

11) A drug for diabetic multiple organ complications

研究代表者 滝山 由美

[研究の背景と目的]

糖尿病性腎症、糖尿病網膜症、糖尿病性神経障害で知られる microvascular complications と、脳梗塞、心筋梗塞等を含む macrovascular complications に対する予防と治療は、糖尿病治療の最終目的といって過言ではなく、その有効性は患者の QOL と共に、医療経済に大きく影響を与える。これら全糖尿病合併症に対して効果的に作用する一創薬の開発は、現実的な goal とは考え難いのが現状であり (*Nature Rev Drug Discovery* 8:417-429, 2009)、現在までのところ、糖尿病網膜症における抗 VEGF 療法に、一定の有効性が確立しているのみである。我々は、現在までの糖尿病性腎症研究において、糖尿病治療薬であるピグアナイド剤メトホルミンが、ヒト尿細管細胞における低酸素誘導 HIF-1 α 蛋白発現と HIF-1 α 標的遺伝子である VEGF、Glut-1、PAI-1 の発現を抑制し、更に低酸素耐性を誘導し腎保護的に作用することを発見、また 2 型糖尿病モデルラットにおいて、メトホルミンが糖尿病腎組織における HIF-1 α 蛋白発現と線維化を抑制、尿中アルブミン排泄を減少させることを確認した (*under revision*)。これらメトホルミンの腎保護的効果は、以前より作用機構として報告されている AMPK 活性化作用非依存的であり、ミトコンドリア呼吸鎖抑制による ATP 産生抑制、酸素消費量の減少、また活性酸素種 (ROS) 産生低下によるものであり、これら作用機序から、ミトコンドリアと酸化ストレスを標的とする合併症治療薬として位置付けられる。メトホルミンは、UKPDS34、UKPDS80 により、糖尿病関連死と全死亡率の低下、更に大血管合併症の改善作用を有することが明らかとなり、その多様な作用と多くの標的臓器の存在より、血糖降下作用を超えた臨床薬理効果 (beyond glucose control) が考えられている。メトホルミンによる HIF-1 α 蛋白発現抑制効果は、retinal epithelial ARPE-19 cells において報告があるが (*BBRC* 324:1197-1202, 2006)、VEGF の neovascularization 抑制による糖尿病網膜症予防・治療効果、また、低酸素耐性、線溶系の改善 (PAI-1 発現低下)、ROS 産生抑制作用は、大血管合併症に対する予防・治療効果を期待させる。そこで、本研究は、糖尿病合併症の病態構成臓器として、糖尿病腎においてメトホルミンにより制御される

遺伝子発現を解析し、その標的遺伝子と共に、新規糖尿病合併症遺伝子の発見を目的とする。

[研究方法]

1. 2型糖尿病性腎症モデルラット：Male Zucker diabetic fatty rats (ZDF/Gmi-*fa/fa*)

Leptin 受容体変異により、高脂血症、初期の高インスリン血症、高血圧、肥満、2型糖尿病と進行性の腎症を呈する。6 週齢より糸球体では巣状に、また尿細管間質の広範囲に脂質が蓄積し、進行性の podocyte 障害、18 週齢では巣状、分節性の糸球体硬化、尿細管間質障害を認めることが報告されている (*Kidney Int* 57: 167-182, 2000)。そこで、9 週齢の本モデルラットを用い、コントロール群 (male heterozygous : ZDF/Gmi-*+/fa*, lean littermates)、未治療糖尿病群 (ZDF/Gmi-*fa/fa*)、メトホルミン投与群としてメトホルミン混餌を 250 mg/kg/day、8 週間投与後、腎臓を採取し OCT コンパウンド包埋凍結標本を作成した。

2. Laser Captured Microdissection (LCM) で採取後のサンプルを用いた Gene Chip 解析 (Affymetrix GeneChip、Rat Gene 1.0 ST Array)

凍結組織切片上において LCM により捕捉した近位尿細管細胞より (Figure 1. lower panel)、total RNA 抽出後 cDNA を合成し、発現解析に必要なまでに増幅。

濃縮、断片化、蛍光標識後に、アレイ内のプローブとハイブリダイズさせ、サンプルの蛍光シグナルを測定した。ラット間 (糖尿病 vs コントロール、メトホルミン治療 vs 糖尿病) の遺伝子群の発現について、GeneSpring GX Version 11.0.2 (Agilent Technologies) を使用して解析を施行した。

[結果と考察]

1. 治療・観察開始時 9 週齢未治療 ZDF ラット随時血糖 411 mg/dl、HbA1c 3.9%、メトホルミン治療ラット 随時血糖 452 mg/dl、HbA1c 4.6 % と糖尿病の発症を確認。メトホルミンの血糖改善効果による遺伝子発現への影響を避けるため、8 週間治療後、組織採取時 17 週齢未治療糖尿病 ZDF ラット (HbA1c 8.3 %) より高血糖を呈したメトホルミン治療ラット (HbA1c 8.9%) を検討対象とした。(コントロールラット HbA1c 3.2%)
2. 糖尿病ラット腎髄質と傍髄質領域皮質において増強の見られた HIF-1 α 蛋白発現は、メトホルミン治療により減弱していた (Figure 1. upper panel)。
3. 3 群間における 27342 の遺伝子発現について、Rat Gene 1.0 ST Array を用いて解析検討した (Figure 2)。コントロール群に比較して糖尿病未治療群では、47 遺伝子、またメトホルミン治療群と糖尿

