



Title	糖尿病性腎症治療の新規ターゲット探索 : 高インスリン血症、HIF-1 、ならびにメグシンが糸球体と尿細管間質に及ぼす影響とその機序
Author(s)	大友, 秀一
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 乙第6716号
Issue Date	2010-03-25
DOI	10.14943/doctoral.r6716
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/42817
Type	theses (doctoral)
File Information	ohtomo_thesis.pdf



[Instructions for use](#)

糖尿病性腎症治療の新規ターゲット探索

高インスリン血症、HIF-1 α 、ならびにメグシンが糸球体と尿細管間質に
及ぼす影響とその機序

大友 秀一

目次

緒言.....	1
第一章	
高インスリン血症による腎障害と腎機能低下.....	5
序文.....	6
材料および方法.....	8
結果.....	11
考察.....	25
小括.....	28
第二章	
HIF-1 α 分解抑制による虚血・低酸素障害の軽減と腎保護作用.....	29
序文.....	30
材料および方法.....	32
結果.....	35
考察.....	49
小括.....	52
第三章	
高血糖により誘導されたメグシンによるメサンギウムマトリックス蓄積促進.....	53
序文.....	54
材料および方法.....	56
結果.....	60
考察.....	72
小括.....	75
総括.....	76
謝辞.....	78
引用文献.....	79
英文概要.....	89

略 語 一 覧

AGE	advanced glycation end products
AP-1	activator protein-1
CTGF	connecting tissue growth factor
GK ラット	Goto-Kakizaki ラット
HbA1c	hemoglobin A1c
HIF	hypoxia inducible factor
HO-1	heme oxygenase-1
HRP	horse-radish peroxidase
IgG	immunoglobulin G
iNOS	inducible nitric oxide synthase
MMP	matrix metalloproteinase
NADPH oxidase	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
PAS	periodic acid-Schiff
RAGE	receptor for advanced glycation end products
SBDD	structure based drug design
SHR	spontaneously hypertensive rats
STZ ラット	streptozotocin ラット
TGF- β	transforming growth factor- β
VEGF	vascular endothelial growth factor
WKY ラット	Wistar Kyoto ラット
ZDF ラット	Zucker diabetic fatty ラット

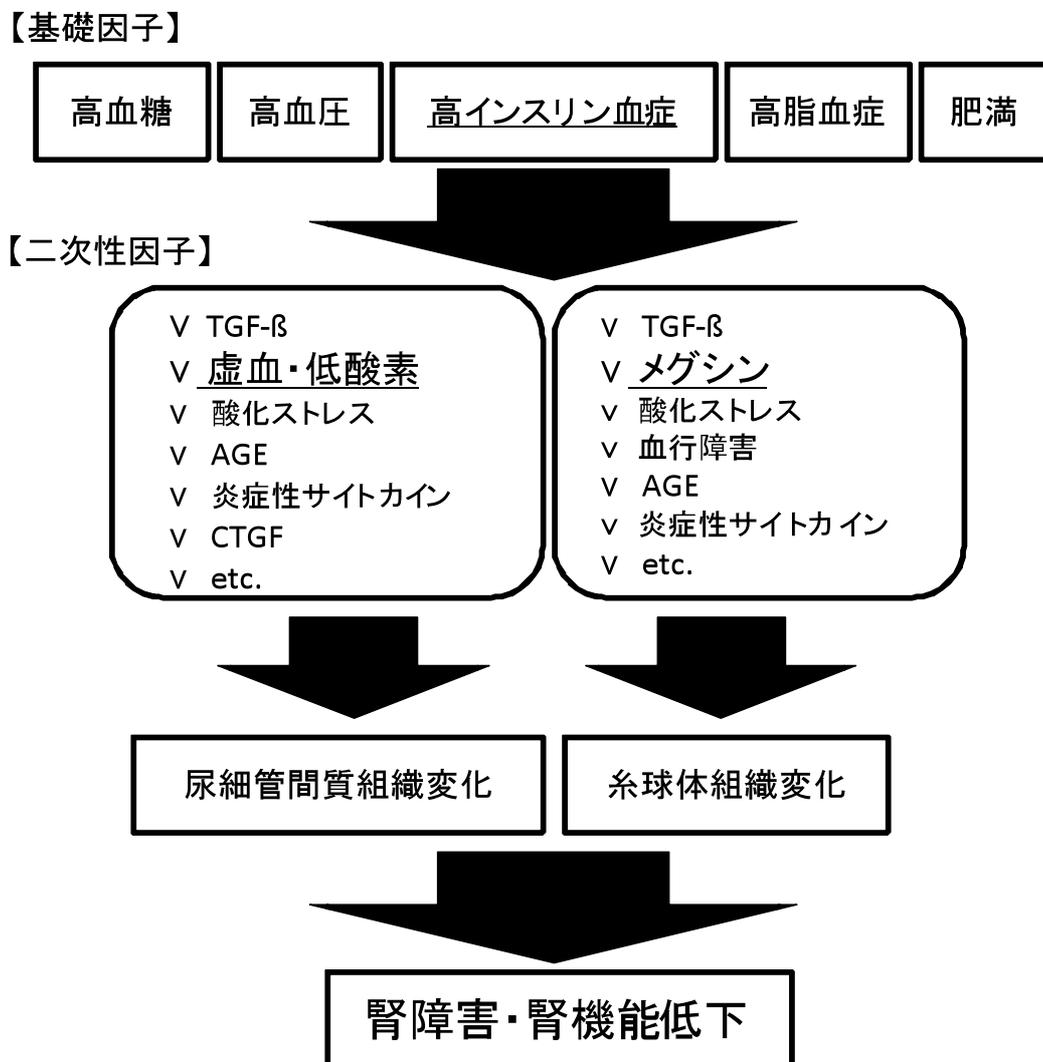
緒 言

透析を必要とする末期腎不全患者数は世界中で増加の一途をたどっており、日本では1990年には43万人であった血液透析患者数は2010年には200万人を突破すると予想されている。腎不全患者数の増加は医療経済的にも大きな問題となっており、この状況を打開すべく世界中で腎臓病の治療を目指した研究が行われている。

現在、先進国における末期腎不全に至る原疾患の第一位は糖尿病性腎症であり、日本においては新規透析導入症例のおよそ半数を占めている。糖尿病性腎症は糖尿病に伴う腎臓障害であり、タンパク尿を呈しながら徐々に腎機能が低下する疾患である。糖尿病性腎症患者に対する治療は、主に高血糖および高血圧により行われる。これは、糖尿病性腎症患者の血糖値、血圧をそれぞれ正常値に保つことにより、腎障害の指標である尿中タンパク質排泄量を低下させ、さらに腎機能の低下速度を緩やかにして透析導入時期を数年遅らせることが可能であることが、ヒトの臨床試験において示されているためである(1-6)。しかし、厳格な血糖コントロール・血圧コントロールをもってしても透析導入は依然として不可避であり、糖尿病性腎症に対する治療手段は未だ不十分である。このため、糖尿病性腎症の新たな治療方法が強く求められている。

Schema 1 に、糖尿病性腎症における腎障害・腎機能低下の原因について示す。糖尿病性腎症における腎機能低下は主に、間質線維化に代表される尿細管間質組織変化と、糸球体マトリックス増加に代表される糸球体組織変化の結果としてもたらされる。高血糖および高血圧以外にも高脂血症、高インスリン血症、肥満、といったII型糖尿病患者に特徴的な複数の代謝異常が、基礎因子としてこれら組織変化に関与すると考えられている(1-9)。また、これらの代謝異常は、酸化ストレス、炎症性サイトカイン、血行障害、AGEなどの二次性の腎障害性因子をもたらし、これらが糸球体および間質組織変化のメカニズムとして働くと想定されている(10-12)。このように、糖尿病性腎症における腎障害・腎機能低下には多数の因子が複雑に影響しているため、血糖や血圧に対する治療だけでは腎臓に対する治療効果が不十分であると考えられている。しかし、どの因子が糖尿病性腎症の腎障害・腎機能低下に強く関与しているのかは明らかではないため、

効果的な治療ターゲットの選定ができず、新たな治療法開発に至っていないのが現状である。



Schema 1

糖尿病性腎症における腎障害・腎機能低下の概念図

Schema 1 に示すように、糖尿病性腎症の治療ターゲットは、1) 基礎因子となる代謝異常、2) 尿細管間質組織変化をもたらす二次性の腎障害性因子、3) 糸球体組織変化をもたらす二次性の腎障害性因子、の三つに大きく分けられるが、本論文では 1) として高インスリン血症に、2) として腎臓虚血・低酸素障害に、3) としてメグシンに、それぞれ着目して検討を行った。

高インスリン血症は、II型糖尿病患者に多く認められるインスリン抵抗性に伴う耐糖能異常状態である。近年、糖尿病性腎症に対してインスリン抵抗性改善薬を用いた治療が行われるようになり、高インスリン血症が腎障害性に働く可能性が示されている(13, 14)が、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。第一章では、高インスリン血症が糖尿病性腎症における腎障害、腎機能低下に及ぼす影響とその機序を明らかにし、高インスリン血症が糖尿病性腎症の治療ターゲットとして有用であるかどうか評価を行った。

虚血・低酸素状態は、糖尿病性腎症の尿細管間質領域に認められ、尿細管間質組織の線維性変化を引き起こし、腎障害性に働くと考えられている(15-20)。腎臓の虚血・低酸素状態を改善することにより、糖尿病性腎症の腎障害が軽減されると期待できるが、虚血・低酸素状態に対する治療方法は未だ開発されていない。本試験では虚血・低酸素状態の軽減をもたらす方法として、生体内で低酸素に対する防御反応を担うタンパク質であるHIFに注目した。HIFは通常酸素濃度では速やかに分解されるが、低酸素濃度やコバルト存在下ではその分解が抑制されることが知られている(21, 22)。第二章では、コバルト投与による糖尿病性腎症の腎障害に対する影響についての検討を通じて、HIF分解抑制作用が糖尿病性腎症治療のメカニズムとして有用であるかどうか評価を行った。

メグシンは、メサンギウム細胞に特異的に発現するセリンプロテアーゼインヒビターである(23, 24)。糖尿病性腎症患者の糸球体においてメグシンRNA量が増加すること(25)、メグシントランスジェニックマウスにおいて糸球体マトリックス増加が観察されること(26, 27)から、メグシンは糖尿病性腎症における糸球体マトリックス増加に関係していると推察される。糸球体マトリックスの分解にはMMP、プラスミンなどが関わっており、MMPはプラスミンにより活性化されることが知られている(28-31)。メグシンは、プラスミン活性の抑制作用を有しており(26)、この作用を介してMMPの活性化を抑制し、糸球体マトリックス分解能の低下を引き起こす可能性がある。第三章では、糖尿病性腎症における糸球体マトリックス増加に対するメグシンの影響と機序についての検討を通じて、メグシン阻害が糖尿病性腎症治療として有用であるかどうか評価を行った。

第一章から第三章全ての検討において、自然発症 II 型糖尿病性腎症モデルラットとして知られている SHR.Cg-Lepr^{op} /NDmcr (以下 SHR/NDmcr-*cp* と省略) (32-34) を用いた。SHR/NDmcr-*cp* は、SHR より派生したラットであり、本態性の高血圧を有する。またレプチン受容体に変異を有するためにレプチンシグナルが正常に機能せず、過食による肥満、さらに高血糖、高脂血症、高インスリン血症、インスリン抵抗性といった代謝異常を示す。SHR/NDmcr-*cp* が呈するこれらの代謝異常は、II 型糖尿病性腎症患者に多くみられる症状である。また SHR/NDmcr-*cp* では、糖尿病性腎症患者と同様に、尿中へのタンパク質排泄量の増加や、糸球体マトリックスの増加および間質領域の線維化といった組織学的変化が認められることが知られている (33-36)。糖尿病モデルラットとしては、STZ ラット、GK ラット、ZDF ラットなどが知られているが、自然発症であり II 型糖尿病性腎症患者と同様の代謝異常・腎臓組織変化を示す SHR/NDmcr-*cp* は、II 型糖尿病性腎症の研究を進める上で最も適したモデル動物と考え、本試験に利用した。

第一章では、インスリン抵抗性改善薬を投与して高インスリン血症を改善した SHR/NDmcr-*cp* と、インスリン製剤を投与して高インスリン血症をさらに悪化させた SHR/NDmcr-*cp* を作製し、これらの腎障害、腎機能、腎臓組織変化、腎障害関連因子について比較することにより、高インスリン血症による腎障害への影響とその機序について検討を行った。第二章では、HIF-1 α の分解抑制をもたらすコバルトを SHR/NDmcr-*cp* に投与し、HIF-1 α の分解抑制を介して虚血に対する腎臓の防御反応を亢進させることにより、糖尿病性腎症における腎臓虚血・低酸素状態および腎障害を軽減することが可能かどうか検討を行った。第三章では、糖尿病性腎症におけるメグシンの役割について検討するため、第一にメグシン RNA 量増加の機序を明らかにした。次にメグシンによる糸球体マトリックス増加の原因としてプラスミン、MMP-2、MMP-9 に注目し、糖尿病性腎症の糸球体マトリックス増加におけるメグシンの役割について検討を行った。

これら一連の検討から、糖尿病性腎症に対する新たな治療法を見出すことが本論文の主目的である。

第一章

高インスリン血症による腎障害と腎機能低下

【序 文】

インスリンの作用が低下した状態すなわちインスリン抵抗性と、それに伴う代償性の高インスリン血症は、II 型糖尿病患者に認められる耐糖能異常状態である。インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン系化合物を糖尿病性腎症患者に投与すると尿中タンパク質排泄量が低下することが知られているが、その際に尿中タンパク質排泄量と相関が見られるのは空腹時血中インスリン濃度であり、空腹時血糖値および HbA1c との相関は非常に弱いと報告されている (37, 38)。また、II 型糖尿病患者にインスリンを投与すると、一過性に尿中タンパク質排泄量が増加することも報告されている (39)。これまで高インスリン血症は、高血糖を引き起こす耐糖能異常と捉えられてきたが、これらの報告は高インスリン血症自体が腎臓に対して傷害性に働く可能性を示している (13, 14)。

インスリンは、尿細管でのナトリウム再吸収の促進やレニン-アンジオテンシン系 (RAS) の活性化を引き起こし、ナトリウム貯留による体液上昇、すなわち全身血圧の上昇をもたらすことが知られている (40-42)。高インスリン血症は、血圧上昇を介して腎障害性に働いている可能性が考えられるが、一方でナトリウム貯留や血圧上昇に依らない腎障害メカニズムが存在することも示唆されている (13)。このため本試験では、高インスリン血症が糖尿病性腎症における腎障害、腎機能低下に及ぼす影響とその機序を明らかにすることを目的として検討を行った。

本章では、高インスリン血症、高血糖、肥満、高脂血症、高血圧といったメタボリックシンドローム様症状を呈する II 型糖尿病性腎症モデルラット SHR/NDmcr-*cp* を用いて、チアゾリジン系化合物ピオグリタゾンもしくはインスリン製剤の 26 週間反復投与を行った。SHR/NDmcr-*cp* の高インスリン血症状態をさらに悪化させた群としてインスリン製剤投与群を設定し、また高インスリン血症を改善させた比較対象群としてピオグリタゾン投与群を設定し、腎障害および腎機能に対する影響について比較検討を行った。腎障害は、尿中タンパク質排泄量、糸球体マトリックスの増加量、間質線維性変化の度合いを指標として評価した。また腎機能すなわち腎臓の糸球体濾過機能の評価には、イヌリンクリアランスの代替として用いられているクレアチニンクリアランスを用いた。

さらに高インスリン血症による腎障害および腎機能低下の機序を解明するために、TGF- β 、酸化ストレス、AGE についてそれぞれ検討した。TGF- β は、糸球体マトリックス増加および間質線維化の双方の組織変化をもたらすサイトカインであり、糖尿病性腎症における腎障害の中心を担う因子の一つと考えられている (43, 44)。酸化ストレスは、生体内の活性酸素種の上昇によりもたらされる細胞傷害性のストレスであり、炎症性サイトカインや線維化因子といった腎障害性因子を誘導すると考えられている (45)。糖化および酸化的修飾を受けたタンパク質の総称である AGE は、細胞毒性や炎症惹起作用を有しており、糖尿病性腎症の腎臓中に蓄積することが知られている (46-48)。

本章では、以上の検討を通じて、高インスリン血症が糖尿病性腎症における腎障害および腎機能に対して及ぼす影響とその機序について述べる。

【材料および方法】

1. 動物実験プロトコール

本研究における動物実験は、東海大学動物倫理委員会の指針に従って計画し、同委員会の承認のもとに倫理的配慮を持って行った。II 型糖尿病性腎症モデルラットである 13 週齢の雄性 SHR/NDmcr-*cp* ラット（日本エスエルシー、静岡）は無作為に 3 群に分け、それぞれ病態対象（溶媒経口投与）群（DM+V, n = 10）、ピオグリタゾン（3 mg/kg/day）経口投与群（DM+PGZ, n = 10）、インスリン（30 U/kg、1 日 2 回）皮下投与群（DM+I, n = 9）とした。また正常対象群として、13 週齢の雄性 WKY ラット（日本エスエルシー）に溶媒経口投与を実施した（WKY, n = 10）。薬剤は 26 週間反復投与を行った。

収縮期血圧は投与開始前、開始 2 週後、4 週後、その後 4 週おきに 26 週後まで、テールカフ法にて覚醒下で測定した。血漿サンプル、代謝ケージを用いた 24 時間蓄尿サンプルは、投与開始前、開始 2 週後、4 週後、その後 4 週おきに 26 週後まで採取を行った。血漿中のグルコース、総コレステロール、トリグリセライド、尿中の総タンパク質、クレアチニンの濃度はオートアナライザ（日立サイエンスシステム、東京）を用いて、血漿インスリン濃度は ELISA キット（森永生化学研究所、神奈川）を用いて、HbA1c は DCA2000 キット（バイエルメディカル、大阪）を用いてそれぞれ測定した。

2. 腎臓組織学的評価

腎臓組織を、100%メタノール、クロロホルム、氷酢酸を 6:3:1 で混合したメチルカルノア溶液を用いて固定し、パラフィン包埋した後、薄切片を作製し、PAS 染色を行った。細胞核はヘマトキシリンにて染色した。PAS 染色標本を光学顕微鏡にて観察し、糸球体の PAS 陽性領域の割合すなわち糸球体マトリックス量を評価した。1 個体につき無作為に選択した 50 の糸球体に対し、糸球体の PAS 陽性領域の割合に従い 0 から 4 の 5 段階のスコアを付与し、50 の糸球体のスコアの平均値を個体の糸球体マトリックススコアとした (35, 36)。

また、腎臓組織を 10%ホルマリン溶液にて固定し、パラフィン包埋した後、薄切片

を作製し、マッソントリクローム染色を行った。細胞核はヘマトキシリンにて染色した。マッソントリクローム染色標本を光学顕微鏡にて観察し、間質線維化の評価を行った。1 個体につき無作為に選択した 10 視野の皮質領域について 200 倍視野にてデジタル画像を取得し、間質のマッソントリクローム陽性領域を Image-Pro Plus ソフトウェア（プラネトロン、東京）を用いて測定し、画像全体における陽性領域の割合を算出した。10 の陽性領域割合の平均値を個体の間質線維化スコアとした。

3. 腎臓組織および培養細胞中の RNA 量測定

リアルタイム PCR 法を用いて組織および細胞中の RNA 量を測定した。凍結ラット腎臓皮質組織および IRPTC 細胞より RNeasy キット (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA サンプルおよび One step RT-PCR キット (タカラバイオ、滋賀) を用いて逆転写・PCR 反応を行い、iCycler PCR システム (Bio-Rad Japan、東京) にて SYBR Green I 色素を検出し RNA 量を算出した。PCR 反応には以下のプライマーセットを用いた。GAPDH を内部標準とし、それぞれの RNA 量を GAPDH RNA 量で補正した値を相対 RNA 量として評価に用いた。

TGF- β	Forward primer	5'-TGCGCCTGCAGAGATTCAAG-3'
	Reverse primer	5'-AGGTAACGCCAGGAATTGTTGCTA-3'
	GenBank accession No.	NM_021578
Nox2	Forward primer	5'-CGGGACTTCGGACCCATATTC-3'
	Reverse primer	5'-ATTCCTGTGATGCCAGCCAAC-3'
	GenBank accession No.	NM_023965
p47 ^{phox}	Forward primer	5'-CCACGGGTATTGCTAGGATGAGA-3'
	Reverse primer	5'-AGACTAAGGCAGCGGGTAATCAGA-3'
	GenBank accession No.	NM_053734
GAPDH	Forward primer	5'-GACAACCTTTGGCATCGTGGA-3'
	Reverse primer	5'-ATGCAGGGATGATGTTCTGG-3'
	GenBank accession No.	XM_001070609

4. 培養細胞実験

雄性 Wistar ラットの近位尿細管由来の培養細胞 (IRPTC) (49) を用いて実験を行った。IRPTC は 10%ウシ胎児血清添加ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用いて 80%密度まで培養し、その後 0, 5, 50, 500 ng/ml のインスリンを含む無血清 DMEM に培地を交換し、さらに 48 時間培養した (n = 9)。培養上清を回収し、遠心により細胞破砕物を除去した後、TGF- β ELISA キット (R&D systems, Minnesota, US) を用いて培養上清中 TGF- β タンパク質濃度を測定した。また上清回収後の細胞から RNeasy キット (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて RNA を抽出し、TGF- β RNA 量を測定した。

5. 腎臓組織中のペントシジン量測定

腎臓組織中のペントシジン含有量の測定は、既報の方法に従って実施した (35, 36)。100 mg の凍結腎臓組織を粉碎し、10%トリクロロ酢酸で洗浄し乾燥させた後、16 時間 110 °C の条件下で塩酸にて加水分解した。PBS にて希釈した 20 μ l の加水分解サンプルを C18 逆相カラム高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて分離し、335/385 nm のピークをペントシジンとして、蛍光検出器 RF-10A (島津製作所、京都) にて検出した。測定の標準対象として、合成ペントシジンを用いた。測定下限は 10 fmol/mg tissue であった。

6. データ解析

データは全て平均値 \pm 標準誤差で示した。血中インスリン濃度は常用対数に変換した値を解析に用いた。各群の比較は、one-way analysis of variance (ANOVA) および Tukey の両側検定を用いた。相関係数の算出は Spearman 相関検定を用いた。P < 0.05 を有意差ありとした。

【結 果】

1. インスリン、体重、血糖、脂質および血圧に対するピオグリタゾン、インスリン製剤の影響

表 1-1 に示すように、II 型糖尿病性腎症モデルラット SHR/NDmcr-*cp* (DM+V) 群のインスリン値は WKY 群に対して約 40 倍と著しく高値であり、また体重、血糖、HbA1c、総コレステロール、血圧は、WKY 群に対して 1.3 倍から 1.5 倍の高値であった。これらの結果から、SHR/NDmcr-*cp* は高インスリン血症、肥満、高血糖、高脂血症、および高血圧を呈していることが明らかになった。

本章では、高インスリン血症の改善もしくは悪化を目的として、SHR/NDmcr-*cp* に対しピオグリタゾンもしくはインスリン製剤の投与を 26 週間行った。ピオグリタゾン投与 (DM+PGZ) 群のインスリン値は、WKY と同等程度に低値であり、高インスリン血症の著明な改善がもたらされた。一方、インスリン投与 (DM+I) 群のインスリン値は、WKY 群に対して約 300 倍、DM+PGZ 群に対して約 100 倍、DM+V 群に対して約 8 倍と極めて高値を示した。

体重は、DM+PGZ 群では DM+V 群に対して高値であったが、DM+I 群では DM+V 群と同等であった。DM+PGZ 群では、血糖値は DM+V 群と同等であるが、HbA1c は DM+V 群に対して有意に低値であった。一方 DM+I 群の血糖値および HbA1c は、DM+V 群と比較して著明に低値であり、DM+PGZ 群に対しても有意に低値であった。また、DM+PGZ 群および DM+I 群の総コレステロール値は正常レベルであったが、DM+PGZ 群においてより低値を示した。トリグリセライド値は、DM+PGZ 群と DM+I 群において同等であり、これらは DM+V 群と比較して有意に低値であった。ピオグリタゾンおよびインスリンによる血圧への明瞭な影響は認められなかった。

以上より、DM+PGZ 群は正常レベルのインスリン値であったが、DM+I 群は DM+V 群を遥かに上回る高インスリン血症を示し、DM+PGZ 群のインスリン値の約 100 倍に達することが明らかになった。また血糖コントロールは DM+I 群において DM+PGZ 群よりも良好であることが示された。次に、腎障害の指標である尿中タンパク質排泄量、

