

## 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 6月11日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590241

研究課題名（和文） 糖尿病性腎症モデルラットにおける亜硝酸塩による腎保護作用の検討

研究課題名（英文） The renal protective effects of nitrite salts in diabetic nephropathy model rats.

研究代表者

土屋 浩一郎（TSUCHIYA KOICHIRO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：70301314

研究成果の概要（和文）：NOは様々な生理作用を持ち、糖尿病性腎症の発症と進行には、腎血管内皮細胞の障害によるNO生成低下が原因であると考えられている。亜硝酸塩は体内でNOとなることで腎保護作用を発揮すると考えられてきたが、今回の研究で、亜硝酸イオンは細胞内のATPレベルを下げることにより5'AMP-activated protein kinase(AMPK)の活性化を導き、その結果eNOSを活性化してNOの生成を高め、そのことによって亜硝酸塩が直接腎保護作用を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Nitric oxide (NO) plays multipotent effects in many kinds of physiological processes. NO is generated by NO synthase (NOS), and disorders in the NOS is known to be related to diabetic nephropathy. Therefore, it has been believed that the production of NO from nitrite by non-enzymatic or enzymatic reduction responsible for the renoprotective effects of it. However, in this study, we found that nitrite suppress intracellular ATP level, then activates 5'AMP-activated protein kinase(AMPK), and following endothelial NOS activation. The activation of AMPK-eNOS pathway in endothelial cells is supposed to play a significant renal protective role in the nitrite action in addition to the NOS-independent NO production by nitrite.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：腎臓、亜硝酸

## 1. 研究開始当初の背景

最近まで、血中の無機の硝酸塩や亜硝酸塩は生体内でNOが代謝された際に生じる不活性な最終代謝物および中間代謝物と考えられ、食品中の硝酸・亜硝酸塩は不純物と考えられてきた。しかし我々は、静脈内投与(Okamoto M., Tsuchiya K. et al., Am. J. Physiol. 288, F182, 2005)や飲水に混ぜて経口で投与した(Tsuchiya k. et al., J

Pharmacol. Sci, 96, 395, 2004.; Tsuchiya K. et al., Am. J. Physiol. 288, H2163, 2005.; Kanematsu Y., Tsuchiya K. et al., Am. J. Physiol. 295, F1457, 2008)亜硝酸塩は体内でNOへと還元されることを、亜硝酸の安定同位体を用いて証明し、さらに他の研究者らによって硝酸塩も口腔内嫌気性細菌によって亜硝酸に還元を受け、同様にNOへと変化することが報告された。

これまで、体内の NO は L-arginine を基質とした、NO 合成酵素(NO synthase: NOS) によって生成するとされてきた。しかし NOS による NO の生成には、基質である L-arginine の他に分子状酸素が必要であり、虚血時のような酸素供給が絶たれるときの NOS による NO 生成への寄与はほとんど無いと考えられる。

一方、我々は、腎臓が虚血に至ったときには腎臓中の亜硝酸塩が NOS に代わり NO を生成することを報告し (Okamoto M., Tsuchiya K. et al., *Am. J. Physiol.* 288, F182, 2005)、Lundberg らは心臓の虚血再灌流時において (Lundberg JO. et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 156, 2008) 亜硝酸が NO の供給源であることを発表している。すなわち、虚血時には亜硝酸塩からの NO 生成が大きな意味を持つことが示された。

これらの知見から、最近では血中及び組織中の硝酸塩および亜硝酸塩は、血管内皮障害時の、NOS に代わる NO 生成のためのプールだと認識されるに至っている (Lundberg JO, Tsuchiya K. et al., *Nat. Chem. Biol.* in press)。

ところで、2 型糖尿病における糖尿病性腎症の発症および病態の進行には、血管内皮細胞障害による eNOS 由来の NO 産生の低下が関与していることが多くの研究グループから報告され、また、実験的に eNOS を KO したマウスではヒトの糖尿病性腎症と同じ病態を示すことが報告されている (*Clin. Nephrol.* 71, 103, 2009)。

