

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：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790381

研究課題名(和文) COMT不全とホモシステイン相互作用が演じる病理学的意義の解明

研究課題名(英文) Investigation for the physiological and pathological significance of the interaction between COMT deficiency and homocysteine

研究代表者

金崎 啓造 (KANASAKI, Keizo)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：60589919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病(糖尿病、癌など)は、素因を有する人間が様々な環境因子に長期間暴露された際に発症すると考えられる。同時に、その発症規模を考慮に入れると、その素因は多くの人々が共有し、人類が進化の過程で獲得したものであると考えられる。申請者は妊娠高血圧腎症の遺伝子改変モデル動物を世界で初めて報告し、catechol-o-methyltransferase(COMT)不全を介したカテコール代謝異常がその原因であることを解明した。妊娠高血圧腎症は生活習慣病と病態における類似点が多い。本研究を通じた検討にて、COMT不全は環境因子に置いて容易に惹起され(高脂肪食摂取マウスや妊娠)される事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Life style related diseases such as diabetes, metabolic syndrome, and cancer, would be caused by the interaction between genetic factor, life style, and environmental factors. When considering the recent epidemic of such life style related diseases, suggesting that most of people are indeed sharing genetic background and therefore such background is probably acquired for the evolutionary process of homo sapience. Applicant of this grant established first genetic mouse model of preeclampsia and revealed catechol metabolism defects in catechol-o-methyltransferase (COMT) deficiency in mice was one possible explanation of preeclampsia pathogenesis. Preeclampsia and metabolic defects in life style related diseases share symptoms, such as glucose intolerance, hypertension, and abnormal adiposity. In our current study using mouse models, we confirmed COMT is fragile and easy to be suppressed in the exposure of environmental factors, such as high fat diet fed and pregnancy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学-病態医科学

キーワード：妊娠高血圧腎症 糖尿病 脂肪肝 メタボリックシンドロームボリックシンドローム COMT

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病 (肥満や糖尿病、高血圧、メタボリック症候群、癌、様々な精神神経疾患) は、素因を有する人間が様々な環境因子に長期間暴露された際に発症すると考えられるが、全世界における発症規模を考慮に入れると、その素因は多くの人々が共有し、おそらく人類が進化の過程で必要不可欠として獲得したものであると考えられる。申請者は妊娠高血圧腎症の遺伝子改変モデル動物を世界で初めて報告し、catechol-o-methyltransferase(COMT) 不全を介したカテコール代謝異常がその原因であることを解明した (Nature 2008 Kanasaki et al)。妊娠高血圧腎症は人類特有の疾病であるとも言われ、また生活習慣病と病態における類似点が多い。興味深いことに COMT 酵素活性自体が齧歯類などに比し人類では低いことが知られている。また人口の 25%~50%程度では COMT 酵素活性がさらに低下する遺伝子多型の存在も知られ、妊娠高血圧腎症のみならず上記の生活習慣病群との関連も報告された。人類が進化過程で COMT 活性を抑制してくる事が不可避であり、その結果、容易に COMT 不全が惹起されるのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

COMT 不全を惹起する遺伝的背景と環境因子の相互作用が病態にもたらす意義を解明する

3. 研究の方法

動物実験: C57BL6 野生型マウスを用い、正常食群および高脂肪食群を作成した。高脂肪食は Quick Fat (14.4%(g) Crude fat: CLEA JAPAN)を用いた。2週間のプロトコルでは、8週齢マウスに高脂肪食投与後1週後より COMT 阻害薬 (Ro41-0960: 25mg/KgW/day)を投与し、さらに Ro41-0960 投与に 2-ME を投与しインターベンション群を作成した。10週間のプロトコルでは、8週齢マウスに高脂肪食を投与し、投与後6週後より 2-ME 投与を4週間行った。妊娠実験では、8週齢野生型 C57BL6 マウスを交配させ、妊娠メスマウスを妊娠16日に腹腔内ブドウ糖負荷試験を実施し17日に屠殺した。

耐糖能試験: 腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT: 0.75g/kgW)にて評価し、インスリン値も測定した。

組織学的評価: 脂肪肝の評価は oil-red-o 染色にて、行った。脂肪・肝臓におけるマクロファージの浸潤は F4/80 陽性細胞数で

評価した。HIF-1 α の染色も同時に行った。蛋白・mRNA 発現: 蛋白発現は western blot にて、mRNA 発現は qPCR にて解析した。オートファジー評価: オートファジー経路の活性化とともに増加するオートファゴソームを可視化することの出来る GFP-LC3 トランスジェニックマウスを用い、高脂肪食 10 週間投与にて生じるオートファゴソーム形成を評価する。屠殺時に 4%PFA でマウスを還流し、GFP 蛋白発現を蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