腎機能の指標であるクレアチンクリアランス、さらに腎臓の組織変化について評価した。

2. 糖尿病性腎症の腎障害に対するピオグリタゾン、インスリン製剤の影響

図 1-1 に試験期間中の尿中タンパク質排泄量の推移を示す。DM+V 群は時間経過とともに直線的に尿中タンパク質排泄量が増加し続けることが明らかになった。DM+PGZ 群においては、WKY 群とほぼ同等の尿中タンパク質排泄量であり、DM+V 群と比較して投与期間を通じて著しく低値であった。DM+I 群の尿中タンパク質排泄量は、投与開始 8 週間までは WKY 群と同程度であったが、それ以後 DM+V 群の尿中タンパク質排泄量の増加を追いかけるように増加し続けた。投与終了時の DM+I 群の尿中タンパク質排泄量は、DM+V 群に対して低値であるが有意差は認められず、DM+PGZ 群および WKY 群に対しては有意に高値であった。

図 1-2 に示すように、DM+V 群のクレアチンクリアランスは、WKY 群の約 60% と低値であり、DM+V 群の糸球体濾過機能が低下していることが示された。DM+PGZ 群のクレアチンクリアランスは DM+V 群の約 1.2 倍と有意に高値であったが、一方 DM+I 群のそれは DM+V 群と同程度であった。

さらに、投与終了時の各群の典型的な糸球体 PAS 染色写真、ならびに糸球体マトリックスの増加を 5 段階で評価しスコア化した値を示す (図 1-3)。糸球体分節性硬化、すなわち糸球体マトリックスが連続的かつ分節性に増加する変化は、糖尿病性腎症に認められる糸球体組織変化であり、尿中へのタンパク質漏出の一因と考えられている (50, 51)。既報 (35, 36) と同様に、DM+V 群 (図 1-3b) の糸球体においては矢印で示すように糸球体分節性硬化が認められたが、WKY 群 (図 1-3a) では全く認められず、DM+V 群の糸球体マトリックススコア (0.95 ± 0.05 , $n = 10$) は、WKY 群 (0.14 ± 0.02 , $n = 10$) の約 7 倍と極めて高値であった (図 1-3e)。DM+PGZ 群 (図 1-3c) の糸球体では分節性硬化はほとんど観察されず、その糸球体マトリックススコア (0.38 ± 0.02 , $n = 10$) は、DM+V 群の約 40% と低値であった (図 1-3e)。DM+I 群 (図 1-3d) では DM+V

群と同様に分節性硬化変化が認められ、その糸球体マトリックススコア (0.78 ± 0.02 , $n = 9$) は DM+V 群に対して有意に低値であったが、DM+PGZ 群の約 2 倍と高値であり、DM+PGZ 群と DM+I 群の間には明らかな差が認められた (図 1-3e)。

同様に両群のラットの腎尿細管間質領域のマッソントリクローム染色の典型的な組織像と、これに基づいてスコア化した各群の間質領域の線維性変化を示す (図 1-4)。DM+V 群 (図 1-4b) の尿細管間質領域においては、広範囲に渡りマッソントリクローム染色で青く染色された領域、すなわち間質の線維化が観察されたが、WKY 群 (図 1-4a) では線維性変化はほとんど認められず、DM+V 群の間質線維化スコア ($13.2\% \pm 0.7\%$, $n = 10$) は WKY 群 ($1.8\% \pm 0.2\%$, $n = 10$) の約 7 倍と著しく高値であった。DM+PGZ 群 (図 1-4c) では間質の線維性変化はほとんど観察されず、そのスコア ($3.8\% \pm 0.3\%$, $n = 10$) は、DM+V 群の約 30%と低値であった (図 1-4e)。DM+I 群 (図 1-4d) では DM+V 群と同様に間質の線維化が認められ、そのスコア ($9.7\% \pm 1.0\%$, $n = 9$) は DM+V 群に対して有意に低値であったが、DM+PGZ 群の約 2.5 倍と高値であり、糸球体マトリックススコアと同様に DM+PGZ 群と DM+I 群の間には明らかな差が認められた (図 1-4e)。

これらの結果は、DM+PGZ 群では腎障害および腎機能低下が強く抑制されたが、DM+I 群ではほとんど抑制されなかったことを示すものであった。これらの差は血中インスリン値に起因すると想定されるが、高インスリン血症による腎障害の機序を検討するため、次に糖尿病性腎症の腎障害の一因と考えられている腎臓中の TGF- β RNA 量、酸化ストレス、AGE 含有量を測定した。

3. 腎臓組織中の TGF- β RNA 量、酸化ストレス、および AGE 量に対するピオグリタゾン、インスリン製剤の影響

TGF- β は線維性変化をもたらすサイトカインであり、糖尿病性腎症における腎障害・腎機能低下の主要な原因の一つとして考えられている腎障害性因子である (43, 44)。図 1-5 に示すように、DM+V 群の腎臓組織中の TGF- β RNA 量は、WKY 群のそれに対

して約2倍と有意に高値であった。DM+PGZ群のTGF- β RNA量は、DM+V群に対して約30%と著しく低値であったが、一方DM+I群ではDM+V群の約70%と低値傾向であったが有意差は認められなかった。さらに、DM+PGZ群のTGF- β RNA量に対して、DM+I群のそれは約2倍と高値であり、その差は統計学的に有意であった。このことは、高インスリン血症による腎障害の機序としてTGF- β が関係することを示唆している。

そこで、TGF- β 発現量に対するインスリンの影響を、近位尿細管由来培養細胞IRPTCをモデルに用いて検討した。図1-6に示すとおり、IRPTC細胞にインスリンを加えて48時間培養したところ、インスリン濃度依存的なTGF- β RNA量およびTGF- β タンパク質量の増加が認められ、DM+I群の血中インスリンレベルに相当する500 ng/mlのインスリン刺激では、無添加時に比べてTGF- β RNA量は約2倍、TGF- β タンパク量は約15%増加した。これらの結果は、高インスリン血症によりTGF- β の発現が増加することを示しており、高インスリン血症が腎臓に対して傷害的に働く機序が明らかになった。

また、糖尿病性腎症の腎臓組織に認められる活性酸素種の産生上昇すなわち酸化ストレスの増大は、腎障害をもたらすと考えられており(45)、NADPH oxidaseサブユニットであるNox2およびp47phoxの組織中のRNA量は酸化ストレスの指標となり得る(52, 53)。図1-7に示すとおり、DM+V群のNox2 RNA量およびp47phox RNA量は、WKY群のそれらに対してそれぞれ約4倍、約1.6倍と有意に高値であった。DM+PGZ群のNox2 RNA量およびp47phox RNA量は、DM+V群のそれらに対してそれぞれ約15%、約50%と有意に低値であり、またDM+I群においても、DM+V群のそれらに対してそれぞれ約50%と有意に低値であった。DM+PGZ群の酸化ストレスとDM+I群のその間には有意差は認められず、高インスリン血症による腎障害が酸化ストレスの亢進によるものである可能性は低いと考えられた。

これまでに分子構造が解明されたAGEとしては、カルボキシメチルリジン、ペントシジン、イミダゾロン、クロスリン、ピラリンなどが挙げられる。中でも、糖尿病性腎症患者およびモデル動物の腎臓にペントシジンが蓄積すること(48)、腎臓中のペントシジン含有量と尿中タンパク質排泄量が相関すること(36)から、本章ではペントシジ

ンを AGE の指標として用いた。図 1-8 に示すとおり、DM+V 群においては腎臓組織 1 mg あたり約 60 fmol のペントシジンが含まれており、WKY 群のそれと比較して約 1.5 倍と有意に高値であった。これは既報 (35, 36) の成績に一致するものである。一方、DM+PGZ 群および DM+I 群においては、DM+V 群と比較して腎臓組織中のペントシジン量は約 75% と有意に低値であった。DM+PGZ 群と DM+I 群のペントシジン量は同程度であることから、高インスリン血症による腎障害が腎臓中ペントシジンの増加に起因する可能性は低いと考えられた。

表 1-1 投与終了時のインスリン、体重、血糖値、HbA1c、総コレステロール、トリグリセライド、および血圧

	WKY	DM+V	DM+PGZ	DM+I
Number	10	10	10	9
Insulin (ng/ml)	1.6 ± 0.1	60.1 ± 10.5 ^{###}	5.4 ± 0.6 ^{***}	472.2 ± 41.7 ^{***††}
Body weight (g)	500 ± 3	672 ± 17 ^{###}	760 ± 10 ^{***}	690 ± 37
Glucose (mg/dl)	120 ± 2	167 ± 5 ^{###}	167 ± 8	112 ± 11 ^{***††}
HbA1c (%)	3.3 ± 0.0	5.3 ± 0.3 ^{###}	4.1 ± 0.1 ^{***}	3.3 ± 0.2 ^{***††}
Total cholesterol (mg/dl)	128 ± 3	186 ± 10 ^{###}	67 ± 4 ^{***}	132 ± 8 ^{***††}
Triglyceride (mg/dl)	39 ± 2	407 ± 44 ^{###}	223 ± 25 ^{**}	221 ± 42 ^{**}
Systolic blood pressure (mmHg)	139 ± 3	170 ± 4 ^{###}	180 ± 6	178 ± 6

値は平均値±標準誤差で示す。^{###}は DM+V と WKY の間で P < 0.001、^{**}ならびに^{***}は DM+PGZ もしくは DM+I と DM+V の間で P < 0.01 あるいは P < 0.001、^{††}ならびに^{***††}は DM+PGZ と DM+I の間で P < 0.01 あるいは P < 0.001 であることを示す。

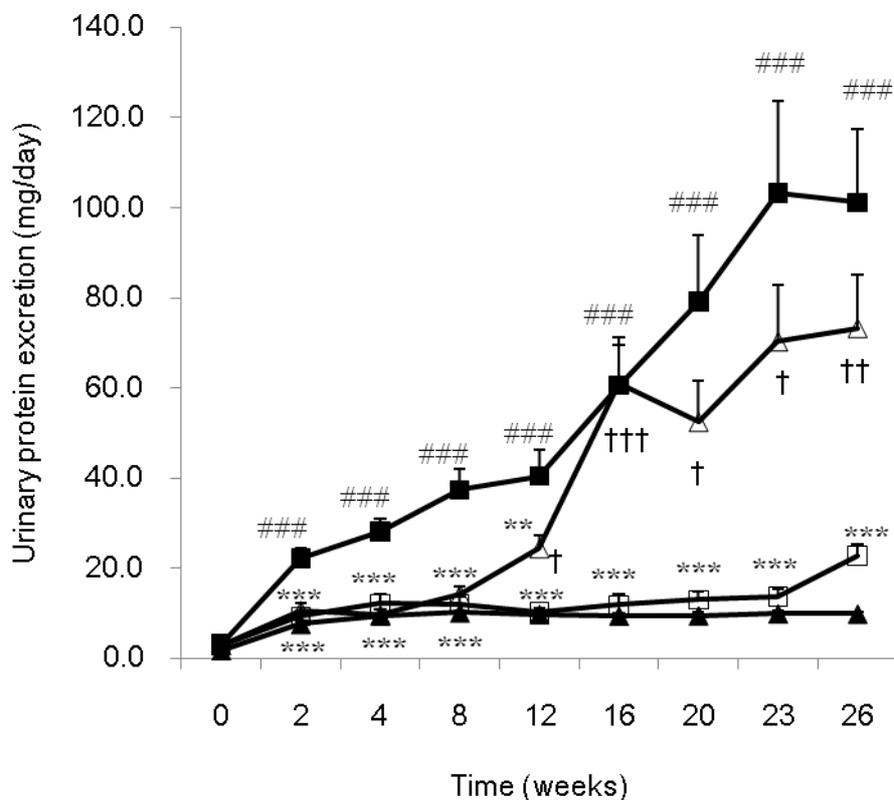


図 1-1 尿中タンパク質排泄量の変動

▲：WKY 群、■：DM+V 群、□：DM+PGZ 群、△：DM+I 群の実験期間中の尿中タンパク質排泄量の変動を示す。###は DM+V と WKY の間で $P < 0.001$ 、**ならびに***は DM+PGZ もしくは DM+I と DM+V の間で $P < 0.01$ あるいは $P < 0.001$ 、†、††ならびに†††は DM+PGZ と DM+I の間で $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ あるいは $P < 0.001$ であることを示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (WKY, DM+V, DM+PGZ: $n = 10$, DM+I: $n = 9$)。

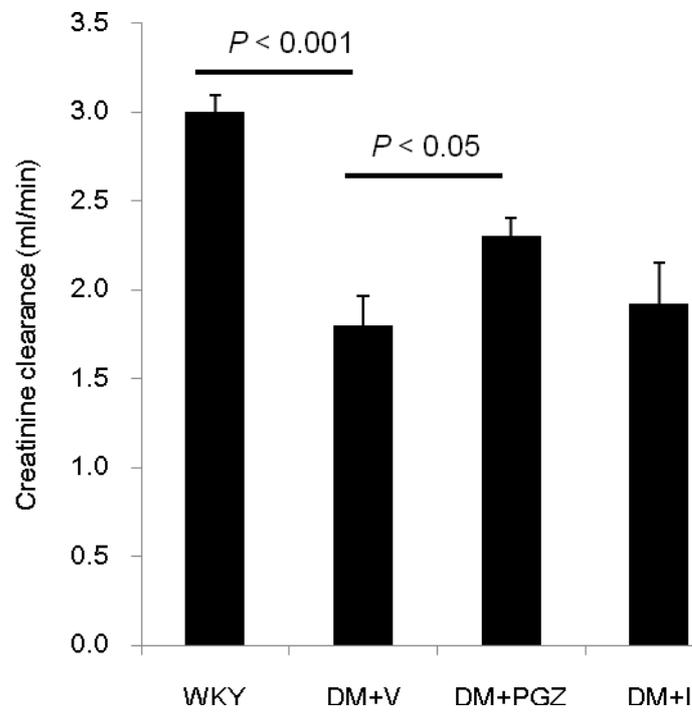


図 1-2 投与終了時のクレアチニンクリアランス

26 週間の投与終了時の各群のクレアチニンクリアランスを示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (WKY, DM+V, DM+PGZ: n = 10, DM+I: n = 9)。

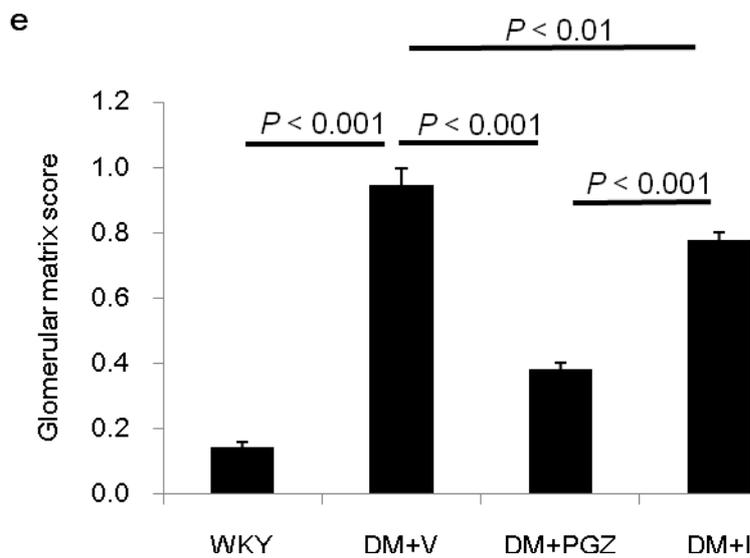
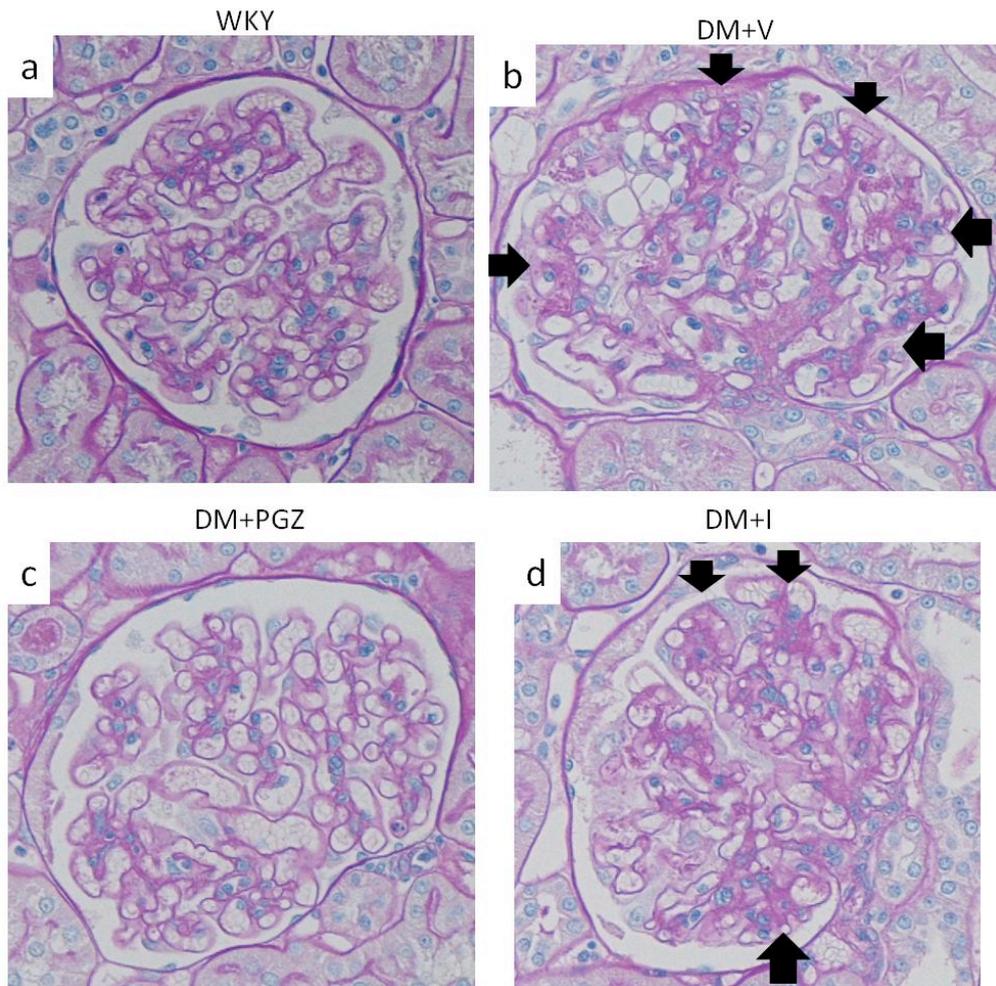


図 1-3 糸球体組織像および糸球体マトリックススコア

各群の典型的な糸球体 PAS 染色写真 (a-d、倍率 400 倍) および算出したマトリックススコア (e) を示す。糸球体内の濃赤染色部分が糸球体マトリックスであり、矢印は分節性糸球体硬化病変を示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (WKY, DM+V, DM+PGZ: n = 10, DM+I: n = 9)。

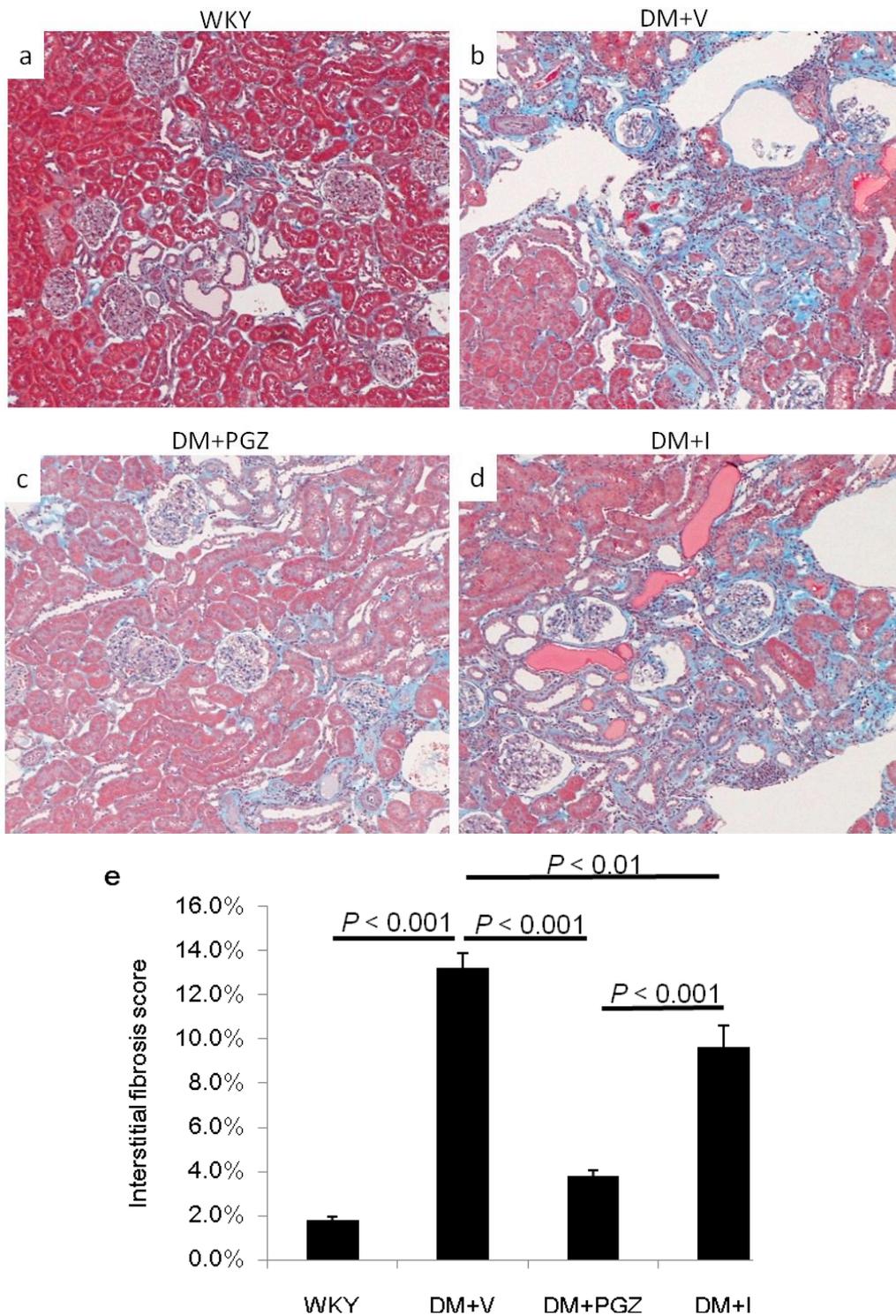


図 1-4 尿細管間質領域の組織像および間質線維化スコア

各群の典型的な尿細管間質領域のマッソントリクローム染色写真 (a-d、倍率 200 倍) および算出した間質線維化スコア (e) を示す。線維性タンパク質はマッソントリクローム染色により青く染まっている。グラフは平均値±標準誤差で示す (WKY, DM+V, DM+PGZ: n = 10, DM+I: n = 9)。

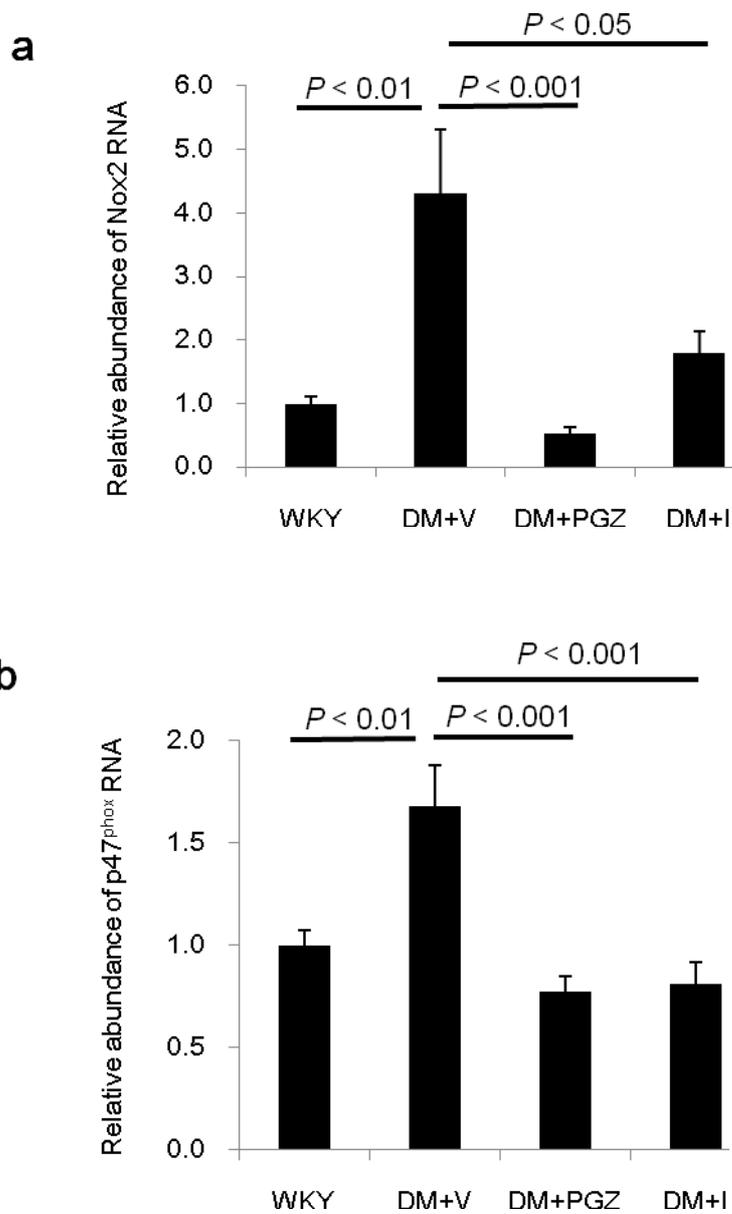


図 1-5 腎臓組織中の Nox2 ならびに p47phox RNA 量

各群の腎臓組織中の Nox2 (a)、p47^{phox} (b) の RNA 量を GAPDH のそれで補正した相対量で示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (WKY, DM+V, DM+PGZ: n = 10, DM+I: n = 9)。

