

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591312

研究課題名(和文) mtROSとmtDNA修復酵素POLGの糖尿病合併症への関与とその制御による治療

研究課題名(英文) Involvement of mitochondrial ROS in the pathogenesis of diabetic complications

研究代表者

西川 武志(Nishikawa, Takeshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：70336212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は糖尿病血管合併症発症機序として「高血糖によるミトコンドリア由来活性酸素(ROS)過剰産生」の意義を提唱している。今回の研究では低酸素誘導因子-1(HIF-1)の糖尿病合併症への関与を検討し、高血糖によるミトコンドリア由来ROSと高血糖による細胞内低酸素誘導が相互作用の上で、糖尿病合併症を進展させるという新たな可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species (ROS) is the key event in the pathogenesis of diabetic complications. In this study, we examined the role of hypoxia-inducible factor-1-alpha (HIF-1alpha) induction in the pathogenesis of diabetic complications, and we clarify that hyperglycemia can progress diabetic complications by the interaction between hyperglycemia-induced mitochondrial ROS and hyperglycemia-induced intracellular hypoxia.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病 糖尿病合併症 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者の著増、それに伴う糖尿病合併症に苦しむ患者数の増加は、世界中で喫緊の課題である。本邦でも未だ糖尿病網膜症による失明者が年間 3,000 人以上、糖尿病腎症による新規透析導入患者が年間 17,000 人以上、糖尿病足病変による下肢切断が年間 3,000 人以上にのぼり、患者 QOL の点のみならず、社会経済的にも問題となっている。糖尿病合併症の発症阻止こそが、糖尿病治療の目的であると云っても過言ではない。

現在医療においても、糖尿病合併症の発症阻止は不完全であることから、糖尿病合併症に対する新たな治療戦略の構築が必要と考えられる。そしてそのためには合併症発症機構の解明し、機序に基づく新規治療法を開発することが重要である。現在、合併症発症の主因が高血糖であることは明らかであるが、高血糖がどのような機序で合併症を発症させるのかはまだ一定の見解が得られてはいない。しかし、申請者らはその機序として「高血糖によるミトコンドリア由来活性酸素(ROS)過剰産生」(Nature, 404: 787, 2000)を世界に先駆けて提唱し、その後も関連する多くの研究を行っており、不明な点はまだあるが、申請者らの仮説が糖尿病合併症発症の最も重要な因子であることが世界中で認められつつある。

一方、高血糖は、低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factor-1 α : HIF-1 α)や VEGF (vascular endothelial growth factor: VEGF) の発現誘導、さらには細胞内 NAD/NADH 比の低下など、細胞内低酸素状態と類似した細胞内代謝異常を起こしていることが以前より報告されている。しかし、この細胞内低酸素状態と類似した細胞内代謝異常の発現メカニズムや糖尿病合併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、高血糖による HIF-1- α 、VEGF の発現機序として、実際に、高血糖により細胞内低酸素状態が発現していないかをまず検討した。さらにその発現メカニズムにおける高血糖によるミトコンドリア由来 ROS 過剰産生の関連、高血糖による細胞内低酸素状態発現誘導の糖尿病合併症発症・進展への関与について、検討を加えた。

3. 研究の方法

1) 高グルコース培養による HIF-1 α および VEGF 発現誘導効果の検討

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 時間または 24 時間培養した。その後、抗 HIF-1 α 抗体を用いた蛍光免疫染色法および抗 VEGF 抗体を用いた蛍光免疫染色法及び VEGF に

対する定量 RT-PCR 法により検討した。

2) 高グルコース培養による細胞内低酸素状態誘導効果の検討

培養血管内皮細胞を 5.5mM グルコース + 1% (または 2.5%) 酸素、25mM グルコース + 1% 酸素、5.5mM グルコース + 21% 酸素、25mM グルコース + 21% 酸素培養下で 3 時間、24 時間、72 時間、168 時間培養した。その後、低酸素プローブ Pimonidazole HCl を用いた蛍光染色法及び Dot Blot 法、または低酸素プローブ LOX-1 を用いたリン光染色法により、細胞内低酸素状態を検討した。

3) ミトコンドリア電子伝達系阻害薬による高グルコース誘導性細胞内低酸素状態への影響の検討

培養血管内皮細胞を 5.5mM グルコース + 1% 酸素下、25mM グルコース + 1% 酸素下、5.5mM グルコース + 21% 酸素下、25mM グルコース + 21% 酸素下、25mM グルコース + 21% 酸素 + 5 μ M ロテノン、25mM グルコース + 21% 酸素 + 10 μ M アンチマイシン A で 3 時間培養した。その後、低酸素プローブ Pimonidazole HCl を用いた蛍光染色法及びリン光染色法により、ミトコンドリア呼吸鎖阻害による細胞内低酸素状態への影響を検討した。

