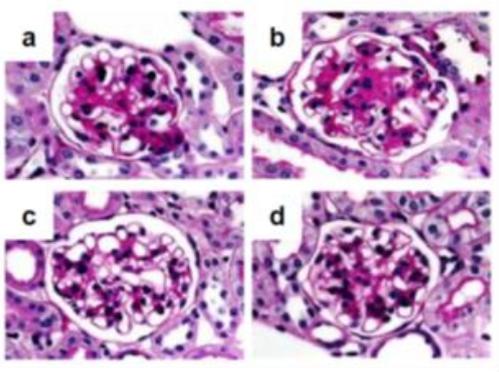


図 10 腎組織像 (PAS 染色; a and b, vehicle 投与; c and d, tempol 投与)

(3) SOD 欠損による C57BL/6-Akita マウスの糖尿病性腎症発症進展への影響

上記の解析結果より、C57BL/6-Akita マウスの腎では SOD の発現およびその活性が比較的保たれており、高血糖状態で産生が高まる活性酸素を除去できていること、さらにはこの結果として酸化ストレスによる腎障害が少ないことが明らかとなった。この糖尿病マウスが糖尿病性腎症の発症進展に対して抵抗性を示す理由が SOD による抗酸化防御機構の保持にあるのかさらに明確にするために、SOD1 と SOD3 をシングルまたはダブルノックアウトした C57BL/6-Akita マウスを作製し、その腎病変の推移について観察した。図 11 に示すように、SOD1 の欠損により、C57BL/6-Akita マウスの腎糸球体における活性酸素レベルの上昇が観察された。一方、SOD3 欠損による活性酸素レベルへの影響は少なかった。また、SOD1 と SOD3 のダブル欠損による相乗効果は観察されなかった。SOD1 欠損による腎活性酸素レベルの増加は、この糖尿病性腎症抵抗性マウス C57BL/6-Akita の腎糸球体病変を進行させるとともに (図 12)、アルブミン尿を増加させ (図 13)、このマウスに糖尿病性腎症への感受性を与える結果となった。

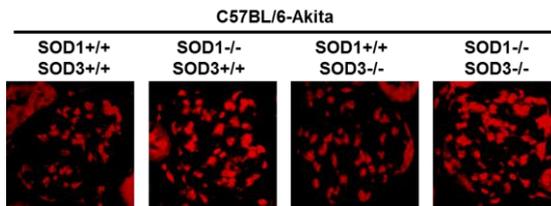


図 11 腎糸球体における活性酸素レベル

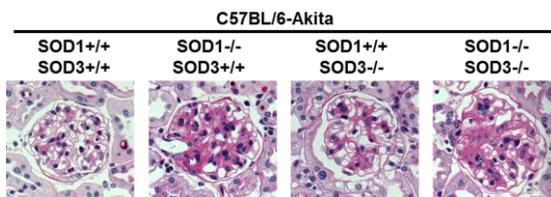


図 12 腎組織像 (PAS 染色)

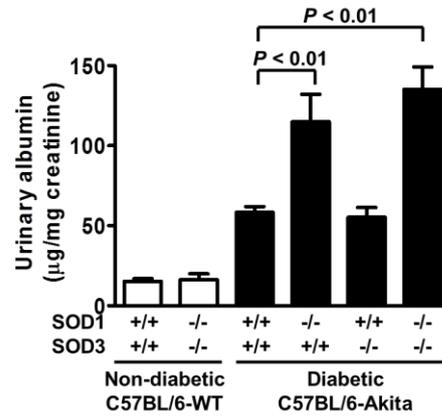


図 13 尿中アルブミンの変化

(4) 研究成果のまとめ

本研究成果から、SOD による抗酸化防御機構は糖尿病性腎症の発症進展を抑制する上で重要な役割を果たしていることが明らかとなった。特に SOD1 アイソフォームは腎では広範囲に発現しており、高血糖により腎糸球体に発生する活性酸素の除去において中心的な役割を果たしていることが明らかとなった。今後、SOD1 に関連した抗酸化治療が糖尿病性腎症の発症進展の抑制に大きく貢献することが期待される。

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 1 件)

- ① Hiroki Fujita, Hiromi Fujishima, Shinsuke Chida, Keiko Takahashi, Zhonghua Qi, Yukiko Kanetsuna, Matthew Breyer, Raymond Harris, Yuichiro Yamada, Takamune Takahashi: Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol 20: 1303-1313, 2009 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 藤田浩樹、Renal effects of superoxide dismutase 1 deficiency in nephropathy resistant C57BL/6-Ins2^{Akita} diabetic mice、米国腎臓学会 Renal Week 2008、2008 年 11 月 7 日、米国 Philadelphia
- ② 藤田浩樹、Effects of telmisartan on renal NADPH oxidase, superoxide dismutase, and prostaglandin E2 in C57BL/6-Ins2^{Akita} diabetic mice、米国腎臓学会 Renal Week 2009、2009 年 10 月 31 日、米国 San Diego

- ③ 藤田 浩樹、SOD1, but not SOD3, deficiency causes diabetic nephropathy through reduction of glomerular endothelial nitric oxide in C57BL/6-Ins2^{Akita} mice、米国腎臓学会 Renal Week 2010、2010年11月18日、米国 Denver

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 浩樹 (FUJITA HIROKI)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：30333933

(2) 研究分担者

山田 祐一郎 (YAMADA YUICHIRO)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60283610