

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 4 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890016

研究課題名（和文） 糖尿病性腎症における凝固第3因子の役割について

研究課題名（英文） Role of coagulation factor 3 in diabetic nephropathy

研究代表者

高橋 信行 (TAKAHASHI NOBUYUKI)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：40588456

研究成果の概要（和文）：

ホモeNOS^{-/-}糖尿病マウスを用いて eNOS欠損が糖尿病性腎症(diabetic nephropathy, DN)を悪化させる原因となっていること、ヘテロeNOS^{+/-}糖尿病マウスを用いてNOS3 276TT遺伝子型による程度のNOの減少がDN悪化に十分であることを示した。興味深いことにeNOS^{-/-}糖尿病マウスのDNは糸球体へのフィブリンの沈着、腎臓での凝固第3因子の発現および活性、そして炎症のマーカーと強い相関を示していた。本研究からeNOS発現の減少したあるいはNO産生の減少した糖尿病患者では凝固第3因子がDN治療の新たなターゲットとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Diabetic nephropathy (DN) is the leading cause of end stage renal disease, and the number of patients with DN has been increasing rapidly. Human variants of the endothelial nitric oxide synthase gene (eNOS, *NOS3*) that produce reduced amounts of nitric oxide (NO) are positively associated with DN, although proof of causation is lacking. Here we have demonstrated that eNOS^{-/-} mice with diabetes develop severe nephropathy. However, complete absence of eNOS has not been reported in humans, although reduced levels are not infrequent. Accordingly, heterozygous eNOS^{+/-} mice have been made diabetic, and they demonstrated that the decrease in eNOS/NO comparable to that of *NOS3* polymorphisms is sufficient to cause exacerbation of DN. Increased expression of tissue factor, initiator of coagulation, likely plays a significant role in the DN of the eNOS^{-/-} diabetic mice. Strategies to ameliorate hypercoagulability could be useful for treatment of DN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：糖尿病性腎症、凝固第三因子、マウス

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は腎不全の最も重要な原因のひとつであり、その発症を予防するまたは進展を阻止する有効な治療法が求められている。糖尿病性腎症の遺伝的要因解明が遅い理由としてヒトの糖尿病性腎症を再現する動物モデルが存在しないことがあげられる。eNOS(*NOS3*)遺伝子多型 276TT によるeNOSの減少は糖尿病性腎症の悪化と関連するが、eNOSの減少が腎症の原因になっているか明らかではなかった。また、血液凝固の亢進が糖尿病ではおこっているが、このことが腎症を悪化させる原因となっているか明らかでなかった。

2. 研究の目的

eNOSの減少が腎症の原因になっているか、また、血液凝固の亢進、特に凝固第3因子の腎症における役割を明らかにする。

3. 研究の方法(下図参照)

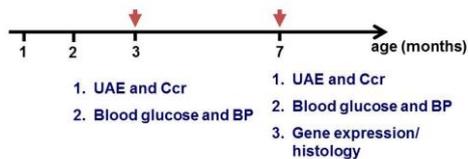
eNOS^{+/+};Akita^{+/+}, ヘテロ eNOS^{+/-};Akita^{+/+}, ホモ eNOS^{-/-};Akita^{+/+}糖尿病マウスの血圧、1日尿中アルブミン排泄量(UAE)、クレアチニンクリアランス(Ccr)を3か月齢および6か月齢にて測定・計算する。6か月齢の測定後、マウスの血液、腎臓を回収し、それらの酸化ストレス(GSH, CML, MDA)を測定し、血液凝固時間、腎のフィブリン沈着を免疫染色で、TFの発現・活性、炎症・線維化に関する遺伝子の発現(TNF α , IL-6, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, TGF β , CTGF, collagen IV)をreal time qRT-PCRにて定量する。腎臓の光顕像から、メサンジウム増殖、糸球体硬化、間質線維化、電顕像から糸球体基底膜の肥厚、podocyte effacementを定量する。蛍光免疫染色にて糸球体のTF発現を検討する。また、TF発現・活性と糖尿病性腎症のパラメーターの相関を調べる。