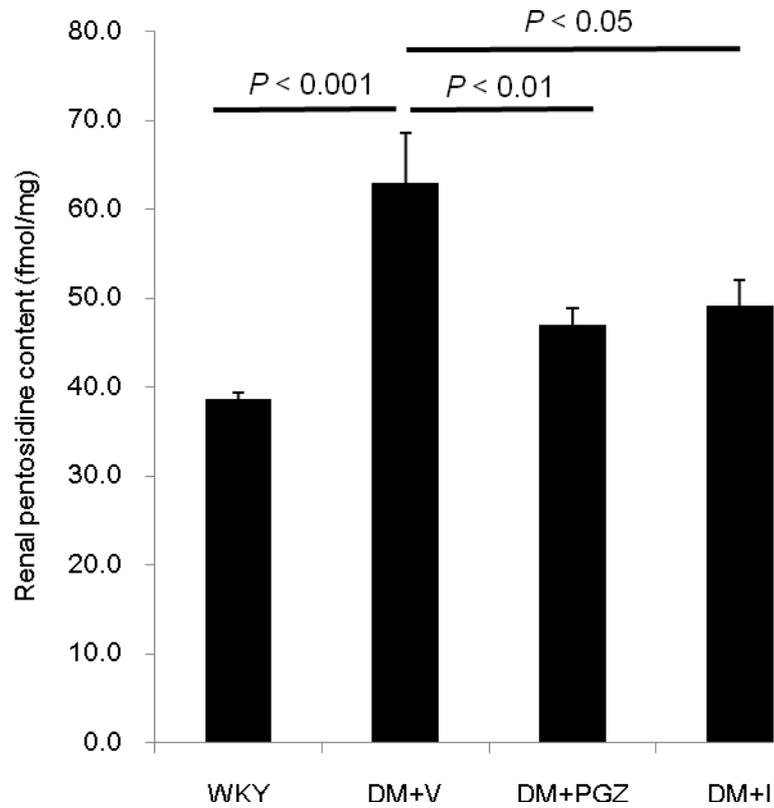


図 1-6 腎臓組織中のペントシジン量

各群の腎臓組織タンパク質 1 mg 中のペントシジン量を示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (WKY, DM+V, DM+PGZ: n = 10, DM+I: n = 9)。

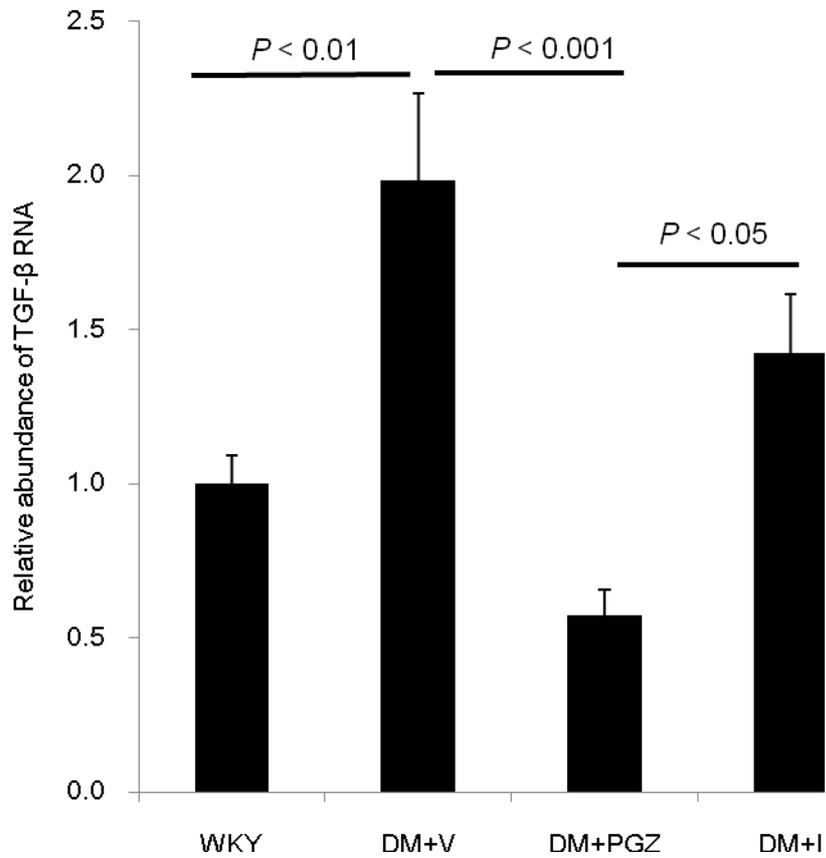


図 1-7 腎臓組織中の TGF-β RNA 量

腎臓組織中の TGF-β RNA 量を GAPDH のそれで補正した相対量で示す。グラフは平均値 ± 標準誤差で示す (WKY, DM+V, DM+PGZ: n = 10, DM+I: n = 9)。

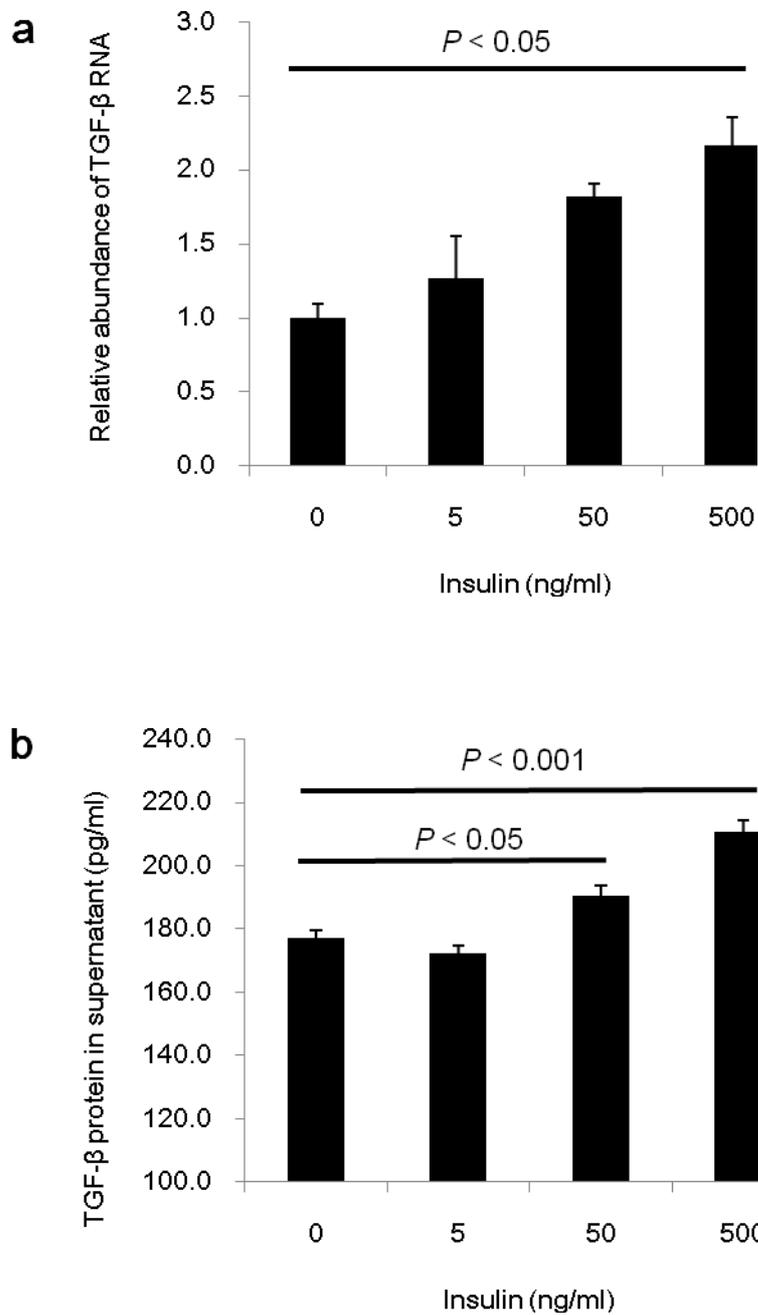


図 1-8 インスリン刺激 IRPTC における TGF-β RNA 量および TGF-β タンパク質量

インスリン添加条件下で培養した IRPTC の、TGF-β RNA 量を GAPDH のそれで補正した相対量 (a)、および培養上清中の TGF-β タンパク質量 (b) を示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (n = 9)。

【考 察】

本章では、高インスリン血症が糖尿病性腎症における腎障害因子として働くかどうかを検討するため、血中インスリン値が正常レベルの DM+PGZ 群と、血中インスリン値が DM+PGZ 群の約 100 倍、DM+V 群に対しても約 8 倍と高値の DM+I 群（表 1-1）の腎障害について、尿中タンパク質排泄量（図 1-1）、クレアチニンクリアランス（図 1-2）、糸球体マトリックススコア（図 1-3）、および間質線維化スコア（図 1-4）を指標として比較を行った。その結果、DM+PGZ 群ではこれら腎障害の指標は全て改善したのに対し、DM+I 群ではほとんど改善が認められず、高インスリン血症が腎障害性に働いたと考えられた。また、DM+I 群の腎臓中の TGF- β RNA 量は DM+V 群と有意差はなく、DM+PGZ 群と比較して有意に高値であった（図 1-5）。TGF- β は、糖尿病性腎症の腎障害における中心的な役割を果たすサイトカインであることが数多くの研究から明らかにされており（43, 44, 54, 55）、TGF- β の発現増加が高インスリン血症による腎障害メカニズムの一つと考えられた。

TGF- β は腎臓においては主に近位尿細管で産生されることが知られている（51, 52）。本章では高インスリン状態により近位尿細管における TGF- β の発現増加がもたらされることを明らかにし、高インスリン血症による腎障害のメカニズムの一つが TGF- β の発現増加であることを裏付けた。これは、ラット近位尿細管由来の培養細胞である IRPTC において、インスリン濃度依存的に TGF- β RNA 量および TGF- β タンパク質量が増加した結果（図 1-6）に基づいている。一方、ヒト尿細管由来の HK-2 細胞を用いた検討では、インスリンにより TGF- β RNA 量は増加するが TGF- β タンパク質量は変化しないと報告されており（56）、タンパク質については本章の結果（図 1-6b）と異なる。しかし、本章で示した最大で約 15% の TGF- β タンパク質量の増加（図 1-6b）は、既報（56）の Western Blotting 法での検出は困難であることから、既報は本章の結果を否定するものではない。また、インスリンによる TGF- β 発現増加の分子メカニズムは未だ明らかになっておらず、今後の検討が必要である。

本章の一連の結果は、高インスリン血症が糖尿病性腎症における腎障害因子であることを示しており、高インスリン血症そのものや、高インスリン血症の原因であるイン

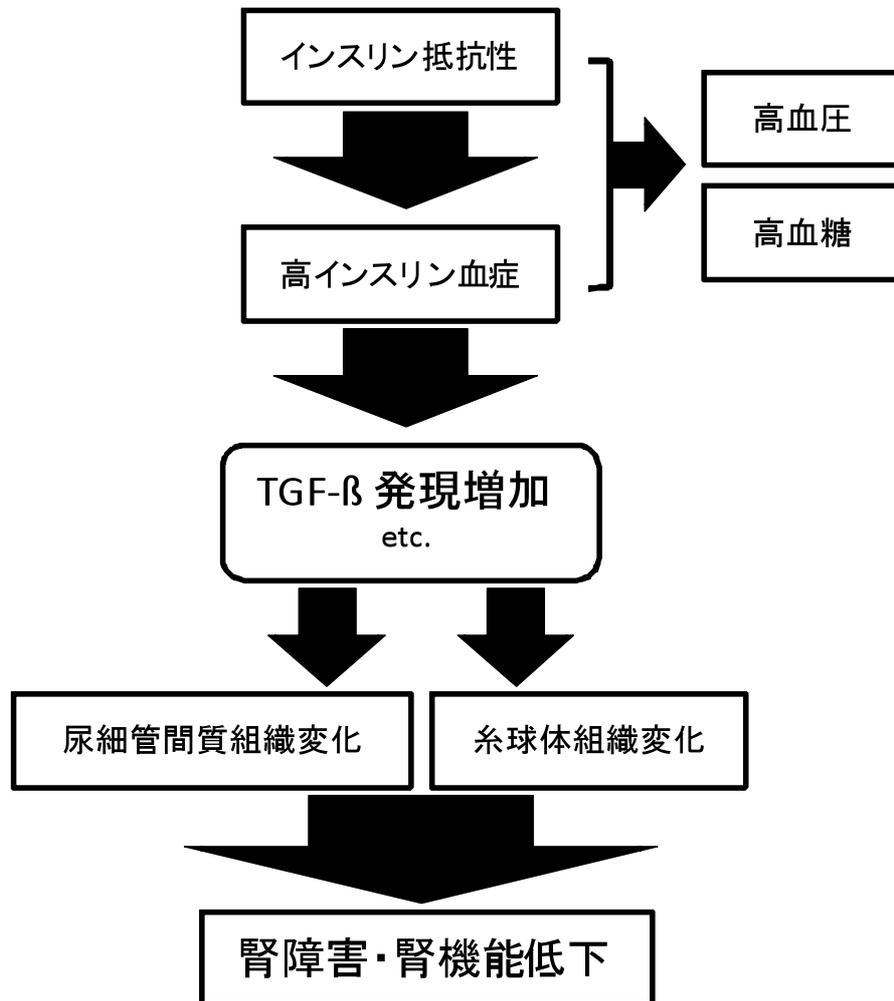
スリン抵抗性を改善する薬剤は、糖尿病性腎症の治療に有用であることを示唆する。本章で用いたピオグリタゾンに代表されるチアゾリジン系化合物は、インスリン抵抗性に対する強い改善作用を有するが、一方で心臓や肝臓に対する強い副作用を有することが知られている。このため例えば、心・肝などの他臓器に対する副作用の弱い次世代のチアゾリジン誘導体は、安全性の高い、臨床の場で使いやすい糖尿病性腎症の治療薬となると期待される。

インスリンはナトリウム貯留・血圧上昇をもたらすことが知られており、高インスリン血症による腎障害メカニズムとしてこれらの作用が関係していると想定されている(40-42)。しかし、DM+V 群、DM+PZG 群ならびに DM+I 群の血圧に差が認められていない(表 1-1)ことから、本試験では高インスリン血症による腎障害について血圧の関与は小さいと考えられる。糖尿病性腎症患者においても、高インスリン血症・腎障害と血圧の間には明らかな関係は認められていないこと(13)から、高インスリン血症による腎障害には、血圧上昇以外のメカニズム、すなわち本章で示した TGF- β 発現増加がより強く関与していると考えられる。

さらに本研究では、インスリン投与により酸化ストレスやペントシジン蓄積といった腎障害性因子の抑制がもたらされたことが、Nox2 RNA 量(図 1-7a)、p47^{phox} RNA 量(図 1-7b)、ペントシジン含有量(図 1-8)のデータから明らかになった。これは、高インスリン血症による腎障害の機序に、酸化ストレスやペントシジンが関係する可能性は低いことを示している。また、これらの抑制はインスリン製剤による血糖値の正常化(表 1-1)によりもたらされたと考えられ(45-48)、本結果は血糖コントロールによる糖尿病性腎症の治療メカニズムの一端を示す知見である。

Schema 2 に本章の結果より得られた知見をまとめて示す。高インスリン血症は腎臓の TGF- β の発現増加を機序として、糸球体マトリックス増加や間質線維化といった腎臓組織の線維性変化をもたらし、糖尿病性腎症に対して傷害性に働くことが明らかになった。インスリン抵抗性ならびにそれにより代償的に引き起こされる高インスリン血症は、II 型糖尿病性腎症において多く見られる代謝異常であることから、糖尿病性腎症の治療において重要なターゲットであると考えられる。今後、高インスリン血症そのもの

や、高インスリン血症の原因であるインスリン抵抗性を改善する薬剤の開発により、糖尿病性腎症の新たな治療法がもたらされると期待される。



Schema 2

高インスリン血症による腎障害・腎機能低下の概念図

【小 括】

インスリン抵抗性およびそれに伴う代償的な高インスリン血症は、II型糖尿病性腎症に多く認められる耐糖能異常である。近年高インスリン血症がII型糖尿病性腎症における腎障害に関わる可能性が示され注目されているが、高インスリン血症による腎障害のメカニズムは明らかにされていない。本章では、高インスリン血症が糖尿病性腎症に及ぼす影響とその機序を明らかにすることを目的とし、II型糖尿病性腎症モデルラット SHR/NDmcr-*cp* に対してピオグリタゾンもしくはインスリン製剤を投与し、腎障害および腎機能に対する影響について比較検討を行い、以下の知見を得た。

SHR/NDmcr-*cp* (DM+V) 群は高インスリン血症を示したが、ピオグリタゾン投与 (DM+PGZ) 群では血中インスリン値は WKY 群と同等の正常レベルを示した。一方、インスリン投与 (DM+I) 群の血中インスリン値は DM+V 群に対して約 8 倍と極めて高値を示し、高インスリン血症の大幅な悪化が認められた。DM+V 群で認められた尿中タンパク質排泄量の増加、クレアチニンクリアランスの低下、糸球体・間質の組織変化は、DM+PGZ 群においては著明に抑制されたが DM+I 群ではほとんど抑制されず、高インスリン血症が腎障害性に働いたことが示された。

高インスリン血症による腎障害のメカニズムとして、糖尿病性腎症における腎障害の一因と考えられる酸化ストレス、ペントシジン、TGF- β について検討した。酸化ストレス、ペントシジン量は DM+PGZ 群と DM+I 群で同程度であったが、DM+I 群の腎臓中 TGF- β RNA 量は DM+PGZ 群に対して約 2 倍と有意に高値であった。さらにラット近位尿細管由来の培養細胞 IRPTC をモデルとして、インスリン濃度依存的に TGF- β RNA および TGF- β タンパク質が増加することが示された。これらの結果より、高インスリン血症は腎臓における TGF- β の発現増加を機序として腎障害性に働くことが明らかになった。

以上より、高インスリン血症およびその原因であるインスリン抵抗性は、糖尿病性腎症の重要な治療ターゲットであり、これらの改善薬は糖尿病性腎症の新たな治療法となると期待される。

第二章

HIF-1 α 分解抑制による虚血・低酸素障害の軽減と
腎保護作用

【序 文】

第一章では、糖尿病性腎症の腎障害に関わる基礎因子として高インスリン血症に着目した。本章では、各種代謝異常により二次的に引き起こされる因子として腎臓虚血・低酸素障害に着目し、虚血・低酸素障害の軽減により糖尿病性腎症の腎障害が抑制されるか検討を行った。

尿細管は腎臓における再吸収および分泌を担っており、トランスポーターやチャネルによる能動輸送のエネルギー源として ATP、酸素を多量に消費する組織である。尿細管への酸素供給は、糸球体輸出細動脈よりつながる尿細管周囲毛細血管網が主に担っており、その血管内には糸球体でろ過を受けた後の血液が流れている。糖尿病性腎症において糸球体が傷害を受けると、糸球体に対する流入血流量が低下することにより、それに続く尿細管周囲毛細血管網の血流量低下が引き起こされ、結果的に尿細管とその周囲の間質領域の虚血状態がもたらされる (15, 16)。尿細管および間質領域における虚血、すなわち低酸素状態は、尿細管細胞の線維性変化や間質領域の線維芽細胞の増加、さらに炎症性細胞の浸潤を引き起こすことにより腎臓の線維化をもたらし、結果的に糖尿病性腎症の腎機能低下の一因となると考えられている (57, 58)。また、尿細管間質領域において線維性変化が起こると、尿細管周囲毛細血管網が圧迫され閉塞することにより虚血が亢進する、いわゆるネガティブループが引き起こされると考えられている (17-20)。したがって、腎臓の虚血・低酸素状態を改善することにより、糖尿病性腎症における腎障害が軽減されることが期待されるが、腎臓虚血の改善をもたらす薬剤は未だ開発されていない。

本章では腎臓虚血を改善する方法として、生体において虚血に対する防御反応を担っている HIF に注目した。通常酸素濃度条件下では、HIF はプロリル水酸化酵素による水酸化を受けた後、von Hippel Lindau tumour suppressor protein により認識されてユビキチン化され、速やかにプロテアソームにより分解される。一方で低酸素濃度条件下においては、HIF は水酸化による分解過程を経ずに核内へ移行し、細胞が低酸素状態に対応することができるようにエリスロポエチンや VEGF、HO-1 の遺伝子発現を増

加させる (21)。

コバルトは HIF のユビキチン化分解を抑制し核内移行を促進することが知られている (22)。本試験は、コバルトによる HIF の分解抑制により、糖尿病性腎症における腎臓虚血・低酸素状態および腎障害を軽減することが可能かどうか明らかにすることを目的とした。II 型糖尿病性腎症モデルラット SHR/NDmcr-*cp* にコバルトの 26 週間反復投与を行い、腎障害への影響を評価した。また、腎障害の機序を解明するために、糖尿病性腎症の腎障害に関与する因子である腎臓中の酸化ストレス、ペントシジン含有量、TGF- β RNA 量、CTGF RNA 量についてそれぞれ検討を行った。

以上のように、本章ではコバルトが糖尿病性腎症の腎障害に及ぼす影響を解析することを通して、HIF 分解抑制を機序とした糖尿病性腎症の治療の可能性を検討した。

【材料および方法】

1. 動物実験プロトコール

本研究における動物実験は、東海大学動物倫理委員会の指針に従って計画し、同委員会の承認のもとに倫理的配慮を持って行った。13週齢の雄性 SHR/NDmcr-*cp* ラット（日本エスエルシー）は無作為に2群に分け、水道水を与えた病態対象群(DM, n = 10)、0.2 mM 塩化コバルト含有の飲料水投与群 (DM+Cobalt, n = 10) とし、26週間の投与を実施した。SHR/NDmcr-*cp* の1日飲水量は30 ml程度であることから、塩化コバルトの1日あたりの投与量は個体あたり1 mgと推算された。

収縮期血圧は塩化コバルト投与開始前、開始8, 16, 26週後にテールカフ法にて覚醒下で測定した。血漿サンプル、代謝ケージを用いた24時間蓄尿サンプルは、塩化コバルト投与開始前、開始8, 16, 26週後に採取を行った。血漿中のグルコース、トリグリセライド、尿中の総タンパク質、クレアチニンの濃度はオートアナライザを用いて測定した。

2. 腎臓組織学的評価

糸球体マトリックススコアならびに間質線維化スコアの評価は第一章と同様に実施した。

3. HIF-1 α 免疫組織染色

腎臓組織を10%ホルマリン溶液にて固定し、パラフィン包埋した後、薄切片を作製し、マウス抗HIF-1 α モノクローナル抗体 (Novus Biologicals, Colorado, US) を一次抗体として、ヤギ抗マウスIgG抗体 (Life Technologies Japan, 東京) を二次抗体として用いて反応させ、DAB法にて発色させた。細胞核はヘマトキシリンにて染色した。光学顕微鏡を用いて400倍視野下で髄質外帯部のHIF-1 α 染色陽性細胞数を計測した。1個体につき無作為に選択した10視野の陽性細胞数を計測し、その平均値を個体のHIF-1 α 染色陽性細胞数とした。

4. HIF-1 α Western blotting

Nuclear extraction キット (Pierce, Illinois, US) を用いて各群の腎臓組織から細胞核のタンパク質サンプルを調製し、ブラッドフォード法を用いてタンパク質量を測定した。熱変性を行った 10 μ g のサンプルを 4% から 20% の濃度勾配の SDS-アクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、その後 PVDF 膜にトランスファーした。マウス抗 HIF-1 α モノクローナル抗体 (Novus Biologicals) を一次抗体として、ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Life Technologies Japan, 東京) を二次抗体として用いて反応させ、NBT/BCIP を基質として発色させた。