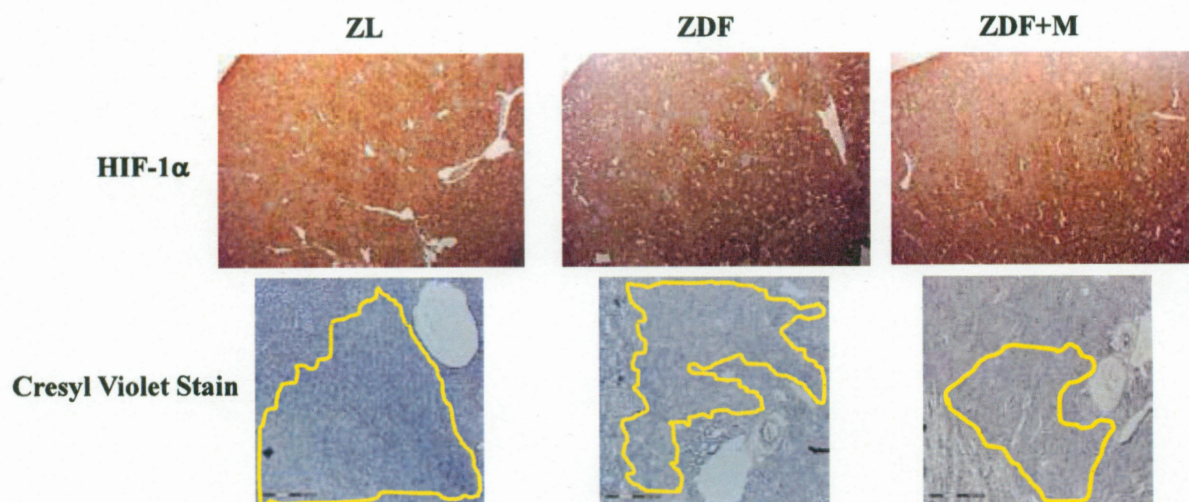


Fig.1 Immunohistochemistry of HIF-1 α and light micrographs of sections from kidneys stained with cresyl violet in experimental animals.

ZL : Lean control, ZDF : ZDF rats, ZDF+M : ZDF rats treated with metformin (250 mg/Kg/day) for 8 weeks at 17 weeks of age. Immunopositive cells appear brown as a result of 3, 3' -diaminobenzidine tetrahydrochloride colorimetric reaction. The proximal tubular cells in cortical juxtamedullary region were captured by LCM.

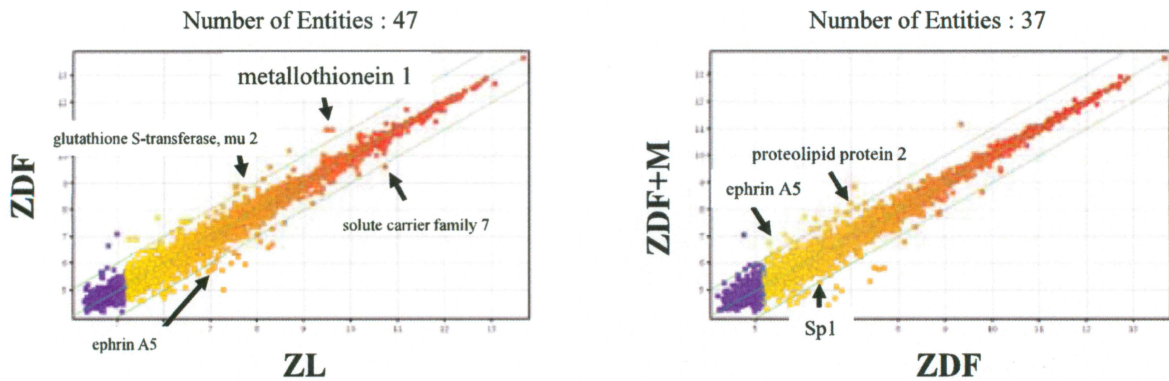


Fig. 2 Genes up- or down-regulated by metformin treatment in proximal tubular cells of ZDF rats.

47 genes were changed by more than twofold in ZDF rats vs lean control rats.

Metformin treatment up- or down-regulated 37 genes, compared with those in non-treated ZDF rats.

ZL : Lean control, ZDF : ZDF rats, ZDF+M : ZDF rats treated with metformin (250 mg/Kg/day)

病群間では、37 遺伝子発現について2倍以上の差を認めた。これら遺伝子群には、糖尿病性腎症関連因子として既に明らかとなっているものも含まれており、コントロールと比較して、未治療糖尿病ラットにおいて2.83 倍の発現増加が認められた Metallothionein は、虚血性腎障害モデルラットにおいて低酸素により発現が増強し、ERK/mTOR pathway を介し、HIF-1 蛋白とともに HIF-1 標的遺伝子の発現を増強することが報告されている (*Kidney Int* 75: 268-277, 2009) 本研究の糖尿病性腎においても、Metallothionein が同様の機序により HIF-1 α 蛋白発現を増強している可能性が考えられる。また、糖尿病ラットにおいて発現が減少し、メトホルミン治療により発現増強を呈した ephrin A5 は、ストレプトゾトシン誘導妊娠糖尿病モデルマウス胚における発現増強の報告があり (*Endocrine J* 55:317-323, 2008)、本研究において自然発症 2 型糖尿病モデルラットにおいても発現の変動が見られたことから、高血糖惹起性尿細管障害の病態に関与することが示唆される。

[結 語]

Microarray analysis により、コントロール、糖尿病、メトホルミン治療の 3 群のラット腎近位尿細管細胞における遺伝子発現に差が認められた。今後、これら新規糖尿病合併症遺伝子候補について、糖尿病性腎症モデルラット腎における発現様式の検討とともに、近

位尿細管培養細胞を用い発現制御機構の解明を進め、diabetic multiple organ complications の治療標的としての可能性についての検討を予定している。