

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 11 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790299

研究課題名（和文） 糖尿病性腎症における尿細管 p21 活性化の意義

研究課題名（英文） the role of renal tubular p21 in diabetic nephropathy

研究代表者

中野 大介 (NAKANO DAISUKE)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：30524178

研究成果の概要（和文）：糖尿病動物における腎臓の老化について検討した。糖尿病を発症したマウスおよびラットでは非糖尿病動物と比べて、腎臓の尿細管において細胞周期調節分子 p21 が活性化することにより老化が進んでおり、これが更に腎臓において炎症惹起因子 TNF- $\alpha$  を誘導することにより病態を増悪させていることがわかった。糖尿病治療により、この腎臓老化は改善することから可逆的で治療可能な現象であることも証明された。本研究は腎臓老化が糖尿病性腎症治療のターゲットになる可能性を示したものである。

研究成果の概要（英文）：We examined the role of renal senescence in the diabetic kidney. The animal models of diabetes (either type 1 or 2) showed early-onset and time-dependently increased renal senescence through p21-dependent pathway in proximal tubular cells. The senescent diabetic kidney had an increase in TNF- $\alpha$  and immune cells infiltration. The treatment of diabetes reversed the senescent kidney into normal. The results suggest that renal senescence is treatable and could be a new target of diabetic nephropathy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病に伴う腎障害は加速的に進むことが知られており、ひとたび病態が進行すると治療は困難であり、最終的には生命維持のために人工透析を行い続けることが必要となる。治療が困難である理由として、原疾患である糖尿病の治療が容易ではないことと、腎症進行のメカニズムが明らかではないことが挙げられる。今後、すでに 2000 万人とも言われている糖尿病患者数は更に増加していくことが予想されており、糖尿病性腎症の発症機序解明、治療法開発は国際的課題である。申請者は、動物実験において、糖尿病を含む腎疾患を誘発するような病態が細胞周期調

節因子 p21 を介した腎細胞老化（生存しているが、有糸分裂を停止した状態）を惹起し、腎における炎症・障害の進展に関与している可能性を見出している。しかしながら、一般に、悪性腫瘍細胞における細胞老化は抗癌現象であると言われていたが、体細胞、特に腎細胞において細胞老化が善であるか、悪であるかは、全くと言っていいほど解明されておらず、申請者らによる上記の発見は、特定の分子が in vivo において慢性的に腎細胞老化を起し、機能にまで影響を与えていることを示した最初の知見であり、詳細は不明である。そこで本研究課題では、糖尿病性腎症進展過程における腎細胞老化の進行と病態進

展への寄与を検討した。

## 2. 研究の目的

申請者は細胞老化の腎障害における意義の解明に取り組んでいる。本研究は糖尿病性腎症進行に伴う細胞周期調節因子 p21 の活性化と炎症との関係に焦点をあて行われ、成果を糖尿病性腎症の病態理解・治療法開発に応用することを目的として行われた。特に、p21 過発現および細胞老化は腎症未発である糖尿病発症初期から観察されることから(図 1)、腎臓全体の機能には異常の観られない糖尿病初期から、いくつかのネフロンにおいては p21 活性化および細胞老化により機能異常が生じている可能性が考えられ(ただし、他の正常ネフロンが機能を代償するため、全腎機能においては異常を検出できない)、糖尿病性腎症治療の早期ターゲットとなる期待が持てる。

そこで本研究課題では、具体的に以下の 3 点を研究目的とした。

- (1) 糖尿病腎において p21 活性化細胞における自己抗原・細胞表面自己認識分子の異常を調べ、p21/細胞老化/炎症の関係を明らかにする。
- (2) p21 の薬物的阻害による炎症および糖尿病性腎症治療が可能であるかを検討する。
- (3) 個々のネフロンにおける p21 活性化や炎症が、どのような機能異常が生じるかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 糖尿病モデルとして streptozotocin (STZ: 10 mg/kg/day, 一週間連続投与) により誘導した 1 型糖尿病モデルと、2 型糖尿病自然発症モデルである Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットを用いた。STZ モデルでは正常および p21-K0 マウスを用い、STZ 投与開始 4 および 28 週後に、OLETF ラットでは 6、10、14、22、34、55 週齢において、それぞれ腎細胞老化と炎症を評価した。腎細胞老化の評価は、老化関連ガラクトシダーゼ (SA- $\beta$ Gal) 染色の増強ならびに p53 および p21 の腎内 mRNA 発現の増強により行った。炎症の評価は、CD68+ (マクロファージ) の免疫染色ならびに ICAM-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 および TGF- $\beta$  などの mRNA 発現測定を定量的 RT-PCR 法により行った。細胞老化と炎症の評価は連続切片上で行い、同一ネフロンにおいて検討できるようにした。