5. 内皮アミノペプチダーゼ P 免疫組織染色

腎臓組織を 10%ホルマリン溶液にて固定し、パラフィン包埋した後、薄切片を作製し、マウス抗ラット内皮アミノペプチダーゼ P モノクローナル抗体 (Bender MedSystems, Vienna, Austria) を一次抗体として、ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Life Technologies Japan, 東京) を二次抗体として用いて反応させ、DAB 法にて発色させた。細胞核はヘマトキシリンにて染色した。1 個体につき無作為に選択した 10 視野の髄質外帯部のデジタル画像を 400 倍倍率にて取得した。取得した画像を用いて希薄インデックス法 (59) にて尿細管周囲毛細血管網の分布密度を評価した。デジタル画像上に縦横それぞれ 10 本の等間隔の線を引き、その交点上に染色陽性領域を含まない場合に 1 点とし、100 の交点の合計スコアを計測した。最小スコアは 0 であり、これは全ての交点上に染色陽性領域が存在する、つまり尿細管周囲毛細血管網の分布密度が高いことを示す。また最大スコアは 100 であり、これは全ての交点上に尿細管周囲毛細血管網が存在せず分布密度が低いことを示す。10 視野のデジタル画像の希薄インデックススコアの平均値を個体のスコアとした。

6. 腎臓組織中の RNA 量測定

第一章と同様にリアルタイム PCR 法を用いて組織中の RNA 量を測定した。PCR 反応には以下のプライマーセットを用いた。 β -actin を内部標準とし、それぞれの RNA 量を β -actin RNA 量で補正した値を相対 RNA 量として評価に用いた。

Erythropoietin	Forward primer	5'-TACCGTCCCAGATACCAAAGTCAAC-3'
	Reverse primer	5'-GAGACAGGCCTTGCCAAACTTC-3'
	GenBank accession No.	NM_017001
VEGF	Forward primer	5'-TGGACCCTGGCTTTACTGCTG-3'
	Reverse primer	5'-GGCAATAGCTGCGCTGGTAGA-3'
	GenBank accession No.	NM_031836
HO-1	Forward primer	5'-AGGTGCACATCCGTGCAGAG-3'
	Reverse primer	5'-TCCAGGGCCGTATAGATATGGTACA-3'
	GenBank accession No.	NM_012580
TGF- β	Forward primer	5'-TGCGCCTGCAGAGATTCAAG-3'
	Reverse primer	5'-AGGTAACGCCAGGAATTGTTGCTA-3'
	GenBank accession No.	NM_021578
CTGF	Forward primer	5'-CACCCGGGTTACCAATGACAA-3'
	Reverse primer	5'-AGCCCGGTAGGTCTTCACACTG-3'
	GenBank accession No.	NM_022266
Nox2	Forward primer	5'-CGGGACTTCGGACCCATATTC-3'
	Reverse primer	5'-ATTCCTGTGATGCCAGCCAAC-3'
	GenBank accession No.	NM_023965
β -actin	Forward primer	5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGA-3'
	Reverse primer	5'-TAGAGCCACCAATCCACACA-3'
	GenBank accession No.	NM_031144

7. 腎臓組織中ペントシジン量測定

腎臓組織中のペントシジン量の測定は第一章と同様の方法にて実施した。

8. データ解析

データは全て平均値 \pm 標準誤差で示した。群間の比較は、対応のない Student の t 検定を用いた。P < 0.05 を有意差ありとした。

【結 果】

1. 体重、血糖値、トリグリセライドおよび血圧に対するコバルトの影響

II型糖尿病性腎症モデルラット SHR/NDmcr-*cp*に対してコバルトを26週間投与し、体重、血糖値、トリグリセライド、血圧への影響を検討した(図 2-1)。いずれの値も、投与期間中、投与終了時に DM 群と DM+Cobalt 群の間に有意な差はなく、これらに対するコバルトの明瞭な影響は認められなかった。

次に、糖尿病性腎症における腎障害に対するコバルト投与の影響を評価するため、尿中タンパク質排泄量および腎臓の組織学的変化を検討した。

2. 糖尿病性腎症における腎障害に対するコバルトの影響

図 2-2 は投与終了時におけるラット各群の尿中タンパク質排泄量を示したものである。DM 群の 100 mg/day の尿中タンパク質排泄量に対して、DM+Cobalt 群は最大 55 mg/day 程度にとどまり、その差は統計学的に有意であった。

図 2-3 に投与終了時の DM 群(図 2-3a)、DM+Cobalt 群(図 2-3b)の典型的な糸球体 PAS 染色写真、ならびに各群の糸球体マトリックスの増加を5段階で評価しスコア化した値(図 2-3c)を示す。既報(35, 36)および第一章と同様に、DM 群の糸球体においては矢印で示すように糸球体分節性硬化が観察された。DM+Cobalt 群の糸球体では、分節性硬化はほとんど観察されず(図 2-3b、矢頭)、DM+Cobalt 群の糸球体マトリックススコア(0.41 ± 0.03 , $n = 10$)は、DM 群(0.97 ± 0.04 , $n = 10$)の約40%と有意に低値であった。

同様に両群ラットの腎尿細管間質領域のマッソントリクローム染色の典型的な組織像と、これに基づいてスコア化した各群の間質領域の線維性変化を示す(図 2-4)。DM 群(図 2-4a)の尿細管間質領域においては、広範囲に渡りマッソントリクローム染色で青く染色された領域、すなわち間質の線維化が観察されたが、DM+Cobalt 群(図 2-4b)では線維性変化はほとんど認められず、DM+Cobalt 群の間質線維化スコア($4.6\% \pm$

0.3%, n = 10) は DM 群 (13.2% ± 0.7%, n = 10) の約 35%と著しく低値であった (図 2-4c)。

これらの結果は、DM+Cobalt 群の腎障害が軽度であったことを示すものであった。コバルト投与による腎保護の機序の一つとして HIF の分解抑制が考えられるため、次いで SHR/NDmcr-cp の腎臓内 HIF タンパク質への影響を検討した。

3. 腎臓組織中 HIF-1 α に対するコバルトの影響

図 2-5 に、各群の抗 HIF-1 α 免疫染色像の典型例ならびに計測した HIF-1 α 染色陽性細胞数を示す。HIF-1 α 染色陽性細胞は DM 群、DM+Cobalt 群いずれの髄質外帯部においても認められ、主に細胞質が染色されていた (図 2-5a, b)。またそのほとんどが刷子縁膜の丈が高いことから大部分が近位尿細管細胞と考えられた。染色陽性細胞数は、DM+Cobalt 群 (20 ± 2, n = 10) では DM 群 (8 ± 1, n = 10) の約 2.5 倍と高値であった (図 2-5c)。

図 2-6 に、Western blotting 法にて検出した各群の腎臓組織の核内の HIF-1 α タンパク質の典型的な写真を示す。10 μ g の核サンプルを用いて検討を行ったところ、120 kDa から 130 kDa 付近にバンドが検出され、DM+Cobalt 群のバンドは、DM 群のバンドよりも強く認められた。

HIF-1 α は、生体内の低酸素状態に応答して、エリスロポエチン、VEGF、HO-1 などの遺伝子発現を増加させることが知られている (21)。そこで次に、腎臓組織中のこれらの RNA 量を検討した。DM+Cobalt 群の腎臓組織中のエリスロポエチン RNA 量は、DM 群のそれに対して約 3.5 倍と極めて高い値であった (図 2-7a)。また DM+Cobalt 群の腎臓組織中の VEGF ならびに HO-1 の RNA 量も、DM 群のそれらに対して 2 倍以上と有意に高値であった (図 2-7b, c)。

またこれまでに、コバルト投与により尿細管周囲の尿細管周囲毛細血管網数の減少が抑制される可能性が報告されている (60, 61)。図 2-8 に血管内皮細胞に発現する内皮アミノペプチダーゼ P に対する抗体を用いた免疫組織染色像の典型例 (図 2-8a, b) と血

管希薄インデックス（図 2-8c）を示す。染色陽性領域として複数の尿細管に囲まれた小さな円形部位が観察され、これが尿細管周囲毛細血管網と考えられた。尿細管刷子縁膜の一部が染色陽性であったが、陰性コントロールとして実施した抗ラット IgG 抗体を用いた免疫染色でも尿細管刷子縁膜部に染色が認められたため、非特異的な染色と判断した。領域内に血管が多く存在するほど低値となる血管希薄インデックスは、DM+Cobalt 群において DM 群の約 70%と有意に低値であった（図 2-8c）。尿細管周囲毛細血管網は、間質領域の線維化に伴い圧迫され消失することが知られており（17-20）、この結果は DM+Cobalt 群では DM 群と比較して尿細管周囲毛細血管網の消失が抑制され、尿細管間質領域における虚血・低酸素障害が軽減されたことを示している。

次に、糖尿病性腎症における腎障害因子と考えられている腎臓中の酸化ストレス、ペントシジン量、TGF- β RNA 量、CTGF RNA 量に対するコバルト投与の影響を検討した。

4. 腎臓組織中の酸化ストレス、ペントシジン量、TGF- β RNA 量および CTGF RNA 量に対するコバルトの影響

第一章と同様に、組織中の Nox2 RNA 量を酸化ストレスの指標とした（52）。図 2-9 に示すとおり、DM+Cobalt 群の Nox2 RNA 量は、DM 群のその約 20%と著しく低値であった。

また、図 2-10 に示すとおり、ペントシジンの腎臓組織中の含有量は、DM 群において腎臓組織 1 mg あたり 60 fmol 程度であったのに対し、DM+Cobalt 群では 40 fmol 程度と有意に低値であった。

線維化因子として知られる CTGF は、TGF- β と同様に糖尿病性腎症における腎臓の線維性変化に関係するサイトカインと考えられている（62）。DM+Cobalt 群の腎臓組織中の TGF- β および CTGF の RNA 量は、いずれも DM 群のその約 60%と有意に低値であった（図 2-11a, b）。

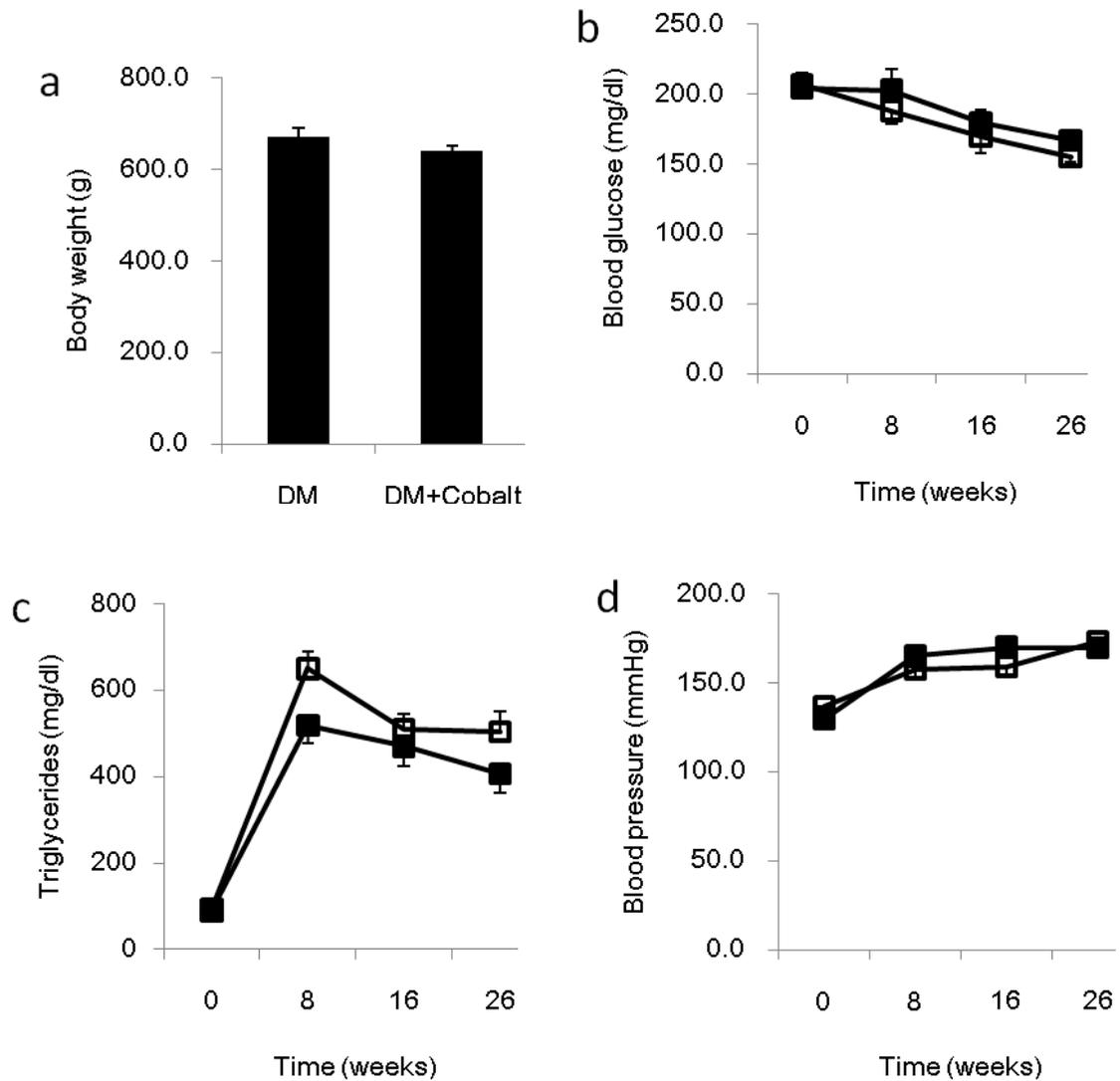


図 2-1 投与終了時の体重、実験期間中の血糖値、トリグリセライドおよび血圧の変動

■ : DM 群、□ : DM+Cobalt 群の体重 (a)、血糖値 (b)、トリグリセライド (c) および血圧 (d) を示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (n = 10)。

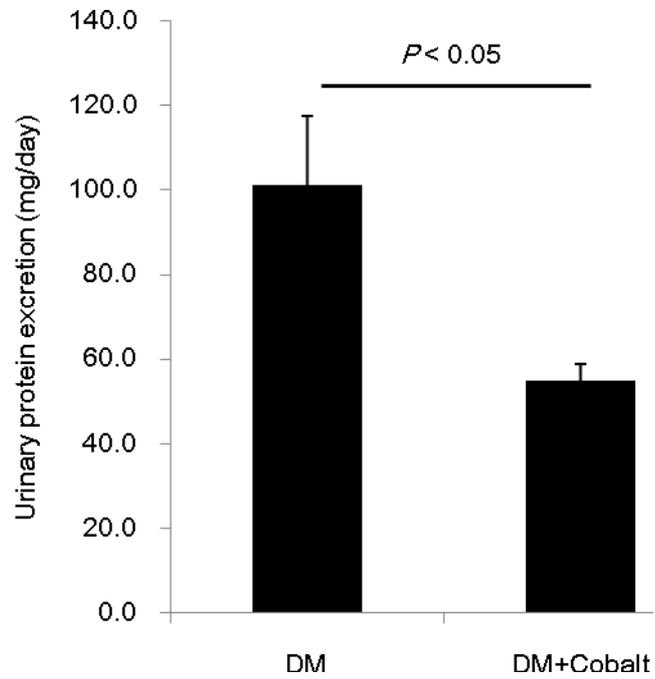


図 2-2 投与終了時の尿中タンパク質排泄量

DM 群、DM+Cobalt 群の投与終了時の尿中タンパク質排泄量を示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (n = 10)。

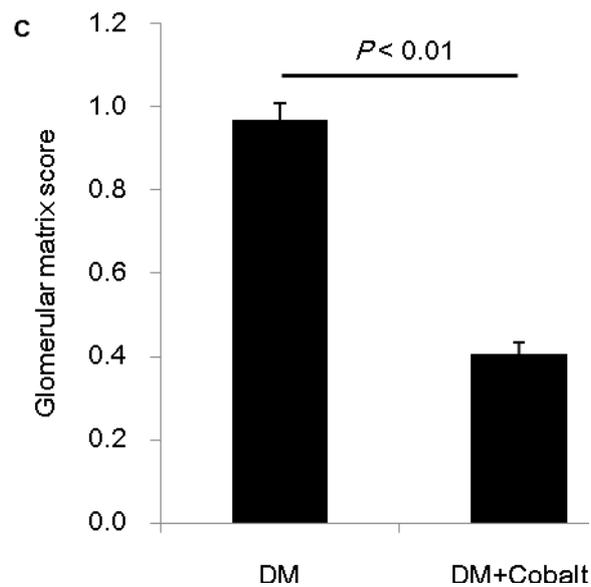
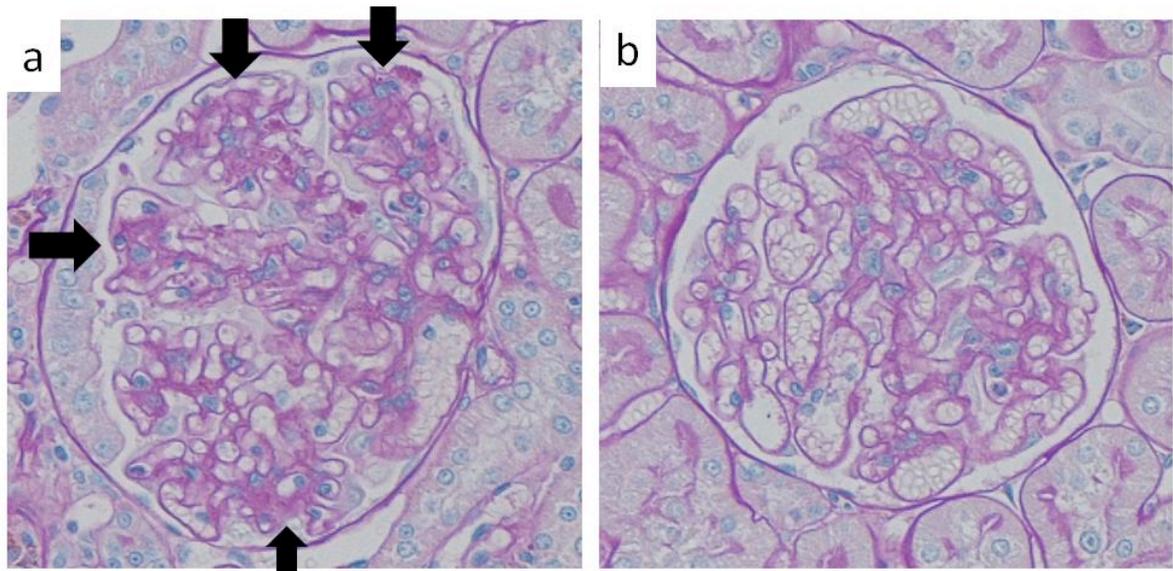


図 2-3 糸球体組織像および糸球体マトリックススコア

DM 群 (a) ならびに DM+Cobalt 群 (b) の典型的な糸球体 PAS 染色写真 (倍率 400 倍) および両群の算出したマトリックススコア (c) を示す。糸球体内の濃赤染色部分が糸球体マトリックスであり、矢印は分節性糸球体硬化病変を示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (n = 10)。

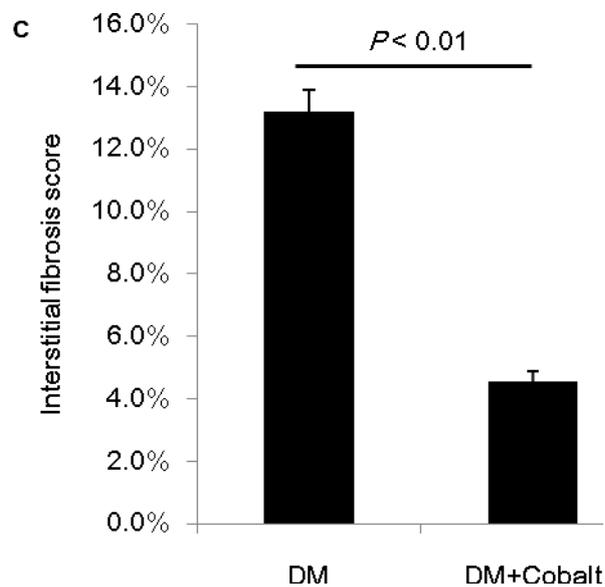
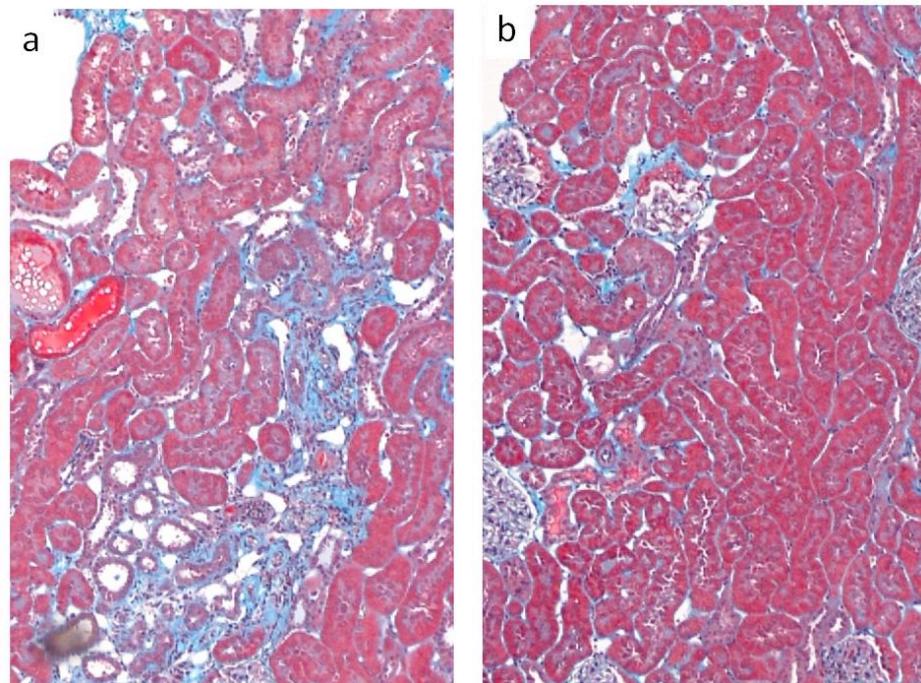


図 2-4 尿細管間質領域の組織像および間質線維化スコア

DM 群 (a) ならびに DM+Cobalt 群 (b) の尿細管間質領域のマッソントリクローム染色写真 (倍率 200 倍) および両群の算出した間質線維化スコア (c) を示す。線維性タンパク質はマッソントリクローム染色により青く染まっている。グラフは平均値±標準誤差で示す (n = 10)。

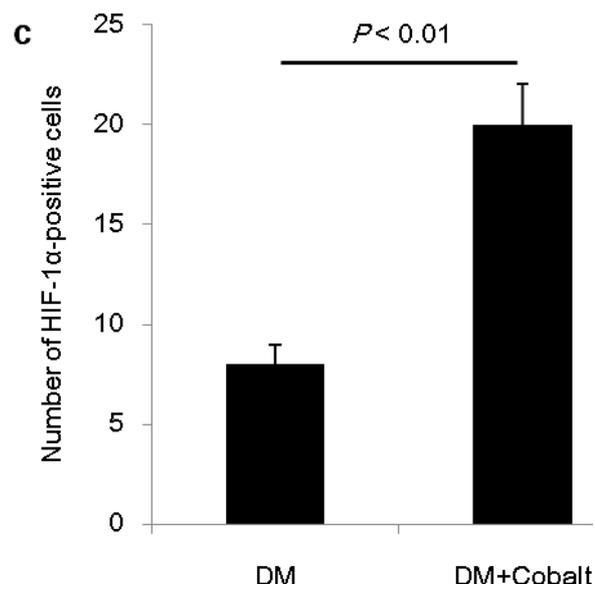
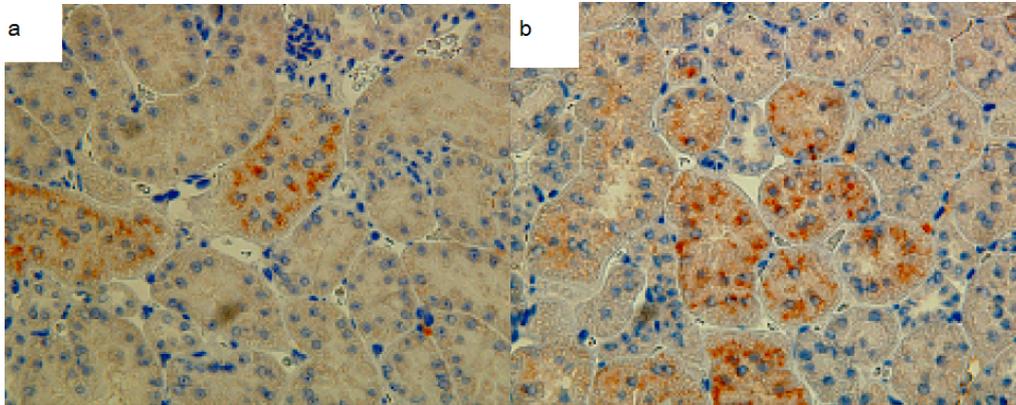


図 2-5 腎臓髄質外帯部の HIF-1 α 免疫染色組織像および HIF-1 α 染色陽性細胞数

DM 群 (a) ならびに DM+Cobalt 群 (b) の腎臓髄質外帯部の典型的な HIF-1 α 免疫組織染色写真 (倍率 400 倍) および両群の計測した HIF-1 α 染色陽性細胞数 (c) を示す。HIF-1 α 染色陽性部位は、細胞質内の赤褐色染色部位として観察できる。グラフは平均値 \pm 標準誤差で示す (n = 10)。

