

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 22 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790866

研究課題名（和文）

メタボリックメモリーの分子機序におけるミトコンドリア ROS と HIF-1 の寄与解析

研究課題名（英文） Contribution analysis of mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) and Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) in the molecular mechanism of the metabolic memory

研究代表者

久木留 大介 (KUKIDOME DAISUKE)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10555759

研究成果の概要（和文）：

申請者らはミトコンドリア由来活性酸素 (mtROS) が糖尿病血管合併症発症の主要因子であることを報告している。今回の研究では mtROS の糖尿病性腎症発症への関与について、培養血管内皮細胞および mtROS の特異的除去酵素である Manganese superoxide dismutase (MnSOD) の血管内皮特異的発現トランスジェニックマウスを用い、*in vitro*、*in vivo* の両面から解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

We previously reported that mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) is one of the major factors in the pathogenesis of diabetic vascular complications. In this study, we examined the impact of mtROS in the pathogenesis of diabetic nephropathy using endothelial cells and transgenic mice, which specifically express manganese superoxide dismutase (MnSOD) in vascular endothelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：糖尿病

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

1. 研究開始当初の背景

わが国において、H19 年国民健康・栄養調査によると「糖尿病が強く疑われる人」：890 万人、「糖尿病の可能性が否定できない人」：1320 万人、合計：2210 万人と増加の一途をたどっており、同時

に糖尿病合併症併発患者数の増加も報告されている。

1987 年、Engerman RL らは、アロキサソ誘導糖尿病犬において、初期の血糖コントロールが不十分であれば、その後厳格な血糖管理を行っても網膜症の進展を食い止めるこ

とが困難であることをはじめて報告した (**Diabetes** 36: 808, 1987)。また近年では、**Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC)(NEJM 353: 2643, 2005)**や **United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)80(NEJM 359: 1577, 2008)**などの大規模臨床研究において、長期間血糖コントロールが不十分であった糖尿病患者では、その後厳格な血糖管理に変更しても、合併症が依然として進展することが報告され、糖尿病モデル動物で報告された現象が、糖尿病患者においても起こりうることを確認された。これらの現象はメタボリックメモリーや **Legacy Effect** と呼ばれているが、その機序はまだ不明である。

申請者らのグループではこれまでに、**1)**高血糖が培養血管内皮細胞において **mtROS** の過剰産生を引き起こし、さらにこの **mtROS** がこれまで糖尿病合併症の成因と考えられていた細胞内代謝異常を引き起こすこと (**Nature**, 404: 787, 2000)、**2)**尿中 **8-OHdG(mtROS のマーカー)**が **2**型糖尿病患者で増加し、尿中 **8-OHdG** の増加が糖尿病合併症の重症度と相関すること (**Diabetes Care**, 26:1507, 2003)、**3)**血管内皮細胞に特異的に **MnSOD (mtROS 除去酵素)** を発現させたトランスジェニックマウス(**eMnSODTg** マウス)の開発に成功し、**in vivo** で **mtROS** の制御により、糖尿病網膜症の発症抑制が認められたこと (**BBRC**, 366:814, 2008)、等を報告している。

申請者自身も **4)**糖尿病治療薬メトホルミンが **AMPK-PGC-1 α -MnSOD** 経路の亢進により、**mtROS** を抑制すること (**Diabetes** 55:120, 2006)、**5)** 糖尿病治療薬のチアゾリジン誘導体が **PGC-1 α -MnSOD** 経路の亢進により、**mtROS** を抑制すること (**BBRC**, 379:43, 2009)、など **in vitro**、**in vivo** の両面から糖尿

病およびその合併症発症において **mtROS** の意義を研究してきたが、まだ不明な点も多い。

一方、申請者らが高血糖により産生されることを報告している **mtROS** が、低酸素状態下でも産生され、**Hypoxia-Inducible Factor-1(HIF-1)**の安定化を誘導するなど、低酸素のセンサーとしても働いていることが報告された (**Cell Metab** 1: 401, 2005)。糖尿病合併症の標的組織で低酸素状態が生じているのかは不明であり、低酸素状態と類似した細胞内代謝異常の発症メカニズムやその腎症発症における意義についてはまだ十分に検討されていない。

2. 研究の目的

これまでの研究を踏まえ、今回の研究では、高血糖の影響が長期間続くと、糖尿病合併症の標的組織で低酸素状態が誘導され、この低酸素状態から産生される **mtROS** がさらに糖尿病合併症を進展させるという仮説を検証する事を目的として **in vitro**、**in vivo** の両面から検討を行う。

3. 研究の方法

(1)高血糖による組織内低酸素状態の **in vitro** での検討

培養血管内皮細胞を **5.5mM** グルコース及び **25mM** グルコース濃度下で **3**時間培養した。その後、低酸素状態と類似した細胞内代謝異常の存在を評価するため、①低酸素状態の細胞に取り込まれる **pimonidazole HCl** を、② **HIF-1 α** 抗体をそれぞれ使用して、免疫組織化学的染色およびウエスタンブロット (**WB**) 法により検討した。

(2) **mtROS** 産生の **in vitro** での検討

培養血管内皮細胞を **5.5mM** グルコース及び **25mM** グルコース濃度下で **3**時間培養した。

その後、mtROS 産生増加について、蛍光プローブ MitoTracker Red CM-H₂XROS を使用した共焦点レーザー顕微鏡により検討した。

(3) 糖尿病マウスの作成

8~10 週齢の雄の eMnSOD-Tg マウスおよび野生型 (WT) マウスに対し、buffer および 10 μM クエン酸ナトリウム buffer (pH 4.5) に溶解したストレプトゾトシン(STZ)を 150 mg/kg・BW (Wako Co, Japan) 腹腔内注射し、非糖尿病 WT マウス、非糖尿病 eMnSOD-Tg マウス、糖尿病 WT マウス、および糖尿病 eMnSOD-Tg マウスの 4 群を作製した。

(4) 腎糸球体における HIF-1α 蛋白および VEGF 蛋白発現の検討

(3)で作成されたマウス群を 4 週間飼育した。その後、これらマウスの腎糸球体での低酸素状態と類似した細胞内代謝異常の発現を評価するため、HIF-1α 蛋白、VEGF 蛋白、細胞核マーカーである DAPI の発現について免疫組織化学的染色を行った。

(5) mtROS 産生の *in vivo* での検討

(3)で作成されたマウス群を 4 週間飼育した。その後、酸化ストレスの変化を評価するため、これらマウスの腎糸球体に対して、8-OHdG 抗体を使用した免疫組織化学的染色を行った。

4. 研究成果

(1) 高血糖による組織内低酸素状態の *in vitro* での検討

① pimonidazole HCl を用いた検討

培養血管内皮細胞において、1%酸素濃度環境下ではグルコース濃度の違いによる pimonidazole HCl の免疫組織化学的染色に差異を確認できなかった。しかし、培養酸素濃

度の差異による pimonidazole HCl の免疫組織化学的染色の差異が生じることより、培養血管内皮細胞においても pimonidazole HCl の免疫組織化学的染色が低酸素状態を示すことを確認した。21%酸素濃度環境下では高グルコース濃度の方が pimonidazole HCl の免疫組織化学的染色濃度が高いことより高グルコース濃度による組織内低酸素状態誘導が示唆された。pimonidazole HCl を 1 次抗体として用いた WB 法では、酸素濃度およびグルコース濃度による組織内低酸素状態への影響は明瞭に示せなかった (図 1A)。

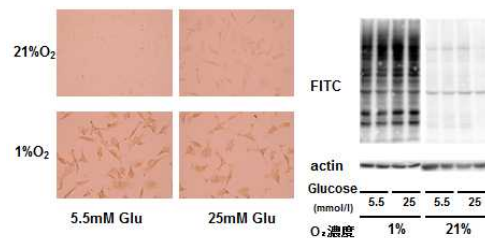


図1A: 培養グルコース濃度と培養酸素濃度の差異による組織内低酸素状態の pimonidazole HCl を用いた評価

② HIF-1α 抗体を用いた検討

HIF-1α 抗体を 1 次抗体として用いた WB 法では、21%酸素濃度環境下での高グルコース濃度による HIF-1α 蛋白の軽度増加を確認できた。また、HIF-1α 抗体を用いた免疫組織化学的染色法では、1%及び 21%酸素濃度環境下でも高グルコース濃度による HIF-1α 蛋白の増加を確認できた。(図 1B)。

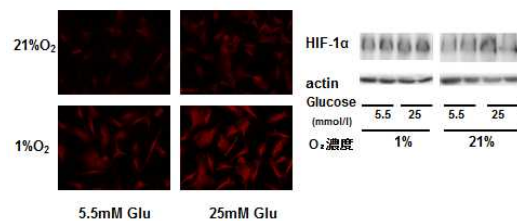


図1B: 培養グルコース濃度と培養酸素濃度の差異による組織内低酸素状態の HIF-1α 抗体を用いた評価

(2) mtROS 産生の *in vitro* での検討

培養血管内皮細胞において、21%酸素濃度環境下では、5.5 mM グルコース培養と比較

して 25 mM グルコース培養で蛍光強度が強くなり、mtROS 産生の増加が確認された。

また、1%酸素濃度環境下では 21%酸素濃度環境下と比較して、いずれのグルコース濃度培養においても蛍光強度が強くなり、mtROS 産生が増加することを確認した。

さらに 21%酸素濃度環境下と同様に 1%酸素濃度環境下においても、25 mM グルコース培養下で 5.5 mM グルコース培養と比較して mtROS 産生が増加することが確認された(図 2)。

