

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860680

研究課題名(和文) PGC-1 α -ERR α 経路を標的とした糖尿病性腎症の新規治療法の開発研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for diabetic nephropathy targeting PGC-1 α -ERR α pathway

研究代表者

田邊 克幸 (TANABE, KATSUYUKI)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40534805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではミトコンドリア機能と血管新生の制御に関与するestrogen-related receptor- α (ERR α)を標的とした糖尿病性腎症の治療について検討した。1型糖尿病モデルマウスにおいて、糸球体内にポドサイトでのERR α 発現増加が認められた。培養ポドサイトへのERR α 拮抗薬の投与は、高糖濃度によるVEGF発現の増加を抑制した。ERR α ノックアウトマウスを用いた1型糖尿病モデルでは尿蛋白の抑制効果が認められなかったが、ERR α 拮抗作用を持つkaempferolは8週での尿蛋白の抑制効果を示した。これらの結果から、ERR α の糖尿病性腎症の進展への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study examined the therapeutic effects for diabetic nephropathy targeting estrogen-related receptor- α (ERR α), which involves mitochondrial function and angiogenesis. In glomeruli from type 1 diabetic mouse model, expression of ERR α was increased on podocytes. Cultured podocytes treated with ERR α antagonist showed to decrease expression of VEGF in high-glucose condition. Diabetic ERR α knockout mice could not reduce proteinuria compared to wild type diabetic mice. However, kaempferol, which is known as ERR α inverse agonist, suppressed proteinuria in diabetic mouse model. These results suggest the potential involvement of ERR α in the progression of diabetic nephropathy.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糖尿病性腎症 核内受容体 ポドサイト

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD) から末期腎不全に至り透析療法を施行されている患者数は本邦において年々増加しており、31 万人を超えるに至っている。透析関連医療費の増大に加えて、CKD は心血管系合併症の重大な危険因子である。透析導入の主要な原疾患として、糖尿病性腎症は約 45%を占めており、また糖尿病自体によるリスクと相まって、糖尿病性腎症の進行は心血管合併症のリスクを大きく増大させることから、新規の治療戦略を必要とする最も重要な腎疾患となっている。

糖尿病性腎症の進展の過程には、様々なメディエーターの関与が示唆されている。その中でも血管内皮成長因子(VEGF) は、糖尿病性腎症の比較的早期から発生・進展に関与しており、これまでに報告された多数の報告から、VEGF の過剰発現が糖尿病性腎症の病変を増悪させることが明らかとなっている。しかし、ヒトでの抗 VEGF モノクローナル抗体の使用経験から、この治療が内皮細胞傷害や蛋白尿を発生させることが示されており、直接的に VEGF を標的とした糖尿病性腎症の治療が困難となっている。

近年、糖尿病におけるミトコンドリア障害が注目されており、筋細胞や脂肪細胞においては、mitochondrial biogenesis の低下が示唆されているが、糖尿病マウスの腎臓においては、早期には mitochondrial biogenesis の制御因子である PGC-1 α の発現が亢進し、ミトコンドリア数が増加することが示されている。更に、筋細胞においては、運動によって mitochondrial biogenesis が起こる時に、PGC-1 α の活性化とともに、その下流にある estrogen-related receptor- α (ERR α) の活性化を介して、プロモーター領域に ERR α 結合部位を持つ VEGF の発現が亢進し、血管新生が促進されることが証明されている。このような実験的事実から、糖尿病に曝露された腎臓では、エネルギー需要の増大のために mitochondrial biogenesis が亢進し、その過程で PGC-1 α -ERR α 経路を介した VEGF の過剰産生が引き起こされるという仮説が導かれ、これは早期糖尿病性腎症における新規の標的経路となる可能性がある。

2. 研究の目的

糖尿病においてポドサイトで過剰産生される VEGF が、早期糖尿病性腎症の発生と進展に関与し、これは PGC-1 α -ERR α 経路の活性化を介して起こるとする仮説の下に、この経路の抑制による糖尿病性腎症の進展抑制効果を検討するために、以下の検討を行う。