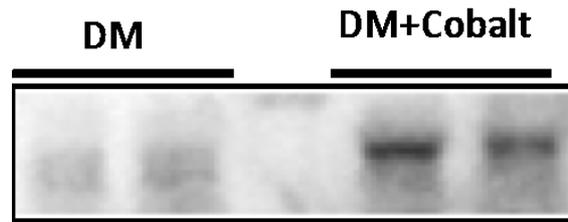


図 2-6 腎臓組織の核内 HIF-1 α タンパク質

Western blotting 法にて検出した DM 群ならびに DM+Cobalt 群の腎臓組織の核内の HIF-1 α タンパク質のバンドの典型的な写真を示す。バンドは 120 kDa から 130 kDa 付近に検出された。

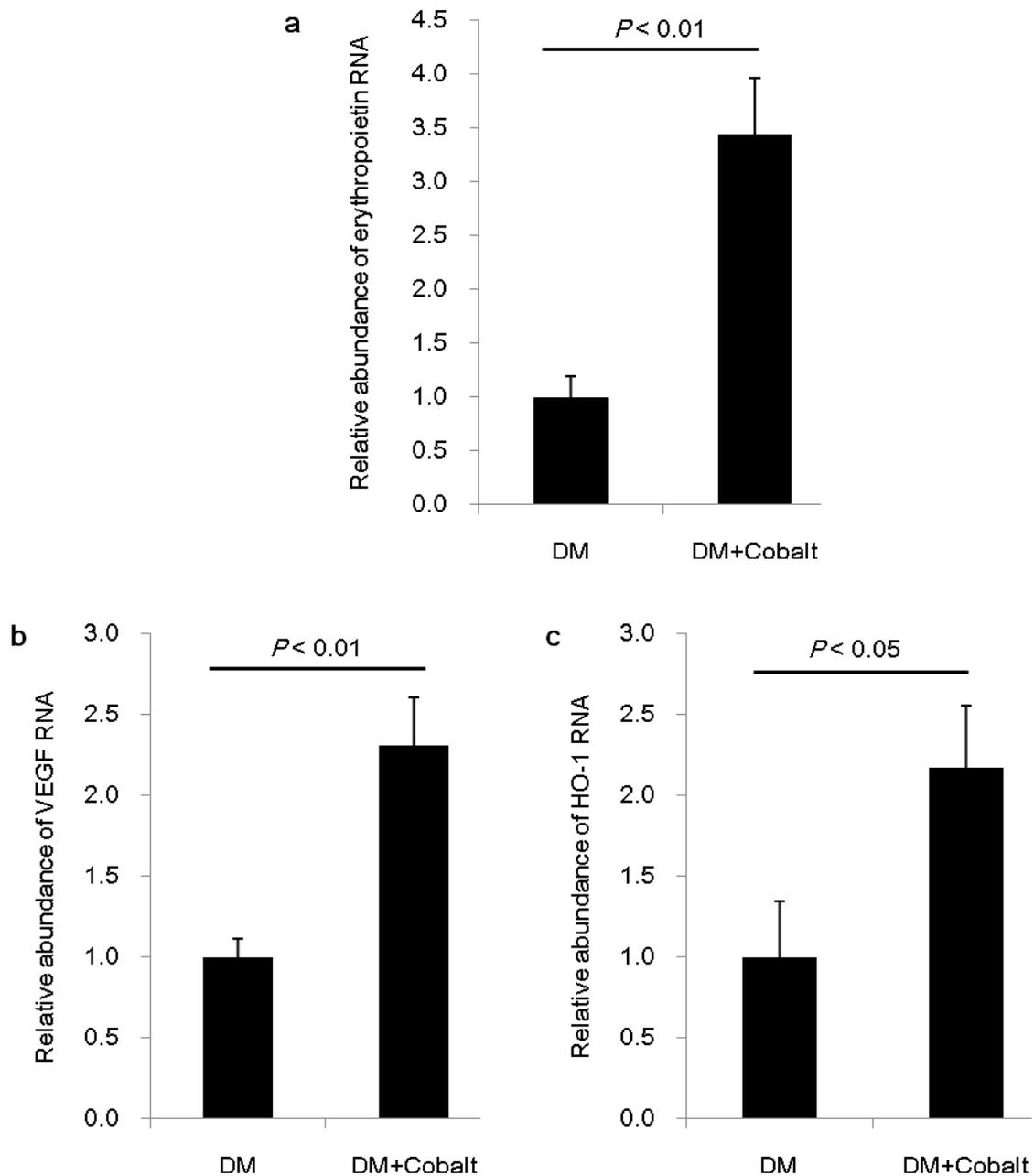


図 2-7 腎臓組織中のエリスロポエチン、VEGF、HO-1 の RNA 量

各群の腎臓組織におけるエリスロポエチン (a)、VEGF (b)、HO-1 (c)の RNA 量を β -actin のそれで補正した相対量で示す。グラフは平均値 \pm 標準誤差で示す (n = 10)。

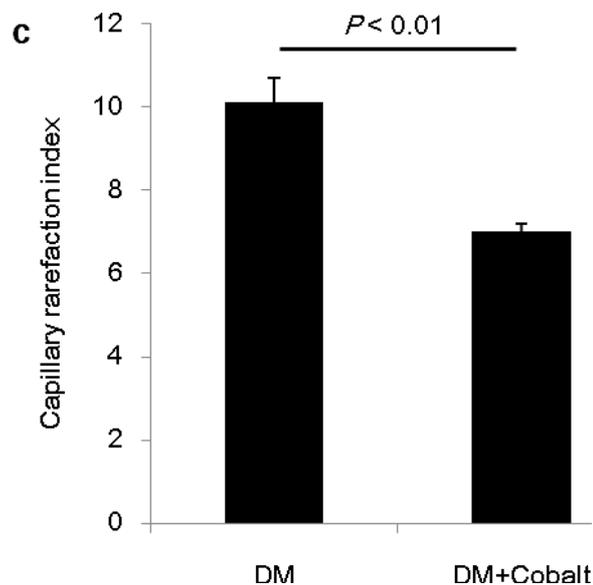
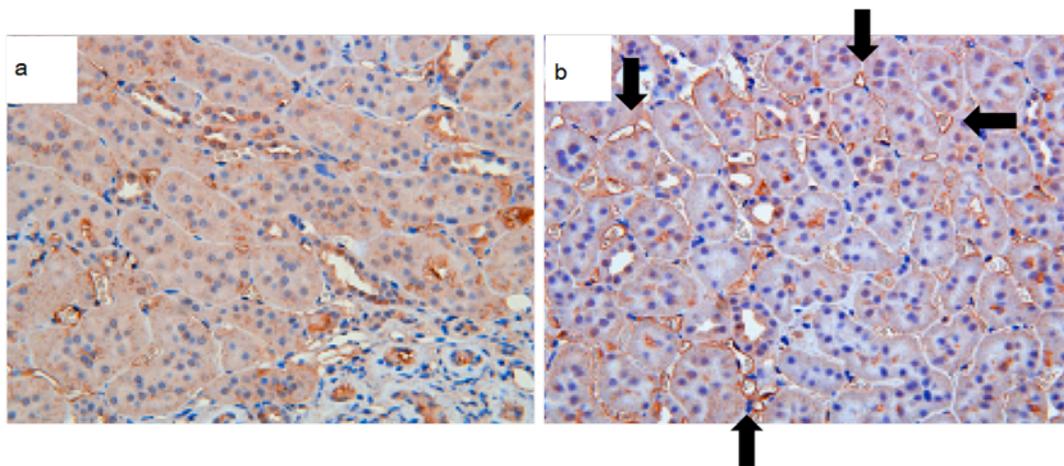


図 2-8 血管内皮細胞免疫染色組織像および血管希薄インデックス

DM 群 (a) ならびに DM+Cobalt 群 (b) の腎臓髄質外帯部の典型的な内皮アミノペプチダーゼ P 免疫組織染色写真 (倍率 200 倍) および両群の計測した血管希薄インデックス (c) を示す。尿細管に囲まれた濃茶染色の円形部位 (矢印で例示) が血管と考えられる。血管希薄インデックスは、血管分布密度が高いほど低値となる。グラフは平均値±標準誤差で示す (n = 10)。

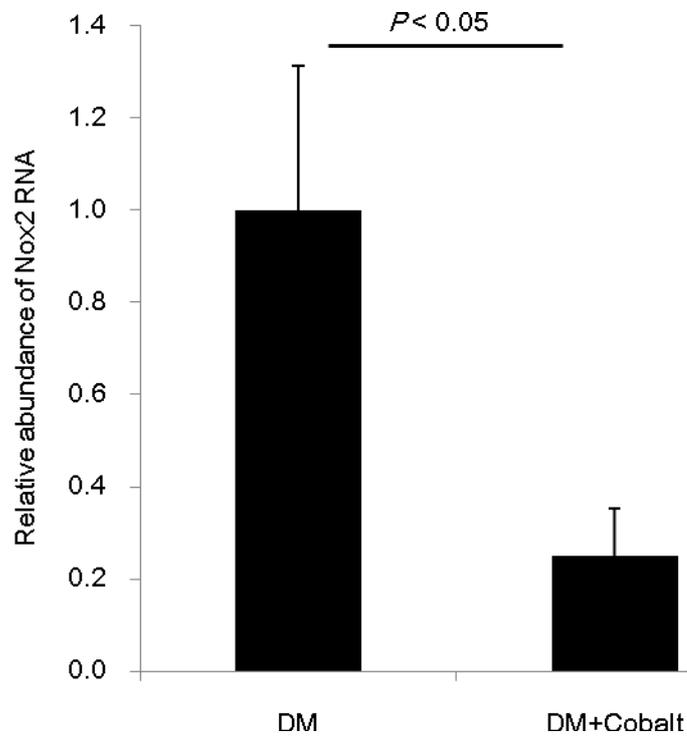


図 2-9 腎臓組織中の Nox2 RNA 量

各群の腎臓組織における Nox2 の RNA 量を β -actin のそれで補正した相対量で示す。グラフは平均値 \pm 標準誤差で示す (n = 10)。

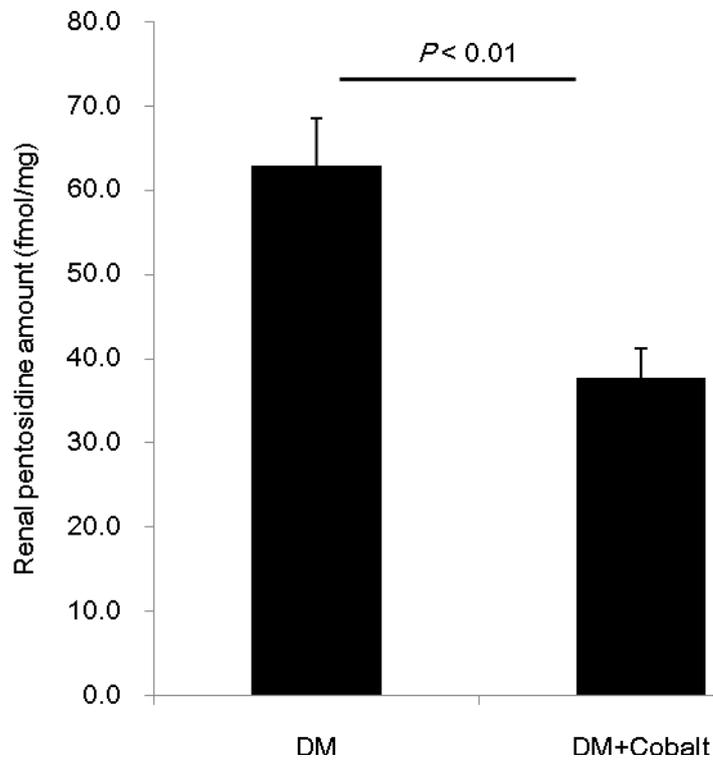


図 2-10 腎臓組織中のペントシジン量

各群の腎臓組織 1 mg に含まれるペントシジン量を示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (n = 10)。

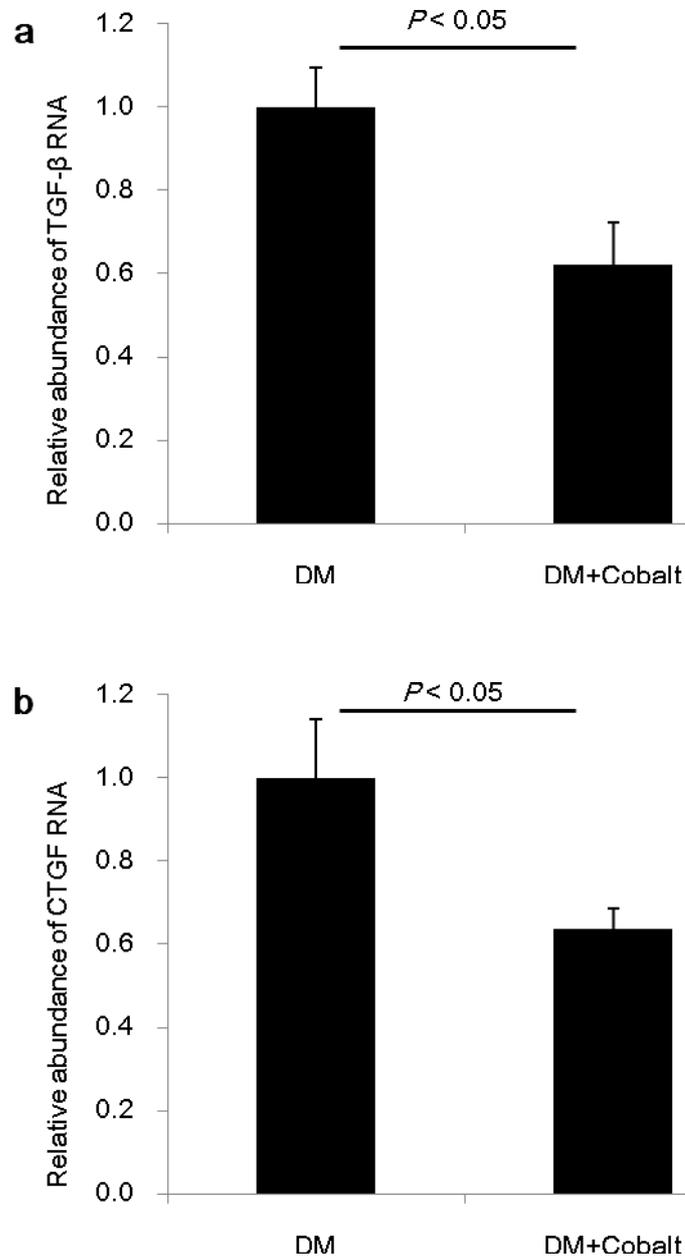


図 2-11 腎臓組織中の TGF-β ならびに CTGF の RNA 量

各群の腎臓組織における TGF-β (a) および CTGF (b) の RNA 量を β-actin のそれで補正した相対量で示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (n = 10)。

【考 察】

本章では、コバルト投与により糖尿病性腎症の腎障害が軽減されることを明らかにした。これは、DM+Cobalt 群の尿中タンパク質排泄量、糸球体マトリックススコアおよび間質線維化スコアがいずれも DM 群に比して低値であった結果（図 2-2, 2-3, 2-4）に基づいている。コバルトに糖尿病性腎症に対する保護作用があることが明らかになったが、一方でコバルトは生体への毒性を有することが知られており（66）、実際の糖尿病性腎症患者の治療に用いることは難しい。しかし、コバルトが腎保護作用をもたらす機序を検討しそのターゲットが明らかとなれば、新たな治療法の開発に重要な知見となると考えられる。本章では、そのターゲットとして腎臓中の HIF-1 α に注目した。

本研究では、HIF-1 α 染色陽性細胞は主に近位尿細管細胞であること（図 2-5a, b）、DM+Cobalt 群の HIF-1 α 染色陽性細胞数が DM 群のそれに対して約 2.5 倍高値であること（図 2-5c）が明らかとなった。HIF-1 α は主に近位尿細管に発現すること（63）、コバルト投与により腎臓中の HIF-1 α 染色陽性細胞数が増加することはすでに報告されており（64）、本章の結果はこれらと一致する。また、DM+Cobalt 群の核内の HIF-1 α タンパク質量は、DM 群に比べて多いことが Western blotting 法を用いた検討から明らかになった（図 2-6）。これはコバルトが HIF-1 α タンパク質のプロテアソーム分解を抑制し核内移行を促進したため（22）と考えられる。さらに DM+Cobalt 群において、腎臓中のエリスロポエチン、VEGF、HO-1 の RNA 量が高値であること（図 2-7）が明らかになった。HIF-1 α は、エリスロポエチン、VEGF、HO-1 の発現増加を介して低酸素状態に対する細胞の抵抗性を上げることが知られており、これらの RNA 量が高値であることは、HIF-1 α の核内移行が促進され、HIF-1 α シグナルが亢進したことを裏付けている。以上より、コバルト投与により腎臓中の HIF-1 α の分解が抑制され、HIF-1 α シグナルの促進がもたらされたことが明らかになった。

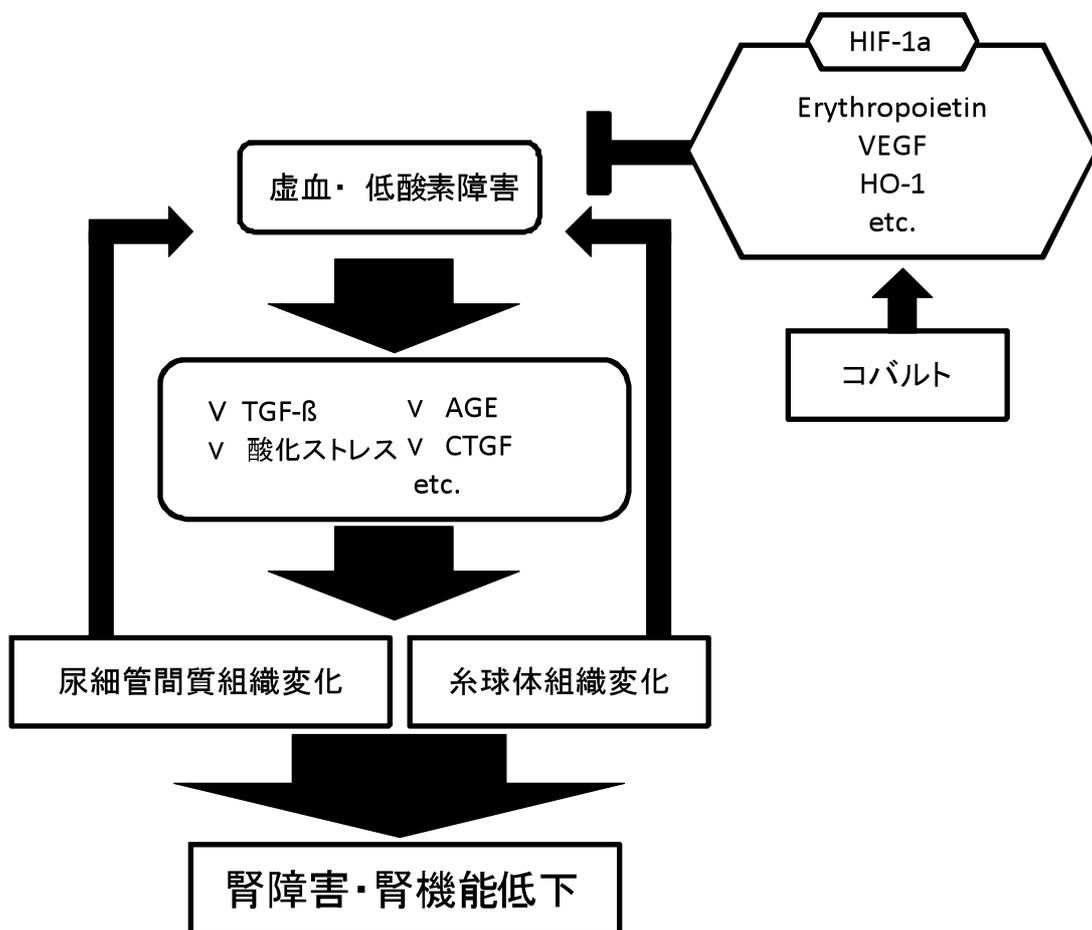
本章では、DM+Cobalt 群において、尿細管間質領域への酸素供給を主に担っている尿細管周囲毛細血管網の消失が抑制されたことが示され（図 2-8）、DM+Cobalt 群の腎臓では DM 群に比べて虚血・低酸素障害が軽度であることが明らかになった。これは、5/6 腎臓摘出モデルやシスプラチン腎症モデルといった糖尿病性腎症以外の腎症

モデルを用いた結果 (19, 60, 61) と一致する知見である。DM+Cobalt 群にて発現上昇が認められたエリスロポエチン、VEGF、HO-1 (図 2-7) は、いずれも血管内皮細胞に対して保護的に働く因子であり、高血糖などによる微小血管の傷害を抑制して血管保護をもたらすことが知られている (65-70)。すなわちコバルト投与は、エリスロポエチン、VEGF および HO-1 の発現増加といった HIF-1 α シグナル促進を介して、尿細管周囲毛細血管網の保護作用をもたらし、糖尿病性腎症の虚血・低酸素障害を軽減したと考えられる。腎臓の虚血・低酸素障害は、糖尿病性腎症の腎機能低下の一因と考えられている (15-20, 57, 58) が、虚血・低酸素障害の改善をもたらす薬剤は未だ開発されていない。本章で示した HIF-1 α シグナル促進による虚血・低酸素障害の改善作用は、糖尿病性腎症に対する新たな治療方法の可能性を示す重要な知見である。

またエリスロポエチンは、血管内皮細胞だけでなくポドサイトの保護に働くことが知られている (71, 72)。糸球体基底膜の外側に存在するタコ足状の形態をした終末分化細胞であるポドサイトは、糸球体濾過におけるスリットバリア機能の一端を担うとされており、ポドサイトの形態変化やアポトーシスが尿中へのタンパク質漏出の一因と考えられている (73, 74)。DM+Cobalt 群において認められた尿中タンパク質排泄量の低下 (図 2-2) は、エリスロポエチンの有するポドサイト保護効果が関係していると考えられる。

さらに、虚血・低酸素障害の軽減や HO-1 の発現増加は、酸化ストレスの抑制をもたらすことが知られている (66, 70, 75, 76)。酸化ストレスは、それ自体が細胞傷害性に働くだけでなく、ペントシジンに代表される AGE の形成を促進し、また TGF- β と CTGF といったサイトカインの発現を増加させることが知られている (43, 44, 46-48, 57, 62, 77)。本章では、DM+Cobalt 群において Nox2 RNA 量が低値 (図 2-9)、すなわち酸化ストレスが抑制されたこと、また腎臓組織中ペントシジン量、TGF- β RNA 量、および CTGF RNA 量が DM+Cobalt 群において低値であること (図 2-10, 2-11) が示された。これは、HIF-1 α シグナル促進による腎保護の分子メカニズムを示す知見であり、酸化ストレス、ペントシジン、TGF- β 、CTGF といった糖尿病性腎症における腎障害性因子の抑制を腎保護の機序の一つとすることが新たに明らかになった。

Schema 3 に本章の結果より得られた知見をまとめて示す。コバルト投与による腎保護作用は HIF-1 α の分解抑制に基づいており、エリスロポエチン、VEGF、HO-1 の発現増加といった HIF-1 α シグナルの促進により、虚血・低酸素障害や酸化ストレスを軽減させることが示された。本章の結果は、HIF-1 α シグナルを促進させる化合物が糖尿病性腎症の治療方法となる可能性を示すものである。今後、HIF-1 α の分解抑制や HIF-1 α 発現増加をもたらす化合物の開発により、糖尿病性腎症の新たな治療法がもたらされると期待される。



Schema 3

虚血・低酸素障害による腎障害・腎機能低下と HIF-1 α シグナル促進による改善作用の概念図

【小 括】

糖尿病性腎症において、糸球体傷害とともに尿細管間質領域に虚血・低酸素状態が引き起こされる。虚血・低酸素障害は、間質領域の線維性変化をもたらし、その結果腎機能が低下すると考えられている。生体内では HIF が虚血に対する防御反応を担うが、HIF は通常酸素条件では速やかに分解されることが知られている。本試験では、HIF-1 α の分解を抑制するコバルトを SHR/NDmcr-*cp* へ投与し、HIF-1 α シグナル促進による腎障害および尿細管間質領域の虚血・低酸素状態に対する影響を検討した。

26 週間のコバルト投与の結果、体重、血糖値、トリグリセライド、血圧に対する明らかな影響は認められなかった。DM+Cobalt 群において、腎障害の指標である尿中タンパク質排泄量は有意に低値であり、糸球体および間質の組織変化も有意に軽度であったことから、DM+Cobalt 群の腎障害が軽減されたと考えられた。DM+Cobalt 群では、HIF-1 α 染色陽性細胞数が有意に多く、エリスロポエチン、VEGF、HO-1 の RNA 量が有意に高値であることから、コバルトにより HIF-1 α の分解が抑制され HIF-1 α シグナルが亢進されたことが明らかになった。また DM+Cobalt 群の尿細管周囲毛細血管網の分布密度が高いことから、腎臓の虚血・低酸素状態が軽減されたことが示された。さらに DM+Cobalt 群の腎臓組織では、糖尿病性腎症の腎障害の一因と考えられている酸化ストレス、ペントシジン、TGF- β 、CTGF の抑制が認められ、これらに対する作用がコバルト投与による腎保護の機序の一つであると考えられた。

