

Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	金沢医科大学糖尿病内分泌内科学
氏 名	金崎啓造
研究テーマ	メタボリックシンドローム・妊娠高血圧腎症に共通の分子機構解明と新規治療戦略の開発

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

研究目的: 申請者は妊娠高血圧腎症の遺伝子改変モデル動物を初めて報告し、catechol-o-methyltransferase(COMT)不全を介したカテコール代謝異常がその原因であることを解明した (Nature 2008 Kanasaki et al)。妊娠高血圧腎症とメタボリックシンドロームは病態における類似点が多い。妊娠時インスリン抵抗性を有する症例は、血糖が正常でもその後妊娠高血圧腎症発症リスクが高い、また妊娠高血圧腎症症例においてはその後の人生における糖尿病発症リスクが2倍程度高い。低 COMT 酵素活性遺伝子多型と妊娠高血圧腎症、高血圧、糖代謝異常、急性冠症候群との関連も報告された。そこで COMT 不全がメタボリックシンドローム・妊娠高血圧腎症に共通の分子機構であると仮説し、COMT 不全がメタボリックシンドロームの病態において演じる役割を網羅的に解析する事を試みた。

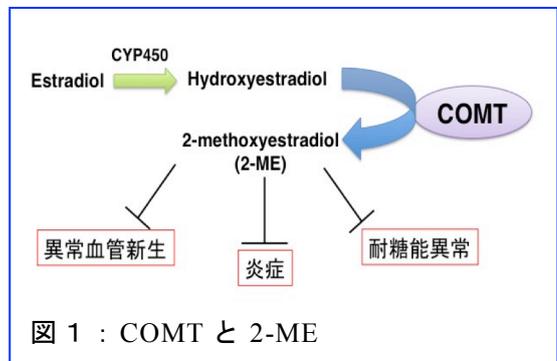


図1: COMT と 2-ME

背景-根拠: 妊娠 COMT ノックアウトマウスは妊娠高血圧腎症様症状を呈し、COMT を介した estradiol の代謝産物、2-methoxyestradiol(2-ME)投与により全ての症状が改善した。2-ME には抗炎症効果、抗異常血管新生、耐糖能改善効果、膵β細胞保護効果も報告されている (図1)。

研究手法: メタボリックシンドロームモデル動物として高脂肪食(クイックファット: fat energy 32%) 投与 C57Bl6 マウスを用いた。COMT 阻害薬(Ro41-0960)、COMT siRNA、metformin 投与実験に関しては短期間プロトコル(2週間)を、2-ME 慢性投与実験に関しては10週間高脂肪食投与を用い、2-ME の投与は最後の4週間のみ行った。膵臓β細胞からのインスリン分泌はマウスβ細胞ライン MIN6 細胞を用いた。妊娠高血圧腎症は血管作動性物質に対する昇圧反応亢進状態である。そこで、アンジオテンシン II(AII)持続皮下注射に対する昇圧反応における COMT 不全および 2-ME 治療効果の検討も行った。

研究結果: 「COMT 不全が妊娠高血圧腎症-メタボリックシンドロームに共通の病態である」という仮説に関して、次の結果を得ている: ①高脂肪食投与(10週) C57Bl6 マウスにおいて、COMT 蛋白発現が有意に抑制。2-ME(高脂肪食投与6週後より4週間)は、耐糖能-脂肪肝を改善。②2-ME による耐糖能改善効果は、肝臓 AMPK リン酸化と関連。③metformin を投与すると肝臓 COMT 蛋白が増加。metformin 投与による肝臓 AMPK リン酸化は COMT 阻害薬投与により抑制。④2週間高脂肪食摂取マウスにおける 2-ME による血糖低下は、インスリン分泌増加と関連; 10週高脂肪食摂取に対する4週間 2-ME 慢性投与では血中インスリンレベルは低下し、インスリン抵抗性が改善。⑤MIN-6 細胞を用いて行った in vitro 検討では、2-ME によりインスリン分泌量が増加し、2-ME はβ細胞の生存シグナルを誘導した。⑥妊娠マウスでは、肝臓 COMT 蛋白発現が低下。妊娠マウスに対する COMT 阻害薬投与によりインスリン抵抗性が増加、2-ME 投与はインスリン抵抗性を改善する事により COMT 阻害薬投与による耐糖能悪化を改善。⑦COMT 阻害薬投与によりアンジオテンシン II に対する昇圧感受性が亢進し、2-ME 投与によりその昇圧反応は抑制。2-ME による AII-1 型受容体の発現抑制を確認。2-ME の前駆物質(2-hydroxyestradiol: COMT の基質)投与ではその効果は得られない。⑧2-ME は内因性 PPARγ活性化分子である

考察: 上記結果から COMT が様々な環境因子により発現が低下する蛋白である事その是正が妊娠高血圧腎症-メタボリックシンドロームに共通の分子標的である可能性が示唆された。

Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	金沢医科大学糖尿病内分泌内科学
氏 名	金崎啓造
研究テーマ	メタボリックシンドローム・妊娠高血圧腎症に共通の分子機構解明と新規治療戦略の開発

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

研究の背景: ヒト catechol-o-methyltransferase(COMT)遺伝子には mRNA・蛋白の安定性を制御する数々の遺伝子多型・haplotype が知られている。COMT 活性低下遺伝子多型と精神疾患、肥満、糖尿病、高血圧、妊娠高血圧腎症等との相関が報告されているが、分子機構は不明である。

申請者は COMT 不全およびその結果として 2-methoxyestradiol (2-ME)欠乏の病態的意義を妊娠高血圧腎症モデルマウスである COMT ノックアウトマウスを用い報告した (Kanasaki et al. Nature 2008)。また、妊娠高血圧腎症では糖代謝異常、インスリン抵抗性の増加が報告されている。DBA-2J マウスや dahl-salt sensitive ラット、spontaneously hypertensive ラットなどメタボリックシンドローム様症状を発症する齧歯類は COMT 酵素活性が低いことが知られる。

COMT はカテコラミンを不活化する事が広く知られているが、実際はカテコール構造を有する多くの生体内物質の代謝に寄与する。Estradiol は CYP450 により中間代謝産物 hydroxyestradiol(2OH-E)に代謝されるが、2OH-E はカテコール構造を有するカテコールエストロゲンの一つである。2OH-E は COMT により、2-methoxyestradiol (2-ME)に代謝される (図 1)。2-ME は、hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α の発現阻害因子であるとともに抗炎症物質としても知られており、正常妊娠後期にかけて血中濃度が顕著に上昇するが、妊娠高血圧腎症では低下していることを申請者は報告し、その後各国からの追試で確認された。

COMT 不全の意義はカテコラミン分解不全にあるとの理解が一般的になされている。しかし、多彩な機能(抗 HIF-1 α 、抗血管新生、抗炎症、抗内皮細胞障害)を持つ 2-ME 欠乏の関与を考慮に入れると、COMT 不全惹起ヒト遺伝子多型と COMT 不全関連疾患群間の論理的説明が可能となる。

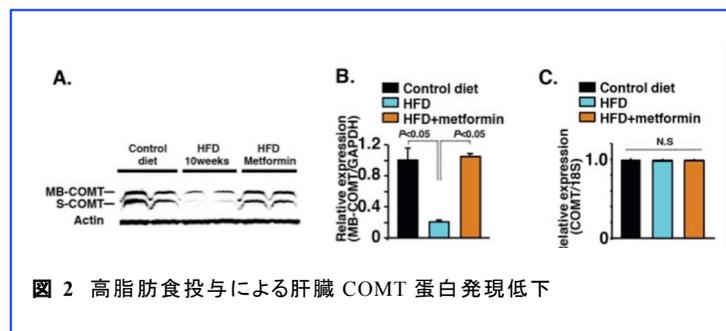


図 2 高脂肪食投与による肝臓 COMT 蛋白発現低下

研究目的: 妊娠高血圧腎症とメタボリックシンドローム病態において COMT 不全が鍵となる共通の分子機構であるとの仮説を証明する為に以下の検討を実施している

検討 1: 高脂肪食下における COMT 蛋白発現調節機構の同定

検討 2: 糖代謝異常において COMT 不全がもたらす影響とその分子機構の解明

検討 3: AII 惹起昇圧反応における COMT 不全の関与と分子機序の解明

検討 1: 高脂肪食下における COMT 蛋白発現調節機構を理解する

根拠 1: COMT は様々な環境因子によりその蛋白レベル、mRNA 安定性が変化する事が知られる。

実験 1-1: 8 週齢 C57Bl6 マウスに高脂肪食(Quick Fat)を 10 週間投与した。肝臓における COMT 蛋白を western blot 法にて解析, mRNA 発現レベルを定量的 PCR にて検討した。

結果 1-1: 高脂肪食投与マウスでは有意な COMT 蛋白の発現抑制が見出された(図 2A,B)。この高脂肪食投与による COMT 蛋白発現低下は mRNA 低下を伴っていなかった (図 2C)。

考察 1-1: 高脂肪食投与による肝臓 COMT 蛋白発現低下が明らかとなり、次に高脂肪食投与により低下する肝臓 COMT を正常化する事ができる薬剤として、後に述べる抗脂肪肝効果、分子機構との相同性に注目し、metformin が COMT 蛋白に及ぼす影響を検討した (実験 1-2)。

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

実験 1-2:10 週間高脂肪食投与マウスに最後の 4 週間 metformin による介入を行い、肝臓 COMT 発現調節を検討した。

結果 1-2: metformin 投与により肝臓 COMT 蛋白発現は正常化し、mRNA 発現は高脂肪食、metformin 投与すべての群で著変を認めなかった(図 2A-C)。

考察 1-2: 高脂肪食による COMT 調節機構に mRNA 発現レベルは関係せず、転写後調節機構の存在を示唆した。そこで COMT 調節機構に関与すると考えられる microRNA に注目した。

実験 1-3: 正常食、高脂肪食、高脂肪食+metformin 投与群の肝臓 microRNA array 解析を行い、COMT 調節の候補 microRNA をスクリーニングした。microRNA array は Agilent 社 release version 15 を用いた。

結果 1-3: humanCOMT3'UTR には、microRNA30c の結合配列が存在する。マウス microRNA array 解析では、図 3 の様に microRNA30c が高脂肪食で上昇し、metformin により正常化した(図 3)。ヒト内皮細胞を用いた検討においても microRNA30c は metformin 投与により低下した。

考察-今後の課題 1: ヒト COMT 3'UTR は既にクローニングが終了し、今後 metformin 投与や microRNA30c を含めたその他根拠のある microRNA を網羅的に解析し、COMT 蛋白発現調節機構を microRNA による制御から検討する。ただし COMT3'UTR の microRNA による調節機構は種によって相違がある事も考えられる。故に、mouse COMT 3'UTR も同様に検討する。

検討 2: COMT 阻害が糖代謝に与える影響とその分子機構を検討する

根拠 1: インスリン抵抗性を妊娠初期に有する症例はたとえ血糖が正常であっても、その後妊娠高血圧腎症を発症しやすい。また、妊娠高血圧腎症を有した女性は、その後の人生で糖尿病発症リスクが高い事が知られている。これらの結果は、妊娠高血圧腎症-糖代謝異常の間の病態生理におけるクロストークを示唆し、その分子機構として COMT 不全の意義を検討した。

実験 2-1: 2 週間高脂肪食投与マウスに COMT 阻害薬(Ro-41-0960 25 μ g/kg/day) を投与し、耐糖能、インスリン値、組織学的検討を行った。

結果 2-1: 高脂肪食投与マウスは正常餌投与マウスに比し耐糖能が悪化し、COMT 阻害薬投与によりさらなる耐糖能の悪化と肝臓への脂肪沈着の増加、及び脂肪へのマクロファージ浸潤の増加が認められた。これら COMT 阻害薬投与による耐糖能異常と病理学的異常は 2-ME の投与により改善した。しかしながら 2-ME による血糖改善は予想に反し、血中インスリンレベルの上昇を伴い、インスリン抵抗性改善を伴っていなかった。同様の COMT 阻害による耐糖能異常は COMT siRNA 投与を行った実験系でも確認できた。

考察 2-1: さらに長期間高脂肪食摂取動物でも検討する(実験 2-2)。

実験 2-2: 長期間高脂肪食投与マウス(10 週間)に対する 2-ME 慢性介入試験(高脂肪食投与後 6 週より、4 週間の 2-ME 10ng/day s.c.投与)を行った。

結果 2-2: 10 週間高脂肪食投与マウスにおいて 6 週後より 2-ME 投与を 4 週行ったところ、非投与群に比し耐糖能・脂肪肝の改善を認めた。高脂肪食投与で異常脂肪沈着も認められ、2-ME により改善した。しかしながら、2 週間投与実験とは違い、2-ME は高脂肪食にて増加した血中インスリン濃度を低下させ、インスリン抵抗性を改善した(図 3)。

考察 2-2: 2-ME は高脂肪食下の血糖改善効果において、短期ではインスリン分泌を介して、長期にはインスリン抵抗性を改善する可能性がある。

実験 2-3: metformin 投与下における COMT 阻害の意義を検討した。

結果 2-3: metformin により肝臓 COMT 蛋白発現が正常化する(図 2)。metformin は肝臓 AMPK のリン酸化を誘導し、血糖を改善した(図 4A-C)。metformin 投与下+COMT 阻害薬投与マウスにおいては肝 AMP-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化が抑制されており(図 4 A,B)、2-ME 投与により

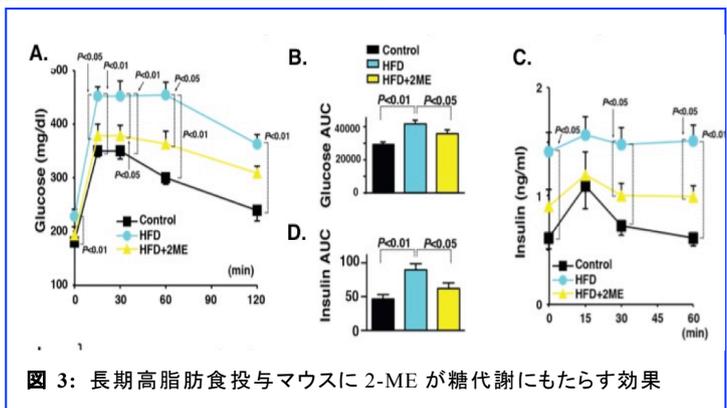


図 3: 長期高脂肪食投与マウスに 2-ME が糖代謝にもたらす効果

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

肝 AMPK リン酸化が回復した(図 4 A,B)。予想に反して、metformin 投与による耐糖能改善はインスリン抵抗性の改善ではなく、インスリン値の上昇を伴った(図 4 E,F)。COMT 阻害薬投与はインスリン分泌を抑制する傾向にあり、2-ME 投与はインスリン分泌を増加させた(図 4 B-G)。
考察 2-3: metformin の作用は一部 COMT/2-ME 依存性の可能性がある。

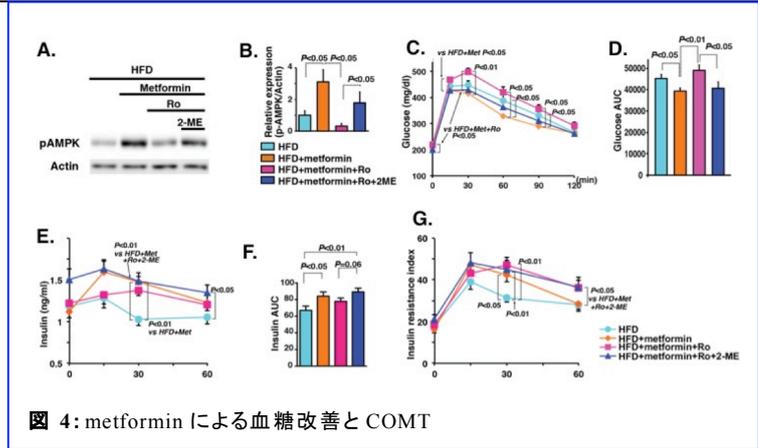


図 4: metformin による血糖改善と COMT

実験 2-4: 妊娠マウスに COMT 阻害薬 (± 2-ME) を投与し(妊娠 10 日より)、耐糖能を検討した。

結果 2-4: 妊娠マウスと非妊娠メスマウスの肝臓 COMT 蛋白発現を比較検討したところ、肝臓 COMT 蛋白は妊娠マウスで有意に低下していた。COMT 阻害薬投与により耐糖能は悪化、インスリン値上昇を伴った。2-ME により肝臓 AMPK 活性化、耐糖能改善と血中インスリン値低下を認めた。

考察 2-4: 同じ COMT 阻害薬投与による耐糖能悪化、2-ME による改善でも実験モデルにより、インスリン分泌に及ぼす影響は異なった。肝臓 AMPK 活性化では実験 2-1,2-3 に見られる 2-ME によるインスリン分泌刺激作用は説明できず、β細胞に対する 2-ME 孵置実験を行った(実験 2-5)。

実験 2-5: マウスβ細胞ラインである MIN6 細胞に 2-ME、metformin の孵置実験を行った。

結果 2-5: MIN6 からのインスリン分泌は 2-ME 孵置で増加、metformin 孵置では変化がなかった。2-ME により MIN6 細胞での AMPK は活性化したが、metformin では認めなかった。AMPK siRNA ノックダウン実験を行い、2-ME による MIN6 細胞からのインスリン分泌増加は AMPK 依存性である事を見出した。しかしながら、AMPK 活性化薬 AICAR のみではインスリン分泌増加は確認されず、AMPK 活性化のみではインスリン分泌誘導が生じなかった。そこでさらなる検討を行ったところ 2-ME により細胞生存シグナルである PDX1 の活性化とアポトーシス誘導と関連する MST1 の抑制が確認された

考察-今後の課題 2: 本実験結果から考えると、metformin による血糖改善効果は COMT に依存しており、投与初期はβ細胞の機能改善を介している可能性がある。COMT 遺伝子多型と metformin 反応性の間に相関がある可能性がある。2-ME によるβ細胞生存シグナル活性化は今後の糖尿病治療戦略開発につながる。

検討 3: COMT が AII に対する昇圧感受性を規定する可能性を検討する

実験 3: COMT 阻害薬投与有無において持続的 AII 皮下投与(700ng/kg/day)の昇圧反応、及び 2-ME 及び 2-ME の前駆物質 2OH-E (いずれも 10ng/day)投与を行い治療効果検討を行った。

結果 3: AII 持続投与では血圧は一過性に数日間軽度上昇しその後低下した(図 6)。COMT 阻害薬投与マウスでは AII による持続的昇圧を認めた。COMT 阻害薬+AII 投与マウスにおいて 2OH-E は血圧に有意な変化を生じなかったが、2-ME 投与では血圧は有意に低下した(図 5)。2-ME は PPAR γ 依存性の AII-1 型受容体の発現抑制機構に基づき AII に対する昇圧感受性を抑制した。

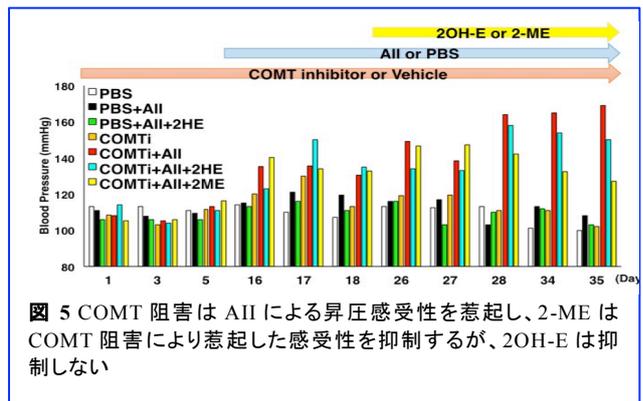


図 5 COMT 阻害は AII による昇圧感受性を惹起し、2-ME は COMT 阻害により惹起した感受性を抑制するが、2OH-E は抑制しない

考察-今後の課題 3: 妊娠高血圧腎症では AII に対する昇圧感受性が亢進しており、COMT 不全がその病態の本態である可能性がある。現在 siRNA 投与マウスでも更に検討している。前述の microRNA30c はヒト妊娠高血圧腎症で血中レベルが上昇しており、妊娠時 COMT 不全がもたらす AII 昇圧感受性亢進に関与している可能性がある。AII は無論メタボリックシンドロームに鍵となる血管作動性分子であり、COMT 不全は血圧制御の面からも共通の分子機構である可能性がある。

Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

所 属	金沢医科大学糖尿病内分泌内科学
氏 名	金崎啓造

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ・ 国内外雑誌を問わない。 ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	Y. Takagaki, D. Koya, ※ <u>K.Kanasaki</u> , Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and renoprotection: the role of antifibrotic effects. Curr Opin Nephrol Hypertens . 26(1):56-66. (2017) (査読あり)
2	S.P. Srivastava, S. Shi, M. Kanasaki, T. Nagai, M. Kitada, J. He, Y. Nakamura, Y. Ishigaki, ※ <u>K.Kanasaki</u> , ※D. Koya, Effect of Antifibrotic MicroRNAs Crosstalk on the Action of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline in Diabetes-related Kidney Fibrosis, Sci Rep , 6, 29884. (2016) (査読あり)
3	S. Shi, ※ <u>K.Kanasaki</u> , ※D. Koya, Linagliptin but not Sitagliptin inhibited transforming growth factor-beta2-induced endothelial DPP-4 activity and the endothelial-mesenchymal transition, Biochem Biophys Res Commun , 471, 184-190. (2016) (査読あり)
4	N. Ueki, S. Takeda, D. Koya, ※ <u>K.Kanasaki</u> , The relevance of the Renin-Angiotensin system in the development of drugs to combat preeclampsia, Int J Endocrinol , 2015, 572713. (2015) (査読あり)
5	S. Shi, S.P. Srivastava, M. Kanasaki, J. He, M. Kitada, T. Nagai, K. Nitta, S. Takagi, ※ <u>K.Kanasaki</u> , D. ※Koya, Interactions of DPP-4 and integrin beta1 influences endothelial-to-mesenchymal transition, Kidney Int , 88, 479-489. (査読あり)
② <論文 PDF 添付なし>	
1	K. Nitta, S. Shi, T. Nagai, M. Kanasaki, M. Kitada, S.P. Srivastava, M. Haneda, ※ <u>K.Kanasaki</u> , ※D. Koya, Oral Administration of N-Acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline Ameliorates Kidney Disease in Both Type 1 and Type 2 Diabetic Mice via a Therapeutic Regimen, Biomed Res Int , 2016: 9172157. (2016) (査読あり)
2	M. Kitada, Y. Ogura, T. Suzuki, S. Sen, S.M. Lee, <u>K.Kanasaki</u> , S. Kume, ※D. Koya, A very-low-protein diet ameliorates advanced diabetic nephropathy through autophagy induction by suppression of the mTORC1 pathway in Wistar fatty rats, an animal model of type 2 diabetes and obesity, Diabetologia , 59, 1307-1317. (2016) (査読あり)
3	<u>K.Kanasaki</u> , Concerted efforts to combat diabetic complications, Kidney Int , 89, 269-271. (2016) (査読なし)
	S. Kato, S. Maruyama, H. Makino, J. Wada, D. Ogawa, T. Uzu, H. Araki, D. Koya, <u>K.Kanasaki</u> , Y. Oiso, M. Goto, A. Nishiyama, H. Kobori, E. Imai, M. Ando, ※S. Matsuo, Anti-albuminuric effects of spironolactone in patients with type 2 diabetic nephropathy: a multicenter, randomized clinical trial, Clin Exp Nephrol , 19, 1098-1106. (2015) (査読あり)
	S. Shi, D. Koya, ※ <u>K.Kanasaki</u> , Dipeptidyl peptidase-4 and kidney fibrosis in diabetes, Fibrogenesis Tissue Repair , 9, 1. (2016) (査読あり)

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2016 年 12 月	第 28 回糖尿病腎症研究会シンポジウム、金崎啓造、糖尿病と microRNA
2	2016 年 11 月	第 46 回日本腎臓学会西部地方会、金崎啓造、新規糖尿病治療薬と腎保護効果
3	2016 年 6 月	第 61 回 透析学会、金崎啓造、糖尿病腎における microRNA の役割
4	2015 年 9 月	第 36 回日本妊娠高血圧学会学術集会、金崎啓造、COMT 不全と糖代謝異常
5	2015 年 5 月	第 15 回日本抗加齢医学会総会、金崎啓造、糖尿病腎の線維化に注目した治療戦略
3. 投稿、発表予定 (投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2017 年 2 月	Hypertension
2	2017 年 2 月	Scientific reports (revise)
3	2017 年 5 月	日本糖尿病学会
4	2017 年 5 月	日本腎臓学会
	2017 年 6 月	日本抗加齢医学会