4) MnSOD 過剰発現による高グルコース誘導性細胞内低酸素状態への影響の検討

培養血管内皮細胞または MnSOD 過剰発現培養血管内皮細胞を 5.5mM グルコース + 1% 酸素下、5.5mM グルコース + 21% 酸素下、25mM グルコース + 21% 酸素下で 3 時間培養した。その後、低酸素プローブ Pimonidazole HCl を用いた蛍光染色法または低酸素プローブ LOX-1 を用いたリン光染色法により、細胞内低酸素状態を検討した。

5) 野生マウス及び内皮細胞特異的 MnSOD 過剰発現トランスジェニックマウス (eMnSOD-Tg マウス) における網膜での糖尿病誘導性 HIF-1 α および VEGF 蛋白発現への影響の検討

8~10 週齢の雄の野生型マウスおよび eMnSOD-Tg マウスに対し、buffer および 10 μ M 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を 150 mg/kg \cdot BW 腹腔内注射し、非糖尿病野生マウス、非糖尿病 eMnSOD-Tg マウス、糖尿病野生マウス、および糖尿病 eMnSOD-Tg マウスの 4 群を作製した。その後、4 週間飼育の後、網膜を摘出し HIF-1 α 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。

6) 低酸素培養および高グルコース培養のミトコンドリア由来 ROS 産生への影響の

検討

培養血管内皮細胞を 5.5mM グルコース + 1%酸素下、5.5mM グルコース + 21%酸素下、25mM グルコース + 21%酸素下で 3 時間または 24 時間培養した。その後、ミトコンドリア由来 ROS 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。

4. 研究成果

1) 高グルコース培養による HIF-1 α および VEGF 発現誘導効果の検討

培養血管内皮細胞において、25mM グルコース培養で 5.5mM グルコース培養に比し、HIF-1 α 蛋白の核での染色増加が確認された (図 1A 上段)。また同様に、25mM グルコース培養で 5.5mM グルコース培養に比し、VEGF の免疫染色増強並びに VEGF mRNA 増加が確認された (図 1A 下段、図 1B)。

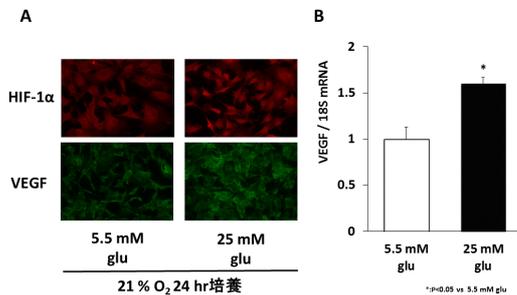


図1: 高グルコース培養によるHIF-1 α およびVEGF発現誘導効果の検討

2) 高グルコース培養による細胞内低酸素状態誘導効果の検討

5.5mM グルコース培養 + 1%酸素培養において、5.5mM グルコース + 21%酸素培養に比し、低酸素プローブ Pimonidazole HCl を用いた蛍光染色では染色増強が確認された。また 25mM グルコース培養においては、いずれの酸素濃度下での培養においても、5.5mM グルコース培養に比し、Pimonidazole HCl 蛍光染色で染色増強が確認された (図 2A)。Dot Blot 法を用いた解析では、24 時間培養では有意差を示し得なかったが、72 時間、168 時間培養において、25mM グルコース + 21%酸素培養は、5.5mM グルコース + 21%酸素に比し、染色増強を認めた (図 2B)。

さらに低酸素プローブ LOX-1 を用いたリン光染色法による検討も行い、同様に、5.5mM グルコース培養 + 2.5%酸素及び 25mM グルコース + 21%酸素培養において、5.5mM グルコース + 21%酸素培養に比し、染色増強することを確認した (図 3)。