ホモシステインとの COMT 不全との相互作用に関しては、現時点では結論は出ていないが、高脂肪食摂取と妊娠という環境因子で肝臓 COMT の抑制が生じる事、COMT 不全が脂肪肝惹起の因子である事を明らかとした。

脂肪肝発症機構における COMT 不全とオートファジー不全に関して次の結果を得た。

(1) 高脂肪食投与(10 週) C57BL6 マウスにおいて、COMT 蛋白発現が有意に抑制される。

(2) 高脂肪食による COMT 抑制は、肝臓でのオートファジーの抑制と相関する。

(3) COMT 阻害薬の投与は高脂肪食下にて肝臓の HIF-1 α 異常集積・肝臓脂肪の蓄積を惹起し、耐糖能異常を伴う。2-ME 投与はそれを改善する。

(4) 脂肪、肝臓へのマクロファージ集積抑制が 2-ME 介入により認められた。

(5) 2-ME(高脂肪食投与 6 週後より 4 週間)は、脂肪肝抑制効果がある。

(6) 2-ME による高脂肪食投与下での耐糖能異常改善効果は、肝臓での AMPK リン酸化と関連した。

(7) 2週間の 2-ME 投与による高脂肪食摂取マウスにおける血糖低下は、インスリン分泌増加と関連し、10週高脂肪食摂取に対する4週間の慢性投与では血中インスリンレベルは低下し、インスリン抵抗性が改善した。

(8) Min-6 細胞を用いて行った in vitro 検討では、2-ME によりインスリン分泌量が増加した。

(9) 妊娠マウスでは、肝臓 COMT 蛋白発現が低下している事が明らかとなり、妊娠は潜在的に脂肪肝発症や、メタボリックシンドローム様代謝異常生じやすい状態にあると考えられる。

(10) 2-ME 投与は妊娠マウスにおける COMT 阻害薬投与による耐糖能悪化を改善した。

(11) ある種の抗糖尿病薬に肝臓 COMT 蛋白量を回復させる効果がある事も明らかとなった。

(12) strain 間における耐糖能変化に対する、ホモシステイン負荷、2-ME 治療を行った検討においては、現時点で仮説を指示する結果が出ておらず、実験方法の再考を行っているところである。高脂肪食自体で COMT 不全が生じてしまい、ホモシステイン投与の影響が確認できない可能性がある。

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)

[雑誌論文](計 33 件)