我々は SD ラットに NOS 阻害剤である L-NAME を 8 週間にわたり慢性投与することで、血中 NO 濃度の低下、タンパク尿の出現 ( $36.7 \pm 1.7$  mg/day)、糸球体の虚血性変性・硝子滴・尿細管間質性障害が観察され、これらの現象は野菜中心食のヒトが 1 日に摂取するのと同程度の亜硝酸塩の経口投与 (1 mg NaNO<sub>2</sub>/L 飲水) で、飲水・餌摂取量に変化無く全て改善されるという結果を得た (Kanematsu Y., Tsuchiya K. et al., *Am. J. Physiol.* 295, F1457, 2008)。

腎臓では eNOS と nNOS が主に発現しており、また L-NAME は非選択的 NOS 阻害剤であるため、SD ラットに L-NAME を慢性投与した場合の腎糸球体障害が亜硝酸塩によって改善したことは、直ちに亜硝酸塩が eNOS からの NO 産生を補って腎障害を軽減したことにはならないが、糖尿病性腎症の予防および病態の進行阻止に、日常摂取する程度の亜硝酸塩が有用であることを強く示唆する結果である。同様の研究では、STZ 誘発腎障害モデルラットに対し、亜硝酸塩 (863 mg NaNO<sub>2</sub>/L 飲水) を 4 週間経口摂取させると腎障害を改善するという報告が 1 報あるのみである (*Nitric Oxide* 17, 75, 2007)。しかし

この実験における亜硝酸ナトリウムの推定摂取量は約 380mg/kg となり、この値は亜硝酸 Na のラットにおける経口 LD50 値 (180 mg/kg) を超えるものであることから、更に詳細な実験が必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

そこで本実験では 1 型および 2 型糖尿病モデル動物を作成し、糖尿病性腎症に対する亜硝酸塩の効果を病理学的、生化学的および分子生物学的に検討することを目的として、研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 糖尿病モデルラットに亜硝酸塩を飲水により経口投与し、抗糖尿病効果及び血液生化学検査を行う。

(2) 糖尿病性腎症の発現および進展には eNOS と NADPH oxidase のクロストークおよび PI3K/Akt 経路が関与することから、亜硝酸塩がこれらの経路に与える影響を明らかにする目的で、腎糸球体血管内皮細胞を亜硝酸塩共存下、細胞内情報伝達関連分子の発現を検討する。

## 4. 研究成果

(1) Wistar 系雄性ラット (8 週齢、各群 7 匹) を、硝酸ナトリウムを飲水に添加した群 (1,000 mg NaNO<sub>2</sub>/L)、ナトリウムの影響を除去するために NaCl を飲水に添加した群 (850 mg NaCl/L)、および蒸留水群の 3 群に分け、高脂肪食 (60%) を 4 週間摂取させ軽度のインスリン抵抗性状態を作り、亜硝酸の影響を検討した。

その結果、体重の推移には 3 群間に違いは見られなかった。4 週目の OGTT テスト (2 g glucose/kg bw, 5 mL/kg bw) の結果、0→3 時間の血中グルコース濃度の AUC (曲線下面積) は、亜硝酸塩投与による改善効果は見られなかった。しかしながら、実験開始 15 日目の血中中性脂肪値は、蒸留水群ではコントロール群に比べ有意に高値であり、亜硝酸塩の投与によってコントロール群と同程度に低下する事が観察された (図 1)。なお、この傾向は実験開始 4 週目でも同様であった。

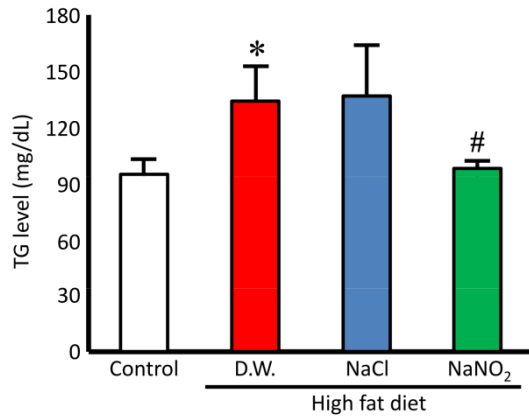


図1. 亜硝酸塩投与による血中中性脂肪変化(\*:p<0.05 vs control, #: p<0.05 vs D.W.)そこで培養細胞を用い、亜硝酸イオンの細胞内情報伝達経路に与える作用について検討した。