即ち、高グルコース培養による細胞内低酸素状態発現誘導の可能性が示唆された。

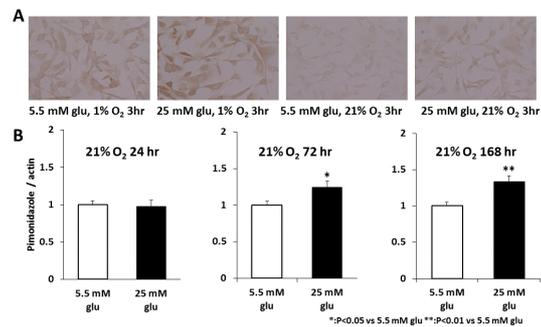


図2: 高グルコース培養による細胞内低酸素状態誘導効果の検討
A: Pimonidazole HCl 免疫染色、B: Dot Blotでの検討

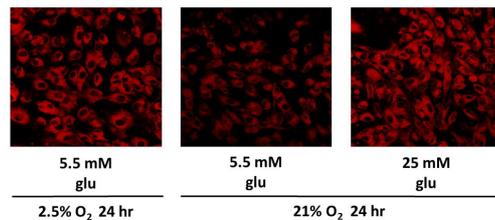


図3: 高グルコース培養による低酸素プローブLOX-1を用いた細胞内低酸素誘導効果の検討

3) ミトコンドリア電子伝達系阻害薬による高グルコース誘導性細胞内低酸素状態への影響の検討

図 2 で確認したように、25mM グルコース培養において 21%酸素下にもかかわらず、Pimonidazole HCl 蛍光染色での染色増強が確認された。さらにミトコンドリア呼吸鎖阻害薬であるロテノン、またはアンチマイシン A の投与は 25mM グルコース培養で認められた Pimonidazole HCl 蛍光染色での染色増強が減弱することが確認された (図 4)。

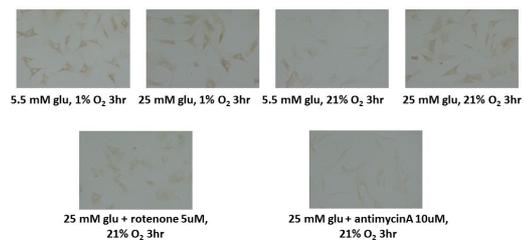


図4: ミトコンドリア電子伝達系阻害薬による高グルコース誘導性細胞内低酸素状態への影響の検討 (Pimonidazole HCl を用いた検討)

4) MnSOD 過剰発現による高グルコース誘導性細胞内低酸素状態への影響の検討

図 2 で確認したように、25mM グルコース培養において 21%酸素下にもかかわらず、Pimonidazole HCl 蛍光染色での染色増強が確認された。さらにミトコンドリア由来 ROS を抑制する MnSOD の過剰発現により、25mM グルコース培養で認められた Pimonidazole HCl 蛍光染色での染色増強が減弱することが確認された (図 5)。

即ち、高グルコース培養により認められた細胞内低酸素状態誘導はミトコンドリア呼吸鎖の阻害やミトコンドリア由来 ROS の抑制により減弱することが示唆された。

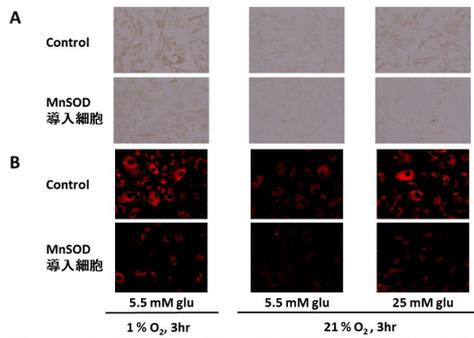


図5: MnSOD過剰発現による高グルコース誘導性細胞内低酸素状態への影響の検討
A: Pimonidazole HCl 免疫染色、B: 低酸素プローブLoX-1リン光染色での検討

5) 野生マウス及び eMnSOD-Tg マウスにおける網膜での糖尿病誘導性 HIF-1 α および VEGF 蛋白発現への影響の検討

糖尿病野生マウスでは、非糖尿病野生マウスに比し、HIF-1 α 蛋白、VEGF 蛋白の発現増加を認めた。さらに糖尿病マウスで誘導された HIF-1 α 蛋白、VEGF 蛋白の発現増加は糖尿病 eMnSOD-Tg マウスにおいては抑制されていることが確認された(図6、図7)。

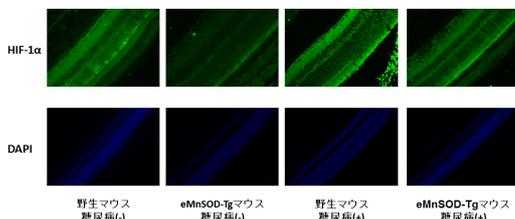


図6: 野生マウス及び内皮細胞特異的MnSOD過剰発現トランスジェニックマウス(eMnSOD-Tgマウス)における網膜での糖尿病誘導性HIF-1 α 蛋白発現への影響の検討