1. Takako Nagai, Kyoko Nitta, Megumi Kanasaki, Daisuke Koya, Keizo Kanasaki## The Biology of Angiotensin-Converting Enzyme in Kidney Fibrosis **CEN** invited review in Press_##Corresponding author 査読あり
2. Keizo Kanasaki##, Takako Nagai, Kyoko Nitta, Munehiro Kitada, Daisuke Koya# N-acetyl-seryl- aspartyl-lysyl-proline: A valuable endogenous anti-fibrotic peptide for combating kidney fibrosis in diabetes **Frontier Pharmacology** Apr 14;5:70. eCollection 2014.##Corresponding author 査読あり
3. Keizo Kanasaki*, Francisco Ayala de la Peña*, Megumi Kanasaki, Sylvia Vong, Carlota Rovira, Raghu Kalluri, Specific Activation of K-RasG12D Allele in the Bladder Urothelium Results in Lung Alveolar and Vascular Defects **Plos One** 2014 Apr 23;9(4):e95888. doi: 10.1371 (* co-first author) 査読あり
4. Keizo Kanasaki ##, Sen Shi , Megumi Kanasaki, Jinhua He, Takako Nagai, Yuka Nakamura, Yasuhito Ishigaki, Munehiro Kitada, Swayam Prakash Srivastava, Daisuke Koya##, Linagliptin-mediated DPP-4 inhibition ameliorates kidney fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition in a therapeutic regimen. **Diabetes** 2014 Jun;63(6):2120-31. ##Corresponding author 査読あり
5. Takako Nagai, Megumi Kanasaki, Swayam Prakash Srivastava, Yuka Nakamura, Yasuhito Ishigaki, Munehiro Kitada, Sen Shi, Keizo Kanasaki##, Daisuke Koya##. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline inhibits diabetes-associated kidney fibrosis and endothelial-mesenchymal transition **BioMed Research International** 2014;2014:696475. doi: 10.1155/2014/696475. ##Corresponding author 査読あり
6. Senshi, Yanzheng He, Daisuke Koya, Keizo Kanasaki##, Cancer Biology in Diabetes, **Journal of Diabetes Investigation** 2014 May 4;5(3):251-264. (review) ##Corresponding author 査読あり
7. Koya D, Kitada M, Kume S, Kanasaki K. Interventions against nutrient-sensing pathways represent an emerging new therapeutic approach for diabetic nephropathy. **Clin Exp Nephrol**. 2013 Nov 14. 2014 Apr;18(2):210-3. doi: 10.1007/s10157-013-0908-3 ##Corresponding author 査読あり
8. Wada T, Miyashita Y, Sasaki M, Aruga Y, Nakamura Y, Ishii Y, Sasahara M, Kanasaki K, Kitada M, Koya D, Shimano H, Tsuneki H, Sasaoka T. Eplerenone ameliorates the phenotypes of metabolic syndrome with NASH in liver-specific SREBP1c Tg mice fed high-fat and high-fructose diet. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2013 Dec 1;305(11):E1415-25. 査読あり
9. Swayam Prakash Srivastava, Daisuke Koya and Keizo Kanasaki. MicroRNAs in kidney fibrosis: roles on EMT and EndMT program. **Biomed Res Int**. 2013;2013:125469. doi: 10.1155/2013/125469. Epub 2013 Sep 8 ##Corresponding author 査読あり
10. Sugimoto H, Lebleu VS, Bosukonda D, Keck P, Taduri G, Bechtel W, Okada H, Carlson W, Bey P, Rusckowski M, Tampe B, Tampe D, Kanasaki K, Zeisberg M, Kalluri R. Reply to Regarding the mechanism of action of a proposed peptide agonist of the bone morphogenetic protein receptor activin-like kinase 3. **Nat Med**. 2013 Jul;19(7):810-1. 査読なし
11. Kitada M, Kume S, Takeda-Watanabe A, S T, Kanasaki K, Koya D. Calorie restriction in overweight males ameliorates obesity-related metabolic alterations and cellular adaptations through anti-aging effects, possibly including AMPK and SIRT1 activation. **Biochim Biophys Acta**. 2013 Oct;1830(10):4820-7 査読あり
12. Plaks V, Rinkenberger J, Dai J, Flannery M, Sund M, Kanasaki K, Ni W, Kalluri R, Werb Z. Matrix metalloproteinase-9 deficiency phenocopies features of preeclampsia and intrauterine growth restriction. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2013 Jul 2;110(27):11109-14. 査読あり