## (2) 亜硝酸イオンによる細胞保護効果の検討

実験には培養ヒト腎糸球体培養細胞 (human glomerular endothelial cells (HGEC))を用い、実験開始4時間前に血清を除去した。細胞内の ATP 含量は、D-luciferin-luciferase 蛍光法で測定を行い、細胞内のタンパク質発現は western blotting 法で解析を行った。

### ①eNOS のリン酸化に対する亜硝酸イオンの影響

HGEC の eNOS リン酸化に対する亜硝酸イオンの影響を western blotting 法で検討したところ、亜硝酸塩の濃度依存的なリン酸化が観察されたが (図2)、硝酸塩ではそのような活性化は起きなかった。

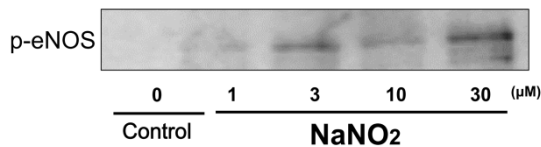


図2. 亜硝酸 Na による eNOS のリン酸化

### ②AMPK 活性化に対する亜硝酸イオンの影響

亜硝酸による、AMPK の活性化の指標である 172 番目のセリン残基に対するリン酸化を western blotting 法で検討したところ、eNOS の活性化を惹起したのと同じ濃度範囲でリン酸化が確認され、さらに AMPK の基質である ACC のセリン 89 番目のリン酸化も同時に観察された (図3)。

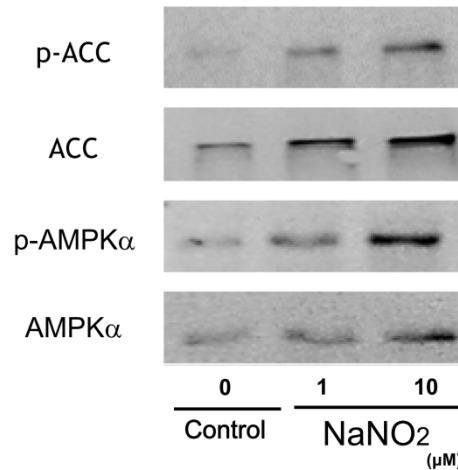


図3. 亜硝酸 Na による AMPK および ACC のリン酸化

そして、AMPK リン酸化を特異的に阻害する BML275 を前処置すると、亜硝酸 Na による eNOS リン酸化が抑制された。

### ③亜硝酸 Na による AMPK 活性化の機序の解明

これまで我々は、亜硝酸イオンによる生理作用の発揮には、亜硝酸イオンが体内 (細胞内) で還元を受けて生成した NO が活性本体であると考えてきた。そこで NO の特異的消去剤である carboxy-PTIO 存在下での亜硝酸 Na による AMPK 活性化を調べたところ、興味深いことに carboxy-PTIO は亜硝酸 Na による AMPK リン酸化には影響を及ぼさず、亜硝酸 Na による AMPK リン酸化は NO によるものではないことが明らかとなった (図4)。

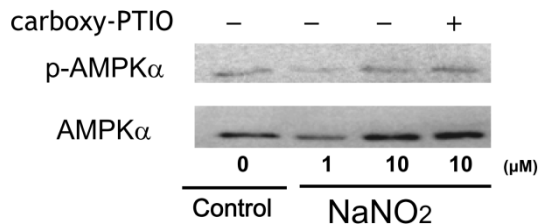


図4. 亜硝酸 Na による AMPK リン酸化に対する carboxy-PTIO の影響

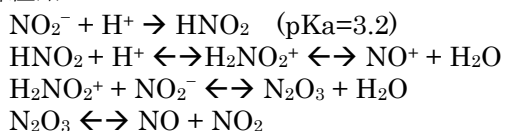
### ④亜硝酸 Na 刺激と細胞内 ATP レベルの検討

AMPK の活性化は、細胞内 AMP/ATP 比によってコントロールされることから、亜硝酸 Na 刺激による細胞内 ATP 変動を検討したところ、10 μM の亜硝酸 Na 刺激により細胞中の ATP レベルは経時的に低下することが明らかとなった。

## ⑤考察

NOは血管内皮細胞で生成される主要な血管弛緩因子であり、また、血管弛緩以外にも生体防御機構、活性酸素の消去、内皮細胞のアポトーシス抑制、血小板凝集抑制や、各種炎症状態に起因する臓器障害に対して抑制効果を持つことが知られている。ところで糖尿病性腎症において、腎糸球体における血管内皮機能低下によって尿中へのアルブミン漏出が現れ、また血管内皮細胞でNO合成酵素から生成されるNO量の低下が病態の発症と進行に関与することが明らかにされてきた。

