

研究成果報告書

新たな糖尿病性腎症治療標的分子としての HSP 遺伝子群の
基礎的・臨床的意義の解明

17590926

平成 17 年度～平成 19 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 20 年 6 月

研究代表者 荒木信一

滋賀医科大学 医学部 助教

はしがき

糖尿病性腎症の発症機構を探る目的で、糖尿病モデルマウスの腎臓におけるストレス応答性分子シャペロン Heat Shock Protein (以下 HSP) と酸化ストレスとの関連に着目し研究を行った。HSP 遺伝子発現は、糖尿病モデルマウスの腎臓において経時的に抑制されていた。培養メサンギウム細胞に酸化ストレス刺激を加えると、HSP70 蛋白の分解が促進された。また、HSP70 過剰発現腎メサンギウム細胞では、酸化ストレス誘発アポトーシスを抑制した。本研究の成果として、長期にわたる糖尿病状態のために惹起された酸化ストレス亢進により、HSP70 蛋白の発現抑制ならびに蛋白分解が促進されることで生じる抗酸化ストレス防御機構の破綻が腎症の発症・進展に関与している可能性が考えられ、HSP70 蛋白を増加させることが糖尿病腎症の発症・進展抑制につながる可能性が示唆された。

研究組織

研究代表者 荒木信一 (滋賀医科大学 医学部 助教)

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	1,800,000	0	1,800,000
平成 18 年度	1,000,000	0	1,000,000
平成 19 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	210,000	3,710,000

研究発表

- (1) Yokomaku Y, Sugimoto T, Kume S, Araki S, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sakaguchi M, Nitta N, Haneda M, Koya D, Uzu T, Kashiwagi A. Asialoerythropoietin prevents contrast-induced nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 19:321-328, 2008
- (2) 横幕由喜代, 杉本俊郎, 久米真司, 坂口正芳, 金崎雅美, 一色啓二, 荒木信一, 樋口正人, 羽田勝計, 古家大祐, 宇津貴. アシアロエリスロポエチンは、造影剤腎症の発症を抑制する 第 50 回日本腎臓学会学術総会 (浜松) 2007 年
- (3) なし

研究成果による産業財産権の出願・取得状況

なし

滋賀医科大学附属図書館



2007015767

研究成果

糖尿病性腎症（以下腎症）による慢性腎不全のため血液浄化療法を必要とする患者数は、年々増加の一途を辿り、新規透析療法導入患者の原疾患の第一位を占めるに至っている。そのため、新たな治療戦略を講じ、この増加する腎症患者数を抑制することが医療上のみならず社会的・経済的緊急課題である。これまでに我々の研究グループでは、糖尿病モデル動物の腎臓において、酸化ストレスの亢進が生じ、腎症の発症に関与していることを報告してきた。そこで、糖尿病状態で生じる抗酸化ストレス防御機構の破綻が腎症の発症・進展に強く関与しているとの仮説のもと以下の研究をおこなった。

1. 2型糖尿病モデルマウスの腎臓における Heat Shock Protein 遺伝子の発現

腎症の発症・進展に関与する新たな治療標的分子を探索するため、2型糖尿病モデル動物である db/db マウス(6、10、14、18 週齢)と同週齢のコントロールマウスである db/m マウスの腎臓より mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイ法を用いて経時的遺伝子発現プロファイルの作成を試みた。この経時的遺伝子発現プロファイルより、腎症の発症に伴い発現量の増加・減少をきたす遺伝子群のクラスター分類を検討したところ、熱ストレスなどの各種ストレスにより発現誘導されるストレス応答性分子シャペロンである Heat Shock

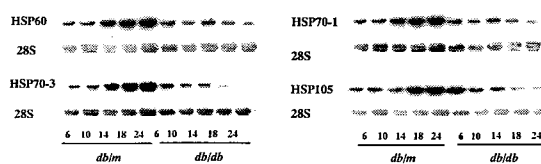


図 1. HSP 遺伝子発現の経時変化

Protein（以下 HSP）に属する遺伝子群の中で、HSP60、HSP70.1、HSP70.3、HSP105 が、糖尿病モデル動物の腎臓において経時的に mRNA 発現が抑制されることを見出した。

そこで、全腎臓から抽出した mRNA・蛋白質を用いてノーザンプロット法・ウエスタンプロット法による HSP mRNA 発現量・蛋白質の経時変化を検討したところ、mRNA 発現量は、DNA マイクロアレイ法により得られた成績と同様に、糖尿病モデル動物である db/db マウスにおいてコントロールマウスである db/m マウスに比較して減少していた（図 2）。

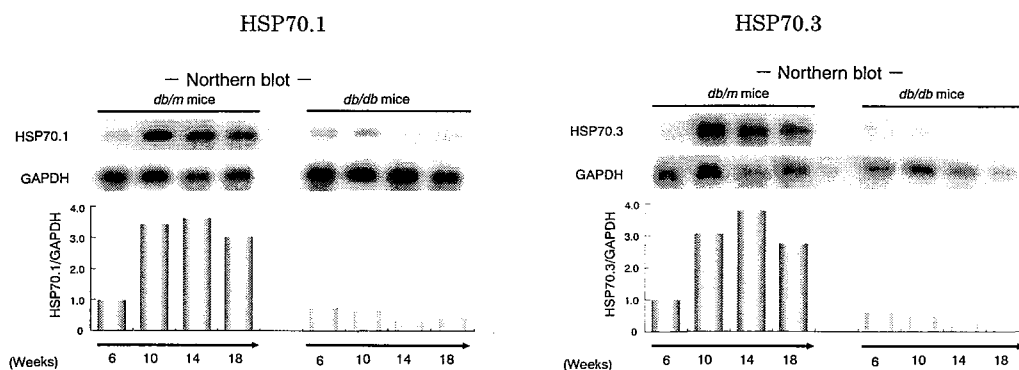


図 2. 糖尿病モデルマウスの腎臓における HSP70mRNA 発現の経時変化

しかしながら、HSP70 蛋白量の経時変化では、第 6 週齢の db/db マウスにおいて、mRNA 発現量の成績とは異なり db/m マウスよりも HSP70 蛋白量の増加を認めた。しかしその後の蛋白量は、DNA マイクロアレイ法やノーザンブロット法により得られた成績と同様に週齢の経過とともに減少を認めた。

2. 高糖濃度条件下培養メサンギウム細胞における HSP

マウス腎メサンギウム細胞を正常糖濃度 (100mg/dl) ならび高糖濃度 (500mg/dl) 条件下にて 1 日から 3 日の短期間培養し、HSP70 発現変化を real-time PCR 法にて検討を行った。その結果、高糖濃度培養条件下において、時間依存性に HSP70.1 ならびに HSP70.3 発現量の増加が認められた (図 3)。ウエスタンブロット法による蛋白量変化についても検討を行ったが、HSP70.1 ならびに HSP70.3 蛋白量の増加が同様に観察された。

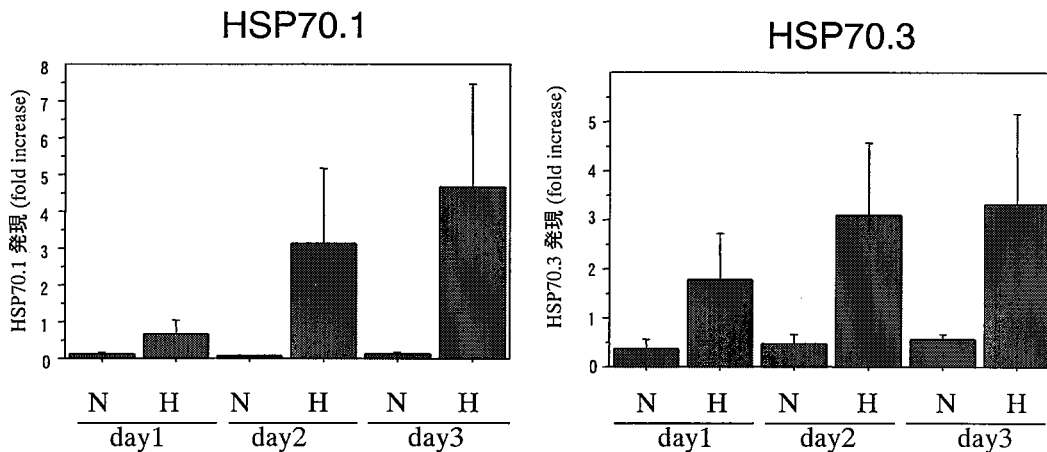


図 3. 高糖濃度条件下培養メサンギウム細胞における HSP 発現量の変化

次に、高糖濃度条件下にてその産生が亢進している TGF- β 1 と HSP との関連性について検討を行った。培養メサンギウム細胞を TGF- β 1 にて共培養することにより、時間・濃度依存的に HSP70.1 ならびに HSP70.3 発現量の増加が認められた。さらに、TGF- β 1 により産生が亢進する PAI-1 の mRNA 発現量を検討したところ、TGF- β 1 刺激前に熱刺激を加え、HSP70 発現を増加させることにより、TGF- β 1 刺激により増加する PAI-1 の mRNA 発現量を抑制した。

3. HSP70.1 過剰発現腎メサンギウム細胞における酸化ストレス誘発アポトーシスの抑制

既に我々の研究グループでは、db/db マウスの腎系球体において酸化ストレスが亢進していることを報告してきた (Kitada M et al. *Diabetes* 52:2603-2614, 2003, Koya D et al. *J Am Soc Nephrol* 14 (8 Suppl 3):S250-253, 2003)。そこで、HSP 蛋白の発現が、酸化ストレス状態により、抑制される可能性を探るため、培養マウス腎メサンギウム細胞を過酸化水素(H₂O₂)

にて1時間前孵置後、43℃の熱刺激を加え HSP 蛋白量をウエスタンブロット法にて検討を行った。その結果、熱刺激で誘導される HSP 蛋白の中で、HSP70.1 蛋白量が過酸化水素前附置により過酸化水素濃度依存性に抑制されることを見出した (図3)。

さらに、HSP 70 過剰発現により、腎メサンギウム細胞の酸化ストレス誘発アポトーシスが抑制されるか否かを検討するため、レトロウイルスを用いてヒト HSP70.1 過剰発現メサンギウム細胞を作製した。ヒト hsp70.1 プラスミド(pCMV70)は、オランダ Groningen 大学 Kampinga 教授より供与いただいた。非 HSP70 過剰発現培養メサンギウム細胞では、過酸化水素 12 時間刺激により、アポトーシスの指標の1つである PARP-1 の断片化が認められるが、ヒト HSP70.1 過剰発現させた培養メサンギウム細胞では、過酸化水素刺激による PARP-1 の断片化は認められず、HSP 70.1 過剰発現により過酸化水素によるメサンギウム細胞のアポトーシスが抑制されることが確認された (図4)。また、HSP 70.1 過剰発現培養メサンギウム細胞においても、高濃度の過酸化水素により hsp70 蛋白の減少が生じること、プロテオゾーム阻害薬の前附置により、過酸化水素による HSP70 蛋白の減少効果が抑制されたことより、過酸化水素は HSP70 蛋白の分解を促進するものと考えられた。

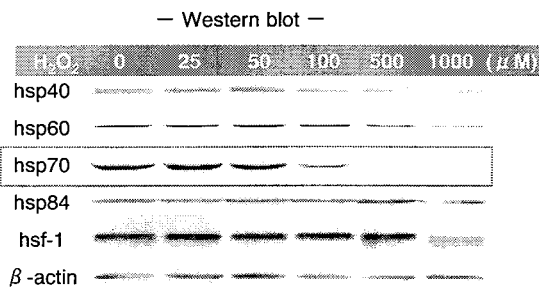


図3. 培養マウス腎メサンギウム細胞における、酸化ストレスによる HSP 蛋白量の減少効果



図4. HSP70 過剰発現による過酸化水素誘発アポトーシスの抑制

以上の結果より、2型糖尿病モデルマウスの腎臓においては、糖尿病初期(生後直後より)における高血糖からの生体防御反応のひとつとして HSP70 蛋白量が増加するものの、長期にわたる糖尿病状態のために惹起された酸化ストレス亢進により、HSP70 蛋白の発現抑制ならびに蛋白分解が促進されることで生じる抗酸化ストレス防御機構の破綻が腎症の発症・進展に関与している可能性が示唆された。

