

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24年5月21日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591031

研究課題名（和文） 炎症をターゲットとした糖尿病性腎症に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文） Development of the novel therapeutic strategy for diabetic nephropathy through anti-inflammatory effects.

研究代表者

四方 賢一（SHIKATA KENICHI）

岡山大学・岡山大学病院・教授

研究者番号：00243452

研究成果の概要（和文）：

我々は過去の一連の研究によって、糖尿病性腎症の成因に炎症(microinflammation)が関与していることを明らかにした。本研究の目的は、糖尿病性腎症の成因に関与する炎症関連分子を探索するとともに、microinflammation をターゲットとした腎症の新しい治療薬を開発することである。Osteopontin ノックアウトマウスに糖尿病を惹起して、腎障害の進展を野生型マウスと比較解析することにより、osteopontin が腎症の進展に深く関与しており、腎症の治療標的となる可能性が示された。また、GLP-1 受容体が糸球体内皮細胞や単球/マクロファージに発現しており、糖尿病ラットに GLP-1 受容体作動薬を投与することによって抗炎症作用を介して腎障害が抑制されたことから、GLP-1 受容体作動薬が腎症の治療薬として有望であることが確認された。

研究成果の概要（英文）：

We have demonstrated that low grade inflammation, microinflammation, is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy as well as of atherosclerosis. We have recently reported that anti-inflammatory agents such as statin and thiazolidinedione show renoprotective effects through anti-inflammatory actions in diabetic animals. In this study, 1) We induced diabetes into osteopontin knockout (KO) mice. Osteopontin KO mice showed the improvement of tissue injuries and inflammatory reactions in the kidney. 2) We found that GLP-1 receptor is expressed on monocyte/macrophage and glomerular endothelial cells. GLP-1 receptor agonist showed renoprotective effects on diabetic rats through anti-inflammatory actions. These results suggest that osteopontin play a role in the pathogenesis of diabetic nephropathy and GLP-1 receptor agonist might be 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	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：糖尿病学 腎臓病学

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：腎臓病学

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は世界的に末期腎不全の最大

の原因疾患である。糖尿病性腎症の成因には様々なメカニズムが関与するが、現在まで糖尿病性腎症を対象に開発された有効な治療薬はきわめて少ない。糖尿病性腎症の成因を解明して新しい治療薬を開発することは、糖尿病患者の生命予後とQOLを改善するために喫緊の課題となっている。我々は以下に述べる一連の研究によって、糖尿病性腎症の成因に炎症が関与していることを明らかにしてきた。我々はさらに、炎症が動脈硬化と腎症の共通の進展メカニズムの一つであることを明らかにした。糖尿病性腎症で見られる「炎症」は、関節リウマチなどの炎症性疾患に見られる炎症と比較すると臨床的にも組織学的にも軽微なものであり、動脈硬化の成因に関与するmicroinflammation（軽度の炎症）と共通した特徴を持つ。

(1) 糖尿病性腎症患者の腎生検組織において、ICAM-1やセレクチンなどの接着分子の発現亢進と著明なマクロファージの浸潤が見られる。糖尿病発症後きわめて早期に糸球体内にICAM-1の発現がおり、マクロファージの浸潤を誘導している (Sugimoto H et al. Diabetes 46, 1997)。5/6腎摘出モデルにおいても、糸球体内にICAM-1の発現が亢進してマクロファージの浸潤を誘導する

(Miyatake M et al. Nephron 79, 1998)。

(2) ICAM-1 KOマウスでは、糖尿病発症6ヶ月後のアルブミン尿、腎肥大、糸球体肥大、メサンギウム基質の増加が抑制され、さらに糸球体内のTGF- β とIV型コラーゲンの発現が抑制される (Okada S. Diabetes 52, 2003)。

(3) DNAマイクロアレイを用いて、糖尿病発症後のICAM-1 KOマウスとwild type マウスの腎組織における遺伝子発現プロファイルを比較することにより、マクロファージの細胞表面に発現するMacrophage scavenger receptor- A (SR-A)や、osteopontin、

cholecystokinin, RANTES, IP-10などのサイトカインやケモカインが、腎症の成因に関与していることが示唆された (Usui H. Diabetes, 2007.)。