(1) 1 型糖尿病糖尿病モデルマウスにおいて、VEGF の発現とともに ERR α の発現変化について検討する。

(2) 培養ポドサイトを高ブドウ糖濃度条件下で培養し、ERR α と VEGF 発現との関連について検討する。

(3) ERR α のノックアウトマウスにおいて 1 型糖尿病モデルを作成し、対照野生型マウスと比較検討する。

(4) 1 型糖尿病マウスモデルに ERR α 拮抗活性を持つ kaempferol を投与し、非投与糖尿病マウスと比較検討する。

3. 研究の方法

(1) 1 型糖尿病マウスモデルでの ERR α 発現についての検討

野生型マウスに streptozotocin (STZ) 50 mg/kg を 5 日間連日腹腔内投与し、1 型糖尿病を誘発する。高血糖の確認から 8 週後にマウスを屠殺し、尿と腎臓を採取し、ERR α の発現について免疫染色や real-time PCR にて解析する。

(2) 培養ポドサイトでの ERR α と VEGF 発現との関連についての検討

マウス由来ポドサイト細胞株を低ブドウ糖濃度 (5.5mM) または高ブドウ糖濃度 (25 mM) の条件の下に培養して、VEGF や ERR α 、ポドサイト指標の発現を real-time PCR にて検討する。また、高ブドウ糖濃度下に ERR α 選択的拮抗薬である XCT-790 を 10 μ M で投与し、VEGF 等の発現変化を検討する。

(3) ERR α のノックアウトマウスでの 1 型糖尿病モデルの検討

Jackson 研究所より購入した ERR α のノックアウトマウスを繁殖させて、ホモ接合体のノックアウトマウスを得る。このマウスに STZ 50mg/kg を 5 日間連日で腹腔内投与し、1 型糖尿病モデルを作成して、高血糖の確認から 8 週後にマウスを屠殺し、尿と腎臓を採取する。尿蛋白や腎組織について、野生型の 1 型糖尿病モデルマウスと比較検討する。

(4) 1 型糖尿病マウスモデルへの ERR α 拮抗薬 kaempferol 投与による治療効果の検討

野生型マウスに streptozotocin (STZ) 50 mg/kg を 5 日間連日腹腔内投与し、1 型糖尿病を誘発する。高血糖の確認から 4 週間より 8 週間にわたり kaempferol 7mg/kg を隔日で腹腔内投与する。その後マウスを屠殺し、尿と腎臓を採取する。尿蛋白や腎組織について、kaempferol 非投与の 1 型糖尿病マウスと比較検討する。

4. 研究成果

(1) 1 型糖尿病マウスモデルでの ERR α 発現についての検討

STZ 誘発性の 1 型糖尿病マウスは STZ 非投与マウスと比較して有意な尿中アルブミン排泄の増加が認められた。また、腎組織には非糖尿病マウスと比較して糸球体のメサンギウム基質の増加が認められた。

腎皮質での VEGF mRNA 発現は糖尿病マウスにおいて有意な上昇が認められた。しかし、ERR α mRNA の発現については、糖尿病

マウス間で著明な上昇を示すマウスと上昇を示さないマウスが認められ、一様な結果が得られなかった。

このため、ERRα 発現部位について免疫染色での確認を行った。免疫組織化学では、ERRα は主としてヘンレの係蹄に相当する尿細管上皮細胞に発現していた（図1左）。免疫蛍光染色による糸球体内での ERRα 発現部位の検討では、糖尿病マウスの糸球体において主としてポドサイトとメサンギウムでの発現増加が認められた（図1右）。

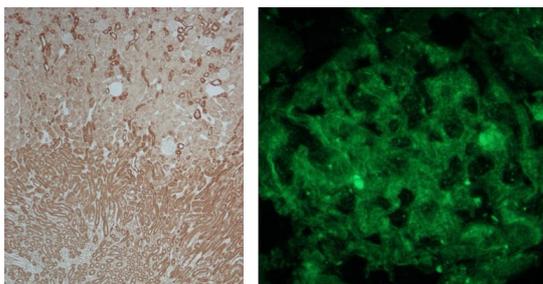


図1

（2）培養ポドサイトでの ERRα と VEGF 発現との連関についての検討

（1）の結果からポドサイトでの ERRα と VEGF 発現を検討するため、マウス由来ポドサイト細胞株を低または高ブドウ糖で培養した。高ブドウ糖濃度下のポドサイトは 24 時間で VEGF mRNA 発現の増加を示した。この条件下で、ERRα mRNA の発現についても増加する傾向が認められた。

ERRα 選択的拮抗薬である XCT-790 を高ブドウ糖濃度での培養に加えることで、ポドサイトでの VEGF 発現増加の抑制が認められた。ポドサイト指標である synaptopodin の mRNA 発現には差が認められなかった。

（3）ERRα のノックアウトマウスでの 1 型糖尿病モデルの検討

Jackson 研究所より購入した ERRα ヘテロ接合体ノックアウトマウスを岡山大学動物資源部門鹿田施設にて繁殖させ、ERRα ホモ接合体のノックアウトマウスを得た。

この ERRα ホモ接合体ノックアウトマウスは、以前の報告において通常状態では野生型マウスと異なる表現型を示さないことが確認されている。我々の検討でも、ERRα ホモ接合体ノックアウトマウスは、野生型マウスと比較して同週齢での体重や血糖値に差を認めなかった。また、アルブミン尿も同等であり、腎組織についても特異的な表現型は認められなかった。

この ERRα ホモ接合体ノックアウトマウスに対して STZ の腹腔内注射により 1 型糖尿病モデルマウスを作成した。高血糖の確認から 8 週後に、野生型マウスとノックアウトマウス間で尿中アルブミン排泄には明らかな差が認められなかった。

ERRα のノックアウトマウスでは代償的に ERRγ の発現が亢進すると考えられ、これがノックアウトマウスでの糖尿病性腎症の抑制効果を打ち消した可能性がある。

（4）1 型糖尿病マウスモデルへの ERRα 拮抗薬 kaempferol 投与による治療効果の検討

野生型 1 型糖尿病モデルマウスを作成し、高血糖の確認から 4 週後より kaempferol を 8 週間にわたって隔日で腹腔内投与した。Kaempferol はフラボノイドの一種であり、これまでの報告から ERRα に対する拮抗作用を持つことが知られている。非糖尿病マウスでは、kaempferol 投与によるアルブミン尿や腎組織への影響は認められなかった。1 型糖尿病マウスにおいて、kaempferol の投与は尿中アルブミン排泄を著明に減少させた（図2）。また、腎臓の組織学的検討では、糖尿病によって引き起こされた、早期糖尿病腎症の徴候である糸球体でのメサンギウム基質増加が、kaempferol の投与によって抑制された（図3）。以上の結果から、ERRα 拮抗作用を持つ kaempferol による糖尿病性腎症に対する治療効果が示唆された。Kaempferol は XCT-790 のような特異的な ERRα 拮抗薬ではなく、非特異的な抗酸化作用が糖尿病性腎症に対する有益性をもたらした可能性があるが、他の報告では kaempferol は ERRγ に対する拮抗作用も持つことが示されていることから、ERRα と ERRγ の両方を抑制したことが、ERRα のみのノックアウトマウスでは認められなかった糖尿病性腎症に対する治療効果につながった可能性がある。

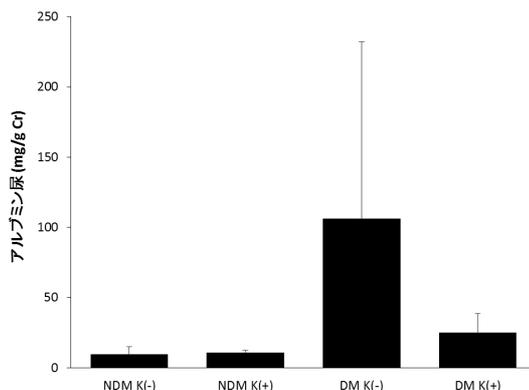
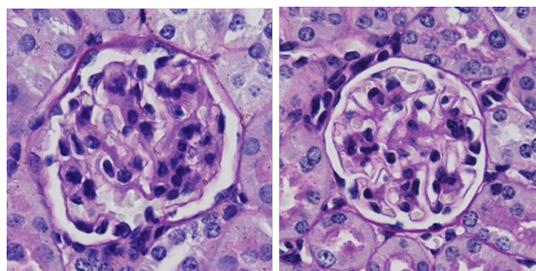


図2



DM K(-)

DM K(+)

図3

<引用文献>

Luo J, Sladek R, Carrier J, Bader JA, Richard D, Giguere V. Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *Mol Cell Biol.* 2003, 23(22); 7947-7956

Wang J, Fang F, Huang Z, Wang Y, Wong C. Kaempferol is an estrogen-related receptor alpha and gamma inverse agonist. *FEBS Lett.* 2009, 583 (4): 643-647

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田邊 克幸 (TANABE KATSUYUKI)

岡山大学病院・助教

研究者番号 : 40534805