コバルト投与により、HIF-1 α の分解抑制、ならびにエリスロポエチン、VEGF、HO-1 の発現増加を介して、腎臓の虚血・低酸素障害の軽減や酸化ストレス、ペントシジン、TGF- β 、CTGF の抑制がもたらされ、糖尿病性腎症の腎障害が軽減されたと考えられた。HIF-1 α の分解を抑制し、HIF-1 α シグナルを促進する薬剤は、糖尿病性腎症に対する新たな治療方法となると期待される。

第三章

高血糖により誘導されたメグシンによる
メサンギウムマトリックス蓄積の促進

【序 文】

第一章では糖尿病性腎症の腎障害に関わる基礎因子に、第二章では主に尿細管間質組織変化に関わる二次性因子に注目して検討したが、本章では糸球体組織変化にかかわる二次性因子としてメグシンに注目し、メサンギウムマトリックス増加に対する役割について検討を行った。

糖尿病性腎症をはじめとする多くの腎臓疾患において、糸球体に特異的に発現する遺伝子や傷害された糸球体において変動する遺伝子を同定し、その遺伝子を制御することにより糸球体治療を目指すアプローチが試みられている。メグシンは、ヒトメサンギウム細胞を用いたトランスクリプトーム解析の結果得られた、メサンギウム細胞に特異的に発現する遺伝子である (23, 24)。メグシンを全身で高発現するトランスジェニックマウスでは、40 週齢頃から糸球体マトリックスの増加や糸球体構成細胞の増加といった腎臓の組織変化が起こるが、他主要臓器では特筆すべき組織変化は認められないと報告されている (26)。また、糖尿病性腎症モデルマウスとして知られる RAGE と iNOS のダブルトランスジェニックマウスとメグシントランスジェニックマウスとを交配させたメグシン/RAGE/iNOS トリプルトランスジェニックマウスでは、さらに若齢の 16 週齢ですでに糸球体マトリックスの高度な増加が認められる (27)。これらトランスジェニックマウスの解析結果から、メグシンは糸球体マトリックスの増加を中心とする糸球体の組織変化に関係すると推察される。

一方、糖尿病性腎症患者の糸球体において、健常者と比較してメグシン RNA 量が増加することが報告されており (25)、ヒトの糖尿病性腎症においても糸球体の組織変化へのメグシンの関与が示唆されている。しかし、メグシン RNA 量増加の機序ならびにメグシンが糸球体の組織学的変化をもたらす機序については未だ解明されていない。本試験では、糖尿病性腎症における糸球体マトリックス形成に対して、メグシンが及ぼす影響とその機序を明らかにすることを目的として検討を行った。

糸球体マトリックスの増加は、糖尿病性腎症において強く起こることが知られている (78)。糸球体マトリックスは主に、タイプ IV コラーゲン、ラミニン、ファイブロネクチン、プロテオグリカンなどにより構成されている (79, 80)。糖尿病性腎症における

糸球体マトリックス構成タンパク質の増加は、マトリックス産生能の亢進やマトリックス分解能の低下、すなわち産生・分解のバランスが崩れた結果引き起こされる(81, 82)。糸球体マトリックスの分解には MMP やプラスミンが関わることが知られている。MMP-2、MMP-9 はタイプ IV コラーゲン、ラミニン、ファイブロネクチンを分解し、プラスミンはラミニンとファイブロネクチンを分解する(28-30)。また MMP-2 と MMP-9 は不活性型として産生され、プラスミンにより切断されて活性型へと変換されることが知られている(31)。このため、糖尿病性腎症における糸球体マトリックスの増加は、プラスミン、MMP-2、MMP-9 の活性低下が原因の1つである可能性が考えられている(31)。

メグシンはセリンプロテアーゼインヒビターファミリーに属するタンパク質である。メグシンは、セリンプロテアーゼの一種であるプラスミンの酵素活性を抑制することが報告されており(26)、メグシンによるプラスミン酵素活性抑制を介して MMP-2 および MMP-9 の活性型への変換抑制がもたらされ、結果として糸球体マトリックス分解能が低下する可能性が推察される。本章では、メグシンがメサンギウム細胞においてプラスミン、MMP-2、MMP-9 活性に対して及ぼす影響についての検討を通じて、糖尿病性腎症の糸球体マトリックス増加におけるメグシンの役割について述べる。

【材料および方法】

1. 動物実験プロトコール

本研究における動物実験は、東海大学動物倫理委員会の指針に従って計画し、同委員会の承認のもとに倫理的配慮を持って行った。

13週齢の雄性 SHR/NDmcr-*cp* ラットを無作為に4群に分け、それぞれ溶媒（蒸留水）経口投与群（DM+V, n = 10）、インスリン（DM+I, 30 U/kg、1日2回）皮下投与群（n = 9）、オルメサルタン（DM+olme, 5 mg/kg/day）経口投与群（n = 10）、ベザフィブラート（DM+beza, 25 mg/kg/day）経口投与群（n = 10）とした。また13週齢雄性 WKY ラットを正常対象群とし、溶媒経口投与（n = 10）を実施した。薬剤投与は26週間実施した。DM+V 群、DM+I 群および WKY 群の個体は第一章で用いた個体と同一であり、DM+olme 群および DM+beza 群は、これらと同時期に投与を行った個体である。

収縮期血圧はテールカフ法にて覚醒下で測定した。剖検時の血漿中の総コレステロール、トリグリセライド濃度はオートアナライザ（日立サイエンス）を用いて測定した。ヘモグロビン A1c は DCA2000 キット（バイエルメディカル）を用いて測定した。

2. 腎臓組織および培養細胞中 RNA 量測定

第一章と同様にリアルタイム PCR 法を用いて組織および細胞中の RNA 量を測定した。PCR 反応には以下のプライマーセットを用いた。GAPDH は内部標準とし、それぞれの RNA 量を GAPDH RNA 量で補正した値を相対 RNA 量として評価に用いた。

Megsin	Forward primer	5'-AGAATTTGGCTTCGACTTATTCAGAGAGATGG-3'
	Reverse primer	5'-ATGACAGCTGATGAGCTGAGGCTGCTGTCCCCC-3'
	GenBank accession No.	NM_130404

GAPDH	Forward primer	5'-GACAACTTTGGCATCGTGGA-3'
	Reverse primer	5'-ATGCAGGGATGATGTTCTGG-3'
	GenBank accession No.	XM_001070609

3. ラットメサングウム細胞培養方法

雄性 Sprague-Dawley ラットのメサングウム細胞由来の培養細胞株である RMC は ATCC 社 (Virginia, US) より購入した。全ての細胞実験は、初代細胞からの累計継代回数 10 回から 12 回の間で実施した。RMC は 10%ウシ胎児血清添加 DMEM 培地に 0.4 mg/ml G-418 を加えて培養した。

4. RMC 高グルコース培養実験

96 ウェルプレートにて RMC を 60%程度の密度まで生育させた後、培地を 5 mM グルコースを含む DMEM、25 mM グルコースを含む DMEM、もしくは 5 mM グルコースに加えて 20 mM マンニトールを含む DMEM に変更し、さらに 72 時間培養した (n = 6)。

5. リコンビナントヒトメグシタンパク質の合成

pET28a ベクター (Novagen, Darmstadt, Germany) に全長ヒトメグシン cDNA (24) を組み込んだ発現プラスミドを *Escherichia coli* に発現させ、ニックルセファロースカラム (GE Healthcare Japan、東京) を用いて His タグの付いたヒトメグシタンパク質を精製した。

6. RMC+メグシタンパク質培養実験

96 ウェルプレートにて RMC を 60%程度の密度まで生育させた後、0.05 U/ml のプラスミノゲン (Sigma-Aldrich, Missouri, US) と 100 μ g/ml の合成ヒトメグシタンパク質を加えた無血清 DMEM (5 mM グルコース) 培地に変更し、さらに 72 時間培養した (n = 6)。72 時間の培養後、培養上清中のプラスミン酵素活性および MMP-2 +MMP-9 酵素活性を測定した。

細胞培養上清中のプラスミン酵素活性は以下の手順で測定した。50 μ l の培養上清に 0.3 mM のプラスミン発色基質 S-2403 (第一化学薬品、東京) を加え、60 分後に 405 nm で吸光度を測定した。細胞数はテトラゾリウム塩 WST-1 (同仁化学、東京) を用いて測定した。各ウェルの 405 nm 吸光度をそれぞれの細胞数で除した値をプラスミン酵素活性とし、相対値として記載した。

細胞培養上清中の MMP-2+MMP-9 酵素活性は LL-20002 キット（ライフ研究所、山形）を用いて測定した。各ウェルの測定値をそれぞれのウェルの細胞数で除した値を MMP-2+MMP-9 酵素活性酵素活性とした。

また MMP に対するメグシンの直接作用を検討するため、LL-20002 キット付属の MMP-9 標準品（5 mU）に 10 μ g の合成メグシタンパク質を加え、37°C で 1 時間反応させた後、LL-20002 キットを用いて MMP-9 酵素活性を測定した（n = 4）。

7. 抗メグシンモノクローナル抗体の作製

抗メグシンモノクローナル抗体は以下の手順に従って取得した。合成ヒトメグシタンパク質にて免疫した雄性 BALB/c マウス（日本チャールズリバー、神奈川）由来の脾臓細胞と SP2 ミエローマ細胞をポリエチレングリコールで細胞融合し、抗ヒトメグシン抗体を発現するハイブリドーマ細胞を取得した。各ハイブリドーマ細胞が産生したマウス抗ヒトメグシン抗体を、ヒトメグシタンパク質でコーティングしたプレートに添加し、HRP 標識した抗マウス IgG 抗体にて検出し（ELISA 法）、抗体のヒトメグシンへの結合性を評価した。結合陽性のハイブリドーマ細胞株は、限界希釈法にてサブクローン化した。サブクローン化したハイブリドーマ細胞株から最終的に 1 つのクローン（クローン名：MS18a、抗体クラス：IgG₁、エピトープ配列：NIVEKQ）を選別した。

抗メグシンモノクローナル抗体 MS18a の中和活性を、メグシンのプラスミン阻害活性を指標に評価した。合成ヒトメグシタンパク質を、抗メグシン抗体 MS18a もしくはコントロールのマウス IgG と反応させた。また 16 アミノ酸のラットメグシン部分配列からなる阻害ペプチド（TAATESNIVEKLLPES）を 100 倍モル比量加えて 37 °C で 2 時間反応させ抗体活性を失わせた MS18a と、合成ヒトメグシタンパク質を反応させた。それぞれにプラスミンを加えてさらに 30 分間反応させた後、プラスミン発色基質 S-2403 を加えて 405 nm の吸光度を測定し、プラスミン酵素活性とした（n = 4）。プラスミン酵素活性はプラスミンのみのウェルの吸光度に対する相対値として表記した。

8. RMC+抗メグシン抗体 MS18a 培養実験

96 ウェルプレートにて RMC を 60% 程度の密度まで生育させた後、100 μ g/ml の抗メグシンモノクローナル中和抗体 MS18a もしくはコントロールのマウス IgG を加え

た DMEM (5 mM もしくは 25 mM グルコース) 培地に変更し、さらに 72 時間培養した (n = 8)。72 時間の培養後、培養上清中の MMP-2+MMP-9 酵素活性を前述の LL-20002 キットにて測定した。

MMP に対する MS18a 抗体の直接作用を検討するため、LL-20002 キット付属の MMP-9 標準品 (5 mU) に 10 μ g の MS18a 抗体を加え、37°C で 1 時間反応させた後、LL-20002 キットを用いて MMP-9 酵素活性を測定した (n = 4)。

9. データ解析

データは全て平均値 \pm 標準誤差で示した。2 群間の比較は、対応のない Student の t 検定を用いた。多群間の比較は、one-way analysis of variance (ANOVA) および Tukey の両側検定を用いた。P < 0.05 を有意差ありとした。

【結 果】

1. 腎臓組織におけるメグシン RNA 量に対する高血糖、高脂血症、高血圧の影響

II型糖尿病性腎症モデルラット SHR/NDmcr-*cp*の腎臓組織中のメグシン RNA 量は、糖尿病性腎症患者 (25) と同様に増加していると想定される。SHR/NDmcr-*cp*における高血糖、高脂血症、あるいは高血圧の状態がメグシン RNA 量に対して及ぼす影響を明らかにするために、SHR/NDmcr-*cp* に対して血糖降下薬インスリン、降圧剤オルメサルタン、脂質低下薬ベザフィブラートを投与し、それぞれの投与群の腎臓組織中のメグシン RNA 量を測定した。

表 3-1 に WKY 群、SHR/NDmcr-*cp* (DM+V) 群、インスリン投与 (DM+I) 群、オルメサルタン投与 (DM+olme) 群およびベザフィブラート投与 (DM+beza) 群の HbA1c、総コレステロール、トリグリセライド、血圧を示す。WKY 群、DM+V 群および DM+I 群は第一章と同一であり、DM+olme 群および DM+beza 群はこれらの群と同時期に投与を行った群である。WKY と比較し、DM+V 群において HbA1c、総コレステロール、トリグリセライド、血圧は全て有意に高値であった。HbA1c は、DM+V 群と比較して DM+I 群のみが有意に低値であった。総コレステロール、トリグリセライドは、DM+I 群、DM+olme 群、DM+beza 群の 3 群において同程度の値であり、それらは DM+V 群と比較して有意に低値であった。血圧は、DM+V 群と比較して DM+olme 群のみが有意に低値であった。すなわち、インスリンのみが明らかな HbA1c の低下をもたらし、オルメサルタンのみが明らかな血圧の低下をもたらした。

図 3-1 に WKY 群、DM+V 群、DM+I 群、DM+olme 群、DM+beza 群の腎臓組織中の GAPDH RNA 量で補正した相対的なメグシン RNA 量を示す。DM+V 群のメグシン RNA 量は、WKY 群に対して約 2.5 倍という高値であった。DM+I 群のメグシン RNA 量は、WKY 群と同程度であり、DM+V 群に対して約 40%と低値であった。一方、DM+olme 群、DM+beza 群のメグシン RNA 量は、DM+V 群と同程度であり、有意差は認められなかった。

DM+I 群、DM+olme 群、DM+beza 群の中で、DM+I 群のみ DM+V 群に対して腎

臓組織中メグシン RNA 量の低下が認められた。HbA1c の低下が同じく DM+I 群のみで認められていることから、高血糖がメグシン RNA 量増加に関係していると推察された。血糖値の上昇によるメグシン RNA 量の増加を検証するため、次に培養ラットメサンギウム細胞 RMC の培地中グルコース濃度の高低によりメグシン RNA 量に影響があるか否かを検討した。

2. 高グルコース培養条件下でのメグシン発現上昇

メグシンは主にメサンギウム細胞に発現すると報告されている (24, 83) ため、本研究では培養ラットメサンギウム細胞 RMC を用いた *in vitro* の解析を行った。RMC 細胞を 5 mM グルコース DMEM (LG)、25 mM グルコース DMEM (HG)、あるいは 5 mM グルコース + 20 mM マンニトール DMEM (LG + mannitol) でそれぞれ 72 時間培養した後、メグシン RNA 量を定量した (図 3-2)。LG + mannitol は、LG と HG との間の 20 mM グルコースに相当する浸透圧差を補正するために、LG に 20 mM マンニトールを加えた培地である。

HG で培養した RMC のメグシン RNA 量は、LG 培養 RMC の約 5.5 倍という高い値を示した。一方、LG + mannitol 培養 RMC のメグシン RNA 量は、LG 培養 RMC と同程度であった。LG 培養 RMC および LG + mannitol 培養 RMC に対して、HG 培養 RMC のメグシン RNA 量が有意に高値であったことから、培地中グルコース濃度を高めることにより、細胞中のメグシン RNA 量が増加することが明らかになった。

3. メグシンによるプラスミンおよび MMP の活性抑制

メグシンは、プラスミンの酵素活性を抑制することが報告されている (26)。このため、RMC の培地中にメグシタンパク質を添加して培養し、プラスミンおよびプラスミンにより活性化される MMP-2、MMP-9 の酵素活性を測定した。

図 3-3 にメグシタンパク質を添加して 72 時間培養した RMC の培養上清中の相対的なプラスミン活性、MMP-2 ならびに MMP-9 活性を示す。メグシン添加 RMC

(Megsin) の培養上清中の相対プラスミン活性は、メグシン無添加 RMC (Control) の約 10%であり有意に低値であった (図 3-3a)。またメグシン添加 RMC (Megsin) の培養上清中の相対 MMP-2 ならびに MMP-9 活性は、メグシン無添加 RMC (Control) に対して約 20%低値であり、有意差が認められた (図 3-3b)。

メグシンが、プラスミン活性抑制を介して MMP 活性を低下させたのか、MMP 活性を直接的に低下させたのか明らかにするために、MMP-9 標品に合成メグシントタンパク質を加え、MMP-9 の活性を測定した。図 3-4 に示すように、MMP-9 にメグシンを添加したサンプル (MMP-9 + megsin) 中の MMP-9 活性は、メグシン無添加の MMP-9 サンプル (MMP-9) と同程度であり、メグシン添加の影響は全く認められず、メグシンが MMP に対して直接的な影響をもたらす可能性は低いと考えられた。

次に、メグシンの作用を中和する抗体を作製して、内因性のメグシンの機能を抑制すると、MMP-2、MMP-9 の活性にどのような影響をもたらされるか検討した。

4. 抗メグシンモノクローナル中和抗体の取得

ハイブリドーマ法を用いて得たマウス抗メグシンモノクローナル抗体 MS18a がメグシントタンパク質に対する中和活性を有するか検討を行った。図 3-5 に、メグシン、MS18a、抗体に対するコントロールとしてのマウス IgG、MS18a に対するブロッキングペプチドを、それぞれプラスミンに加えたときの相対プラスミン活性を示す。プラスミンの活性 (図 3-5、A) は、メグシンを加えることにより約 50%減少し (図 3-5、B)、IgG と反応させたメグシンを加えても同様であった (図 3-5、C)。一方 MS18a と反応させたメグシンを加えた場合は、プラスミン活性はほとんど減少しなかった (図 3-5、D)。しかし、事前にブロッキングペプチドを加えてメグシンとの結合能を失わせた MS18a を用いた場合は、メグシンのみを加えた場合と同様に約 50%のプラスミン活性の減少が認められた (図 3-5、E)。

以上のデータより、MS18a は、メグシンのもつプラスミン活性に対する抑制作用を減弱させる、すなわちメグシンに対する中和活性を有することが示された。

5. 高グルコース培養条件下でのメグシンの作用

内因性メグシンの MMP-2、MMP-9 に及ぼす影響を明らかにするために、メグシン中和抗体 MS18a を加えて RMC を培養し、培養上清中の MMP-2 ならびに MMP-9 活性を測定した。

5 mM グルコース DMEM、25 mM グルコース DMEM、25 mM グルコース DMEM + MS18a、あるいは 25 mM グルコース DMEM + マウス IgG という条件下で RMC 細胞を 72 時間培養し、培養上清中の MMP-2 ならびに MMP-9 活性を測定した (図 3-6)。5 mM グルコース DMEM 培養 RMC (LG) と比較し、25 mM グルコース DMEM 培養 RMC (HG) の MMP-2 ならびに MMP-9 活性は約 20% 低下し、その差は有意であった。25 mM グルコース DMEM + MS18a 培養 RMC (HG + MS18a) の MMP-2 ならびに MMP-9 活性は、HG 群と比較して有意に高値であった。一方 25 mM グルコース DMEM + マウス IgG RMC (HG + IgG) の MMP-2 ならびに MMP-9 活性は、HG 群と同程度であり、有意差は認められなかった。

MMP-9 標品に MS18a を加え、MMP-9 の活性を測定した。図 3-7 に示すように、MMP-9 に MS18a を添加したサンプル (MMP-9 + MS18a) 中の MMP-9 活性は、メグシン無添加の MMP-9 サンプル (MMP-9) と同程度であり、MS18a 添加の影響は全く認められず、MS18a が MMP に対して直接的な影響をもたらす可能性は低いと考えられた。

HG 培養 RMC の MMP-2 ならびに MMP-9 活性が、LG 培養 RMC の MMP-2 ならびに MMP-9 活性に対して約 20% 低かったことから、高血糖状態においてメサンギウム細胞の MMP-2 ならびに MMP-9 活性が低下していることが明らかになった。HG 培養 RMC に IgG を加えても MMP-2 ならびに MMP-9 活性に変化は認められなかったが、メグシン中和抗体 MS18a を加えると MMP-2 ならびに MMP-9 活性が増加することから、メグシンは HG における MMP-2 ならびに MMP-9 活性低下の一因であることが示された。

表 3-1 HbA1c、総コレステロール、トリグリセライド、血圧に対するインスリン、オルメサルタン、ベザフィブラートの影響

	WKY	DM+V	DM+I	DM+olme	DM+beza
Number	10	10	9	10	10
HbA1c (%)	3.3 ± 0.0	5.3 ± 0.3 ^{***}	3.3 ± 0.2 ^{†††}	5.3 ± 0.2 ^{***}	5.2 ± 0.3 ^{***}
Total cholesterol (mg/dl)	128 ± 3	186 ± 10 ^{***}	132 ± 8 ^{†††}	141 ± 5 ^{†††}	132 ± 7 ^{†††}
Triglyceride (mg/dl)	39 ± 2	407 ± 44 ^{***}	221 ± 42 ^{**††}	259 ± 30 ^{****†}	239 ± 23 ^{****††}
Systolic blood pressure (mmHg)	139 ± 3	170 ± 4 ^{**}	178 ± 6 ^{***}	115 ± 6 ^{*†††}	173 ± 4 ^{***}

*, **ならびに***は WKY と DM+V の間で P < 0.05、P < 0.01、あるいは P < 0.001、†、††ならびに†††は DM+I、DM+olme、もしくは DM+beza と DM の間で P < 0.05、P < 0.01、あるいは P < 0.001 であることを示す。数値は平均値±標準誤差で記す。

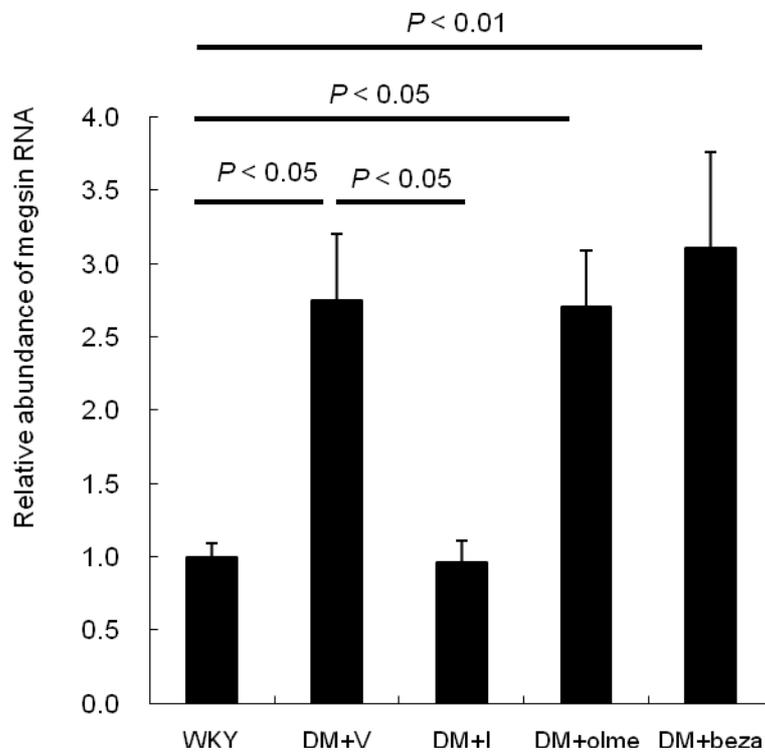


図 3-1 SHR/NDmcr-cp の腎臓組織中のメグシンの RNA 量

各群の腎臓組織におけるメグシンの RNA 量を GAPDH のそれで補正した相対量で示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (WKY, DM+V, DM+olme, DM+beza: n = 10, DM+I: n = 9)。