Experimental design

Experimental design

eNOS129/SvEv Tac x Akita C57BL/6J
-->[+/+, +/-, -/-, +/+A, +/-A, -/-A]F1 mice

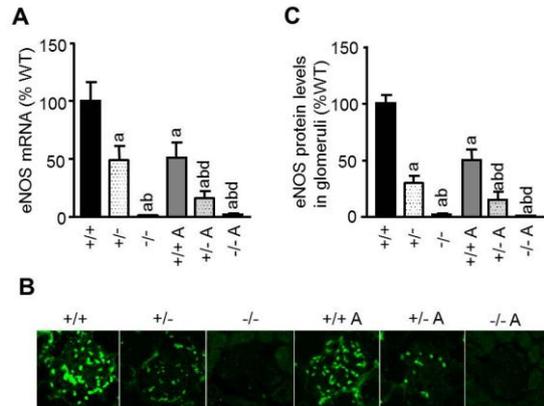
Diabetic Complications Consortium (DCC)
Breeding Scheme and Selection of Animals for DCC Experiments



4. 研究成果

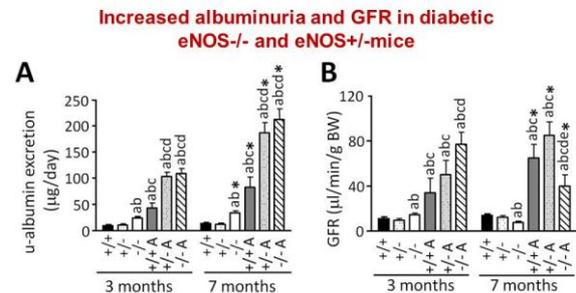
eNOS欠損が糖尿病性腎症を悪化させる原因となっていること、ヘテロeNOS^{+/-}糖尿病マウスを用いてNOS3 276TT遺伝子型による程度のNOの減少が糖尿病性腎症悪化に十分であることを示した。

即ち、ヘテロeNOS^{+/-}マウスは野生型eNOSマウ



スの約30%のeNOSタンパク発現量をもち(上図B, C)、これはヒトのポリモルフィズムに相当するNO産生量の差である。従って、ヘテロeNOS^{+/-}マウスは、ヒトのeNOSポリモルフィズムに相当するNO産生量の減少が糖尿病性腎症の原因となっているかテストするのに適したモデルである。

これらのマウスをAkitaマウスと組み合わせ

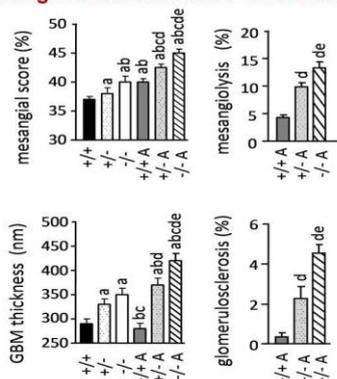


Data are mean \pm SEM. n \geq 8. a, b, c, d, e: p<0.05 vs. +/+, +/-, -/-, +/+A, +/-A, respectively. *p<0.05 vs. values when the same mice were 3 months old. A: Akita.

て糖尿病にした場合、1日尿中アルブミン排泄量はヘテロeNOS^{+/-} Akitaマウスでは野生型eNOS^{+/+} Akitaマウスと比べ有意に増加しており、ホモeNOS^{-/-} Akitaマウスと匹敵していた(上図A)。クレアチニンクリアランス(GFR)もヒトで糖尿病性腎症早期には増加するという事実と一致して増加していた(上図B)。ただしホモeNOS^{-/-} Akitaマウスでは7か月になるとGFRは減少してきており、糖尿病性腎症が進行していることを示唆する。おそらく観察期間を延長すればヘテロeNOS^{+/-} AkitaマウスでもGFRは減少すると予想される

。このような腎臓の機能的な変化のみならず、形態学的にもeNOSの減少はメサンギウム領域の増加、糸球体基底膜 (GBM) の肥厚、糸球体硬化を助長していた (下図参照)。

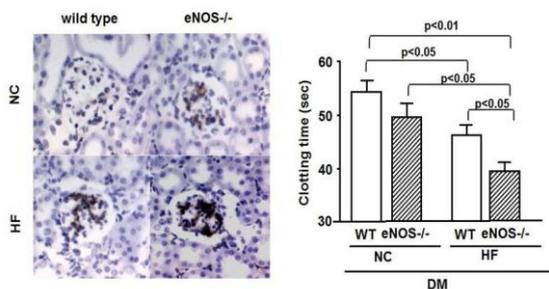
Mesangial expansion, glomerulosclerosis, and GBM thickening in diabetic eNOS^{-/-} and eNOS^{+/-} mice



A: Ins2Akita. a, b, c, d, e: p<0.05 vs. +/+, +/+, -/-, +/+ A, +/- A, respectively.