(2) 研究期間内に in vivo で必要な阻害薬が手に入らなかったため、方針を転換し、現在唯一糖尿病性腎症に対する有効性が立証されているアンジオテンシン受容体阻害薬

(テルミサルタン) の処置により、腎老化・炎症が緩解されるかを検討した。実験動物としては上記 OLETF を用い、既に立証されているアンジオテンシン受容体阻害薬の効果が腎細胞老化の抑制を介しているものかについて検討を行った。

(3) 炎症を生じたネフロンを可視化する目的で、GFP transgenic マウスより単球を分離し、recipient マウスに養子細胞移植を行う。Recipient マウスにおいて腎臓に浸潤した GFP 陽性単球を炎症の指標とする。麻酔下の生きた被移植 STZ マウスを用いて、腎における炎症ネフロン (GFP 陽性細胞が浸潤しているネフロン) における機能異常を多光子レーザー顕微鏡を用いて、リアルタイムイメージングにより観察する。具体的には、1) 炎症により腎糸球体ろ過装置のバリアー機能が減弱するかを、蛍光色素によりラベル化アルブミンを投与し、糸球体毛細血管内と Bowman 腔内の蛍光強度を比較することにより、2) 尿細管再吸収能が炎症尿細管では減弱しているかを、尿細管内におけるラベル化アルブミンの蛍光強度により、および 3) 尿濃縮能を利尿薬投与に伴う近位尿細管腔と遠位尿細管腔との蛍光強度の比較 (遠位では尿が濃縮され、蛍光強度が増す) により、それぞれ計測する。実験終了後、腎臓を摘出し、SA- $\beta$ Gal 陽性ネフロンと GFP 陽性細胞の共局在を調べる。

## 4. 研究成果

(1) 1 型 2 型の糖尿病ではともに糖尿病進行とともに腎臓内老化細胞数が増加した。また老化誘導因子である p21 の腎における発現も糖尿病進行とともに増加していた (図 1)。

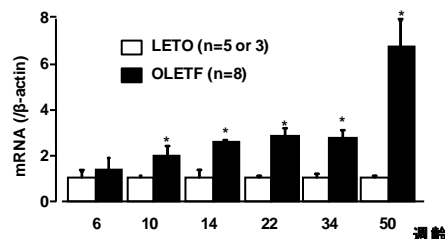


図 1: 自然発症糖尿病ラット (OLETF) における腎 p21 mRNA 発現の加齢に伴う増大 (LETO は非糖尿病対照動物)

興味深いことに、p21 の発現増大は腎老化が進行する時期 (図 1 のモデルでは 22 週齢から) よりも早期から進行していた。これは腎老化を誘導するシグナル自体は認識さ

れているよりも早期からスイッチが入っていることを意味し、早期予防、早期治療の必要性を示唆するものとなっている。

1型2型いずれの糖尿病モデルにおいても、腎内マクロファージの浸潤が進んでおり、これは老化細胞の出現とほぼ同期するものであった。老化細胞および炎症の出現直前に IL-10 の増大が見られ、出現時に TNF- $\alpha$  の上昇が確認できた。これらの変化は p21 遺伝子を欠損したマウス (p21-KO) では改善されていた。また、腎細胞老化の原因探索を目的として、糖尿病 p21-KO および wild-type マウスに対してインスリンを処置し、高血糖の関与について調べた。糖尿病マウスにおいてインスリンは血糖値は正の度合いに応じて、腎老化・炎症を軽減させることができた。したがって、糖尿病腎における細胞老化および炎症は高血糖・p21 により生じていることが証明された。

(2) 既に腎老化が生じている 22 週齢 OLETF にアンジオテンシン受容体阻害薬を投与し、糖尿病性腎症の進展を強力に抑制したところ、22 週齢においては腎臓に蓄積していた老化細胞が、34 週齢においては劇的に改善していた (図2)。これは腎臓の老化は可逆的であり、環境を改善することにより、腎臓を若返らせることが可能であることを示唆する結果である。