経口的に硝酸塩を摂取すると25%の硝酸塩が体内で還元を受け亜硝酸塩となる。亜硝酸塩は体内で更に還元を受けNOとなることで臓器保護作用、腎保護作用を發揮することを報告してきた。ところでこのような亜硝酸塩からのNO生成は強酸条件下による酸分解経路



または deoxyHb や xanthine oxidase による還元によって生じるが、腎臓は pH の極端な低下は起きず、また deoxyHb や xanthine oxidase による還元は、高度な虚血状態で起きることから、糖尿病性腎症のようなある程度酸素供給が行われている組織において亜硝酸による保護作用が上記の機構による直接的なNOによるものという仮説は完全に受け入れられてこなかった。

しかしながら今回の検討により、亜硝酸塩は細胞内ATPの減少を通してAMPKの活性化を図り、これがeNOSのリン酸化を引き起こすことで細胞保護作用のあるNO生成を促進するという新しい亜硝酸塩による腎保護機構のメカニズムを提案できた。

また、動物実験における血中TG低下についても、肝臓のAMPK活性化によるものと推定している。

## ⑥まとめ

亜硝酸塩を摂取すると、体内において非酵素的・酵素的な還元によって直接NO源になるほか、AMPK-eNOS経路によって間接的にNO生成を促進し、細胞保護作用を發揮することを明らかにした(図5)。

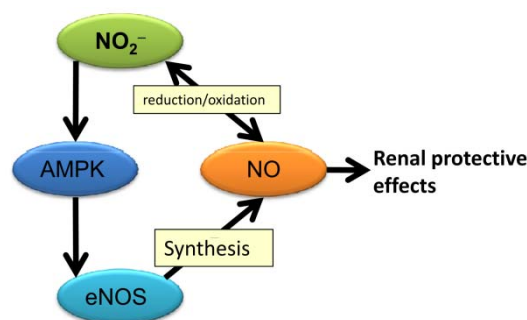


図5. 亜硝酸塩による腎保護のスキーム

## 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2件)

1. 土屋浩一郎、石澤啓介、宮本理人、堀ノ内裕也、池田康将、木平孝高、富田修平、玉置俊晃、亜硝酸塩による腎保護作用(総説)、腎とフリーラジカル、査読無、11、2013、30-33.
2. Tsuchiya K, Miyamoto L, Yamane M, Kono M, Tomida Y, Ishizawa K, Kihira Y, Ikeda Y, Tamaki T. Significance of AMPK-eNOS pathway in renal protective effects of nitrite. Nitric Oxide, 査読無, S24, 2013. DOI: 10.1016/j.niox.2013.02.029

[学会発表] (計3件)

1. 土屋浩一郎、宮本理人、石澤啓介、富田洋輔、山根萌、木平孝高、池田康将、玉置俊晃、亜硝酸塩による腎保護作用とその機序、第66回日本酸化ストレス学会、2013年06月14日、ウインク愛知(愛知県)
2. Tsuchiya K, Miyamoto L, Yamane M, Kono M, Tomida Y, Ishizawa K, Kihira Y, Tamaki T. Significance of AMPK-eNOS pathway in renal protective effects of nitrite. Fifth International Meeting on the role of Nitrite and Nitrate in Pathology, Pathophysiology, and Therapeutics. 2013年05月04日~2013年05月05日、The University Club (USA)
3. 宮本理人、山根萌、河野舞、富田洋輔、石澤啓介、玉置俊晃、土屋浩一郎、亜硝酸による腎保護作用におけるAMPKの意義、第42回日本心脈管作動物質学会、2013年2月9日、奈良県新公会堂(奈良県)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 浩一郎 (TSUCHIYA KOICHIRO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：70301314

(2)研究分担者

富田 修平 (TOMITA SHUHEI)  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号：00263898

石澤 啓介 (ISHIZAWA KEISUKE)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：60398013

濱野 修一 (HAMANO SHUICHI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授  
研究者番号：60530392

玉置 俊晃 (TAMAKI TOSHIAKI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号：80179879

(3)連携研究者

( )

研究者番号：