(4) 糖尿病ラットにHMG-CoA還元酵素阻害薬 (スタチン) (Usui H. Nephrol. Dial. Transplant. 2004)、Methotrexate (Yozai K. J. Am. Soc. Nephrol. 2005)、Erythromycin (Tone A. diabetologia, 2005)、チアゾリジン誘導体 (Am J Physiol. in revision) などの薬剤を投与することにより、腎臓におけるNF- κ Bの活性化、ICAM-1の発現とマクロファージの浸潤が抑制される。

(5) SR-A KOマウスに糖尿病を誘発すると、腎組織へのマクロファージの浸潤とアルブミン尿、腎組織傷害が抑制された。In vitroの実験結果より、SR-Aはマクロファージと細胞外基質への接着を誘導する接着分子として機能していることが明らかとなった (Usui H. Diabetes. 2007)。

さらに、糸球体硬化に伴って進行するネフロン減少のモデルとして、5/6腎摘出モデルを用いて同様の実験を行った結果、ICAM-1 KOマウスでは5/6腎摘出モデルにおいても糸球体硬化が抑制されることが明らかになり、腎症が進行した時期の糸球体硬化と間質の線維化にも炎症メカニズムが関与することが示唆された。

(6) 日本人2型糖尿病患者において、血清中IL-18濃度は、動脈硬化の指標である頸動脈内膜肥厚度 (IMT)、baPWVと有意な正の相関を示すとともに、血清中および尿中IL-18濃度はアルブミン尿と有意な正の相関を示すことを明らかにした (Nakamura A. Diabetes Care 2005)

上記の結果から、糖尿病性腎症の成因にマクロファージを中心とする炎症メカニズムが重要な役割を果たしていることが明らかとな

った。糖尿病性腎症の発症機構には、糖化蛋白(AGEs)、酸化ストレス、protein kinase C活性化、糸球体血行動態異常などが関与し、これらが糸球体細胞の機能異常を引き起こすことにより糸球体硬化が進行すると想定されているが、これらの要因に加えて、炎症メカニズムが腎症進展の加速因子として関与していることが想定される。

そこで、我々は糖尿病性腎症の成因に関与する炎症(microinflammation)に焦点を絞り、糖尿病性腎症の成因に関与する炎症関連分子を明らかにするとともに、これらをターゲットとした新しい治療法の開発を目指す研究を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病性腎症の成因に関与する炎症関連分子を探索するとともに、microinflammationをターゲットとした腎症の新しい治療法を開発することである。本研究では、osteopontinの糖尿病性腎症の成因への関与を解明して治療標的としての可能性を明らかにすることと、GLP-1の腎臓および炎症細胞への作用を解明して、GLP-1受容体作動薬の腎症治療薬としての可能性を検証することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) Osteopontinノックアウトマウスを用いた、糖尿病性腎症の成因へOsteopontinの関与の検討。

①動物：8週令Osteopontin KOマウス、C57/BL6マウス(wild type)を用いる。

②糖尿病の作成：糖尿病群にはstreptozotocin(STZ:300mg/kg)を腹腔内投与する。非糖尿病群には、citrate bufferのみを投与する。

③代謝データ：STZ投与後1,4,8,12週に、血糖、HbA1c、尿中アルブミン排泄量、血清クレ

アチニン値を測定する。1,4,12週後に糸球体濾過値(GFR)を測定する。1,4,12週後にマウスを屠殺して腎組織を採取する。

④組織学的検討：12週後の腎組織からPASおよびPAM染色標本を作成して、画像解析ソフト(NIH Image)により糸球体サイズ、メサンギウム基質の面積を定量的に評価する。Masson染色により間質の線維化を評価する。

⑤免疫組織学的検討：蛍光抗体法と酵素抗体法を用いて、マクロファージの浸潤、TGF- β の発現、細胞外基質(I, IIIおよびIV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン)の発現を検討する。

⑥DNAマイクロアレイ：腎組織からRNAを抽出し、DNAマイクロアレイシステムを用いて、約30,000個の遺伝子の発現プロファイルを比較する。発現の差が大きい遺伝子を選択して、Northern blot、Real time RT-PCR、免疫染色で確認する。

⑦核内転写因子活性：腎組織から核蛋白を抽出して、NF- κ B、AP-1等の転写因子活性をELISA法で検討する。

(2) 糖尿病性腎症に対するGLP-1受容体アゴニストの効果

1) GLP-1受容体の発現

糸球体内皮細胞および末梢血単球におけるGLP-1受容体の発現を、RT-PCRとWestern Blotで検討した。

2) GLP-1受容体アゴニストの抗炎症作用

THP-1細胞を高等濃度下に培養して、Exendin-4を添加し、TNF- α およびIL-1 β の発現に与える影響を、定量RT-PCRおよび培養情勢中蛋白濃度によって検討した。

