

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009 ～ 2012

課題番号：21249053

研究課題名（和文） 糖尿病性腎症治療ターゲットとしての核内受容体の研究

研究課題名（英文） Nuclear receptors as therapeutic targets for diabetic nephropathy.

研究代表者

榎野 博史 (MAKINO HIROFUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50165685

研究成果の概要（和文）：糖尿病性腎症の病態の初期には細胞肥大が重要であり、その後慢性炎症が糖尿病性腎症の進展を促進させている。核内受容体の modulator はこれらの病態を総合的に改善する薬剤の候補である。Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- δ アゴニストおよび Liver X receptor (LXR) アゴニストは抗炎症作用によって治療効果を発揮し、Retinoid X receptor (RXR) アンタゴニストは主として細胞周期の異常を是正して細胞肥大を抑制することが判明した。核内受容体の modulator は糖尿病性腎症に有効であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In the development of diabetic nephropathy, the hypertrophy of renal cells is important for the initial disease process and chronic inflammation further promotes the progression of the disease. Modulator for nuclear receptors may improve these pathological processes. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- δ and Liver X receptor (LXR) agonists exerted therapeutic potential by improving inflammation. Retinoid X receptor (RXR) antagonist demonstrated therapeutic potential by correcting cell-cycle abnormalities and cellular hypertrophy. Modulators for nuclear receptors are beneficial for the treatment of diabetic nephropathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2010 年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2011 年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2012 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
総計	35,000,000	10,500,000	45,500,000

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：核内受容体、糖尿病性腎症、レチノイド、細胞周期、糸球体上皮細胞、PPAR、RXR、LXR

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の変化により糖尿病患者は増加の一途をたどっている。その結果、糖尿病性腎症により透析導入となる患者も年々増加しており、原疾患の第 1 位である。しかも糖尿病性腎症を

原疾患として透析導入となった場合、心・脳血管障害等のマクロアングリオパチーや感染症のため予後は不良である。糖尿病性腎症の進展予防のために、厳格な血糖コントロール、厳格な血圧コントロール、renin-angiotensin system (RAS) 抑

制薬の投与、脂質異常症の是正、食塩制限と低たんぱく食などを組み合わせた集約的治療が推奨され、ある程度のエビデンスが集積しているものの、糖尿病性腎症の増加を阻止するに至っていない。

ヒトゲノム上には48種類の核内受容体が同定され、そのなかでも peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)、レチノイドX受容体(RXR)、レチノイン酸受容体(RAR)、Liver X受容体(LXR)、ファルネソイドX受容体(FXR)は、ある種の脂肪酸、ヒドロキシコレステロール、胆汁酸などの内因性リガンドの存在が判明している。さらにこれらの核内受容体の薬理的なアゴニストやアンタゴニストは、メタボリックシンドロームや2型糖尿病に認められるエネルギー代謝・糖代謝・脂質代謝異常を是正することが判明している。PPAR γ アゴニストであるチアゾリジン誘導体は糖尿病治療薬として、PPAR α アゴニストであるフィブラートは高脂血症治療薬として臨床の場で使用されている。糖尿病性腎症に対しては、チアゾリジン誘導体やフィブラートの腎保護効果が動物実験レベルで報告される一方、前者は遠位ネフロンへの作用による水分貯留、後者は腎不全患者における腎機能悪化によってその使用が制限されている。

2. 研究の目的

核内受容体をターゲットとした糖尿病・メタボリックシンドローム治療は、これから重要性が益々高まると考えられるが、核内受容体の modulation による糖尿病性腎症への治療効果とその作用機構については不明な点が多く残されている。そこで本研究においては核内受容体(PPAR δ , RXR, LXR)に対するアゴニストやアンタゴニストといった modulator の糖尿病性腎症に対する治療効果を検討しその分子機構を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

1型糖尿病のモデルである8週齢の C57BL/6J マウスを用いて、ストレプトゾトシンを投与して糖尿病を誘発し、コントロール群、糖尿病群に加えて核内受容体 modulator を投与して、8週間後にその糖尿病性腎症に対する治療効果を検討した。PPAR δ アゴニスト(GW0742)投与群、LXRアゴニストである T0901317 投与群について検討した。