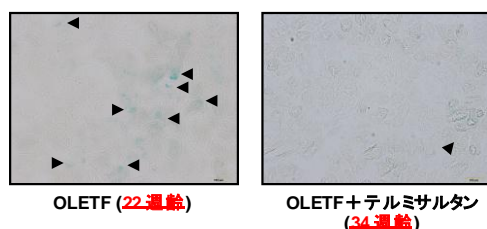


図2：糖尿病ラット OLETF における腎臓老化に対するアンジオテンシン受容体阻害薬の効果 (矢頭は老化細胞を指す)

一方、酸化ストレスは細胞老化を誘導する因子として、よく知られていることから、既に腎臓に老化細胞が蓄積している 22 週齢から抗酸化薬であるテンポールを処置した。しかしながら、テンポールによる酸化ストレスの軽減は腎臓老化に対して効果を示さなかった。

これらのことから、糖尿病腎における老化は可逆的であり、その反応はアンジオテンシン受容体依存的かつ酸化ストレス非依存的であることが示唆された。

(3) 続いて、炎症を生じたネフロンを可視化する目的で、GFP transgenic マウスより単球を分離し、recipient マウスに養子細胞移植を行ったが、 $\gamma$  線照射を行っていないマウスでは、移植細胞のほとんどが肺で捕捉されてしまい (図3)、顕微鏡下にて接着浸潤を確認できる白血球数が極めて微量であり (図3)、ネフロンごとの機能解析までには至らなかった。

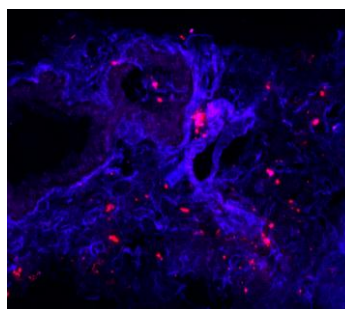


図3：蛍光標識単球を移植した後の肺組織。赤色で表される移植単球が肺組織 (青色) に補足されているのが、確認できる。

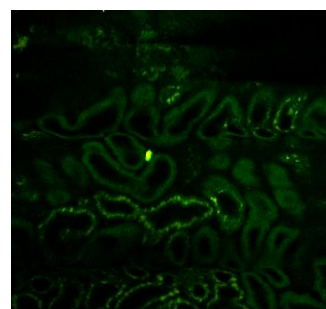


図4：黄色で単球を標識した腎 in vivo imaging 像。緑で描かれているのは尿細管であり、尿細管の間に毛細血管がある。この像の中で確認できる移植単球は一つのみである。

## 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)

[学会発表] (計6件)

- ① 中野大介、北田研人、大崎博之、人見浩史、小堀浩幸、今西政仁、西山 成、2 型糖尿病ラット OLETF の腎において蓄積した老化細胞はテルミサルタン投与に

より除かれるが、テンポールでは効果はみられない、日本薬理学会第86回年会、2013年3月、福岡

- ② Nakano D, Kitada K, Ohsaki H, Hitomi H, Kobori H, Imanishi M, Nishiyama A. Telmisartan but not tempol improves the already established renal cell senescence in type 2 diabetic rats. 66<sup>th</sup> Council for high blood pressure research, Sep 2012 (Washington D. C., USA)
- ③ 中野大介、北田研人、人見浩史、小堀浩幸、西山 成、2 型糖尿病ラット OLETF の腎において蓄積した老化細胞はテルミサルタン投与により除かれる、第 55 回日本腎臓学会学術総会、2012 年 6 月、横浜
- ④ 北田研人、中野大介、人見浩史、小堀浩幸、西山成、cyclin-dependent kinase inhibitor p21 は糖尿病腎にみられる近位尿細管細胞の老化を惹起する、日本薬理学会第 85 回年会、2012 年 3 月、京都
- ⑤ Kitada K, Nakano D, Hitomi H, Kobori H, Nishiyama A. High glucose-induced increase in p21 causes cellular senescence in proximal tubules of diabetic nephropathy. 65<sup>th</sup> Council for high blood pressure research, Sep 2011 (Orlando, FL, USA).
- ⑥ 北田研人、中野大介、人見浩史、西山成、糖尿病腎における細胞老化はインスリンにより改善する、第 54 回 日本腎臓学会学術総会、2011 年 6 月、横浜

[その他]

ホームページ等  
香川大学薬理学講座ホームページ  
<http://www.kms.ac.jp/~yakuri/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中野 大介 (NAKANO DAISUKE)  
香川大学・医学部・助教  
研究者番号：30524178