3) 糖尿病ラットに対するGLP-1受容体アゴニストの効果

①動物：5週令SDラット

②糖尿病の誘発：糖尿病群にはSTZ (65mg/kg)を尾静脈内投与する。非糖尿病群には、citrate bufferのみを投与する。

③ラットを1)非糖尿群、2)非糖尿病＋Exendin-4投与群、3)糖尿病群、4)糖尿病＋Exendin-4投与群に分けて8週間観察し、腎保護効果とそのメカニズムを検討した。

④評価項目：

1)代謝データ：血糖、HbA1c、尿中アルブミン排泄量、血清クレアチニン値、糸球体濾過値(GFR)。

2)組織学的評価：PASおよびPAM染色標本を作成して、画像解析ソフト(NIH Image)により糸球体サイズ、糸球体硬化の程度(メサンギウム基質の面積)を定量する。

3)免疫組織学的検討：蛍光抗体法と酵素抗体法を用いて、マクロファージの浸潤、TGF- β の発現、IV型コラーゲンの発現を評価する。

4)Northern blot、Real time RT-PCR：TGF- β とIV型コラーゲンの遺伝子発現を評価する。

5)核内転写因子活性：腎組織から核蛋白を抽出して、NF- κ Bの転写因子活性をELISA法で検討する。

6)酸化ストレス：Nox-4の糸球体内発現、8-OHdGの糸球体内発現と尿中排泄を検討した。

4. 研究成果

(1)Osteopontin ノックアウトマウスを用いた、糖尿病性腎症の成因へOsteopontinの関与の検討。

糖尿病を発症した osteopontin KO マウスでは、糖尿病を発症した wild type マウスに比べて、血糖値および血圧に差はなかったが、アルブミン尿が抑制された。腎組織におけるマクロファージの浸潤が抑制され、組織障害の程度が軽減する傾向を認めた。

(2)糖尿病性腎症に対する GLP-1 受容体アゴニストの効果

糖尿病群では正常群にくらべ、有意に

HbA1cの増加、摂餌量の増加、体重の低下を認めたが、exendin-4投与による影響は認めなかった。血圧は、全群間で有意差を認めなかった。Exendin-4は糖尿病ラットにおけるアルブミン尿の増加を有意に抑制した。腎組織においては、exendin-4投与によって、糸球体肥大の抑制、メサンギウム領域の増大の抑制、糸球体内マクロファージの浸潤の抑制、ICAM-1、IV型コラーゲン発現の抑制を認めた。さらに、exendin-4は、Nox-4の糸球体内発現、8-OHdGの糸球体内発現と尿中排泄を有意に減少させるとともに、NF- κ Bの活性を有意に抑制した。in vitroの検討では、培養マクロファージ(THP-1細胞)と、培養ヒト糸球体内皮細胞にGLP-1受容体の発現を確認した。Exendin-4は、高血糖刺激によるTHP-1細胞からのTNF- α 、IL-1 β の産生を有意に抑制した。また、exendin-4は、TNF- α 刺激による培養ヒト糸球体内皮細胞のICAM-1の発現を有意に抑制した。これらのexendin-4の効果は、GLP-1受容体拮抗剤の添加により消失した。

【考察】

Osteopontinは、糖尿病性腎症の発症進展過程において、腎組織へのマクロファージの浸潤に関与していることが示唆された。Osteopontinは糖尿病性腎症ノ新たな治療標的となる可能性がある。

GLP-1受容体が糸球体内皮細胞とマクロファージに発現しており、GLP-1はこれらの細胞に抗炎症作用を示すことが明らかとなった。GLP-1受容体作動薬であるexendin-4は、糖尿病ラットにおいて、血糖降下作用とは独立して、抗炎症作用を介した腎保護効果を示した。これらの結果より、GLP-1受容体作動薬の糖尿病性腎症に対する有用性が強く示唆される。

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) (すべて査読あり)