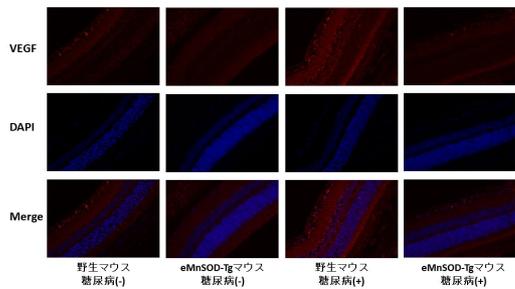


図7: 野生マウス及び内皮細胞特異的MnSOD過剰発現トランスジェニックマウス(eMnSOD-Tgマウス)における網膜での糖尿病誘導性VEGF蛋白発現への影響の検討

6) 低酸素培養および高グルコース培養のミトコンドリア由来 ROS 産生への影響の検討

これまでの我々の報告と同様に、培養血管内皮細胞を 25mM グルコース + 21%酸素下で培養すると、著明なミトコンドリア由来 ROS の産生増加を認めた。さらに 1%酸素下培養では、5.5mM グルコース培養においても、著明なミトコンドリア由来 ROS の産生増加を認めることが確認された(図8)。

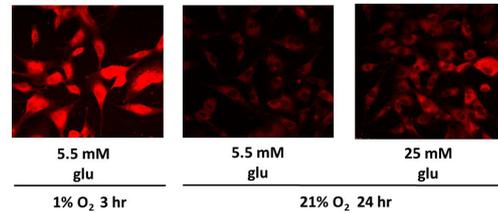


図8: 低酸素培養および高グルコース培養のミトコンドリア由来ROS産生への影響の検討

以上の研究より、高グルコース培養により細胞内低酸素状態誘導の可能性が高いこと、その機序として、高グルコースによりミトコンドリア呼吸鎖での酸素消費が亢進する可能性と、詳細の機序はまだ不明だが、高グルコースによるミトコンドリア由来 ROS 産生過剰が関与する可能性が示唆された。またその一方で、細胞内低酸素状態がミトコンドリア由来 ROS の産生増加をきたすことも明らかにした。申請者らは糖尿病合併症発症の新たな仮説として、高グルコースによるミトコンドリア由来 ROS の産生増加と高グルコースによる細胞内低酸素状態誘導が相互作用の上で、合併症の進展を促進するという仮説を考えている。今後、このメカニズムの詳細をさらに検討していくことで、糖尿病性合併症の発症・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。

謝辞

研究遂行にあたりご指導いただいた熊本大学大学院生命科学研究部代謝内科学 荒木栄一教授、ならびに共同研究者の近藤龍也助教、久木留大介特任助教に深謝いたします。

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 9件)

1. Nishikawa T, Brownlee M, Araki E: Mitochondrial reactive oxygen species in the pathogenesis of early diabetic nephropathy. *J Diabetes Invest* in press (査読あり)
2. Matsumura T, Taketa K, Motoshima H, Senokuchi T, Ishii N, Kinoshita H, Fukuda K, Yamada S, Kukidome D, Kondo T, Hisada A, Katoh T, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E: Association between circulating leukocyte subtype counts and carotid intima-media thickness in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* in press (査読あり)