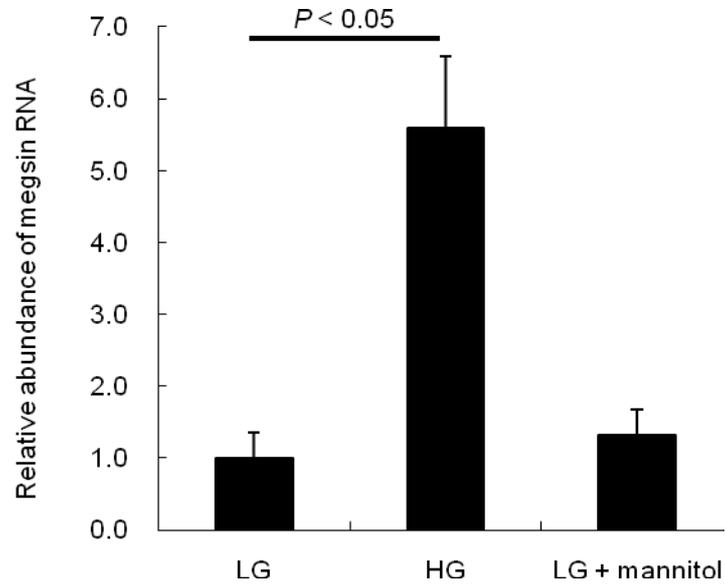


図 3-2 培養ラットメサンギウム細胞 RMC におけるメグシンの RNA 量

5 mM グルコース DMEM (LG)、25 mM グルコース DMEM (HG)、あるいは 5 mM グルコース + 20 mM マンニトール DMEM (LG + mannitol) で 72 時間培養した RMC におけるメグシンの RNA 量を GAPDH のそれで補正した相対量で示す。グラフは平均値 ± 標準誤差で示す (n = 6)。

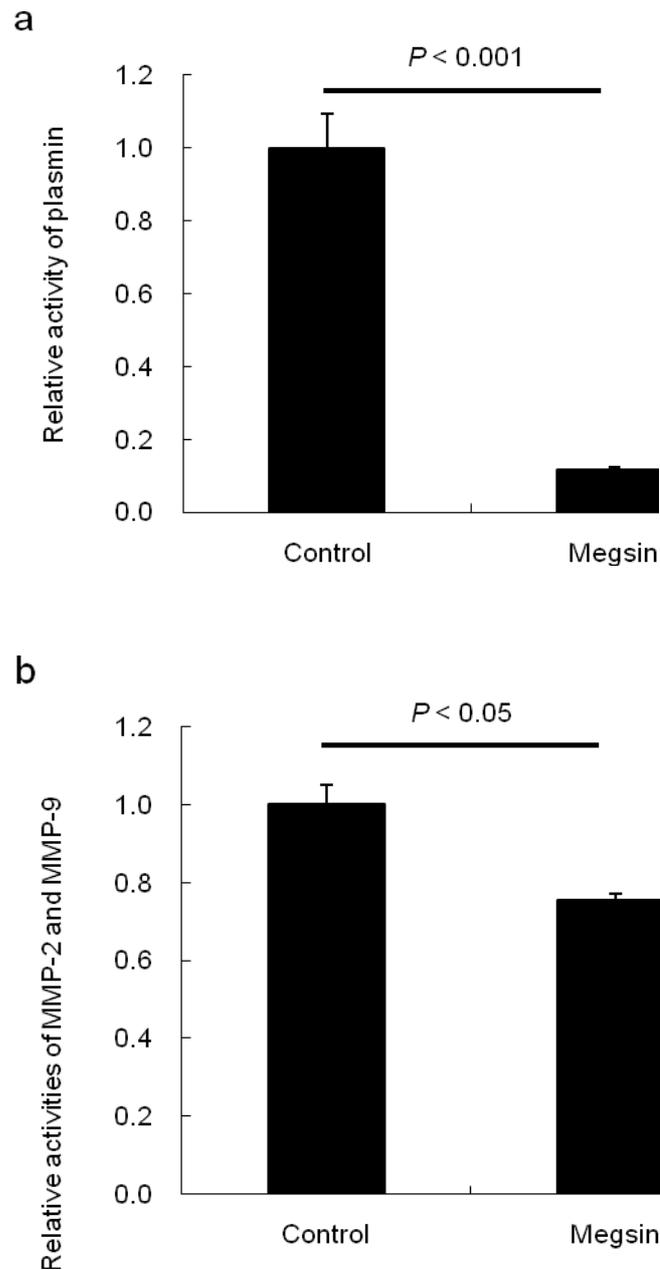


図 3-3 RMC 培養上清中の相対プラスミン活性および相対 MMP-2 ならびに MMP-9 活性

5 mM グルコース DMEM (Control) あるいはメグシン添加 5 mM グルコース DMEM (Megsin) で 72 時間培養した RMC 細胞の培養上清中の相対プラスミン酵素活性 (a)、相対 MMP-2 ならびに MMP-9 活性 (b) を示す。プラスミン活性および MMP-2 ならびに MMP-9 活性は、Control に対する相対値として示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (n = 6)。

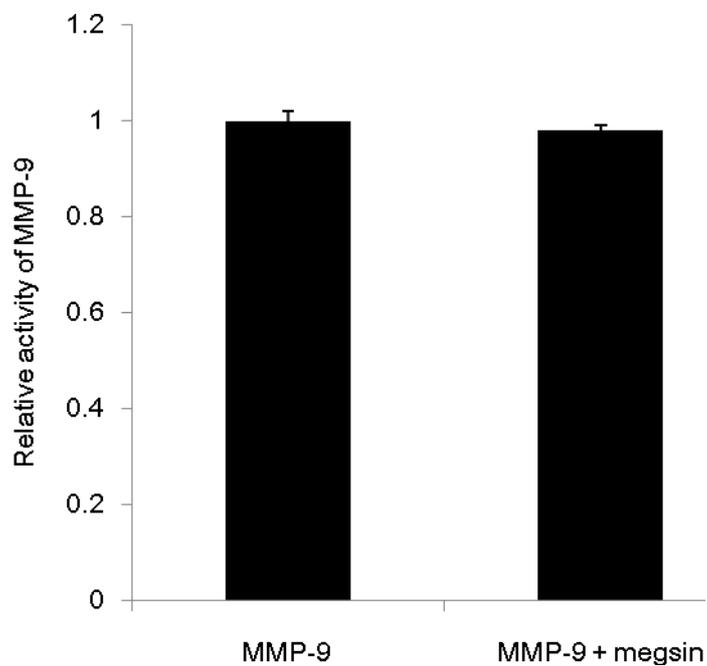


図 3-4 MMP-9 活性に対するメグシンの直接的な影響

MMP-9 標品と、合成メグシタンパク質と混合した MMP-9 標品 (MMP-9 + megsin) の、それぞれの MMP-9 活性を示す。MMP-9 活性は、MMP-9 標品に対する相対値として示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (n = 4)。

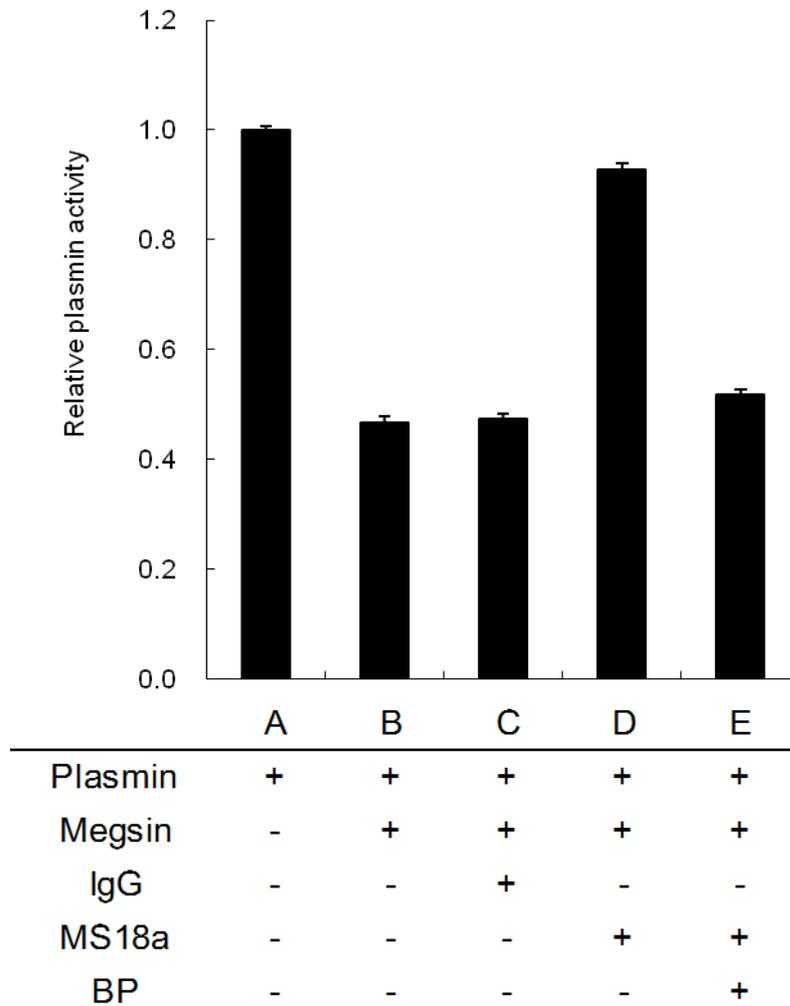


図 3-5 抗メグシンモノクローナル抗体 MS18a のメグシン活性に対する影響

プラスミンをメグシン、マウス IgG (IgG)、MS18a、ブロックングペプチド (BP) と反応させた後のプラスミン活性を示す。プラスミン活性は、A に対する相対値として示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (n = 4)。

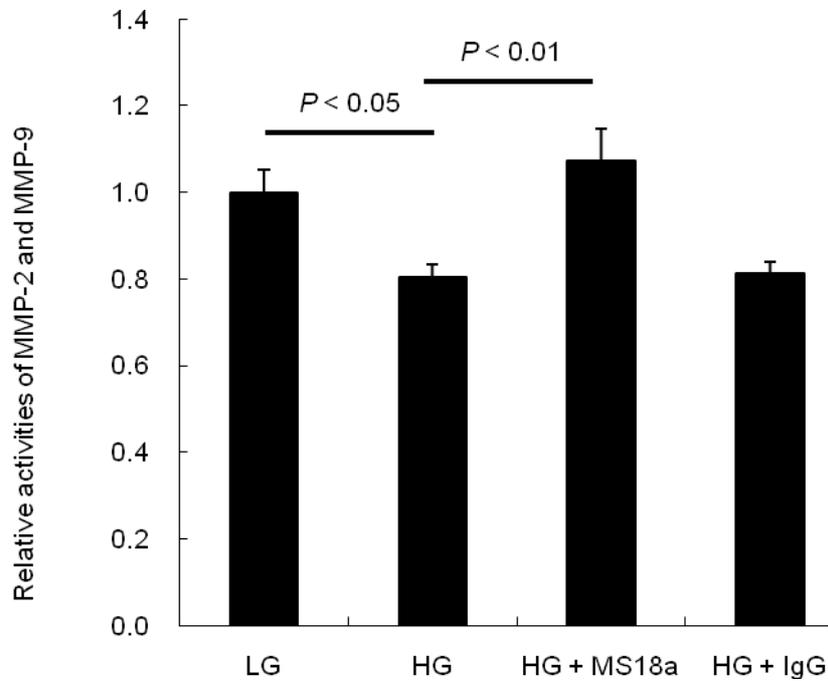


図 3-6 RMC 培養上清中の MMP-2 ならびに MMP-9 活性に対するメグシン中和抗体 MS18a の影響

5 mM グルコース DMEM (LG)、25 mM グルコース DMEM (HG)、MS18a を加えた 25 mM グルコース DMEM (HG + MS18a)、あるいはマウス IgG を加えた 25 mM グルコース DMEM (HG + IgG) で培養した RMC 細胞の、培養上清中の MMP-2 ならびに MMP-9 活性を示す。MMP-2 ならびに MMP-9 活性は、LG に対する相対値として示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (n = 8)。

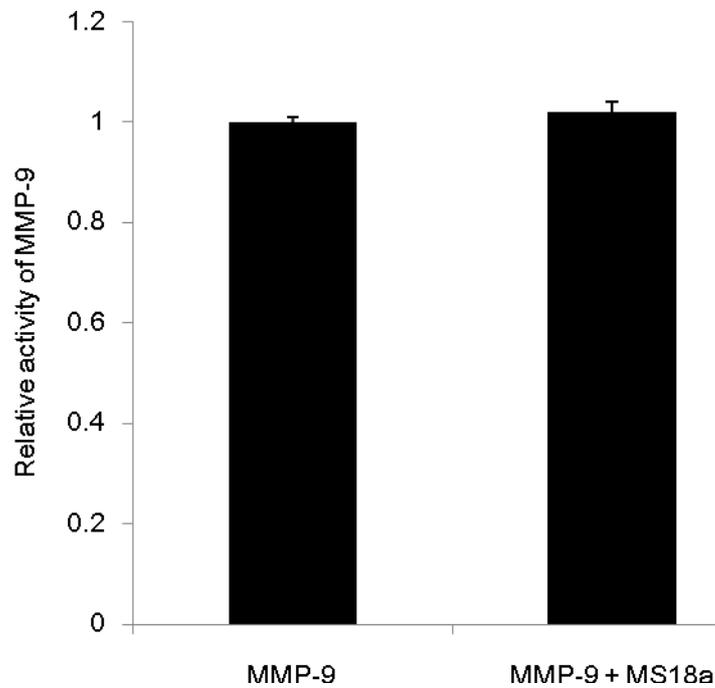


図 3-7 MMP-9 活性に対する MS-18a の直接的な影響

MMP-9 標品と、MS18a と混合した MMP-9 標品 (MMP-9 + MS18a) の、それぞれの MMP-9 活性を示す。MMP-9 活性は、MMP-9 標品に対する相対値として示す。グラフは平均値±標準誤差で示す (n = 4)。

【考 察】

本章では、腎臓中のメグシン RNA 量がグルコース濃度の上昇に伴い増加することを明らかにした。これは、インスリン投与を行った SHR/NDmcr-*cp* において、HbA1c の低下とともに腎臓中メグシン RNA 量の低下が認められたこと (図 3-1)、高グルコース濃度の DMEM 培地で培養した RMC 細胞のメグシン RNA 量が高値であったこと (図 3-2) に基づいた知見である。糖尿病性腎症患者の腎臓組織においてメグシン RNA 量が増加することは報告されており (24, 84)、本研究の結果はこれらの報告と一致する。糖尿病性腎症におけるメグシン RNA 量増加の機序はこれまで明らかにされておらず、本研究により細胞外液中のグルコース濃度の上昇が関係することが新たに示された。メグシン RNA 量増加の分子メカニズムは明らかではないが、メグシンの 5' 隣接領域には転写因子として知られる AP-1 結合サイトが存在しており (85)、高グルコース培養条件下のメサンギウム細胞における AP-1 結合サイトへの AP-1 の結合増加 (86) に起因する可能性がある。

メグシンの機能については、プラスミン酵素活性に対する阻害作用を有することが明らかになっており、またトランスジェニック動物を用いた検討により生体内では糸球体マトリックス増加に関与することが示されている (26, 27)。本章では、図 3-3 に示したように、メグシンがプラスミンのみならず MMP-2 および MMP-9 活性に対する阻害作用を有することを新たに明らかにした。メグシンは MMP-9 活性に対する直接的な阻害作用はないこと (図 3-4) から、プラスミンの活性低下を介して MMP-2 および MMP-9 の不活性型から活性型への変換を抑制した (31) と考えられる。本章で明らかにしたプラスミン、MMP-2、MMP-9 に対するメグシンの作用は、トランスジェニック動物における糸球体マトリックス増加のメカニズムを示す知見である。

さらに本章では、高グルコース条件下において引き起こされる MMP-2 ならびに MMP-9 の活性低下の原因の一つがメグシンであることを示した。これは、高グルコース条件下にて低下した MMP-2 ならびに MMP-9 活性が、メグシン中和抗体 MS18a の添加により低グルコース条件下と同等の MMP-2 ならびに MMP-9 活性へと回復した結果に基づいている (図 3-6)。通常、生体内の MMP-2 および MMP-9 の活性は厳密に制御さ

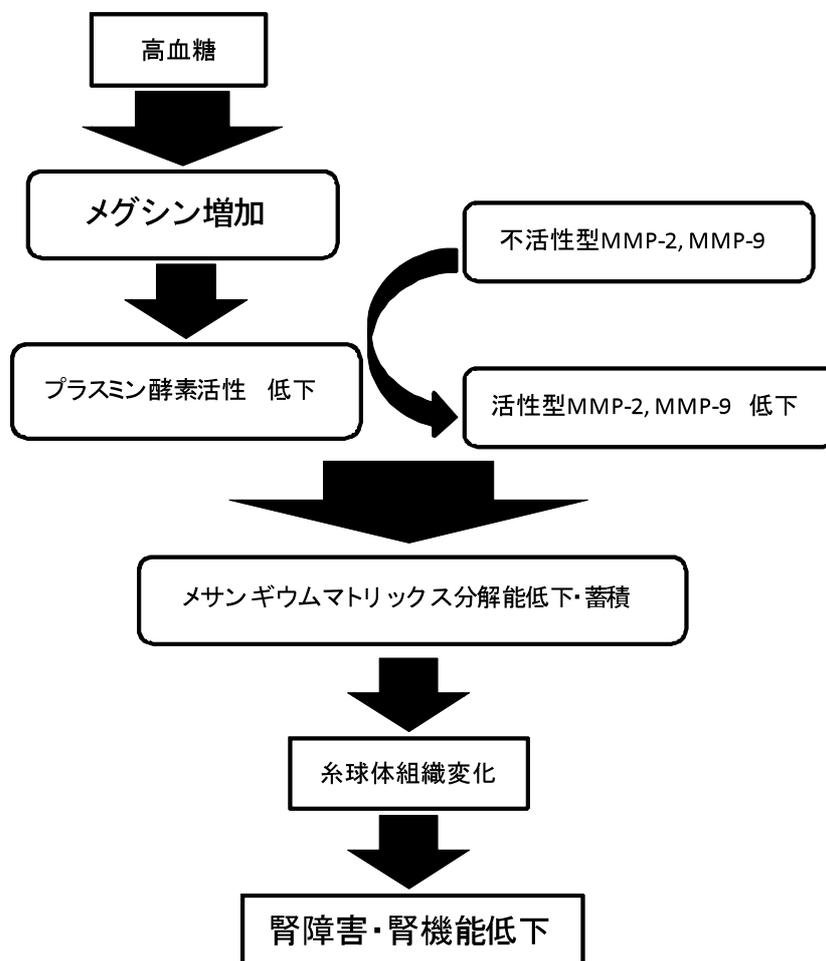
れているが、高血糖状態では何らかの要因によりその制御機構に不具合が生じて活性が低下し、その結果として糖尿病性腎症に特徴的な糸球体マトリックスの蓄積が引き起こされると想定されている (31)。すなわち、高血糖状態で発現増加するメグシンは、糖尿病性腎症における糸球体マトリックス蓄積の一因であることが本研究により新たに明らかになった。糸球体マトリックスの蓄積は糸球体濾過機能の低下、すなわち腎機能の低下につながる (46) から、本章の結果は、糖尿病性腎症における腎機能改善を目的とした薬物治療の可能性を考える上で有用な知見である。

創薬ターゲットとしての有用性を評価するにあたっては、薬効の強さ、すなわちその因子が病態に対してどの程度関与しているかという点だけでなく、その因子を阻害もしくは活性化させた場合の副作用の強さを考慮に入れる必要がある。糸球体マトリックスの蓄積には、メグシンだけでなく TGF- β も関与することが知られている (31, 82, 87, 88)。第一章でも述べたように TGF- β は腎機能低下に関わるサイトカインであり (43, 44)、その阻害は糸球体マトリックス増加だけでなく、間質線維化に対しても有効であると考えられる。その一方で、TGF- β の発現は全身に及んでおり、生体における創傷治癒を担っていること (89) から、その阻害剤は大きな副作用を有すると懸念される。これに対してメグシンは、腎臓メサンギウム細胞に特異的に発現し、その作用は腎臓に選択的と推察される (24, 26) ことから、メグシンは副作用の少ない、より有用な新たな創薬ターゲットとして期待できる。

また本研究からは、メグシン阻害化合物のスクリーニング手法についても知見が得られた。本研究で用いたメグシン中和抗体 MS18a のエピトープ配列は、メグシンの反応性ループ (90) と呼ばれる部位に位置する。この反応性ループはヒト、チンパンジー、イヌ、ラット、マウスに渡って広く保存されている配列であることから、メグシンのセリンプロテアーゼインヒビター活性に重要な部位であると推察される (24, 91)。これは、反応性ループに相当するアミノ酸が、MS18a に対する阻害ペプチドとして働き、MS18a により中和されたメグシンのプラスミン活性低下作用が回復した結果と一致する (図 3-5)。メグシンのように活性中心となる部位が明らかである場合は、三次元立体構造を利用してコンピューター上で反応性ループ部位の阻害に有効な化合物を探索する、いわゆる SBDD の手法が利用できるため、効率的な化合物スクリーニングが可能になると期

待できる。また、MS18a もしくは同様の中和抗体を用いた抗体療法も、メグシンの機能阻害には有用と考えられる。

Schema 4 に本章の結果より得られた知見をまとめて示す。高血糖により誘導されたメグシンは、プラスミン、MMP-2、MMP-9 活性を低下させ、糸球体マトリックスの分解抑制を引き起こす、糸球体組織変化の一因であることを示した。糸球体選択的に発現するメグシンは、阻害による全身性副作用の可能性が低いと考えられ、糖尿病性腎症の治療のための創薬ターゲットとして有用であると期待できる。



Schema 4
糖尿病性腎症におけるメグシンによる糸球体組織変化の概念図

【小 括】

糖尿病性腎症における糸球体マトリックスの増加は、糸球体の傷害や機能低下をもたらすと想定されており、MMP-2、MMP-9 およびプラスミンの酵素活性低下が糸球体マトリックスの増加の一因と考えられている。メサンギウム細胞に特異的に発現するメグシンは、プラスミンを基質とするセリンプロテアーゼインヒビターであり、糸球体マトリックス増加に関与すると考えられている。本章では、糖尿病性腎症における糸球体マトリックス増加に対するメグシンの役割として、以下の知見を得た。

SHR/NDmcr-*cp* の腎臓組織においてメグシン RNA 量が増加し、血糖を低下させることによりメグシン RNA 量が低下すること、さらに高グルコース濃度 DMEM で培養したラットメサンギウム細胞 RMC においてメグシン RNA 量が増加することから、メグシン RNA 量の増加はグルコース濃度の上昇に起因することが推察された。RMC にメグシンを添加すると、プラスミン酵素活性の抑制が起こり、さらにプラスミン活性低下を介して MMP-2、MMP-9 の活性化が抑制されることを示した。次に、メグシン機能を抑制することによる MMP-2、MMP-9 への影響を検討するため、メグシン中和抗体 MS18a を取得した。高グルコース濃度 DMEM で培養した RMC では MMP-2 ならびに MMP-9 活性が低下すること、一方高グルコース DMEM にメグシン中和抗体 MS18a を加えて培養した RMC では、高グルコース DMEM 培養 RMC に対して MMP-2 ならびに MMP-9 活性が増加することを示し、メグシンが高グルコースにおける MMP-2 ならびに MMP-9 活性低下の一因であることを示した。

メグシンは、高血糖により発現が増加し、プラスミン、MMP-2、MMP-9 の活性抑制、すなわち糸球体マトリックス分解能の低下をもたらすことから、糖尿病性腎症における糸球体組織変化をもたらす原因の一つと考えられる。腎臓特異的に発現するメグシンは、糖尿病性腎症の有用な治療ターゲットとして期待される。

総 括

血糖ならびに血圧を正常値に保つことにより糖尿病性腎症における透析導入時期を遅延することが可能となったが、依然として腎機能低下の阻止や低下した腎機能の回復は適わず、透析導入は不可避である。糖尿病性腎症に対する、より効果的な治療方法が世界的に求められる中、本研究では糖尿病性腎症治療薬の開発ターゲットとして、高インスリン血症、HIF、メグシンの3つの可能性を示した。

第一章では、II型糖尿病性腎症モデルラット SHR/NDmcr-*cp* に対してピオグリタゾンもしくはインスリン製剤を投与し、腎障害および腎機能に対する影響について比較検討を行い、高インスリン血症が糖尿病性腎症において腎障害性に働くことを示した。高インスリン血症による、腎臓組織中の酸化ストレス、ペントシジン量に対する明らかな影響は認められなかったが、TGF- β RNA 量の増加が認められた。培養近位尿細管細胞 IRPTC において、インスリン濃度依存的に TGF- β RNA 量、タンパク質量の増加が認められ、TGF- β 発現増加が高インスリン血症による腎障害メカニズムの一つと推察された。II型糖尿病性腎症に多く認められる耐糖能異常状態である高インスリン血症は、糖尿病性腎症における重要な治療ターゲットと考えられる。

第二章では、コバルトを SHR/NDmcr-*cp* へ投与し、コバルトにより腎障害の抑制、HIF-1 α の分解抑制、尿細管間質領域の虚血・低酸素状態の軽減がもたらされることを示した。コバルト投与により、酸化ストレス、ペントシジン、TGF- β 、CTGF の抑制が認められ、これらは虚血・低酸素状態の軽減に主に起因していると推察された。HIF 分解抑制による腎臓中のエリスロポエチン、VEGF、HO-1 の発現増加を中心として、糸球体傷害の軽減、腎臓虚血・低酸素状態の軽減、間質線維性変化の軽減がもたらされたと推察され、HIF シグナルを促進する薬剤が、糖尿病性腎症における腎障害および腎機能低下に対する新たな治療法となる可能性が考えられた。

