

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461223

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症の新しい治療標的としてのメタロチオネインの分子機構の解明と臨床応用

研究課題名(英文) The role of metallothionein in diabetic nephropathy

## 研究代表者

小川 大輔(Ogawa, Daisuke)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：70535195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに糖尿病ラットの近位尿細管上皮細胞でメタロチオネインの発現が増強することが報告されているが、メタロチオネイン発現の抑制により糖尿病による酸化ストレス・糖尿病性腎症が増悪するかは不明であった。我々は、メタロチオネイン抑制により抗酸化作用が抑制され糖尿病性腎症が悪化すると仮説を立て、メタロチオネインノックアウトマウスやメタロチオネインノックダウンマウス培養近位尿細管上皮細胞を用いてメタロチオネインの糖尿病における酸化ストレスや炎症、糖尿病性腎症における役割を検討した。その結果、メタロチオネイン欠損により高血糖による酸化ストレスと腎臓の炎症が促進されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Metallothionein (MT) is induced in proximal tubular epithelial cells as an antioxidant in diabetic kidney; however, the role of MT in renal function remains unclear. We therefore investigated if MT deficiency accelerates diabetic nephropathy through oxidative stress and inflammation. Diabetes was induced by streptozotocin injection in MT-deficient (MT<sup>-/-</sup>) and MT<sup>+/+</sup> mice. Murine proximal tubular epithelial cells were used to elucidate the role of MT under high-glucose conditions. Parameters of diabetic nephropathy and markers of ROS and inflammation were accelerated in diabetic MT<sup>-/-</sup> mice compared with diabetic MT<sup>+/+</sup> mice. In vitro studies demonstrated that knockdown of MT by small interfering RNA enhanced mitochondrial ROS generation and inflammation-related gene expression in cultured cells under high-glucose conditions. These results suggest that MT may play a key role in protecting the kidney against high glucose-induced ROS and subsequent inflammation in diabetic nephropathy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病性腎症 酸化ストレス 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

メタロチオネインは、システイン由来のチオール基に富む低分子量(6-7 kDa)のたんぱく質であり、チオール基がフリーラジカルを消去するため強い抗酸化作用を有する。メタロチオネイン および は、肝臓・腎臓・心臓等さまざまな組織に発現し、活性酸素を抑えることで神経保護や心保護をすることが報告されており、腎臓でもカドミウムやスプラチン等による腎障害を抑制することが知られている。

また、糖尿病性腎症は末期腎疾患および心血管疾患の独立した危険因子であることが知られている。さらに、多くの研究で糖尿病性腎症の発症に酸化ストレス、活性酸素種 (ROS) 生成の増強が関連していることが示唆されており、酸化ストレスと炎症の制御は糖尿病性腎症発症の主要な治療標的となることが報告されている。

これまでに、糸球体上皮細胞でのメタロチオネインの特異過剰発現により糖尿病による糸球体上皮細胞の障害・細胞死が改善するとの報告がある。また、以前に我々は糖尿病ラットの近位尿細管上皮細胞でメタロチオネインの発現が増強することを報告しているが、メタロチオネイン発現の抑制により糖尿病による酸化ストレス・糖尿病性腎症が増悪するかは依然として不明であった。

## 2. 研究の目的

我々は、メタロチオネイン抑制により抗酸化作用が抑制され糖尿病性腎症が悪化すると仮説を立て、メタロチオネインノックアウトマウスやメタロチオネインノックダウンマウス培養近位尿細管上皮細胞 (mProx24) を用いてメタロチオネインの糖尿病における酸化ストレスや炎症、糖尿病性腎症における役割を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験

8週齢の雄の野性型 129/SV マウス(MT+/+)とメタロチオネイン(MT-I/II)ノックアウトマウス(MT-/-)を、それぞれコントロール群、ストレプトゾトシンによる糖尿病群、糖尿病誘発後に持効型インスリン(グラルギン)を投与したインスリン群の計6群に割り付けた。糖尿病群はストレプトゾトシン投与3日後に血糖 300mg/dl以上となったマウスを使用した。グラルギンはストレプトゾトシン投与後3日~6週間は0.5単位、ストレプトゾトシン投与後7週間~12週間後は0.75単位/日皮下注射を行った。8・12・16・20週齢に血糖・体重測定・尿中アルブミン量を測定し、20週齢で尿中アルブミン、血糖、HbA1c等の測定後、安楽死させ腎組織を回収した。腎症の程度は、電子顕微鏡撮影、マクロファージの浸潤、型コラーゲンの発現、ミトコンドリア ROS 産生、メサンギウム基質面積率、間質の線維化などを観察し、リアルタイム PCR 法にて炎症性サイトカインの Monocyte Chemotactic Protein-1(MCP1)などの遺伝子発現を検討した。

### (2) 細胞実験

マウス培養近位尿細管上皮細胞(mProx24)に siRNA を用いてメタロチオネイン発現を抑制し、リアルタイム PCR 法にて高糖濃度条件下における活性酸素種の発現や、MCP1 及び炎症性サイトカインの Transforming growth factor  $\beta$ (TGF $\beta$ )、Osteopontin(OPN)や、NADPH oxidase 4(NOX4)の発現について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 動物実験

ELISA Assay により、MT+/+群では糖尿病により MT-I/II の発現の増加を認めたが、MT-/-群での発現は認めなかった。また、免疫二重染色により、MT-I/II の発現は主に近位尿細管上皮細胞に局在しており、遠位尿細管上