- ① Nagase R, Kajitani N, **Shikata K**, Ogawa D, Kodera R, Okada S, Kido Y, Makino H. Phenotypic change of macrophages in the progression of diabetic nephropathy; sialoadhesin-positive activated macrophages are increased in diabetic kidney. Clin Exp Nephrol. In press.
- ② Miyamoto S, **Shikata K**, Miyasaka K, Okada S, Sasaki M, Kodera R, Hirota D, Kajitani N, Takatsuka T, Kataoka HU, Nishishita S, Sato C, Funakoshi A, Nishimori H, Uchida HA, Ogawa D, Makino H. Cholecystokinin plays a novel protective role in diabetic kidney through anti-inflammatory actions on macrophage: anti-inflammatory effect of cholecystokinin. Diabetes. 61: 897-907. 2012.
- ③ 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. 534872, 2012. .
- ④ Matsushita Y, Ogawa D, Wada J, Yamamoto N, **Shikata K**, Sato C, Tachibana H, Toyota N, Makino H Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta inhibits streptozotocin-induced diabetic nephropathy through anti-inflammatory mechanisms in mice. Diabetes. 60:960-968, 2011
- ⑤ Kodera R, **Shikata K**, Kataoka HU, Takatsuka T, Miyamoto S, Sasaki M, Kajitani N, Nishishita S, Sarai K, Hirota D, Sato C, Ogawa D, Makino H. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes. Diabetologia. 54:965-978, 2011.
- ⑥ 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. Diabetes. 60:189-199, 2011.
- ⑦ Kido Y, Ogawa D, **Shikata K**, Sasaki M, Nagase R, Okada S, Usui Kataoka HU, Wada J, Makino H. Intercellular adhesion molecule-1 plays a critical role in glomerulosclerosis after subtotal nephrectomy. Clin Exp Nephrol. 15:212-219, 2011.
- ⑧ Tone A, **Shikata K**, Nakagawa K, Hashimoto M, Makino H. Renoprotective effects of clarithromycin via reduction of urinary MCP-1 levels in type 2 diabetic patients. Clin Exp Nephrol. 15:79-85, 2011.
- ⑨ Tone A, Iseda I, Higuchi C, Tsukamoto K, Katayama A, Matsushita Y, Hida K, Wada J, **Shikata K**. Comparison of insulin detemir and insulin glargine on glycemic variability in patients with type 1 and type 2 diabetes. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 118:320-324, 2011.
- ⑩ Miyatake N, **Shikata K**, Makino H, Numata T: The Relation between estimated glomerular filtration rate (eGFR) and proteinuria in Okayama prefecture, Japan. Environ Health Prev Med 16: 191-195, 2011.
- ⑪ Miyatake N, **Shikata K**, Makino H, Numata T: Comparison of ventilatory threshold between subjects with and without proteinuria in Japanese. Health 3: 394-399, 2011.
- ⑫ Miyatake N, **Shikata K**, Makino H, Numata T: Decreasing serum uric acid levels might be associated with improving estimated glomerular filtration rate (eGFR) in Japanese men. Health 3: 498-503, 2011.
- ⑬ Miyatake N, **Shikata K**, Makino H, Numata T: The relation between estimated glomerular filtration rate (eGFR) and coffee consumption in the Japanese. Health 3: 549-552, 2011.
- ⑭ Miyatake N, **Shikata K**, Makino H, Numata T: Comparison of muscle strength between subjects with and without proteinuria. Health 3: 698-702, 2011.
- ⑮ **Shikata K**, Haneda M, Koya D, Suzuki Y, Tomino Y, Yamada K, Maeda S, Kawakami N, Uzu T, Nishimura M, Sato C, Ogawa D, Makino H; DNETT-Japan Study Group. Diabetic Nephropathy Remission and Regression Team Trial in Japan (DNETT-Japan): Rationale and study design. Diabetes Res Clin Pract. 2010 Feb;87(2):228-232.
- ⑯ Miyatake N, **Shikata K**, Makino H, Numata T: Relation between estimated glomerular filtration rate and pulse wave velocity in Japanese. Intern Med 49: 1315-1320, 2010
- ⑰ Kajitani N, **Shikata K**, Nakamura A, Nakatou T, Hiramatsu M, Makino H : Microinflammation is a common risk factor for progression of nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract 88: 171-176, 2010.
- ⑱ Tone A, Iseda I, Higuchi C, Tsukamoto K, Katayama A, Matsushita Y, Hida K, Wada J, **Shikata K**. Comparison of insulin detemir and insulin glargine on glycemic variability in patients with type 1 and type 2 diabetes. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 18:320-324. 2010