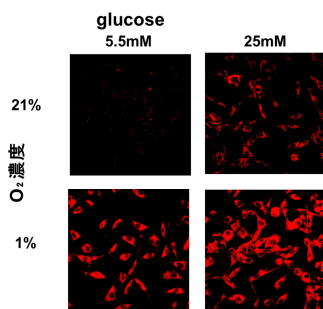


図2: 培養グルコース濃度と培養酸素濃度の差異によるmtROS産生の変化

(3) 糖尿病マウスの作成

STZ または buffer をそれぞれ WT マウスおよび eMnSOD-Tg マウスに投与することによって、糖尿病群と非糖尿病群を作製し、随時血糖値の推移を観察した。

WT マウスおよび eMnSOD-Tg マウスにおいて、糖尿病群では非糖尿病群と比較して実験開始時には随時血糖値および体重に有意な差は認められなかった。薬剤投与 4 週間後には WT マウスおよび eMnSOD-Tg マウスの糖尿病群 (WT マウス; 400 ± 23 , eMnSOD-Tg マウス; 492 ± 21 mg/dL) と非糖尿病群 (WT マウス; 122 ± 6 , eMnSOD-Tg マウス; 120 ± 5 mg/dL) の随時血糖値に関して有意な差が認められた。

(4) 腎系球体における HIF-1 α 蛋白および VEGF 蛋白発現の検討

非糖尿病 eMnSOD-Tg マウスでは、非糖尿病 WT マウスと比較して HIF-1 α 蛋白および VEGF 蛋白発現に変化は認められなかった。

一方、糖尿病 WT マウスでは、非糖尿病 WT マウスと比較して HIF-1 α 蛋白および VEGF 蛋白発現の増加を認めた。

しかし、糖尿病 eMnSOD-Tg マウスでは糖

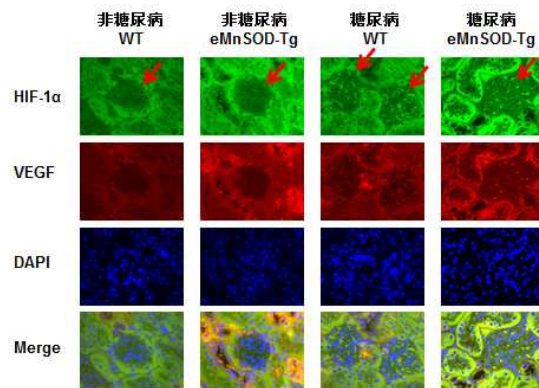


図3: 腎系球体における糖尿病導入およびeMnSOD発現のHIF-1 α 蛋白およびVEGF蛋白発現への影響

尿病により増加する HIF-1 α 蛋白および VEGF 蛋白発現増加は抑制されていることが確認された (図 3)。

(5) mtROS 産生の *in vivo* での検討

非糖尿病 eMnSOD-Tg マウスと非糖尿病 WT マウスとを比較した時、8-OHdG 発現に変化は認められなかった。

しかし、糖尿病 WT マウスでは、非糖尿病 WT マウスと比較して著明な 8-OHdG 発現増加を認めた。

さらに、糖尿病 eMnSOD-Tg マウスでは、糖尿病 WT マウスと比較して 8-OHdG 発現が抑制されることが確認された (図 4)。

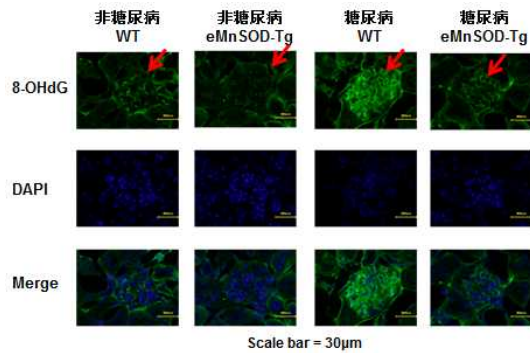


図4:腎系球体における糖尿病導入およびMnSOD発現の酸化ストレスへの影響

以上の研究より、高血糖により低酸素状態と類似した細胞内代謝異常が誘導されること、また *in vivo* の検討からは、その腎系球体での低酸素類似状態の発現と mtROS の関与が示唆された。今後、そのメカニズムの詳細をさらに検討していく予定である。この研究を進めていくことで、糖尿病性腎症の発症・進展を制御しうる新規治療法および新規治療薬開発につながる可能性が示されたものと思われる。

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 2 件)