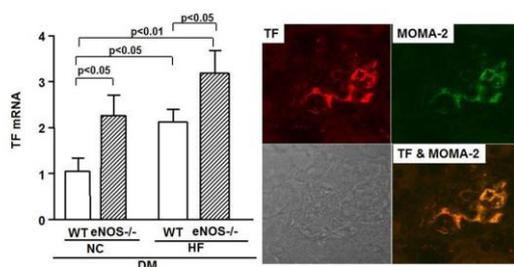
糖尿病では血液凝固が亢進しており、DNでは糸球体にフィブリンの沈着を伴うが、血液凝固亢進がDNを悪化させるか明らかでない。興味深いことにeNOS^{-/-}糖尿病マウスのDNは酸化ストレスとは相関せず、糸球体へのフィブリンの沈着 (下図右パネル)、腎臓での凝固第三因子 (tissue factor, TF) TFの発現および活性、そして炎症のマーカーと強い相関を示していた。

Hypercoagulability by lack of eNOS^{-/-} and HF diet



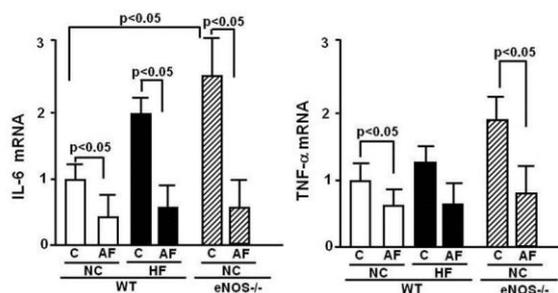
さらに興味深いことに腎臓でのTFはMOMA-2陽性の糸球体に浸潤したマクロファージに発現していた (下図参照)。

Increased tissue factor expression in glomerular macrophages



さらに、下図に示されるように、TF中和抗体で炎症性マーカーの腎臓での発現が抑制されたことからTFが糖尿病性腎症の悪化に重要であることが示唆された。

Anti-TF neutralizing antibody (AF3178) reverses gene expression of inflammatory genes in 5wk-DM mice



我々は、eNOSの減少がTF増加・凝固能亢進を伴いDNを悪化すること、高脂肪食がeNOS減少によるTF増加・凝固能亢進・DNの悪化を促進することを明らかにした。

しかしながら、野生型eNOSの糖尿病マウスでは高脂肪食はTF増加・凝固能亢進をもたらすもののDNを悪化させなかった。従ってTF増加・凝固能亢進のみではDNを悪化させず、NO減少等の他の因子の変化がDNの悪化に必要であることが明らかとなった。本研究からeNOS発現の減少したあるいはNO産生の減少した糖尿病患者ではTFがDN治療の新たなターゲットとなりうる可能性が示唆される。

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2件)

1. Li F and Takahashi N. eNOS and diabetic nephropathy J Nephrol Therapeutic 2012. 10:S2-004 (査読あり) doi: [10.4172/2161-0959.S2-004](https://doi.org/10.4172/2161-0959.S2-004) <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0959.S2-004>
2. Wang C-H, Li F, Hiller S, Kim H-S, Maeda N, Smithies O, Takahashi N. A modest decrease in endothelial NOS in mice

comparable to that associated with human *NOS3* variants exacerbates diabetic nephropathy **Proc Natl Acad Sci USA** 2011 108: 2070-2075 (査読あり)
<http://www.pnas.org/content/early/2011/01/11/1018766108.full.pdf>

〔学会発表〕 (計 1件)

1. 第24回腎と脂質研究会 2012年3月3日
京都
高橋信行、Feng Li, Chih-Hong Wang,
Nigel Mackman, Nobuyo Maeda,
Oliver Smithies, J Charles
Jennette, 佐藤博、伊藤貞嘉

東北大学大学院 薬学研究科 臨床薬学分野
東北大学病院 腎高血圧内分泌科
University of North Carolina at
Chapel Hill, NC, USA
東北大学大学院 医学系研究科 腎・高血圧・内分泌学

講演タイトル

糖尿病性腎症における eNOS・NO 減少と高脂肪食の役割

〔図書〕 (計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

名称:

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 信行 (TAKAHASHI NOBUYUKI)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号: 40588456

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし