

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：34519

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893278

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症での尿細管・間質線維化における細胞内鉄代謝異常の関与

研究課題名(英文) The pathogenic role of altered renal proximal tubular iron metabolism in diabetic tubulopathy

研究代表者

名波 正義 (Nanami, Masayoshi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：30412034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症(DN)の尿細管間質病変は腎予後と深く関連している。本研究ではDNの尿細管障害過程における細胞内鉄代謝の関与を検討した。2型DNモデルマウス(db/db)の近位尿細管において、鉄取り込み蛋白であるトランスフェリン受容体1(TfR1)、二価金属イオン輸送体1(DMT1)の発現亢進、ミトコンドリアにおける鉄シャペロン蛋白であるフラタキシンの発現抑制およびマンガンスーパーオキシドジスムターゼ(MnSOD)活性の低下が認められた。以上の結果から、DNでの近位尿細管における細胞内鉄輸送異常とミトコンドリアでの鉄代謝および酸化ストレス制御障害が尿細管障害過程に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The development of tubulointerstitial lesions is closely correlated with the progressive decline in renal function in diabetic nephropathy (DN). The aim of this study was to clarify the influential role of cellular iron metabolism in the process of tubular injury in DN. We observed an increased expression of the iron-importing transport proteins [transferrin receptor 1 (TfR1) and divalent metal transporter 1 (DMT1)], while a decreased expression of the mitochondrial iron chaperone, Frataxin, accompanied the decline of manganese superoxide dismutase (MnSOD) activity in isolated proximal tubules from the db/db mouse, a model of type II DN. These findings suggest that the dysregulations of cellular iron transport as well as mitochondrial iron metabolism including antioxidative functions within proximal tubules in DN could contribute to the pathophysiology of the progressive tubulointerstitial damage.

研究分野：腎臓病学

キーワード：糖尿病性腎症 尿細管間質障害 細胞内鉄代謝異常

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症 (DN) における尿細管間質病変は腎予後を規定する要因である。DN から末期腎不全への進展防止および透析導入抑制のために、糸球体病変のみならず尿細管間質障害の機序解明はきわめて重要な問題であるが、十分な知見が得られていない現状にある。従来、DN での尿細管障害は糸球体病変に続発した病変と考えられていたが、早期より出現し、糸球体病変とは独立した病態により惹起されるとの見解が得られている。特に近位尿細管での Reactive Oxygen Species (ROS) 産生の亢進がこの病態に深く関与することが示されている。

近年、DN の進展過程において、腎皮質、尿細管での鉄代謝障害の関連性が報告されている。DN の近位尿細管では、このような細胞内鉄代謝異常が Haber-Weiss 反応・Fenton 反応を介した酸化ストレスの増幅をきたし、尿細管障害の重要な促進因子となっている可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、DN での尿細管障害進行過程において、近位尿細管の鉄代謝異常の関与を検証し、その機序を解明することを目的とし、DN モデルマウスの単離近位尿細管を用いて以下の検討を行った。

(1) DN での近位尿細管における細胞内鉄輸送蛋白発現

我々は血管内皮細胞においてサイトカインによってもたらされる ROS 産生が細胞内鉄輸送蛋白の翻訳レベルに影響を与え、鉄取り込み蛋白である transferrin receptor 1 (TfR1)、divalent metal transporter 1 (DMT1) の発現を促進し、鉄汲み出し蛋白である ferroportin 1 (FP1) の発現を抑制し、その結果として細胞内鉄過剰状態が惹起されることを報告している。

糖尿病病環境下において、グルコース再吸収を担い、ミトコンドリアが濃密に保たれる近

位尿細管上皮細胞は、ROS 産生が亢進した状態にあり、同様の機序により鉄輸送調節障害が誘導されていることが想定され、これを検証した。

(2) DN での近位尿細管におけるミトコンドリア鉄代謝

我々は慢性腎不全患者の多核白血球において、ミトコンドリアでの鉄-硫黄クラスター、Heme 合成に重要な役割を果たす鉄シャペロン蛋白である Frataxin の発現抑制が起こっていることを報告した。

DN の近位尿細管においても Frataxin 発現が抑制され、鉄利用障害により酸化ストレスが亢進しているのではないかとの仮説を立て、これを検証した。

引用文献

Ziyadeh FN, Goldfarb S. The renal tubulointerstitium in diabetes mellitus. *Kidney Int.* 39: 464-75, 1991.

Bagby SP. Diabetic nephropathy and proximal tubule ROS: challenging our glomerulocentricity. *Kidney Int.* 71: 1199-202, 2007.

Ward DT, Hamilton K, Burnand R, Smith CP, Tomlinson DR, Riccardi D. Altered expression of iron transport proteins in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *Biochim Biophys Acta.* 1740: 79-84, 2005.

Ikeda Y, Enomoto H, Tajima S, Izawa-Ishizawa Y, Kihira Y, Ishizawa K, Tomita S, Tsuchiya K, Tamaki T. Dietary iron restriction inhibits progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 304: F1028-36, 2013.

Nanami M, Ookawara T, Otaki Y, Ito K, Moriguchi R, Miyagawa K, Hasuike Y,

Izumi M, Eguchi H, Suzuki K, Nakanishi T. Tumor necrosis factor-alpha-induced iron sequestration and oxidative stress in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25: 2495-501, 2005.

Hasuike Y, Nagai T, Yorifuji S, Tanaka S, Matsumoto A, Yahiro M, Kaibe S, Kida A, Tokuyama M, Nagasawa Y, Otaki Y, Kuragano T, Nakanishi T. The mitochondrial protein frataxin is downregulated in hemodialysis patients. *Clin Exp Nephrol.* 17: 424-30, 2013.

3. 研究の方法

2型DNモデルであるレプチン受容体遺伝子変異マウス [C57BL/6J - Lepr^{db}/Lepr^{db}] (db/db) と Wild-type Littermates [C57BL/6J] (WT)を用い、8-10週歳で近位尿管を単離し、比較検討を行った。

(1) DNでの近位尿管における細胞内鉄輸送蛋白発現

鉄輸送蛋白 (TfR、DMT1、FP1) の mRNA レベルでの発現を TaqMan real-time PCR 法を用いて解析した。

(2) DNでの近位尿管におけるミトコンドリア鉄代謝

Frataxin 発現

Frataxin の mRNA レベルでの発現を TaqMan real-time PCR 法を用いて解析した。

酸化ストレス状態の評価

ヘマトキシリンの自動酸化抑制反応を用い、manganese superoxide dismutase (Mn-SOD)の活性を測定した。

(統計処理: データは平均値 ± 標準誤差で示した。2群間比較には t-検定を行い、検定の結果は $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。)

4. 研究成果

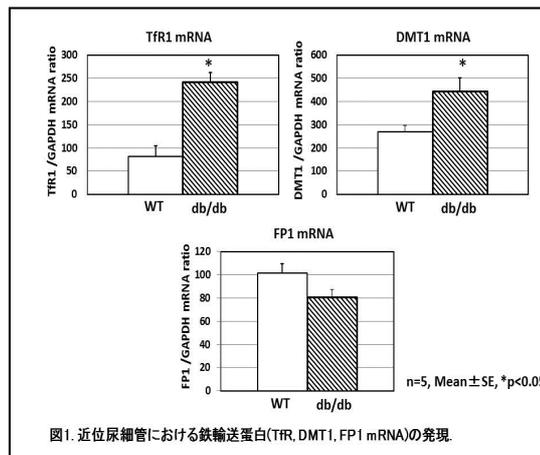
(1) 結果

尿・血液検査

db/db 群において WT 群に比べ BUN と Glucose の有意な上昇を認めた [BUN (mg/dL): WT 29.4 ± 6.3 v.s. db/db 54.3 ± 14.9 $n=7$, $p < 0.05$, Glucose (mg/dL): WT 229 ± 60 v.s. db/db 589.0 ± 120.0 $n=7$, $p < 0.05$] 尿蛋白量、Cr 値、Hb 値については両群間に有意差は認められなかった。

DNでの近位尿管における細胞内鉄輸送蛋白発現

db/db 群の単離近位尿管において TfR1、DMT1 mRNA の有意な発現増加を認めた (TfR1/GAPDH mRNA ratio: WT 81.4 ± 22.5 v.s. db/db 242.4 ± 20.2 $n=5$, $p < 0.05$, DMT1/GAPDH mRNA ratio: WT 268.1 ± 27.5 v.s. db/db 442.6 ± 60.4 $n=5$, $p < 0.05$)。また、FP1 mRNA には両群間に有意差は認められなかった (図1)。



DNでの近位尿管におけるミトコンドリア鉄代謝 (Frataxin 発現および Mn-SOD 活性)

db/db 群の単離近位尿管において Frataxin mRNA の有意な発現低下 (Frataxin/GAPDH mRNA ratio: WT 78.3 ± 7.2 v.s. db/db 30.8 ± 6.4 $n=5$, $p < 0.05$) (図2)と Mn-SOD 活性の有意な低下を認めた (Mn-SOD (units SOD/ml): WT 117.4 ± 7.24 v.s. db/db 61.2 ± 1.4 $n=5$, $p < 0.05$) (図3)。

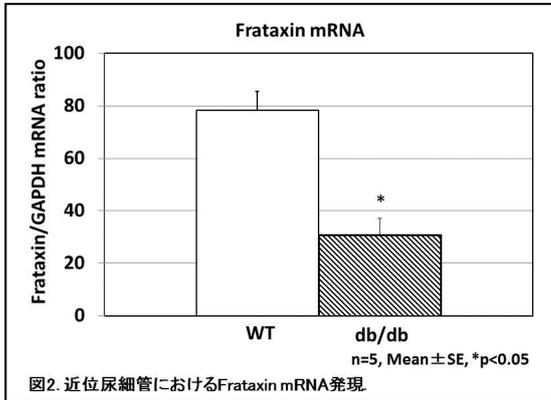


図2. 近位尿細管におけるFrataxin mRNA発現.

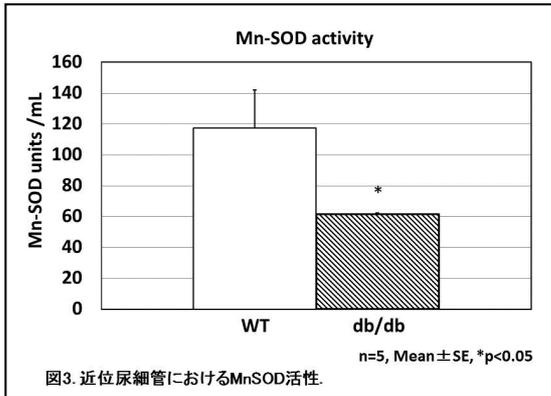


図3. 近位尿細管におけるMnSOD活性.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

発表者名：山本清子、木村知子、永井孝憲、木田有利、海邊正治、名波正義、倉賀野隆裕、中西健 発表標題：糖尿病性腎症進行過程における近位尿細管でのミトコンドリア鉄代謝異常の関与 学会名：第 58 回日本腎臓学会学術総会 発表年月日：2015 年 6 月 6 日 発表場所：愛知県・名古屋市

発表者名：木村知子、山本清子、永井孝憲、八尋真名、木田有利、海邊正治、名波正義、長澤康行、蓮池由紀子、倉賀野隆裕、中西健 発表標題：糖尿病性腎症での近位尿細管におけるミトコンドリア鉄代謝異常 学会名：第 44 回日本腎臓学会西部学術大会 発表年月日：2014 年 10 月 4 日 発表場所：兵庫県・神戸市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

名波 正義 (NANAMI, Masayoshi)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：30412034

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：