さらに肥満と2型糖尿病の動物モデルである OLETF ラットを、コントロール群、PPAR γ アゴニストである pioglitazone (PIO) 投与群、RXRアンタゴニストである HX531 投与群に分けて糖・脂質代謝および糸球体病変を比較した。また、高糖濃度下で培養メサンギウム細胞に PIO、HX531 を添加して、Laser scan cytometer により細胞周期を解析し、CKI やこれを制御する Mitogen-activated protein kinase (MAPK)の発現をウエスタンブロットで定量した。さらに LETO 群、OLETF コントロール群、PIO 群、HX531 投与群の脂肪組織から成熟脂肪細胞を分離して細胞周期を解析し、培養脂肪細胞に PIO、HX531 を添加して CKI や MAPK などの発現についてウエスタンブロットで検討し、メサンギウム細胞の結果と比較した。

4. 研究成果

(1) PPAR δ アゴニスト(GW0742)の治療効果

核内受容体 PPAR δ アゴニスト(GW0742)の糖尿病性腎症への治療効果を検討した。C57BL/6 マウス(雄、8週齢)を①非糖尿病群(以下C群)、②非糖尿病+GW0742投与群、③糖尿病群(以下D群)、④糖尿病+GW0742投与群(以下G群)の4群に振り分け、糖尿病誘発後に GW0742 を8週間経口投与した(1mg/kg/日)。GW0742の投与により、体重、血圧、HbA1cに有意差を認めなかったが、糖尿病誘発8週の時点でG群マウスはD群マウスと比較し尿中アルブミン($\mu\text{g/day}$)の有意な

減少をみとめた。腎臓組織の観察では D 群マウスにみられるメサンギウム基質の面積率 (Mesangial matrix index; MMI) (%) の増加が GW0742 投与により抑制され、IV 型コラーゲンの発現増加も抑制された。さらに糸状体内マクロファージの浸潤(個/糸状体)も抑制された。また炎症性サイトカインの遺伝子発現の検討では、腎臓において MCP-1、CD14 の mRNA の発現が減少していた。PPAR δ アゴニストは糖尿病性腎症において炎症を抑制することで、腎症を改善させることが示唆された。

(2) LXRアゴニストT0901317の治療効果

LXR アゴニスト投与群において血糖低下効果は認められなかったが、尿中アルブミンを有意に減少させた。組織学的検討では、糸球体肥大を抑制し、メサンギウム基質の増加も有意に抑制した。さらに尿細管間質における線維化も著明に抑制された。糸球体内の F4/80 陽性マクロファージの浸潤も有意に抑制された。オステオポンチの腎臓組織の mRNA 発現は LXR アゴニストの投与によって抑制され、さらにウエスタンブロットでもその蛋白発現の減少が確認された。また免疫組織化学では尿細管間質にオステオポンチンの発現が確認され、LXR アゴニストにより抑制されていた。オステオポンチン遺伝子の-76 には AP-1 結合配列が存在し、近位尿細管細胞である mProx24 細胞で検討したところその転写活性はルシフェラーゼアッセイによって確認された。さらにクロマチン免疫沈降法によっても AP-1 の結合が確認された。これらの転写活性は高糖培養下で上昇し、LXR アゴニスト添加によって抑制された。

(3) RXRアンタゴニスト(HX531)の治療効果

OLETF ラットを 8 週齢から 30 週齢にわた

って観察したところ、PIO 投与群では OLETF 群と比較して著明な体重増加を認めたが、HX531 投与群では体重増加が抑制されていた。PIO、HX531 投与群の両群で、血糖値や HbA1c、血清中性脂肪・コレステロール値は OLETF 群に比べて改善し、尿中アルブミン量の減少と、組織学的には糸球体肥大の改善を認めた。高糖培養下のメサンギウム細胞で認められる G1 期細胞周期停止は、PIO、HX531 添加により解除された。また高糖培養下では、CKI の発現を制御している p44/42 MAPK、p38MAPK のリン酸化が亢進し、p21Cip1、p27Kip1 の発現が亢進していたが、PIO や HX531 の添加により、G1 期細胞周期停止に関与するこれらの蛋白発現は両薬剤で同様に抑制された。一方、PIO 投与 OLETF ラットの成熟内臓脂肪細胞では M+late M 期の細胞の比率が高いのに比して、HX531 投与群では GO+G1 期の細胞が増加しており、培養内臓脂肪細胞に PIO や HX531 を添加すると、前者が分化を促進するのに対して、後者は分化を抑制し、更に CKI や MAPK の発現が両薬剤では異なっていた。糖尿病性腎症におけるメサンギウム細胞および肥満における内臓脂肪細胞の細胞周期異常を明らかにし、その異常は核内受容体 RXR アンタゴニストによって制御されることを示した。細胞種やその状態により、核内受容体 modulator は複雑に作用するが、細胞周期異常の是正が、肥満の改善と蛋白尿や糸球体硬化の抑制をもたらすことが期待される。

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 20 件)

- ① Kurose Y, Wada J, Kanzaki M, Teshigawara S, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Katayama A, Watanabe M,

- Higushi C, Eguchi J, Miyatake N, Makino H. Serum galectin-9 levels are elevated in the patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 14, 23, 2013 (査読有)
- ② Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Tagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as a ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. *Circ Res* 112(5), 771-780, 2013 (査読有)
- ③ Sato-Horiguchi C, Ogawa D, Wada J, Tachibana H, Kodera R, Eguchi J, Nakatsuka A, Terami N, Shikata K, Makino H. Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress in db/db mice. *Nephron Exp Nephrol* 121(3-4), e97-e108, 2013 (査読有)
- ④ Murakami K, Wada J, Ogawa D, Horiguchi CS, Miyoshi T, Sasaki M, Uchida HA, Nakamura Y, Makino H. The effects of telmisartan treatment on the abdominal fat depot in patients with metabolic syndrome and essential hypertension: Abdominal fat Depot Intervention Program of Okayama (ADIPO). *Diab Vasc Dis Res* 10(1), 93-96, 2013 (査読有)
- ⑤ Inoue J, Wada J, Teshigawara S, Hida K, Nakatsuka A, Takatori U, Kojo S, Akagi S, Nakao K, Miyatake N, McDonald JF, Makino H. The serum vaspin levels are reduced in Japanese chronic hemodialysis patients. *BMC Nephrol* 13(1), 163, 2012 (査読有)
- ⑥ Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Bruemmer D, Wada J, Teshigawara S, Eguchi J, Sato-Horiguchi C, Uchida HA, Shikata K, Makino H. Activation of liver x receptor inhibits osteopontin and ameliorates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 23(11), 1835-1846, 2012 (査読有)
- ⑦ Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex. *Diabetes* 61(11), 2823-2832, 2012 (査読有)
- ⑧ Kanzaki M, Wada J, Kikumoto Y, Akagi S, Nakao K, Sugiyama H, Makino H. The therapeutic potential of synthetic human atrial natriuretic peptide in nephrotic syndrome: a randomized controlled trial. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 5, 91-96, 2012 (査読有)
- ⑨ Kawai D, Takaki A, Nakatsuka A, Wada J, Tamaki N, Yasunaka T, Koike K, Tsuzaki R, Matsumoto K, Miyake Y, Shiraha H, Morita M, Makino H, Yamamoto K. Hydrogen-rich water prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology* 56(3), 912-921, 2012 (査読有)
- ⑩ Teshigawara S, Wada J, Hida K, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Iseda I, Matsushita Y, Miyatake N, McDonald JF, Hotta K, Makino H. Serum vaspin concentrations are closely related to insulin resistance and rs77060950 at SERPINA12