3. Nishikawa T, Araki E: Mechanism-based antioxidant therapies promise to prevent diabetic complications? *J Diabetes Invest* 4:105-107, 2013 (査読あり)
 4. Kinoshita H, Matsumura T, Ishii N, Fukuda K, Senokuchi T, Motoshima H, Kondo T, Taketa K, Kawasaki S, Hanatani S, Takeya M, Nishikawa T, Araki E: Apocynin suppresses the progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice by inactivation of macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 431:124-130, 2013 (査読あり)
 5. Zhang SC, Wei CN, Harada K, Ueda K, Fukumoto K, Matsuo H, Minamoto K, Nishikawa T, Araki E, Ueda A, Fang J: Relationship between lifestyle and lifestyle-related factors in a rural-urban population of Japan. *Environ Health Prev Med* 18:267-274, 2013 (査読あり)
 6. Kawasaki S, Motoshima H, Hanatani S, Takaki Y, Igata M, Tsutsumi A, Matsumura T, Kondo T, Senokuchi T, Ishii N, Kinoshita H, Fukuda K, Kawashima J, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E: Regulation of TNF α converting enzyme activity in visceral adipose tissue of obese mice. *Biochem Biophys Res Commun* 430:1189-1194, 2013 (査読あり)
 7. Tsutsumi A, Motoshima H, Kondo T, Kawasaki S, Matsumura T, Hanatani S, Igata M, Ishii N, Kinoshita H, Kawashima J, Taketa K, Furukawa N, Tsuruzoe K, Nishikawa T, Araki E: Caloric restriction decreases ER stress in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Biochem Biophys Res Commun* 404:339-344, 2011 (査読あり)
 8. Fukumoto K, Wei CN, Matsuo H, Harada K, Zhang SC, Kalay L, Yamashiro T, Nishikawa T, Araki E, Ueda A: An intervention study to promote self-improvement of lifestyle in a Japanese community: a new health support program. *Environ Health Prev Med* 16:253-263, 2011 (査読あり)
 9. Matsumura T, Kinoshita H, Ishii N, Fukuda K, Motoshima H, Senokuchi T, Taketa K, Kawasaki S, Nishimaki-Mogami T, Kawada T, Nishikawa T, Araki E: Telmisartan Exerts Antiatherosclerotic Effects by Activating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ in Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:1268-1275, 2011 (査読あり)
- [学会発表] (計 10 件)
1. 久木留大介, 河島淳司, 井形元維, 近藤龍也, 西川武志, 荒木栄一: 各甲状腺ホルモン測定試薬の反応性の相違からFT3偽高値を呈した1例, 第56回日本甲状腺学会学術集会, 2013/11/14-2013/11/16, 和歌山県民文化会館
 2. 佐田公範, 西川武志, 久木留大介, 梶原伸宏, 本島寛之, 松村剛, 荒木栄一: 高血糖によるミトコンドリア由来活性酸素種 (mtROS) と組織内低酸素との関連性, 第51回日本糖尿病学会九州地方会, 2013/11/8-2013/11/9, 沖縄コンベンションセンター
 3. 佐藤美希, 久木留大介, 泉香織, 狩場宏美, 古庄正嗣, 守田雄太郎, 河島淳司, 下田誠也, 西川武志, 荒木栄一: 糖尿病合併症進展度と小径線維神経における痛覚閾値との関連性, 第51回日本糖尿病学会九州地方会, 2013/11/8-2013/11/9, 沖縄コンベンションセンター
 4. Kukidome D, Sato M, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E: Pain threshold values of small fibers are associated with the severity of diabetic complications. 49th EASD Annual Meeting 2013, 2013/9/23-2013/9/27, Barceló Congressos, Spain
 5. 久木留大介, 佐藤美希, 下田誠也, 西川武志, 荒木栄一: 小径線維神経における痛覚閾値と糖尿病合併症進展度との関連性, 第28回日本糖尿病合併症学会 (ワークショップ), 2013/9/13-2013/9/14, 旭川グランドホテル
 6. 西川武志, 佐田公範, 久木留大介, 荒木栄一: 酸化ストレスからみた合併症治療の展望, 第56回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013/5/16-2013/5/18, くまもと県民交流会館パレオ, シンポジウム

7. 西川武志, 荒木栄一: 糖尿病合併症の体質と環境, 第62回日本体質医学会総会, 2012/11/3-2012/11/4, 大阪国際会議場, シンポジウム
8. Sada K, Nishikawa T, Yamashiro T, Kukidome D, Isami S, Motoshima H, Matsumura T, Araki E Lifestyle interventions reduce risk factors for metabolic syndrome and improve early insulin responses in subjects with an impaired early insulin response: The impact of early insulin response in Tabaruzaka Study. The 72nd Annual Meeting of American Diabetes Association, 2012/6/8-2012/6/12, Pennsylvania Convention Center, USA
9. 西川武志, 久木留大介, 佐田公範, 本島寛之, 松村剛, 荒木栄一: 糖尿病性大血管障害と酸化ストレス, 第49回糖尿病学会九州地方会, 2011/10/14-2011/10/15, アクロス福岡, シンポジウム
10. 西川武志, 久木留大介, 荒木栄一: 糖尿病網膜症に対する集約的治療の重要性と合併症発症機序に基づく新規治療開発の可能性, 第54回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011/5/19-2011/5/21, 札幌プリンスホテル, シンポジウム

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 武志(Nishikawa Takeshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・特任准教授

研究者番号: 70336212

(2) 研究分担者

近藤 龍也(Kondo Tatsuya)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 70398204

久木留 大介(Kukidome Daisuke)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号: 10555759

(3) 連携研究者
なし