13. Keizo Kanasaki, Megumi Kanasaki Angiogenic defects in preeclampsia: What is known and how are such defects relevant to preeclampsia pathogenesis? **Hypertension Research in Pregnancy** ##Corresponding author 2013; 1: 57–65 (invited review) 査読あり
14. Keizo Kanasaki, Munehiro Kitada, Megumi Kanasaki, Daisuke Koya. The biological consequence of obesity on the kidney. **Nephrology Dialysis and Transplantation** 2013 Nov;28 Suppl 4:iv1-7. doi: 10.1093/ndt/gft098. Epub 2013 Jun 5. (invited review) 査読あり
15. Kitada M, Kume S, Kanasaki K, Takeda-Watanabe A, Koya D. Sirtuins as possible drug targets in type 2 diabetes. **Curr Drug Targets**. 2013 Jun 1;14(6):622-36. 査読あり
16. Hirokazu Kakuda, Keizo Kanasaki, Daisuke Koya, Noboru Takekoshi, The administration of pitavastatin augments creatinine clearance associated with the reduction in oxidative stress parameters: acute and early effects. **Clin Exp Nephrol** 2013 Apr;17(2):240-7. 査読あり
17. Keizo Kanasaki, Weiqun Yu, Maximilian von Bodungen, John D. Larigakis, Megumi Kanasaki, Francisco Ayala de la Pena, Raghu Kalluri, Warren G. Hill. Loss of β 1-Integrin from Urothelium Results in Overactive Bladder and Incontinence in Mice: A Mechanosensory rather than Structural Phenotype, **FASB J** 2013 27(5):1950-61. doi: 10.1096/fj.12-223404. Epub 2013 Feb 8. 査読あり
18. Jianhua He, Yong Xu, Daisuke Koya, Keizo Kanasaki. Role of the Endothelial-to-mesenchymal Transition in Renal Fibrosis of Chronic Kidney Disease, 2013 **Clin Exp Nephrol** Clin Exp Nephrol. 2013 Aug;17(4):488-97. doi: 10.1007/s10157-013-0781-0. Epub 2013 Feb 21. ##Corresponding author (REVIEW) 査読あり
19. Keizo Kanasaki, Gangadhar Taduri, Daisuke Koya, Diabetic Nephropathy: The Role of Inflammation in Fibroblasts Activation and Kidney Fibrosis. **Frontiers in Endocrinology** 2013 4:7. doi: 10.3389/fendo.2013.00007. eCollection 2013. (Invited review) 査読あり
20. Kitada M, Kume S, Takeda-Watanabe A, Kanasaki K, Koya D. Sirtuins and renal diseases: relationship with aging and diabetic nephropathy. **Clin Sci (Lond)**. 2013 Feb 1;124(3):153-64. 査読あり
21. Keizo Kanasaki, Munehiro Kitada, Daisuke Koya, Pathophysiology of the aging kidney and therapeutic interventions, **Hypertension Research** 2012 Dec;35(12):1121-8. (review) 査読あり
22. Takeda-Watanabe A, Kitada M, Kanasaki K, Koya D. SIRT1 inactivation induces inflammation through the dysregulation of autophagy in human THP-1 cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 2012 Oct 12;427(1):191-6. 査読あり
23. Xu L, Kanasaki K, Kitada M, Koya D, Diabetic angiopathy and angiogenic defects, **Fibrogenesis&Tissue Repair** 2012 Aug 1;5(1):13. doi: 10.1186/1755-1536-5-13 ##Corresponding author (REVIEW) 査読あり
24. Sugimoto H, Lebleu VS, Bosukonda D, Keck P, Taduri G, Bechtel W, Okada H, Carlson W, Bey P, Ruscowski M, Tampe B, Tampe D, Kanasaki K, Zeisberg M, Kalluri R. Activin-like kinase 3 is important for kidney regeneration and reversal of fibrosis. **Nat Med**. 2012 Feb 5;18(3):396-404 査読あり
25. Megumi Kanasaki, Takako Nagai, Munehiro Kitada, Daisuke Koya, Keizo Kanasaki. Elevation of the anti-fibrotic peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline: a blood pressure-independent beneficial effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitors. **Fibrogenesis&Tissue Repair** 2011 Nov 30;4:25. doi: 10.1186/1755-1536-4-25 ##Corresponding author (REVIEW) 査読あり

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Keizo Kanasaki, Takako Nagai, Megumi Kanasaki, Daisuke Koya. Linagliotin-Mediated DPP-4 Inhibition Cures Kidney Fibrosis in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice by Inhibiting Endothelial-to-Mesenchymal Transition. **American Society of Nephrology, Annual Meeting, 2013 年 11 月 9 日, Georgia World Congress Center, Atlanta**
2. 金崎啓造, 古家大祐 糖尿病性腎症に対する抗線維化を標的とした新規治療戦略 日本腎臓学会西部地方会 (招待講演) 2013 年 10 月 12 日 (松山全日空ホテル、松山)
3. 金崎啓造 COMT 不全がもたらす妊娠高血圧腎症と糖代謝異常、妊娠高血圧学

会(招待講演)2013年10月4日(富山国際会議場、富山)

4. Keizo Kanasaki, Megumi Kanasaki, Daisuke Koya
Catechol-o-methyltransferase and 2-Methoxyestradiol Deficiency is Associated With Hepatic Steatosis and Glucose Tolerance Defects, 73th American Diabetes Association Annual Meeting, 2013年6月22日, McCormick Place Convention Center, Shicago)

〔図書〕(計28件)

1. 金崎啓造、古家大祐 (医学書院)
糖尿病診療マスター増大号:糖尿病性腎症に対するたんぱく質制限食と運動療法 2013年6ページ
2. 金崎啓造 (日本腎臓学会)エビデンスに基づくCKD診療ガイドライン2013サブグループ、糖尿病性腎症2013年2ページ
3. 金崎啓造、古家大祐、(中山書店)ヴィジュアル 糖尿病臨床のすべて 糖尿病性腎症 食事療法 2013 8ページ
4. 金崎啓造、古家大祐、(東京医学社)腎と透析 糖尿病腎症最新治療:The update of the therapy for diabetic nephropathy 2013 6ページ
5. 金崎啓造、古家大祐、(医歯薬出版)プラクティス:糖尿病腎症に対する食事療法 2013 9ページ
6. 金崎啓造、古家大祐、(最新医学社)最新医学別冊「ネフローゼ症候群」第2章 病理・病態生理:病因 6.糖尿病性腎症」2013 10ページ

6. 研究組織

((1)研究代表者

金崎 啓造 (KANASAKI, Keizo)

金沢医科大学 医学部 講師

研究者番号:60589919