- ⑱ Koya D, Haneda M, Inomata S, Suzuki Y, Suzuki D, Makino H, Shikata K, Murakami Y, Tomino Y, Yamada K, Araki SI, Kashiwagi A, Kikkawa R; Low-Protein Diet Study Group. Long-term effect of modification of dietary protein intake on the progression of diabetic nephropathy: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 52:2037-2045, 2009
- ⑳ Sarai K, Shikata K, Shikata Y, Omori K, Watanabe N, Sasaki M, Nishishita S, Wada J, Goda N, Kataoka N, Makino H: Endothelial barrier protection of FTY720 under hyperglycemic condition: Involvement of focal adhesion kinase, small GTPases and adherens junction proteins. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009

[学会発表] (計 10 件)

- ① Kajitani N, Shikata K, Kodera R, Miyamoto S, Hirota D, Sato C, Wada J, Ogawa D, and Makino H: Helmsartan attenuates diabetic nephropathy through anti-oxidative and anti-inflammatory actions via activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes Lisbon Portugal, 12-16 September 2011.
- ② Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Yamamoto N, Toyota N, Sato C, Wada J, Shikata K, Makino H: Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor δ Inhibits Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy Through Anti-inflammatory Mechanisms in Mice. American Diabetes Association 71st Scientific Sessions (San Diego, California, USA) 2011. 6. 24-6. 28
- ③ Ogawa D, Wada J, Matsushita Y, Nakatsuka A, Murakami K, Kanzaki M, Shikata K, Makino H. Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor δ Inhibits Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy Through Anti-inflammatory Mechanisms in Mice. Keystone Symposia (Keystone, Colorado, USA) 2011. 1. 12-1. 17
- ④ Kodera R, Kataoka H, Shikata K, Sato C, Sasaki M, Nishishita S, Miyamoto S, Hirota D, Kajitani N, Ogawa O, Makino H: Exendin-4 ameliorates renal injuries through anti-oxidative and anti-inflammatory effects in type 1 diabetic rats. 46th EASD Annual Meeting Stockholm, Sweden, September 21-24, 2010
- ⑤ Ogawa D, Matsushita Y, Shikata K, Wada J, Sato C, Makino H. PPAR δ -mediated anti-inflammatory mechanisms inhibit streptozotocin-induced diabetic nephropathy. The 2nd Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes. May 29, 2010.
- ⑥ Ogawa D, Matsushita Y, Shikata K, Wada J, Sato C, Makino H. PPAR δ -mediated anti-inflammatory mechanisms inhibit streptozotocin-induced diabetic nephropathy. ISN-NEXUS Kyoto in 2010. Kyoto, April 15-18, 2010
- ⑦ Ogawa D, Matsushita Y, Shikata K, Wada J, Sato C, Makino H: PPAR δ -mediated anti-inflammatory mechanisms inhibit streptozotocin-induced diabetic nephropathy. Keystone Symposia, Banff, Alberta, Canada. February 12-17, 2010
- ⑧ Miyamoto S, Shikata K, Sasaki M, Nishishita S, Sato C, Kataoka H, Kodera R, Hirota D, Kajitani N, Makino H: Cholecystokinin ameliorates diabetic renal injuries via anti-inflammatory effects. 45th EASD Annual Meeting, September 29-October 2, 2009
- ⑨ Kodera R, Kataoka H, Shikata K, Sato C, Sasaki M, Nishishita S, Miyamoto S, Hirota D, Kajitani N, Ogawa D, Makino H: Exendin-4 ameliorates renal injuries through anti-oxidative and anti-inflammatory effects in type 1 diabetic rats. 45th EASD Annual Meeting. September 30-October 2, 2009.
- ⑩ Kodera R, Kataoka H, Shikata K, Makino H: Exendin-4 ameliorates renal injuries through anti-inflammatory effects in type 1 diabetic rats. Asia Islet Biology and Incretin Symposium (AIBIS). August 1-2, 2009

[図書] (計 2 件)

- ① 四方賢一、榎野博史:慢性合併症の臨床2(腎症)1. 腎症の成因. 糖尿病学の進歩 262-266, 2010, 日本糖尿病学会編
- ② 四方賢一:腎不全期 糖尿病最新の治療, 南江堂, 172-173, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

四方 賢一 (SHIKATA KENICHI)
岡山大学・岡山大学病院・教授
研究者番号: 00243452

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者