皮での発現は軽度であった。

糖尿病群では HbA1c の増加、体重減少及び腎臓の相対重量の増加、腎臓のメサンギウム基質の面積率の増加が認められたが、MT+/+群と MT-/-群の間に有意差は認められなかった。糖尿病群において、MT-/-群では、型コラーゲン及びフィブロネクチン染色、Masson 染色で腎尿細管間質の線維化の進行が認められた。フィブロネクチンのウエスタンブロッティングでも同様の傾向が認められた。さらに、インスリン群で腎尿細管間質の線維化の改善を認めた。

さらに、糖尿病群において、MT+/+群と MT-/-群の間で糸球体へのマクロファージ浸潤に有意差はなかったが、MT-/-群では間質へのマクロファージ浸潤を有意な増加を認めた。このことから、メタロチオネイン欠損マウスは糖尿病により腎臓間質へのマクロファージ浸潤を促進することが示された。腎皮質の PCR 分析でも MT-/-群でマクロファージマーカーの CD14 の遺伝子発現が増加した。また、マクロファージ動員に関与する重要なケモカインである MCP1 や炎症マーカーの TGFβ および OPN の増加も認められた。さらに、炎症性サイトカインに関係する転写因子 NF-κB の発現も糖尿病群において MT+/+群と比較して MT-/-群で有意な増加を認めた。

腎臓の酸化ストレス産生を評価するため 4-HNE 染色を行ったところ、糖尿病群において MT+/+群と比較して MT-/-群で酸化ストレスの増加を認めた。また、ミトトラッカーグリーンとミトトラッカーレッド-H2XROS の二重染色でも MT+/+群と比較して MT-/-群で近位尿細管ミトコンドリアの活性酸素種 (ROS) 産生の増強を認めた。さらに、近位尿細管細胞内のミトコンドリアの膨張、クリステの著明な減少を認めた。

## (2) 細胞実験

ELISA Assay によりメタロチオネイン siRNA によるメタロチオネインの発現抑制

を確認した。マウス培養近位尿細管上皮細胞 (mProx24) 細胞の高糖濃度条件下で、ミトトラッカーグリーンとミトトラッカーレッド-H2XROS の二重染色を行ったところ、メタロチオネイン抑制によりミトコンドリア内の ROS 産生が増加した。さらに、リアルタイム PCR 法でもメタロチオネイン抑制により MCP1 や NOX4 などの発現が増加した。このことから、近位尿細管において、メタロチオネイン抑制により ROS 産生の増加をきたし、炎症マーカーを増加させることが示された。

## 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 12 件)

Wang Y, Katayama A, Terami T, Han X, Nunoue T, Zhang D, Teshigawara S, Eguchi J, Nakatsuka A, Murakami K, Ogawa D, Furuta Y, Makino H, Wada J. Translocase of inner mitochondrial membrane 44 alters the mitochondrial fusion and fission dynamics and protects from type 2 diabetes. *Metabolism*. 査読有、2015;64(6):677-88.

Higuchi C, Nakatsuka A, Eguchi J, Teshigawara S, Kanzaki M, Katayama A, Yamaguchi S, Takahashi N, Murakami K, Ogawa D, Sasaki S, Makino H, Wada J. Identification of circulating miR-101, miR-375 and miR-802 as biomarkers for type 2 diabetes. *Metabolism*. 査読有、2015;64(4):489-97.

Terami N, Ogawa D, Tachibana H, Hatanaka T, Wada J, Nakatsuka A, Eguchi J, Horiguchi CS, Nishii N, Yamada H, Takei K, Makino H.

Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. **PLoS One** 査読有、2014;9:e100777.

Watanabe M, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Higuchi C, Katayama A, Teshigawara S, Eguchi J, Ogawa D, Watanabe E, Wada J, Makino H. Pemt deficiency ameliorates endoplasmic reticulum stress in diabetic nephropathy. **PLoS One** 査読有、2014;9:e92647.

Ogawa D, Eguchi J, Wada J, Terami N, Hatanaka T, Tachibana H, Nakatsuka A, Horiguchi CS, Nishii N, Makino H. Nuclear hormone receptor expression in mouse kidney and renal cell lines. **PLoS One** 査読有、2014;9:e85594.

Tachibana H, Ogawa D, Sogawa N, Asanuma M, Miyazaki I, Terami N, Hatanaka T, Horiguchi CS, Nakatsuka A, Eguchi J, Wada J, Yamada H, Takei K, Makino H. Metallothionein deficiency exacerbates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. **Am J Physiol Renal Physiol** 査読有、2014;306:F105-115.

Terami T, Wada J, Inoue K, Nakatsuka A, Ogawa D, Teshigawara S, Murakami K, Katayama A, Eguchi J, Makino H. Urinary angiotensinogen is a marker for tubular injuries in patients with type 2 diabetes. **Int J Nephrol Renovasc Dis** 査読有、2013;6:233-40.

〔学会発表〕(計 6件)

小川大輔、寺見直人、畑中崇志、西井尚子、江口潤、中司敦子、和田淳、槇野博史、SGLT2 阻害薬ダパグリフロジンの糖代謝改善作用および腎保護作用の検討、第 29 回日本糖尿病合併症学会、2014 年 10 月 4 日、都市センターホテル(東京)

〔図書〕(計 4件)

小川大輔、槇野博史、朝倉書店、内科学第 10 版、2013、pp. 1461-1463

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

なし

取得状況(計 0件)

なし

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 大輔 (OGAWA DAISUKE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70535195

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし