

## 糖尿病性腎症に対する抗酸化防御機構の解明\*

藤田 浩樹

秋田大学大学院医学系研究科医学専攻 内分泌・代謝・老年内科学講座

(平成24年3月15日掲載決定)

### Role of antioxidant defense system in diabetic nephropathy

Hiroki Fujita

*Department of Endocrinology, Diabetes and Geriatric Medicine, Akita University Graduate School of Medicine*

**Key words :** diabetic nephropathy, oxidative stress, superoxide dismutase

#### はじめに

糖尿病性腎症は我が国をはじめ、先進諸国において末期腎不全の原因の第一位を占める腎疾患であり、重要な社会的問題となっている。現在、糖尿病性腎症に対し、血糖降下療法、降圧療法、蛋白制限食療法、レニン・アンジオテンシン系 (RAS) 阻害療法といった様々な治療が行われてはいるが、糖尿病性腎症から末期腎不全に至る患者を十分に減らすことができていないのが現状である。それゆえ、糖尿病性腎症の十分な病態解明とそれに基づいた新しい治療法の開発が急がれるところである。最近、慢性の高血糖状態によって引き起こされる酸化ストレスが糖尿病性腎症の主要な原因として注目されてきている<sup>1)</sup>。生体内には様々な抗酸化酵素が存在し、酸化ストレスに対する防御の役割を担っている。しかしながら、糖尿病性腎症におけるこれら抗酸化酵素の役割については十分に解明されていない。本稿では、糖尿病性腎症に対する抗酸化防御機構について我々の最近の研究からの知見を含めて解説する。

#### 1. 糖尿病性腎症と酸化ストレス

図1に示すように、糖尿病発症後、腎において長期間の高血糖状態が続くことにより、腎血管内皮細胞ではNAD(P)H oxidaseの発現上昇や内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の uncoupling 反応亢進により、過剰の活性酸素 (Superoxide) が産生される<sup>2)</sup>。この過剰の Superoxide は内皮細胞の機能にとって不可欠な一酸化窒素 (NO) と結合することでNOを減少させるとともに、この結合反応は Peroxynitrite や Hydroxyl radical といった二次的な活性酸素種 (ROS) の生成を亢進させる結果となる<sup>3)</sup>。これら ROS は非常に強い細胞毒性を有し、ROS 増加は腎血管内皮細胞障害を引き起こすに至る。Superoxide や ROS による細胞障害を防御するため、生体内には様々な抗酸化酵素が存在する。これら抗酸化酵素の中心的役割を担うのが Superoxide dismutase (SOD) である。SOD は Superoxide の無毒化反応の第一のステップを触媒し、過剰に発生した Superoxide を  $H_2O_2$  に変換することで Superoxide を除去する<sup>4)</sup>。その後、GSH peroxidase および Catalase により  $H_2O_2$  は  $H_2O$  と  $O_2$  に分解され完全に無毒化される<sup>5)</sup>。健常状態下での細胞では、Superoxide の産生系が亢進しておらず、またこうした抗酸化酵素の働きも保たれているため、酸化的障害を受けることはない。しかしながら、Superoxide の産生系と抗酸化防御系とのバランスが崩れたとき、Superoxide の細胞内レベルが高まり、酸化ストレスが発生する結果となる。前述のごとく、糖尿病状態下で

Correspondence : Hiroki Fujita, M.D., Ph.D.  
Division of Endocrinology, Metabolism and Geriatric Medicine, Akita University Graduate School of Medicine,  
1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan  
Tel : 81-18-884-6769  
Fax : 81-18-884-6449  
E-mail : hirofujii@gipc.akita-u.ac.jp

\*平成23年度秋田医学会学術賞受賞記念講演

(8)

糖尿病性腎症に対する抗酸化防御機構の解明

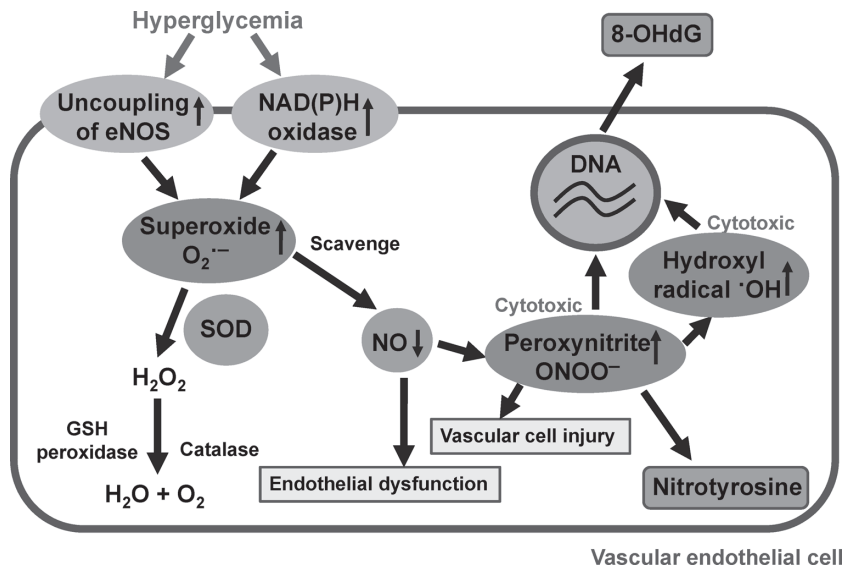


図1. 血管内皮細胞での高血糖による酸化ストレス発生の分子機構。

は過剰の Superoxide が腎内に産生される。したがって、この状態下で SOD を中心とした抗酸化防御系が保たれているかどうか、酸化腎障害を防御できるかどうか、すなわち糖尿病性腎症の発症進展を防ぐことができるかの鍵となると考えられる。

## 2. 糖尿病性腎症の病態における酸化ストレスの役割

糖尿病性腎症の臨床的特徴はタンパク尿（アルブミン尿）の出現である。その初期の原因は糸球体高血圧および糸球体内皮障害であり、進行するとメサンギウム基質の著しい増加や結節性病変といった不可逆的な組織学的変化をきたし、腎の廃絶へと至る。腎での

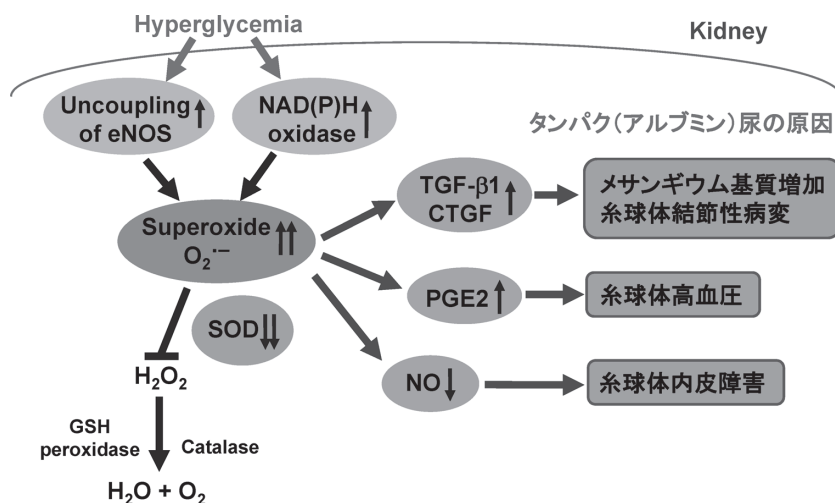


図2. 酸化ストレスによる腎障害のメカニズム。

Superoxide の過剰状態による酸化ストレスの亢進は、TGF- $\beta$ 1, CTGF などの Fibrogenic cytokine を up-regulate し、腎輸入細動脈の拡張因子である PGE2 の産生を亢進し、内皮細胞の機能をつかさどる NO を減少させる (図2)。これらの変化は糖尿病性腎症の発症進展に大きく貢献する。したがって、抗酸化治療による腎での酸化ストレスの減少は糖尿病性腎症の劇的な改善につながるものと期待される。

### 3. 進行性糖尿病性腎症マウスモデル KK/Ta-Akita の腎病変と腎 SOD

Akita マウス (C57BL/6-Akita) は秋田大学医学部衛生学教室にて開発された非肥満型インスリン欠乏型糖尿病マウスモデルであり、現在糖尿病の研究のため世界中で幅広く使用されている<sup>6)</sup>。Akita マウスは *Insulin2* 遺伝子における Cys96Tyr の単一遺伝子変異 (*Ins2<sup>Akita</sup>*) により正常インスリン欠乏状態に陥り、約4週齢から 400 mg/dl 以上の高血糖状態をきたす<sup>7)</sup>。こ

のように腎毒性が懸念される糖尿病誘発用の薬剤を用いることなく、腎疾患に全く関係のない遺伝子の単一変異により糖尿病を発症するため、Akita マウスは糖尿病性腎症の研究にとって好ましいモデルと考えられる。しかしながら、その後の解析から、Akita マウスは著明な高血糖状態が持続するにもかかわらず、その腎病変は軽度にとどまり、糖尿病性腎症の発症進展に対し比較的抵抗性を示す。この原因が Akita マウスの背景 C57BL/6 ストレインによるものであることを我々と米国 Vanderbilt 大学のグループが最近明らかにした<sup>8)</sup>。ヒトでも人種などの遺伝的背景により糖尿病性腎症への感受性が異なるように、マウスにおいてもそのストレインにより糖尿病性腎症への感受性が異なる。我々は、数種類の近交系マウスに対しストレプトゾトシン投与による糖尿病誘発後の腎病変の形成について評価を行い、Akita マウスの背景である C57BL/6 ストレインマウスは最も腎病変が軽度でヒトでの早期腎症期程度にとどまる一方、KK ストレインマウスは進行した腎病変をきたし糖尿病性腎症への感受性が極

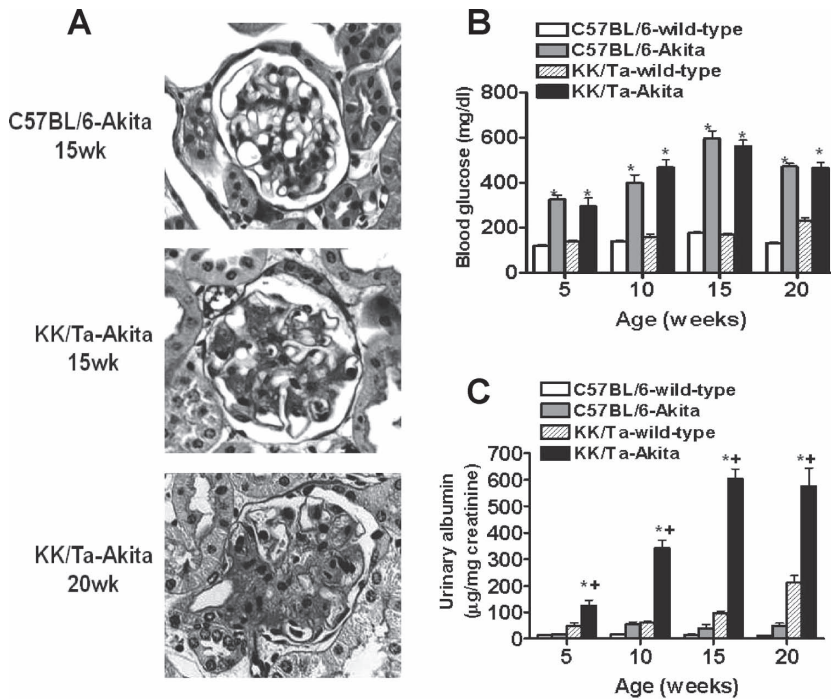


図3. C57BL/6-Akita と KK/Ta-Akita マウスの腎病変の比較 (文献9より改変)。

A. PAS 染色像。

B. 血糖値の経時的変化。n=8。\* $P < 0.001$ ; + $P < 0.05$  versus counterpart WT mice.

C. アルブミン尿の経時的変化。n=8。\* $P < 0.001$  versus C57BL/6-Akita mice. + $P < 0.001$  versus KK/Ta-Akita mice.

(10)

糖尿病性腎症に対する抗酸化防御機構の解明

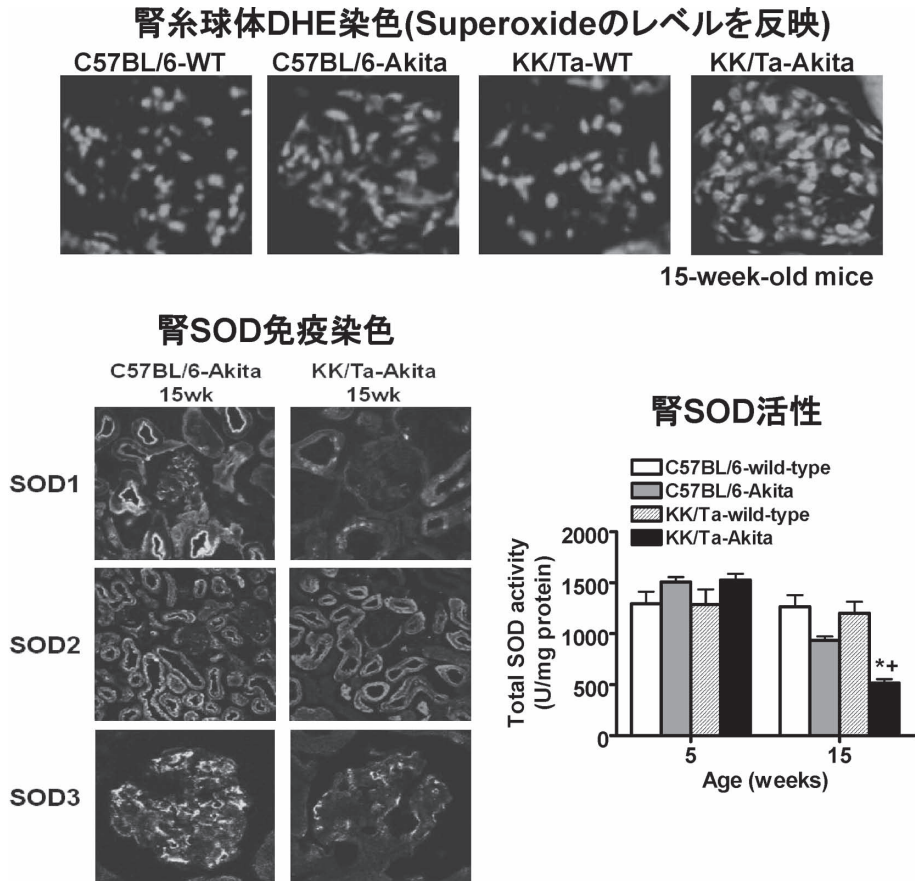


図4. C57BL/6-Akita と KK/Ta-Akita マウスの腎における Superoxide と SOD の比較 (文献9より改変).

めて高いことを明らかにした。この結果に基づいて、我々は *Ins2<sup>Akita</sup>* 遺伝子を KK/Ta マウスに導入し、新しい Akita マウス (KK/Ta-Akita) を開発した<sup>9)</sup>。経時的腎病変の解析から、KK/Ta-Akita は C57BL/6-Akita とは異なり、アルブミン尿やメサンギウム基質の著明な増加を示し、進行性の糖尿病性腎症を発症することが示された (図3)。

2種類の Akita マウス C57BL/6-Akita と KK/Ta-Akita は同程度の著明な高血糖をきたすにもかかわらず、明らかに糖尿病性腎症への感受性が異なる。この原因が腎での酸化ストレスの程度の違いにあるのではないかという仮説を立て、これを検証するため、我々は両マウスの腎での酸化ストレスおよび抗酸化酵素 SOD の状態について解析を進めた。図4に示すように、C57BL/6-Akita と比較して KK/Ta-Akita の腎系球体で

は Superoxide のレベルが増加するとともに、Cytosolic CuZn-SOD (SOD1) と Extracellular CuZn-SOD (SOD3) の発現および Total SOD 活性が低下するといった非常に興味深い所見が得られた<sup>9)</sup>。これらの結果から、糖尿病状態下での腎 SOD の保持能力が糖尿病性腎症の発症進展に大きくかかわっていることが示された。糖尿病性腎症に対する防御における SOD の重要性をさらに検証するため、糖尿病性腎症感受性を示す KK/Ta-Akita に対して10週齢から4週間、SOD mimetic の Tempol の投与を行った。図5Aに示すように、Tempol 投与により KK/Ta-Akita の糖尿病性腎症の進行は劇的に抑制された。さらに、糖尿病性腎症抵抗性を示す C57BL/6-Akita の SOD 遺伝子を欠損させたところ、図5Bに示すように、SOD1 遺伝子欠損により糖尿病性腎症の進行が観察され、SOD isoform の

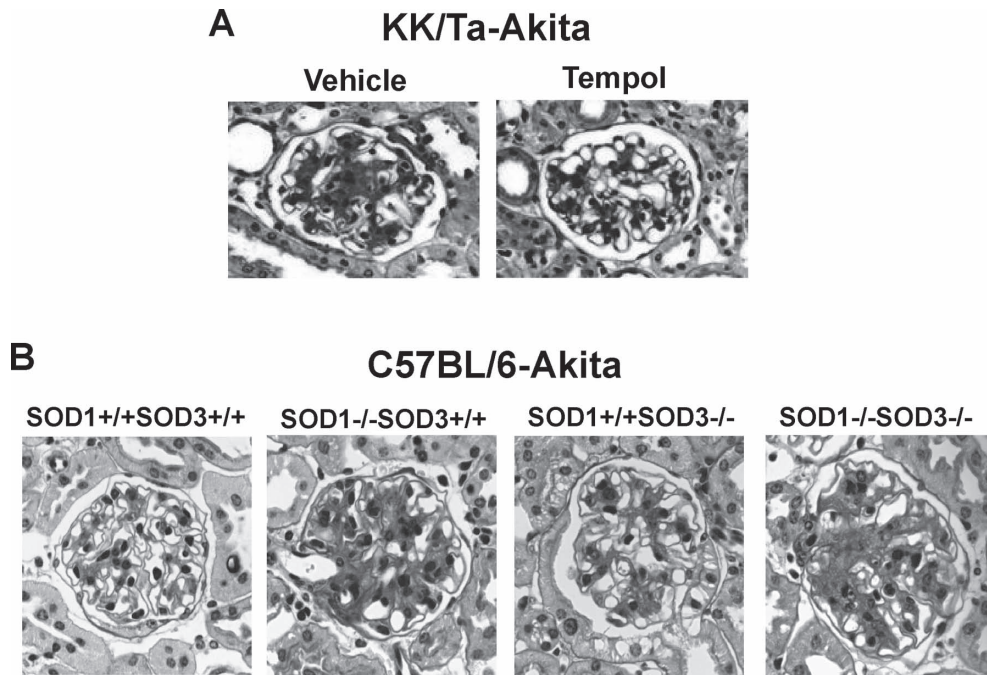


図5. PAS染色像 (文献9より改変).

A. KK/Ta-Akita マウスに対する Tempol 治療の効果.

B. SOD 遺伝子欠損 C57BL/6-Akita マウスの腎病変の変化.

うち SOD1 の糖尿病性腎症における重要性が明らかとなった。

#### 4. アンジオテンシン II type 1 受容体拮抗薬 (ARB) の抗酸化作用

アンジオテンシン II type 1 受容体拮抗薬 (ARB) は降圧薬として高血圧患者の治療のため現在幅広く用いられている。最近, ARB には心臓や脳などの臓器保護作用があることが示され, 心疾患・脳疾患における降圧薬の第一選択としてその使用が推奨されている。各種腎疾患に対する ARB 治療の有効性に関するエビデンスも集積してきている。現在, 糖尿病性腎症に対する ARB 投与を中心とした RAS 阻害療法は, 血糖コントロールおよび全身性血圧コントロールから独立して効果を発揮する唯一の治療法として確立されており, ARB は糖尿病性腎症に対する治療薬の第一選択として積極的に使用されている。特に, 糸球体高血圧をその病態の特徴とする早期糖尿病性腎症の患者に対しては, ARB のアルブミン尿減少効果は高く, 正常

腎症期まで改善することもしばしばみられる。この ARB の優れた効果は糸球体高血圧の改善に基づいたものと考えられているが, その詳細な機序についてはまだ不明な点も多い。

最近, 動物実験において, ARB が腎での NAD (P) H oxidase 遺伝子発現を抑制することで糸球体での Superoxide の産生を減少させる効果を有することが示された<sup>10,11)</sup>。しかしながら, ARB の腎における抗酸化酵素への影響については知られておらず, 我々はこれを解明するため, Akita マウスを用いて研究を進めた。前述したとおり, C57BL/6-Akita はその遺伝的背景のため, 進行した糖尿病性腎症は発症しないが, ヒトでの早期糖尿病性腎症に類似した軽度の腎病変をきたす。ARB が早期糖尿病性腎症の患者に対して優れた効果をもたらす背景を考慮し, 我々はこの C57BL/6-Akita マウスに対して ARB の Telmisartan を 5 mg/kg/day の dose で 10 週齢から 4 週間投与し, 腎での Superoxide の産生と抗酸化酵素 SOD および抗酸化酵素の調節因子である NF-E2-related factor 2 (Nrf2) の変化について調査を行った。図6に示すように,

(12)

糖尿病性腎症に対する抗酸化防御機構の解明

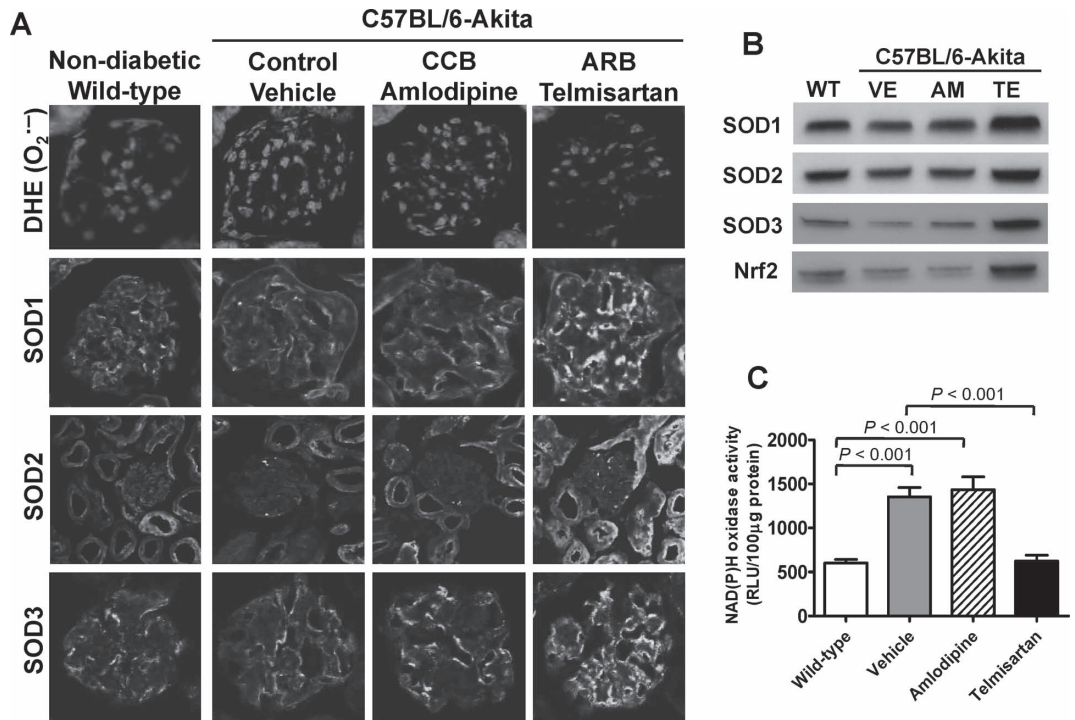


図6. C57BL/6-Akita マウスに対する Telmisartan 治療の効果 (文献 12 より改変)。

A. 腎 DHE 染色および SOD 免疫染色像。

B. 腎における Western blot によるタンパク発現解析。WT, non-diabetic wild-type. VE, vehicle. AM, amlodipine. TE, telmisartan.

C. 腎における NAD (P) H oxidase activity.

Telmisartan 治療は腎での NAD (P) H oxidase 活性を低下させ糸球体 Superoxide を減少させることが期待していたごとく確認された<sup>12)</sup>。また, Telmisartan 治療によるアンジオテンシン II type 1 (AT1) 受容体阻害は, すべての SOD isoform および Nrf2 の腎での発現を増加させる効果をもたらすことを我々は初めて明らかにした<sup>12)</sup>。このような抗酸化作用は ARB に特有なものであり, 一般によく用いられる降圧薬である Calcium channel blocker の Amlodipine 投与では観察されなかった。また, Telmisartan 治療による腎での酸化ストレスの改善とともに, アルブミン尿の減少もみられた。次に, ARB の抗酸化酵素を up-regulate するメカニズムを解明するため, 我々は 10 週齢の C57BL/6-Akita マウスに対して NAD (P) H oxidase 阻害薬の Apocynin を 40 mg/kg/day の dose で 8 週間投与し, 腎における抗酸化酵素の変化を調査した。図 7 に示すように, NAD (P) H oxidase 阻害は腎でのすべ

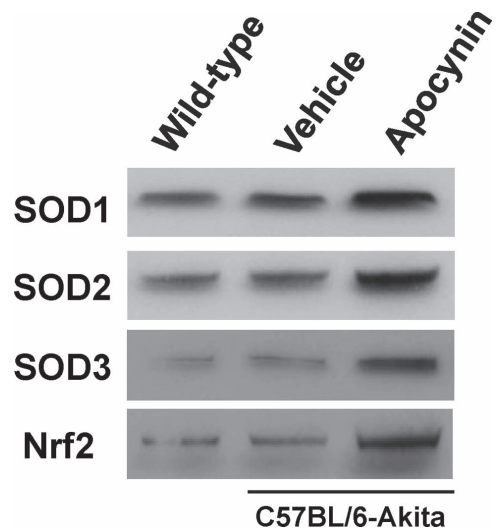


図7. C57BL/6-Akita マウスに対する Apocynin 治療の効果。腎における Western blot によるタンパク発現解析 (文献 12 より改変)。

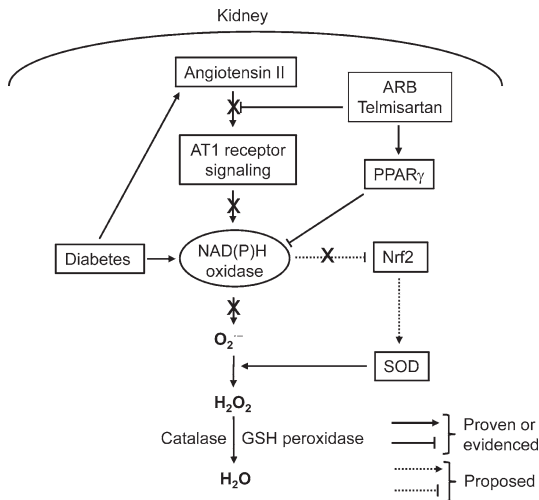


図8. ARBによる酸化ストレス改善のメカニズム (文献12より改変).

でのSOD isoformとともにNrf2の発現を増加させるという非常に興味深い所見が観察された<sup>12)</sup>。以上の結果は、図8に示すように、腎におけるARBによるAT1受容体シグナルの減少は、糖尿病状態で活性化

したNAD(P)H oxidaseを抑制することで、NAD(P)H oxidaseによるNrf2の抑制的制御を解除し、Nrf2の活性化を介してSODのup-regulationをもたらし、酸化ストレスを改善するというARBの抗酸化作用に関する新しい分子機構を提唱する。

### 5. 早期糖尿病性腎症患者へのARB治療による酸化ストレス改善効果

動物実験の結果から示されたSOD up-regulationを中心としたARB治療の抗酸化作用が実際に臨床的にもみられるのか検証するため、我々はARB未治療の12人の早期糖尿病性腎症患者に対し、ARBのTelmisartan治療(40 mg/day)を開始し、8週間後の血清SOD活性および酸化ストレスマーカー8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)の血清レベルの変化について調査を行い、さらに治療後の血清SOD活性の変化とアルブミン尿の変化との相関について検討した。図9に示すように、Telmisartan治療後、血清SOD活性の上昇および血清8-OHdGレベルの低下が観察され、臨床的にもARB治療による抗酸化作用が確認された<sup>13)</sup>。さらに、非常に興味深いことに、ARB治療

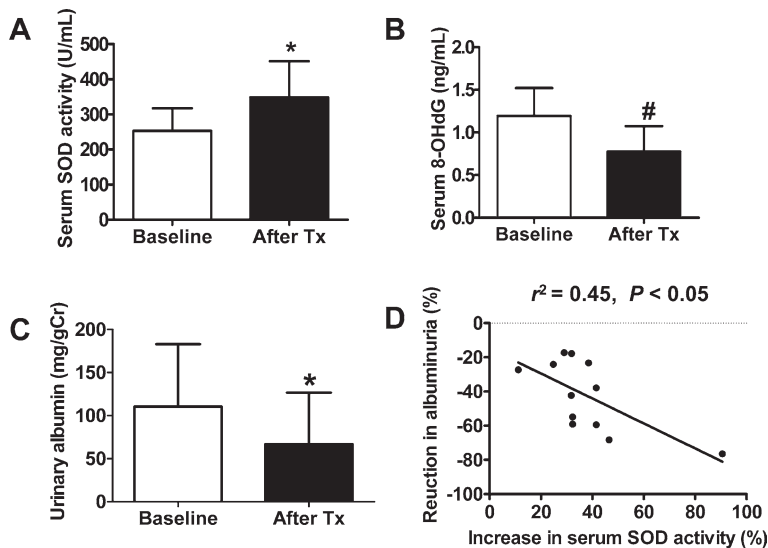


図9. 早期糖尿病性腎症患者に対するTelmisartan治療の効果 (文献13より改変).

A. 血清SOD活性の変化.  $n=12$ .  $*P<0.001$ .

B. 血清8-OHdGの変化.  $n=12$ .  $\#P<0.01$ .

C. 尿中アルブミンの変化.  $n=12$ .  $*P<0.001$ .

D. 血清SOD活性増加率と尿中アルブミン減少率との相関.  $n=12$ .

後の血清 SOD 活性の上昇率とアルブミン尿の減少率との間には有意な相関関係がみられ、抗酸化能を高めることは早期糖尿病性腎症の改善にとって有益な効果をもたらすことが示唆された<sup>13)</sup>。

### おわりに

Akita マウスを用いた基礎研究および早期糖尿病性腎症患者を対象とした臨床研究の結果より、我々は、酸化ストレスに対する SOD を中心とした抗酸化防御機構の破綻が糖尿病性腎症の発症進展に大きく関わっていること、さらには糖尿病性腎症に対する抗酸化的治療の有効性を示すことができた。また、糖尿病性腎症治療薬として幅広く用いられている ARB も抗酸化作用を有すること、さらにはその効果に関する新しい作用機序を明確に示した。我々の一連の研究結果が優れた抗酸化薬の今後の開発と糖尿病性腎症の改善に貢献することを期待する。

### 謝 辞

本研究は、秋田大学大学院医学系研究科内分泌・代謝・老年内科学教室と米国 Vanderbilt 大学腎臓内科学部門との共同研究として行われました。研究を遂行するにあたり、当教室の山田祐一郎教授をはじめとする多くの共同研究者の先生方から貴重なアドバイスをいただきました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Brownlee, M. (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, **54**, 1615-1625.
- 2) Satoh, M., Fujimoto, S., Haruna, Y., *et al.* (2005) NAD (P) H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **288**, F1144-1152.
- 3) Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., *et al.* (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.*, **23**, 599-622.
- 4) Fridovich, I. (1997) Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.*, **272**, 18515-18517.
- 5) Halliwell, B. (1995) Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 1341-1348.
- 6) Yoshioka, M., Kayo, T., Ikeda, T., *et al.* (1997) A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes*, **46**, 887-894.
- 7) Wang, J., Takeuchi, T., Tanaka, S., *et al.* (1999) A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J. Clin. Invest.*, **103**, 27-37.
- 8) Qi, Z., Fujita, H., Jin, J., *et al.* (2005) Characterization of susceptibility of inbred mouse strains to diabetic nephropathy. *Diabetes*, **54**, 2628-2637.
- 9) Fujita, H., Fujishima, H., Chida, S., *et al.* (2009) Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **20**, 1303-1313.
- 10) Fujimoto, S., Satoh, M., Horike, H., *et al.* (2008) Olmesartan ameliorates progressive glomerular injury in subtotal nephrectomized rats through suppression of superoxide production. *Hypertens. Res.*, **31**, 305-313.
- 11) Sugiyama, H., Kobayashi, M., Wang, D.H., *et al.* (2005) Telmisartan inhibits both oxidative stress and renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction in acatalasemic mice. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **20**, 2670-2680.
- 12) Fujita, H., Fujishima, H., Morii, T., *et al.* (2012) Modulation of renal superoxide dismutase by telmisartan therapy in C57BL/6-Ins2 (Akita) diabetic mice. *Hypertens. Res.*, **35**, 213-220.
- 13) Fujita, H., Sakamoto, T., Komatsu, K., *et al.* (2011) Reduction of circulating superoxide dismutase activity in type 2 diabetic patients with microalbuminuria and its modulation by telmisartan therapy. *Hypertens. Res.*, **34**, 1302-1308.