

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860694

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症におけるNADPHオキシダーゼNoxアイソフォームの病態的意義の解明

研究課題名(英文) Pathological significance of Nox isoforms of NADPH oxidase in diabetic nephropathy

研究代表者

浪越 為八(Namikoshi, Tamehachi)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：90509332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症進展にはNADPHオキシダーゼ活性化が関与しているが、その細胞膜Noxアイソフォームの病態的意義は不明である。そこでNox1、Nox4遺伝子改変マウスの糖尿病モデルを用いて検討した。欠損(KO)/野生型に糖尿病/対照群を作成、～20週で解析した。Nox1KO、Nox4KOともアルブミン尿増加は軽減されたが、糸球体硬化はNox1KOで抑制傾向であった。Nox2、フィブロネクチン、 α -SMAのmRNA発現上昇もNox1KOのみ抑制された。糸球体ニトロチロシン蓄積はNox1KOで完全に抑制されたが、Nox4KOでは抑制不十分であった。糖尿病性腎症進展にはNox1活性化の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Activated NADPH oxidase is associated with progression of diabetic nephropathy, but the pathological significance of Nox isoforms, cell membrane components of NADPH oxidase, remains to be elucidated. Here, we investigated ameliorative effects of genetic manipulation of Nox1 and Nox4, on diabetic mice kidneys, to clarify the role of Nox isoforms in diabetic nephropathy. Diabetic/control knockout (KO)/wild-type mice were used for the examination at ~20 weeks after induction of diabetes. Diabetes-induced albuminuria was attenuated in both Nox1KO and Nox4KO mice, while the glomerular sclerosis was mitigated in only Nox1KO kidneys. Increased mRNA expressions of Nox2, fibronectin, and α -SMA in diabetic kidneys were suppressed in only Nox1KO mice. Accumulation of nitrotyrosine in glomeruli of diabetic kidneys was completely suppressed in Nox1KO mice, although it was reduced insufficiently in Nox4KO mice. Collectively, activated Nox1 may contribute to progression of diabetic nephropathy.

研究分野：腎臓学

キーワード：糖尿病性腎症 NADPHオキシダーゼ Nox

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症の発症・進展に酸化ストレスが重要な役割を果たしており、活性酸素種(ROS)産生源として NADPH オキシダーゼが主要な役割を果たしている。

NADPH オキシダーゼ活性化には細胞膜上に存在するコンポーネントの活性化が不可欠であるが、食細胞では p22^{phox}, gp91^{phox}(Nox2)の存在が確認されている。腎組織では、Nox アイソフォームとして、Nox2 以外に Nox1, Nox4 の発現が確認されている。

これらのアイソフォームは組織局在、発現制御、病態形成への関与が異なり、腎症発症・進展に關与する標的 Nox アイソフォームを特定する必要がある。

Nox4 は腎組織で高発現しており、ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病腎組織において、p22^{phox}, Nox2 とともに発現上昇することが報告されている。

さらに特定 Nox の発現抑制が糖尿病性腎症の進展阻止に有効である可能性が示唆されている。アンチセンスオリゴヌクレオチド投与による Nox4 発現阻害が STZ 糖尿病ラットにおける腎・糸球体肥大を抑制したことが報告されている。また、2型糖尿病マウスを用いて Nox1/Nox4 阻害薬 GKT-136901 は腎障害の進展を抑制し得ること、培養近位尿細管細胞において、同薬剤は、NADPH オキシダーゼ活性化と ROS 産生を抑制することも報告されている。

以上のように Nox4 の活性・発現抑制は腎症の進展阻止に有効である可能性が示唆されているが、確実ではなく、また腎症の病態形成における他の Nox アイソフォームの役割についての検討も不十分である。糖尿病における主要な ROS 産生源としての Nox 各アイソフォームの発現動態・制御機構を解明し、治療標的

を同定し、糖尿病性腎症の発症・進展阻止戦略を立案に資したい。

2. 研究の目的

糖尿病性腎症の各病態(基質増加、アルブミン尿出現等)における Nox 各アイソフォームの役割を特定し、特異的阻害薬開発等の新規治療法開発に資することを本研究の主目的とする。具体的には、Nox1、Nox2、Nox4 各々の遺伝子改変動物を用いて、糖尿病性腎症の発症・進展における各々の役割を解明し、新規治療法開発につなげたい。

3. 研究の方法

Nox1, Nox2, Nox4 欠損型(KO)および野生型(WT)マウス各々に STZ を腹腔内投与し 1 型糖尿病を誘発(偽投与を対照群に設定)。糖尿病発症確認後、10 週目と 20 週目で、生理学・生化学検査、アルブミン尿、腎組織障害度、RT-PCR 法による各種病態関連遺伝子の mRNA 発現、免疫染色による各種病態関連蛋白の発現を検討する。共同研究施設(Baker IDI Heart and Diabetes Institute)よりデータ、腎組織の提供を受け、解析を進めていく。

また、Cre-loxP システムによる内皮特異的(Tie2-Cre)Nox2 KO マウスを用いて、KO/WT 各々に STZ 誘導糖尿病モデルを作成、上記同様の項目にて比較検討する。さらに、糖尿病性腎症におけるアルブミン尿出現メカニズムを解明するため、two-photon laser 顕微鏡を用いた in vivo live-imaging 法により、内皮特異的 Nox2 KO/WT 各マウスの STZ 誘導糖尿病モデルにおけるアルブミンの糸球体濾過状態を非糖尿病モデルと対比させることにより検討する。

4. 研究成果

Nox1KO, Nox4KO とともに 20 週糖尿病によるアルブミン尿増加は軽減されていたが、糸球体硬化については Nox1KO のみ抑制傾向がみられた。Nox2KO については、アルブミン尿、糸球体硬化ともに改善はみられなかった。したがって、以降の解析は Nox1KO および Nox4KO において実施された。

10 週糖尿病による Nox2, フィブロネクチン, α -平滑筋アクチンの mRNA 発現上昇は、いずれも Nox1KO では抑制されていたが、Nox4KO では抑制されなかった。また、次の遺伝子群についても mRNA 発現を解析した：Nox1(Nox4KO のみ), Nox4(Nox1KO のみ), p47phox, TGF- β , CTGF, α 1 型コラーゲン, MCP-1。しかし、いずれにおいても、10 週糖尿病による発現上昇は、Nox1KO, Nox4KO とともに抑制されなかった。

20 週糖尿病による糸球体ニトロチロシン蓄積は、Nox1KO で完全に抑制されていたが、Nox4KO では十分に抑制されなかった。糸球体 α 1 型コラーゲン蛋白についても検討を行ったが、20 週糖尿病による発現上昇は、Nox1KO, Nox4KO とともに十分に抑制されなかった。

これらの結果をまとめると、糖尿病性腎症進展には Nox4 よりも Nox1 活性化の関与が示唆された。しかし、Nox1 の発現抑制のみでは、糖尿病性腎症の進展を抑制するには不十分とも考えられる。既報では、特異的 Nox1/Nox4 阻害薬が糖尿病性腎症の進行を抑制したことが示されていることから、Nox1 のみならず Nox4 も同時に抑制することが、糖尿病性腎症の進展阻止に有効なのかもしれない。さらに、NADPH オキシダーゼ以外の ROS 産生源が糖尿病性腎症の進展に関わっている可能性も考慮すべきである。

なお、内皮特異的 (Tie2-Cre)Nox2 KO/WT マウスの作成については、平成 26 年度末までにモデル作成にまでは至っておらず、現在も継続中である。モデル作成後は STZ 糖尿病を誘発し、データおよび腎組織解析と、in vivo live-imaging 法による糸球体血行動態およびアルブミン糸球体濾過を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Jay C. Jha, Stephen P. Gray, David Barit, Jun Okabe, Assam El-Osta, Tamehachi Namikoshi, Vicki Thallas-Bonke, Kirstin Wingler, Cedric Szyndralewicz, Freddy Heitz, Rhian M. Touyz, Mark E. Cooper, Harald H.H.W. Schmidt, Karin A. Jandeleit-Dahm. Genetic targeting or pharmacologic inhibition of NADPH oxidase Nox4 provides renoprotection in long-term diabetic nephropathy. JOURNAL OF AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, 査読有, 25 巻, 2014, 1237 ~ 1254

DOI : 10.1681/ASN.2013070810

Young-Hyun You, Shinichi Okada, San Ly, Karin Jandeleit-Dahm, David Barit, Tamehachi Namikoshi, Kumar Sharma. Role of Nox2 in diabetic kidney disease. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY RENAL PHYSIOLOGY, 査読有, 304 巻, 2013, F840 ~ F848

DOI : 10.1152/ajprenal.00511.2012

〔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）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浪越 為八 (NAMIKOSHI, Tamehachi)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：90509332

(2) 研究協力者

柏原 直樹 (KASHIHARA, Naoki)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：10233701

佐藤 稔 (SATO, Minoru)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70449891

桑原 篤憲 (KUWABARA, Atsunori)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：50368627

依光 大祐 (YORIMITSU, Daisuke)
川崎医科大学・医学部・臨床助教
研究者番号：50412177

(3) 連携研究者

Prof. Mark Cooper
Baker IDI Heart and Diabetes Institute

Prof. Keith Channon
Oxford University

Prof. George Tanner
Indiana University