第三章では、糖尿病性腎症における糸球体マトリックスの増加の一因として、高血糖により発現増加したメグシンによる、プラスミン、MMP-2、MMP-9 の活性低下の可

能性を示した。SHR/NDmcr-*cp*の腎臓組織およびラットメサンギウム細胞 RMC を用いた検討より、メグシン RNA 量の増加は、グルコース濃度の上昇に起因してもたらされることが示唆された。メグシンにより、プラスミン活性が抑制され、その結果 MMP-2、MMP-9 の活性化が抑制される可能性を示した。また高グルコース培地で培養した RMC では MMP-2 ならびに MMP-9 活性が低下するが、メグシン中和抗体 MS18a を高グルコース培地に加えて培養した RMC では MMP-2 ならびに MMP-9 活性低下が抑制されることを示し、メグシンが高グルコース条件における MMP-2 ならびに MMP-9 活性低下の一因である可能性を示した。メグシンは、糖尿病性腎症の糸球体組織変化をもたらす原因の一つであると推察され、その阻害剤は糖尿病性腎症の腎障害抑制をもたらす新たな治療法となる可能性が考えられる。

過去 15 年以上にわたり、PKC- β 阻害剤、ピリドキサミンなどの AGE 形成阻害剤、CTGF 阻害剤などが糖尿病性腎症に対する治療薬として開発が進められてきたが、成功に至った薬剤はこれまでになく、今後は、より確かな治療ターゲットの選定が重要となると考えられている。これまでは薬剤の開発にマウス、ラットといったげっ歯類が主に用いられてきたが、げっ歯類で明らかな腎臓保護効果が示される薬剤でも、ヒトでは効果が認められない場合が多いことが分かってきており、ヒトにより近いとされるサルを用いた薬効評価の重要度が増している。また近年、II 型糖尿病に関する全ゲノム解析が相次いで発表されており (92, 93)、II 型糖尿病患者におけるターゲット遺伝子および関連遺伝子の発現変動をデータベースから検索することが可能となり始めている。本試験では、糖尿病性腎症モデルラットや培養細胞を使った検討から治療ターゲットの可能性を提示したが、さらにこれらのターゲットをゲノム解析データや糖尿病性腎症モデルサルといった複数の手段で評価し、糖尿病性腎症患者の治療につながるターゲットを絞り込んでいく必要があると考えられる。

糖尿病性腎症は、数ある疾患の中でも治療薬開発が困難な部類に入ると思われるが、本研究で示した高インスリン血症、HIF シグナル、メグシンをターゲットとした薬剤研究により、糖尿病性腎症に対する新たな治療法がもたらされることが期待される。

謝 辞

本論文の作成にあたり、終始御懇篤なる御指導をいただきました北海道大学大学院獣医学研究科の稲葉睦教授に甚大なる謝辞を表します。

本論文を御高閲頂いた北海道大学大学院獣医学研究科の安居院高志教授、昆泰寛教授、ならびに滝口満喜教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究に際し終始ご指導いただきました東北大学大学院医学系研究科の宮田敏男教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、本論文をまとめるにあたり、終始ご指導いただきました中外製薬株式会社の堀場直博士に甚大なる謝辞を表します。

引用文献

- 1) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, **329**, 977-86.
- 2) Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. (2003) Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *JAMA.*, **290**, 2159-67.
- 3) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. (1998) Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*, **352**, 854-65.
- 4) Parving HH, Andersen AR, Smidt UM, Svendsen PA. (1983) Early aggressive antihypertensive treatment reduces rate of decline in kidney function in diabetic nephropathy. *Lancet*, **1**, 1175-1179.
- 5) Viberti G, Wheeldon NM. (2002) Microalbuminuria reduction with valsartan in patients with type 2 diabetes mellitus. A blood pressure-independent effect. *Circulation*, **106**, 672-678.
- 6) Parving HH, Lehnert H, Bröchner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P; Irbesartan in Patients with Type 2 Diabetes and Microalbuminuria Study Group. (2001) The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.*, **345**, 870-878.
- 7) Sarafidis PA, Ruilope LM (2006) Insulin resistance, hyperinsulinemia, and renal injury: mechanisms and implications. *Am. J. Nephrol.*, **26**, 232-244.
- 8) Trovati M, Cavalot F (2004) Optimization of hypolipidemic and antiplatelet treatment in the diabetic patient with renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **15**, S12-20.
- 9) Inagi R, Miyata T, Suzuki D, Toyoda M, Wada T, Ueda Y, Izuhara Y, Sakai H, Nangaku M, Kurokawa K. (2001) Specific tissue distribution of megsin, a novel serpin, in the

- glomerulus and its up-regulation in IgA nephropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **286**, 1098-1106.
- 10) Tan AL, Forbes JM, Cooper ME (2007) AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin. Nephrol.*, **27**, 130-43.
 - 11) Navarro-González JF, Mora-Fernández C (2008) The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **19**, 433-42.
 - 12) Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME (2008) Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*, **57**, 1446-54.
 - 13) Sarafidis PA, Bakris GL (2006) Protection of the kidney by thiazolidinediones: an assessment from bench to bedside. *Kidney Int.*, **70**, 1223-1233.
 - 14) Ruggenenti P, Remuzzi G. (2006) Time to abandon microalbuminuria? *Kidney Int.*, **70**, 1214-1222.
 - 15) Nangaku M. (2006) Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **17**, 17-25.
 - 16) Ries M, Basseau F, Tyndal B, Jones R, Deminière C, Catargi B, Combe C, Moonen CW, Grenier N. (2003) Renal diffusion and BOLD MRI in experimental diabetic nephropathy. Blood oxygen level-dependent. *J. Magn. Reson. Imaging*, **17**, 104-113.
 - 17) Futrakul N, Vongthavarawat V, Sirisalipotch S, Chairatanarat T, Futrakul P, Suwanwalaikorn S. (2005) Tubular dysfunction and hemodynamic alteration in normoalbuminuric type 2 diabetes. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, **32**, 59-65.
 - 18) Gilbert RE, Cooper ME. (1999) The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? *Kidney Int.*, **56**, 1627-1637.
 - 19) Matsumoto M, Tanaka T, Yamamoto T, Noiri E, Miyata T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M. (2004) Hypoperfusion of peritubular capillaries induces chronic hypoxia before progression of tubulointerstitial injury in a progressive model of rat glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **15**, 1574-1581.
 - 20) Phillips AO, Steadman R. (2002) Diabetic nephropathy: the central role of renal

proximal tubular cells in tubulointerstitial injury. *Histol. Histopathol.*, **17**, 247-252.

- 21) Semenza GL. (2001) HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell*, **107**, 1-3.
- 22) Salnikow K, Donald SP, Bruick RK, Zhitkovich A, Phang JM, Kasprzak KS. (2004) Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J. Biol. Chem.*, **279**, 40337-40344.
- 23) Yasuda Y, Miyata T, Nangaku M, Iida Y, Maeda K, Kurokawa K, Okubo K. (1998) Functional quantitative analysis of the genome in cultured human mesangial cells. Technical note. *Kidney Int.*, **53**, 154-158.
- 24) Miyata T, Nangaku M, Suzuki D, Inagi R, Uragami K, Sakai H, Okubo K, Kurokawa K. (1998) A mesangium-predominant gene, megsin, is a new serpin upregulated in IgA nephropathy. *J. Clin. Invest.*, **102**, 828-836.
- 25) Suzuki D, Miyata T, Nangaku M, Takano H, Saotome N, Toyoda M, Mori Y, Zhang SY, Inagi R, Endoh M, Kurokawa K, Sakai H. (1999) Expression of megsin mRNA, a novel mesangium-predominant gene, in the renal tissues of various glomerular diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **10**, 2606-2613.
- 26) Miyata T, Inagi R, Nangaku M, Imasawa T, Sato M, Izuhara Y, Suzuki D, Yoshino A, Onogi H, Kimura M, Sugiyama S, Kurokawa K. (2002) Overexpression of the serpin megsin induces progressive mesangial cell proliferation and expansion. *J. Clin. Invest.*, **109**, 585-593.
- 27) Inagi R, Yamamoto Y, Nangaku M, Usuda N, Okamoto H, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Yamamoto H, Miyata T. (2006) A severe diabetic nephropathy model with early development of nodule-like lesions induced by megsin overexpression in RAGE/iNOS transgenic mice. *Diabetes*, **55**, 356-366.
- 28) Liotta LA, Goldfarb RH, Terranova VP. (1981) Cleavage of laminin by thrombin and plasmin: alpha thrombin selectively cleaves the beta chain of laminin. *Thromb. Res.*, **21**, 663-673.
- 29) Catania JM, Chen G, Parrish AR. (2007) Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **292**, F905-911.

- 30) Nagase H, Visse R, Murphy G. (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.*, **69**, 562-573.
- 31) McLennan SV, Fisher E, Martell SY, Death AK, Williams PF, Lyons JG, Yue DK. (2000) Effects of glucose on matrix metalloproteinase and plasmin activities in mesangial cells: possible role in diabetic nephropathy. *Kidney Int. Suppl.*, **77**, S81-87.
- 32) Michaelis OE 4th, Carswell N, Velasquez MT, Kimmel PL, Abraham AA, Canary JJ, Hansen CT. (1990) Influence of genetic obesity, dietary carbohydrate and age on parameters of glucose tolerance and kidney and adrenal gland histology in female SHR/N-corpulent rats. *Int. J. Obes.*, **14**, 973-985.
- 33) Velasquez MT, Kimmel PL, Michaelis OE 4th, Carswell N, Abraham A, Bosch JP. (1989) Effect of carbohydrate intake on kidney function and structure in SHR/N-cp rats. A new model of NIDDM. *Diabetes*, **38**, 679-85.
- 34) Gross ML, Ritz E, Schoof A, Adamczak M, Koch A, Tulp O, Parkman A, El-Shakmak A, Szabo A, Amann K. (2004) Comparison of renal morphology in the Streptozotocin and the SHR/N-cp models of diabetes. *Lab. Invest.*, **84**, 452-464.
- 35) Izuhara Y, Nangaku M, Inagi R, Tominaga N, Aizawa T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Miyata T. (2005) Renoprotective properties of angiotensin receptor blockers beyond blood pressure lowering. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **16**, 3631-3641.
- 36) Nangaku M, Miyata T, Sada T, Mizuno M, Inagi R, Ueda Y, Ishikawa N, Yuzawa H, Koike H, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. (2003) Anti-hypertensive agents inhibit in vivo the formation of advanced glycation end products and improve renal damage in a type 2 diabetic nephropathy rat model. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, 1212-1222.
- 37) Imano E, Kanda T, Nakatani Y, Nishida T, Arai K, Motomura M, Kajimoto Y, Yamasaki Y, Hori M. (1998) Effect of troglitazone on microalbuminuria in patients with incipient diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, **21**, 2135-2139.
- 38) Schernthaner G, Matthews DR, Charbonnel B, Hanefeld M, Brunetti P; Quartet Study Group. (2004) Efficacy and safety of pioglitazone versus metformin in patients with type 2 diabetes mellitus: a double-blind, randomized trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**,

6068-6076.

- 39) Catalano C, Muscelli E, Quiñones Galvan A, Baldi S, Masoni A, Gibb I, Torffvit O, Seghieri G, Ferrannini E. (1997) Effect of insulin on systemic and renal handling of albumin in nondiabetic and NIDDM subjects. *Diabetes*, **46**, 868-875.
- 40) Weder AB. (1994) Sodium metabolism, hypertension, and diabetes. *Am. J. Med. Sci.*, **307**, S53-59.
- 41) Semplicini A, Ceolotto G, Massimino M, Valle R, Serena L, De Toni R, Pessina AC, Dal Palù C. (1994) Interactions between insulin and sodium homeostasis in essential hypertension. *Am. J. Med. Sci.*, **307**, S43-46.
- 42) Hall JE. (1997) Mechanisms of abnormal renal sodium handling in obesity hypertension. *Am. J. Hypertens.*, **10**, 49S-55S.
- 43) Schena FP, Gesualdo L. (2005) Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, [Suppl]1, S30-33.
- 44) Chiarelli F, Gaspari S, Marcovecchio ML. (2009) Role of growth factors in diabetic kidney disease. *Horm. Metab. Res.*, **41**, 585-593.
- 45) Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. (2003) Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, [Suppl]14, S241-245.
- 46) Horie K, Miyata T, Maeda K, Miyata S, Sugiyama S, Sakai H, van Ypersole de Strihou C, Monnier VM, Witztum JL, Kurokawa K. (1997) Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. *J. Clin. Invest.*, **100**, 2995-3004.
- 47) Suzuki D, Miyata T, Saotome N, Horie K, Inagi R, Yasuda Y, Uchida K, Izuhara Y, Yagame M, Sakai H, Kurokawa K. (1999) Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **10**, 822-832.
- 48) Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G. (2005) Advanced glycation end products and the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **289**, F645-659.

- 49) Ingelfinger JR, Jung F, Diamant D, Haveran L, Lee E, Brem A, Tang SS. (1999) Rat proximal tubule cell line transformed with origin-defective SV40 DNA: Autocrine ANG II feedback. *Am. J. Physiol.*, **276**, F218–F227.
- 50) Savin VJ. (1993) Mechanisms of proteinuria in noninflammatory glomerular diseases. *Am. J. Kidney Dis.*, **21**, 347-362.
- 51) Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH. (1982) Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N. Engl. J. Med.*, **307**, 652-659.
- 52) Wolak T, Kim H, Ren Y, Kim J, Vaziri ND, Nicholas SB. (2009) Osteopontin modulates angiotensin II-induced inflammation, oxidative stress, and fibrosis of the kidney. *Kidney Int.*, **76**, 32-43.
- 53) Whaley-Connell A, Habibi J, Nistala R, Cooper SA, Karuparthi PR, Hayden MR, Rehmer N, DeMarco VG, Andresen BT, Wei Y, Ferrario C, Sowers JR. (2008) Attenuation of NADPH oxidase activation and glomerular filtration barrier remodeling with statin treatment. *Hypertension*, **51**, 474-480.
- 54) Schnaper HW, Jandeska S, Runyan CE, Hubchak SC, Basu RK, Curley JF, Smith RD, Hayashida T. (2009) TGF-beta signal transduction in chronic kidney disease. *Front Biosci.*, **14**, 2448-2465.
- 55) Hao CM, Breyer MD. (2007) Roles of lipid mediators in kidney injury. *Semin. Nephrol.*, **27**, 338-351.
- 56) Morrisey K, Evans RA, Wakefield L, Phillips AO. (2001) Translational regulation of renal proximal tubular epithelial cell transforming growth factor-beta1 generation by insulin. *Am. J. Pathol.*, **159**, 1905-1915.
- 57) Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt KU, Iwano M, Haase VH. (2007) Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.*, **117**, 3810-3820.

- 58) Simonson MS. (2007) Phenotypic transitions and fibrosis in diabetic nephropathy. *Kidney Int.*, **71**, 846-854.
- 59) Tanaka T, Matsumoto M, Inagi R, Miyata T, Kojima I, Ohse T, Fujita T, Nangaku M. (2005) Induction of protective genes by cobalt ameliorates tubulointerstitial injury in the progressive Thyl nephritis. *Kidney Int.*, **68**, 2714-2725.
- 60) Tanaka T, Kojima I, Ohse T, Ingelfinger JR, Adler S, Fujita T, Nangaku M. (2005) Cobalt promotes angiogenesis via hypoxia-inducible factor and protects tubulointerstitium in the remnant kidney model. *Lab. Invest.*, **85**, 1292-1307.
- 61) Tanaka T, Kojima I, Ohse T, Inagi R, Miyata T, Ingelfinger JR, Fujita T, Nangaku M. (2005) Hypoxia-inducible factor modulates tubular cell survival in cisplatin nephrotoxicity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **289**, F1123-1133.
- 62) Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, Brady HR. (2000) Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int.*, **58**, 1389-1399.
- 63) Eckardt KU, Bernhardt W, Willam C, Wiesener M. (2007) Hypoxia-inducible transcription factors and their role in renal disease. *Semin. Nephrol.*, **27**, 363-372.
- 64) Matsumoto M, Makino Y, Tanaka T, Tanaka H, Ishizaka N, Noiri E, Fujita T, Nangaku M. (2003) Induction of renoprotective gene expression by cobalt ameliorates ischemic injury of the kidney in rats. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, 1825-32.
- 65) Bahlmann FH, Song R, Boehm SM, Mengel M, von Wasielewski R, Lindschau C, Kirsch T, de Groot K, Laudeley R, Niemczyk E, Güler F, Menne J, Haller H, Fliser D. (2004) Low-dose therapy with the long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alpha persistently activates endothelial Akt and attenuates progressive organ failure. *Circulation*, **110**, 1006-1012.
- 66) Abraham NG, Kappas A. (2005) Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 1-25.
- 67) Eckardt KU. (2009) Erythropoietin and microvascular diabetic complications. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **24**, 388-390.

- 68) Lindenmeyer MT, Kretzler M, Boucherot A, Berra S, Yasuda Y, Henger A, Eichinger F, Gaiser S, Schmid H, Rastaldi MP, Schrier RW, Schlöndorff D, Cohen CD. (2007) Interstitial vascular rarefaction and reduced VEGF-A expression in human diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **18**, 1765-1776.
- 69) Kitayama H, Maeshima Y, Takazawa Y, Yamamoto Y, Wu Y, Ichinose K, Hirokoshi K, Sugiyama H, Yamasaki Y, Makino H. (2006) Regulation of angiogenic factors in angiotensin II infusion model in association with tubulointerstitial injuries. *Am. J. Hypertens.*, **19**, 718-727.
- 70) Courtney AE, Maxwell AP. (2008) Heme oxygenase 1: does it have a role in renal cytoprotection? *Am. J. Kidney Dis.*, **51**, 678-690.
- 71) Eto N, Wada T, Inagi R, Takano H, Shimizu A, Kato H, Kurihara H, Kawachi H, Shankland SJ, Fujita T, Nangaku M. (2007) Podocyte protection by darbepoetin: preservation of the cytoskeleton and nephrin expression. *Kidney Int.*, **72**, 455-63.
- 72) Logar CM, Brinkkoetter PT, Krofft RD, Pippin JW, Shankland SJ. (2007) Darbepoetin alfa protects podocytes from apoptosis in vitro and in vivo. *Kidney Int.*, **72**, 489-498.
- 73) Comper WD, Hilliard LM, Nikolic-Paterson DJ, Russo LM. (2008) Disease-dependent mechanisms of albuminuria. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **295**, F1589-1600.
- 74) Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH. (2008) Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney Int.*, **74**, 22-36.
- 75) Palm F. (2006) Intrarenal oxygen in diabetes and a possible link to diabetic nephropathy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **33**, 997-1001.
- 76) Singh DK, Winocour P, Farrington K. (2008) Mechanisms of disease: the hypoxic tubular hypothesis of diabetic nephropathy. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.*, **4**, 216-226.
- 77) Higgins DF, Biju MP, Akai Y, Wutz A, Johnson RS, Haase VH. (2004) Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **287**, 1223-1232.
- 78) Wolf G, Ziyadeh FN. (2007) Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol.*, **106**, 26-31.

- 79) Adler S. (1994) Structure-function relationships associated with extracellular matrix alterations in diabetic glomerulopathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **5**, 1165-1172.
- 80) Miner JH. (1999) Renal basement membrane components. *Kidney Int.*, **56**, 2016-2024.
- 81) Steffes MW, Osterby R, Chavers B, Mauer SM. (1989) Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients. *Diabetes*, **38**, 1077-1081.
- 82) Schena FP, Gesualdo L. (2005) Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **16**, S30-33.
- 83) Inagi R, Miyata T, Suzuki D, Toyoda M, Wada T, Ueda Y, Izuhara Y, Sakai H, Nangaku M, Kurokawa K. (2001) Specific tissue distribution of megsin, a novel serpin, in the glomerulus and its up-regulation in IgA nephropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **286**, 1098-1106.
- 84) Inagi R, Izuhara Y, Tominaga N, Nangaku M, Kurokawa K, Miyata T. (2007) Establishment of a sandwich ELISA for human megsin, a kidney-specific serine protease inhibitor. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **22**, 3311-3317.
- 85) Inagi R, Miyata T, Nangaku M, Ueyama H, Takeyama K, Kato S, Kurokawa K. (2002) Transcriptional regulation of a mesangium-predominant gene, megsin. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **13**, 2715-2722.
- 86) Wilmer WA, Cosio FG. (1998) DNA binding of activator protein-1 is increased in human mesangial cells cultured in high glucose concentrations. *Kidney Int.*, **53**, 1172-1181.
- 87) Lee HB, Ha H. (2005) Plasminogen activator inhibitor-1 and diabetic nephropathy. *Nephrology*, **10**, S11-13.
- 88) Miyata T, Li M, Yu X, Hirayama N. (2007) Megsin gene: its genomic analysis, pathobiological functions, and therapeutic perspectives. *Current Genomics*, **8**, 203-208.
- 89) Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. (2008) Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.*, **16**, 585-601.

- 90) Bijmens AP, Gils A, Stassen JM, Komissarov AA, Knockaert I, Brouwers E, Shore JD, Declerck PJ. (2001) The distal hinge of the reactive site loop and its proximity: a target to modulate plasminogen activator inhibitor-1 activity. *J. Biol. Chem.*, **276**, 44912-44918.
- 91) Nangaku M, Miyata T, Suzuki D, Umezono T, Hashimoto T, Wada T, Yagi M, Nagano N, Inagi R, Kurokawa K. (2001) Cloning of rodent megsin revealed its up-regulation in mesangioproliferative nephritis. *Kidney Int.*, **60**, 641-652.
- 92) Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. (2007) A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*, **445**, 881-885.
- 93) Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ, Harries LW, Marchini JL, Owen KR, Knight B, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Morris AD, Doney AS; Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), McCarthy MI, Hattersley AT. (2007) Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science*, **316**, 1336-1341.

英文概要

The development of novel therapeutic targets for diabetic nephropathy: hyperinsulinemia, HIF-1 α , and megin

Shuichi Ohtomo

Diabetic nephropathy is the most common cause of end-stage renal failure in developed countries. Strict glycemic control or blood pressure control of diabetic patients with nephropathy result in delay of dialysis onset. However, there is no therapeutic agent at the moment to regress the kidney injury in diabetic nephropathy. Thus, the development of novel therapeutics for diabetic nephropathy is an intensively investigated topic. In the present study, the mechanisms of the progression of diabetic nephropathy was investigated, using type II diabetic nephropathy rat model SHR/NDmcr-*cp* and *in vitro* cultured renal cells.

First, the renoprotective effects achieved by an insulin-sensitizer, pioglitazone, or by insulin were compared in SHR/NDmcr-*cp*. Pioglitazone markedly attenuated hyperinsulinemia and renal dysfunction in contrast with insulin treatment. Although renal accumulation of pentosidine and the local oxidative stress were both reduced to a similar extent by pioglitazone and insulin, the enhanced TGF- β expression was suppressed only by pioglitazone, suggesting that hyperinsulinemia up-regulated TGF- β expression. These data suggest that hyperinsulinemia together with a stimulated TGF- β expression significantly contribute to the incidence and deterioration of diabetic nephropathy.

Second, the renoprotective effects of cobalt chloride, which enhances a key defensive factor against hypoxia, i.e. HIF, were evaluated in SHR/NDmcr-*cp*. The renal expression of TGF- β and CTGF, renal accumulation of pentosidine, and the local oxidative stress were reduced, and significant renoprotection was observed by cobalt treatment. Cobalt treatment up-regulated renal HIF-1 α expression, increased the expression of HIF-regulated genes, e.g. erythropoietin,

VEGF, and HO-1, and protected peritubular capillaries. Thus, cobalt achieved renal protection via the activation of HIF-1 α signals, and its effect was attributed to prevention of renal hypoxia.

Third, the role of megsin, a member of the serine protease inhibitor superfamily, in the decreased activities of MMP-2, MMP-9 and plasmin was investigated. High-glucose up-regulated megsin RNA expression in the kidney of SHR/NDmcr-*cp* as well as *in vitro* in cultured mesangial cells (RMC). The functional studies in RMC showed that megsin potentially inhibits total enzymatic activities of MMP-2, MMP-9 and plasmin, indicating decreased degradation of mesangial matrix. An anti-megsin neutralizing antibody restored the reduced activities of MMP-2 and MMP-9 by megsin in RMC. These data suggest that hyperglycemia induces up-regulation of megsin which, in turn, inhibits activities of plasmin, MMP-2 and MMP-9, potentially contributing to mesangial matrix accumulation in diabetic nephropathy.

In conclusion, this study shows that the etiology of diabetic nephropathy involves hyperinsulinemia due to the increased expression of TGF- β that occurs through several distinct pathways including activation of HIF-1 α signals and up-regulation of megsin. These findings provide new insights into searching and identifying therapeutic targets for diavetic nephropathy.