- genetically defines distinct group with higher serum levels in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 97(7), E1202-1207, 2012 (査読有)
- ⑪ Kanzaki M, Wada J, Sugiyama K, Nakatsuka A, Teshigawara S, Murakami K, Inoue K, Terami T, Katayama A, Eguchi J, Akiba H, Yagita H, Makino H. Galectin-9 and T cell immunoglobulin mucin-3 pathway is a therapeutic target for type 1 diabetes. *Endocrinology* 153(2), 612-620, 2012 (査読有)
- ⑫ Hida K, Poulsen P, Teshigawara S, Nilsson E, Friedrichsen M, Ribel-Madsen R, Grunnet L, Lund SS, Wada J, Vaag A. Impact of circulating vaspin levels on metabolic variables in elderly twins. *Diabetologia* 55(2), 530-532, 2012 (査読有)
- ⑬ Nakatsuka A, Wada J, Hida K, Hida A, Eguchi J, Teshigawara S, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Ogawa D, Kagechika H, Makino H. RXR antagonism induces G0/G1 cell cycle arrest and ameliorates obesity by up-regulating the p53-p21^{Cip1} pathway in adipocytes. *J Pathol* 226(5), 784-795, 2012 (査読有)
- ⑭ Ogawa D, Asanuma M, Miyazaki I, Tachibana H, Wada J, Sogawa N, Sugaya T, Kitamura S, Maeshima Y, Shikata K, Makino H. High glucose increases metallothionein expression in renal proximal tubular epithelial cells. *Exp Diabetes Res* 2011:534872, 2011 (査読有)
- ⑮ Takatori Y, Akagi S, Sugiyama H, Inoue J, Kojo S, Morinaga H, Nakao K, Wada J, Makino H. Icodextrin increases technique survival rate in peritoneal dialysis patients with diabetic nephropathy by improving body fluid management: a randomized controlled trial. *Clin J Am Soc Nephrol* 6(6), 1337-1344, 2011 (査読有)
- ⑯ Matsushita Y, Ogawa D, Wada J, Yamamoto N, Shikata K, Sato C, Tachibana H, Toyota N, Makino H. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ Inhibits Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy Through Anti-Inflammatory Mechanisms in Mice. *Diabetes* 60(3): 960-968, 2011 (査読有)
- ⑰ Sato C, Shikata K, Hirota D, Sasaki M, Nishishita S, Miyamoto S, Kodera R, Ogawa D, Tone A, Kataoka HU, Wada J, Kajitani N, Makino H. P-selectin glycoprotein ligand-1 deficiency is protective against obesity-related insulin resistance. *Diabetes* 60(1):189-99, 2011 (査読有)
- ⑱ Zhang Q, Shi Y, Wada J, Malakauskas SM, Liu M, Ren Y, Du C, Duan H, Li Y, Li Y, Zhang Y: In vivo delivery of gremlin siRNA plasmid reveals therapeutic potential against diabetic nephropathy by recovering bone morphogenetic protein-7. *PLoS ONE* 5(7), e11709, 2010 (査読有)
- ⑲ Nakao A, Nakao K, Takatori Y, Kojo S, Inoue J, Akagi S, Sugiyama H, Wada J, Makino H: Effects of icodextrin peritoneal dialysis solution on the peritoneal membrane in the STZ-induced diabetic rat model with partial nephrectomy. *Nephrol Dial Transplant* 25(5), 1479-1488, 2010 (査読有)
- ⑳ Sarai K, Shikata K, Shikata Y, Omori K, Watanabe N, Sasaki M, Nishishita S, Wada J

J, Goda N, Kataoka N, Makino H:
Endothelial barrier protection by FTY720
under hyperglycemic condition:
involvement of focal adhesion kinase, small
GTPases, and adherens junction proteins.
Am J Physiol Cell Physiol 297(4):C945-54,
2009 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Makino H: Renin angiotensin system inhibition in diabetic nephropathy. ASN Kidney Week 2012, Nov 2 2012, San Diego, CA, USA
- ② Makino H: Basic mechanism underlying diabetic nephropathy and CKD. World Congress of Nephrology, Apr 11 2011, Vancouver, Canada
- ③ 榎野博史: 全身を制御する腎臓—33 年の腎臓研究を顧みて—、2010 年 6 月 17 日、神戸市
- ④ Makino H: Thiazolidinediones and diabetic nephropathy. World Congress of Nephrology, May 22 2009, Milan, Italy

[図書] (計 2 件)

- ① 榎野博史編、南山堂、糖尿病×CKD診療ガイド、2012、197 ページ
- ② 榎野博史編、南山堂、CKDのサイエンス—基礎と臨床—、2010、230 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎野 博史 (MAKINO HIROFUMI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：50165685

(2) 研究分担者

和田 淳 (WADA JUN)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：30294408

(3) 連携研究者

小川大輔 (OGAWA DAISUKE)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：70535195