1. Kukidome D, Miyamura N, Sakakida K, Shimoda S, Shigematu Y, Nishi K, Yamashita Y, Eto M, Sasano H, Araki E. :A case of cortisol producing adrenal adenoma associated with a latent aldosteronoma: usefulness of the ACTH loading test for the detection of covert aldosteronism in overt Cushing syndrome. *Intern Med.* (査読あり) 2012;51(4):395-400.
2. Yamashiro T, Nishikawa T, Isami S, Wei CN, Fukumoto K, Matsuo H, Yoshinaga T, Kukidome D, Motoshima H, Matsumura T, Ueda A, Araki E. The effect of group-based lifestyle interventions

on risk factors and insulin resistance in subjects at risk for metabolic syndrome: the Tabaruzaka Study 1. *Diabetes Obes Metab.*(査読あり) 2010 Sep;12(9):790-7.

[学会発表] (計 11 件)

1. Kukidome D, Koga K, Igata M, Kawashima J, Shimoda S, Shigematu Y, Nishi K, Yamashita Y, Eto M, Sasano H, Miyamura N, Araki E. : Usefulness of the ACTH administration test in three cases with hypercortisolism and hyperaldosteronism. ENDO 2011: The 93rd Annual Meeting & Expo, 2011/6/4-2011/6/7, USA, Boston.
2. 久木留 大介, 馬場晋平、島村梨紗、嶋田さやか、福永麻希子、古賀荒太郎、本田佳子、大串幹、下田誠也、西川武志、荒木栄一: 2型糖尿病患者での合併症とバランス能力との関連性, 第54回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011/5/19-2011/5/21, ロイトン札幌
3. 西川武志, 久木留大介, 荒木栄一: インスリンからみた糖尿病の病態, 第45回糖尿病学の進歩, 2011/2/18-2011/2/19, 福岡国際会議場
4. 久木留 大介, 古賀 荒太郎、水流添 寛、西川 武志、宮村 信博、荒木 栄一: 原発性アルドステロン症に可逆性後白質脳症を併発した一例, 第20回臨床内分泌代謝update, 2011/1/28-2011/1/29, 札幌コンベンションセンター
5. 久木留大介, 馬場晋平、島村梨紗、嶋田さやか、福永麻希子、古賀荒太郎、本田佳子、大串幹、下田誠也、西川武志、荒木栄一: 2型糖尿病患者における糖尿病合併症と静的・動的バランス能力との関連性, 第48回日本糖尿病学会九州地方会, 2010/10/29-2010/10/30, 別府ビーコンプ

- ラザ.
6. 西川武志, 久木留大介, 荒木栄一: 酸化ストレスと糖尿病網膜症, 第 25 回日本糖尿病合併症学会, 2010/10/22-2010/10/23, びわ湖ホール・ピアザ淡海
 7. 古賀荒太郎, 馬場晋平, 島村梨紗, 嶋田さやか, 福永麻希子, 久木留大介, 本田佳子^{#2}, 大串幹, 下田誠也, 西川武志, 荒木栄一: 静的・動的バランス能力と 2 型糖尿病患者における糖尿病合併症との関連性, 第 60 回日本体質医学会総会, 2010/10/16-2010/10/17, 熊本パレア
 8. 古賀 荒太郎, 久木留 大介, 水流添 寛, 西川 武志, 宮村 信博, 荒木 栄一: 可逆性後白質脳症発症(PLES)を契機に診断に至った原発性アルドステロン症(PA)の一例, 第 10 回日本内分泌学会九州地方会, 2010/8/28, 鹿児島大学
 9. Nishikawa T, Kukidome D, Araki E: Mitochondrial reactive oxygen species: A cause and therapeutic target of diabetic complications. The 26th Kumamoto Medical Biosciences Symposium, 2010/6/19, 熊本大学医学部山崎記念会館, Kumamoto, Japan
 10. Kukidome D, Sakakida K, Sakaguchi M, Furukawa N, Shigematu Y, Nishi K, Ymashita Y Eto M, Sasano H ,Miyamura H, Araki E.: A case of double adenomas in a single adrenal gland associated with primary aldosteronism and hypercortisolism - analysis using the bilateral adrenal venous catheterization and immunohistochemical evaluation of steroidogenesis -, ENDO 2010: The 92nd Annual Meeting & Expo, 2010/6/19-2010/6/22, San Diego, USA.
 11. 久木留大介, 西川武志, 山城武司, 吉永智昭, 本島寛之, 松村剛, 荒木栄一: 腎機

能障害発症へのインスリン抵抗性とメタボリックシンドロームの関与, 第 53 回日本糖尿病学会総会, 2010/5/27-2010/5/29, ホテルグランビア岡山

6. 研究組織

(1)研究代表者

久木留 大介(KUKIDOME DAISUKE)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号:10555759