

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2017) 第17巻:69-71.

平成27年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 20)  
Metallothionein3の糖尿病・糖尿病性腎症の発症・進展における役割の検  
討

滝山 由美

ナトリウムなどの再吸収量の増加は、尿細管細胞における酸素消費量の増加と細胞内低酸素状態を惹起する<sup>1)</sup>。ROS 除去に働く Antioxidants は糖尿病治療薬として期待されているが、現在までの多くの臨床成績は否定的である。我々は、実臨床、治療対象となる 2 型糖尿病患者は、相当期間の肥満・耐糖能障害という前糖尿病状態を経ての発症のため、既に ROS への成体防御機構として発導された抗酸化システムは過剰状態を来しており、この maladaptation が糖尿病治療標的であると考えられる。Metallothionein (MT) は、金属結合蛋白の特性とシステイン残基を 30% 程度有することから、抗酸化物質としての役割が報告されている。MT isoform には全身臓器に広範囲に発現する MT1 と 2 以外に、脳特異的に発現し、ヒトアルツハイマー病での発現低下が報告されている MT 3<sup>2)</sup> と、皮膚に限局してのクローニングの報告がある MT 4 がある。脳特異的 MT 3 は、その DNA 配列、またアミノ酸配列が MT1 との相同性が高く、また、ヒト糖尿病での発症率が高いアルツハイマー病における病態学的役割を有する<sup>2)</sup> ことから、今回、我々は MT 3 の糖尿病腎症における病態学的関与について明らかとすることを目的に、尿細管培養細胞とともに、MT 3 トランスジェニック (transgenic : TG) マウスを用い、検討した。

#### 【方 法】

1. MT 3 の発現制御機構について、ヒト近位尿細管上皮培養細胞 (HRPTEC ; Lonza 社) とマウス近位尿細管上皮培養細胞 mProx を用い、real-time RTPCR 法にて検討した。
2. HIF-1 $\alpha$ 、MT 3 の特異的 siRNA、Nucleofection system (Amaxa, Koln, Germany) を用い、ノックダウンした。
3. MT 3 をノックダウンした HRPTEC を用い、Gene Chip 解析 (Affymetrix Gene Chip, Human Gene 1.0 ST Array) を施行した。
4. 顕性蛋白尿を呈する 2 型糖尿病患者腎生検組織と、対照群として微小変化群腎生検組織を用い、MT 3 の発現様式について免疫組織化学的染色法にて検討した。
5. ヒト MT 3 を近位尿細管細胞に過剰発現したトランスジェニック (TG) マウス (TGMT 3) とヒト MT 3 ゲノムを含む bacterial artificial chromosome (BAC)

#### 20) Metallothionein3 の糖尿病・糖尿病性腎症の発症・進展における役割の検討

The Role of Metallothionein3 in Diabetes and Diabetic Nephropathy

研究代表者 滝山 由美

#### 【目 的】

糖尿病腎では、高血糖はグルコース代謝過程における活性酸素種 (Reactive Oxygen Species) の過剰産生を引き起こす。更に、過剰濾過とともに、グルコース、

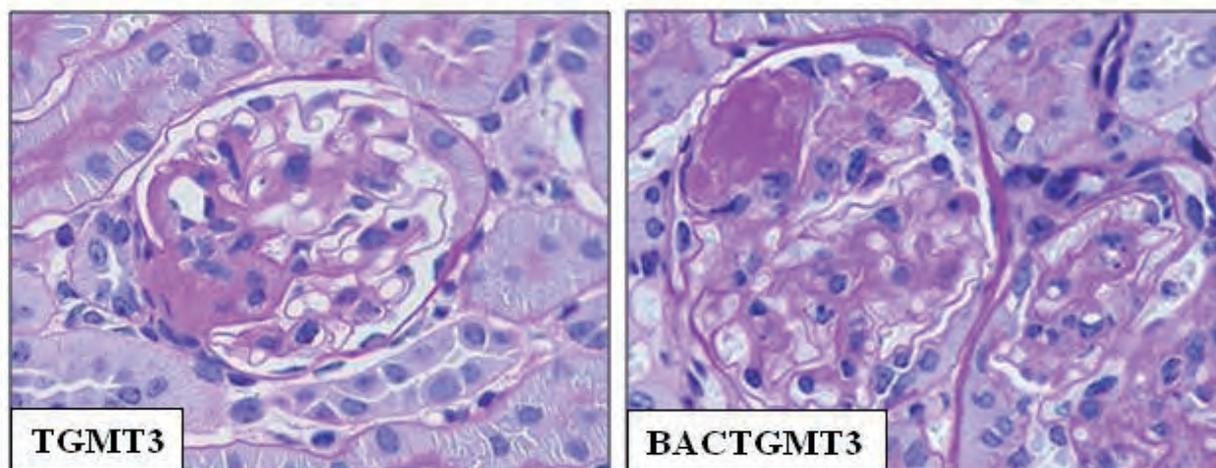


図1 Metallothionein 3 トランスジェニックマウス腎病変  
 TGMT3 マウスでは、糸球体茎部のPAS陽性細胞外基質の増加、BACTGMT3 マウスでは、糖尿病腎症様糸球体結節、メサンギウム融解など、糖尿病腎症様糸球体病変を認めた。  
 (Periodic acid-Schiff stain, original magnification x800)。

clone を transgene した TG マウス (BACTGMT3) を作成し、それぞれ腎の組織学的検討を行った。

#### 【結果】

1. 低酸素暴露は、MT isoforms のうち、MT 3 を約 300 倍まで増強し、MT 2 を約 5 倍程度増強したが、MT1 発現は増強しなかった。
2. 低酸素暴露による MT 3 mRNA 発現増強作用は、HIF-1 $\alpha$  をノックダウンすることにより消失した。
3. 低酸素暴露は、マウス近位尿細管細胞 mProx における MT 3 mRNA は誘導しなかった。
4. ヒト MT 3 遺伝子のプロモーター領域において、hypoxia response elements (HRE) が存在し、MT 3 が HIF-1 標的遺伝子であることを確認したが、マウス MT 3 遺伝子プロモーター領域には HRE は存在しなかった。
5. 28,869 遺伝子の解析の結果、MT 3 ノックダウンにより、ceruloplasmin と cytochrome b reductase 1 が 2 倍以上に低下していた。
6. 顕性蛋白尿を呈する 2 型糖尿病患者腎生検組織において、MT 3 蛋白は尿細管細胞に発現し、対照群と比較して発現は増強していた。
7. 両 TG マウスとも、血糖は正常を呈した。
8. TGMT3 マウスでは、糸球体茎部の PAS 陽性細胞外基質の増加 (図 1)、小血管増生、糸球体虚脱、髄質領域の尿細管障害を認めた。

9. BACTGMT3 腎組織では、糖尿病性腎症様糸球体結節、メサンギウム融解 (図 1) と capsular drop を認めた。

10. 血管内皮細胞マーカー CD31 免疫組織化学的染色において、TGMT3 マウスの糸球体周囲の peritubular capillary の拡張と増生を認めた。
11. 電顕上、BACTGMT3 マウスでは、メサンギウム基質にデポジットの無い結節性病変、MT 3 TG マウスでは上皮細胞の腫大と絨毛状変化、尿細管上皮細胞内小器官増加、また、両マウスに共通し、足突起の融合、基底膜肥厚、内皮細胞の腫大と内腔狭小化を認めた。

#### 【考察】

抗酸化物質 MT 3 は、新規 HIF-1 標的分子であり、HIF-1 を介した低酸素誘導腎障害病態への関与が示唆された。更に、TG マウス尿細管細胞における MT 3 の発現増強が、糖尿病腎症様糸球体病変、傍尿細管毛細血管の狭窄とその上流の血管増生を引き起こしたことから、尿細管細胞低酸素状態により誘導される HIF-1-MT 3 のシグナル系による、新規糖尿病腎症病態機序が明らかとなった。MT 3 の糖尿病腎症の新規治療標的としての可能性と、糸球体結節形成前に先行する尿細管病変検出が可能となることから、臨床現場における糖尿病腎症早期診断バイオマーカーとして可能性が期待される。

**【文献】**

- 1) Takiyama Y, Haneda M. Hypoxia in diabetic kidneys.  
Biomed Res Int. 2014;2014:837421. doi:10. 1155/  
2014/837421.
- 2) Tsuji S, Kobayashi H, Uchida Y, Ihara Y, Miyatake T.  
Molecular cloning of human growth inhibitory factor  
cDNA and its down-regulation in Alzheimer's disease.  
EMBO J 11, 4843-4850 (1992).