4. HSP70 遺伝子多型と糖尿病性腎症の進展ならびに心血管病変の関連

HSP70 遺伝子多型が糖尿病性腎症の進展ならびに心血管病変に影響を及ぼす可能性について検討するため、582名の2型糖尿病患者(非腎症群328名、腎症群254名)を対象に、*HSPA1B* の coding region に存在する 1267A/G 遺伝子多型の遺伝子型決定をおこない、case-control 研究を行った。結果、+1267A/G 遺伝子型の分布は、腎症の有無ならびに心血管病変の有無と関連性を認めなかった。

5. エリスロポイエチン製剤による HSP 発現

糖尿病性腎症の発症において、腎局所の虚血

(Hypoxia) が関与しているとの報告がある。

また、虚血による腎障害にエリスロポイエチン製剤が保護作用を有するとの報告されている。

そこで、腎保護作用を示すエリスロポイエチン製剤の効果が、HSP70 を介しているものか否かを検討した。腎近位尿管細胞である LLC-PK1 細胞にエリスロポイエチンならびにそのアナログ製剤であるアシアロ・エリスロポイエチンを 1 時間附置したところ、HSP70 蛋白発現量の増加が認められた。

さらに、雄性 SD ラットにエリスロポイエチンならびにアシアロ・エリスロポイエチンを静注 1 時間後の腎臓における HSP 蛋白発現量を検討したところ、同様に HSP70 蛋白発現量の増加が認められた(図 5)。

以上の結果より、エリスロポイエチン製剤により HSP70 を増加させることが、腎保護に関与している可能性が示唆された。

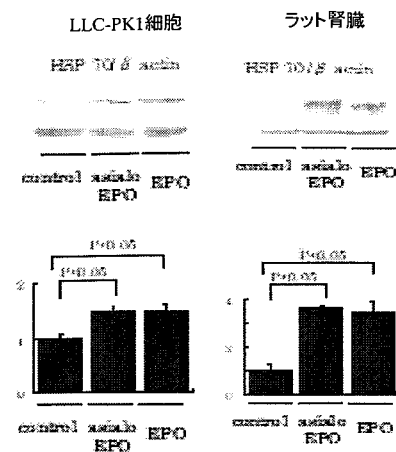


図 5. Epo 製剤による HSP 発現

【現在進行中の課題ならびに今後の研究展開】

1. HSP70 トランスジェニックマウスを用いた糖尿病性腎症の検討

これまでに得られた知見をさらに検討するために、HSP70 トランスジェニックマウスを用いて、糖尿病性腎症の発症・進展に及ぼす影響を検討することを計画した。その目的のため、ギリシャ Ioannina 大学 Angelidis 博士の承諾のもと、名古屋大学医学部 祖父江元教授より HSP70 トランスジェニックマウスを供与いただいた。

すでに我々の研究グループでは、マウスを 60% 高脂肪食にて長期間飼育することにより、ヒトメタボリック症候群で認められる耐糖能異常 (高血糖)、高血圧、脂質代謝異常、腎機能障害が生じることを報告している (Kume S et al. *J Am Soc Nephrol* 18:2715-2723, 2007)。そこで、HSP70 トランスジェニックマウスならびにコントロールマウスを 60% 高脂肪食と通常脂肪食にて 24 週間飼育し、HSP70 過剰発現による腎機能・組織変化を検討する。現在、60% 高脂肪食と通常脂肪食にて飼育中である。

また、2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウスと HSP70 トランスジェニックマウスの交配をおこない、db/db マウスに認められる腎組織・腎機能障害が、HSP70 過剰発現により改善を認めることができるのかを検討している。