

特集：糖尿病性腎症の成因と病態—新たな展開

糖尿病性腎症の成因—酸化ストレス

井口登與志

要 旨

糖尿病性腎症の成因仮説として、高血糖に起因する種々の代謝異常が推定されているが、腎組織障害の最終的なメディエーターとして炎症や酸化ストレス亢進の重要性が明らかにされつつある。本稿では、糖尿病腎における酸化ストレス亢進の機序として、腎組織 NAD(P)H オキシダーゼ活性化とその活性化機序としての高血糖を介したプロテインキナーゼ C(PKC)活性化や、腎組織レニン・アンジオテンシン系(RAS)の活性化の関与を示す。さらに、これらの機序をターゲットとした薬剤(スタチン, RAS 系阻害薬, ビリルビン, PKC β 阻害薬, GLP-1 アナログ)の糖尿病モデル動物腎症に対する有効性を示す自験成績を紹介し、糖尿病性腎症治療に対する新たな抗酸化療法の可能性を示す。

緒 言

糖尿病心血管壁系の機能異常の機序の成因として、高血糖に起因する代謝異常、すなわち非酵素的糖化亢進、ポリオール代謝亢進、プロテインキナーゼ C(PKC)活性化や酸化ストレスなどの機序が推定されている。さらに近年、これらの代謝異常は相互に密接に関連していることが明らかとなってきた。特に、組織障害の最終的なメディエーターとして、炎症とともに酸化ストレス亢進が注目される。実際、心血管疾患発症進展における酸化ストレスの重要性については多くの知見が集積してきているが、腎臓も酸素消費量がきわめて多い臓器であり、各種腎疾患においても活性酸素種(ROS)の直接的・間接的関与が報告されている。本稿においては、糖尿病性腎症の成因としての酸化ストレ

ス亢進とその機序について自験成績を中心に概説し、さらに、この機序を標的とした腎症治療戦略について考察する。

糖尿病腎組織における酸化ストレス亢進

糖尿病患者や糖尿病動物において血中や尿中の酸化ストレス指標の増加が報告されており、全身の心血管系の酸化ストレス亢進が推定される。腎組織においても酸化ストレスの亢進を示唆する多くの報告がなされている。Ha らは、STZ ラットの腎組織における酸化ストレス指標である 8 ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)含量の増加を報告した¹⁾。われわれも ELISA 法による検討において、尿中 8-OHdG 排泄量の増加とともに腎組織のミトコンドリア DNA の 8-OHdG 含量が有意に増加する成績を認めた(図 1)²⁾。

糖尿病腎組織における酸化ストレス亢進の機序として、われわれは、NAD(P)H オキシダーゼの活性化と発現亢進を報告してきた^{3~5)}。NAD(P)H オキシダーゼは p22phox と NOX ファミリー蛋白の 2 つのサブユニットより構成される細胞膜貫通型チトクローム b558p と、細胞質に存在する制御蛋白質 p47phox と p67phox および低分子量 GTP 結合蛋白から構成される。特に NAD(P)H オキシダーゼ NOX4 が腎における主なスーパーオキシドの産生源と考えられている。ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病ラットや自然発症 2 型糖尿病モデル db/db マウス腎組織では NOX4 と p22phox の有意な発現増加を認めた^{5,6)}。興味あることに、免疫染色法による NOX4 と p22phox の発現部位は 8-OHdG の染色部位ときわめて一致しており、糖尿病腎の酸化ストレス亢進における NAD(P)H オキシダーゼの役割を支持する成績と考えられた。

一方、糖尿病性腎症の発症・進展への AGE の関与を示唆する報告も多くなされている。AGE は、細小血管内皮細胞の RAGE(receptor of AGE)を介して作用し細胞内酸化ス

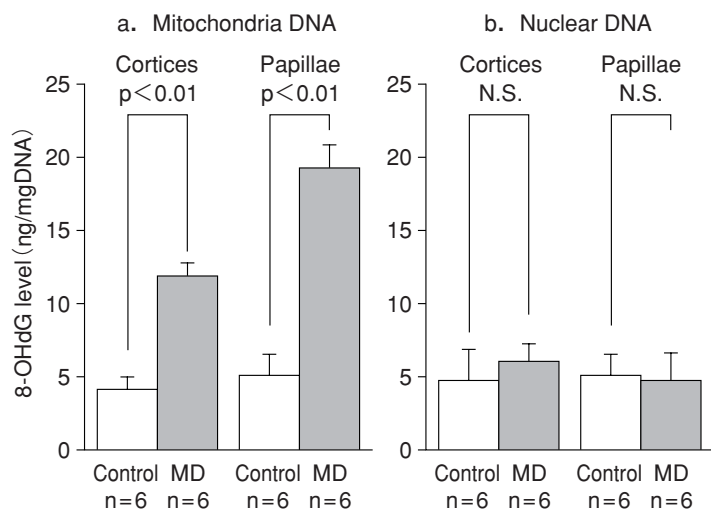


図1 糖尿病腎組織ミトコンドリア DNA における 8-OHdG 含量の増加 (文献2より引用, 改変)

トレス産生を亢進させること⁷⁾, また, この分子機構として NAD(P)H オキシダーゼを介した機序が報告されており, AGE を介した酸化ストレス亢進の機序も推定される。

PKC-NAD(P)H オキシダーゼ系と腎症

糖尿病心腎血管系における NAD(P)H オキシダーゼ活性化機序として, われわれは, 高血糖により活性化された細胞内調節酵素である PKC が, 血管壁細胞 NAD(P)H オキシダーゼを活性化しスーパーオキシド産生を増加させることを報告した³⁾。PKC による活性化機序として, 低分子量 GTP 結合蛋白 Rac の活性化⁸⁾や p47phox や p67phox の磷酸化の関与も報告されている。

NAD(P)H オキシダーゼからのスーパーオキシド産生は, このような活性化による制御とともに発現動態による制御も受ける。特に, 腎における主なアイソフォームとして同定された NOX4 は, 調節因子による制御よりも, 主にその発現動態によって活性が制御されると考えられている。PKC β アイソフォームのノックアウトマウスでは, 糖尿病が誘導されても腎組織における NOX4 発現亢進が認められないことより, その発現亢進にも PKC 活性化の関与が推定されている⁹⁾。NOX4 をはじめ NAD(P)H オキシダーゼ各構成蛋白の発現制御については明らかにされていないことが多く, 糖尿病における発現増加の機序の詳細についても今後の検討課題である。

PKC β アイソフォームのノックアウトマウスでは糖尿病を誘導されても, 上記の NOX4 発現の正常化と酸化ストレスの改善および蛋白尿や腎組織異常の改善が認められ, ま

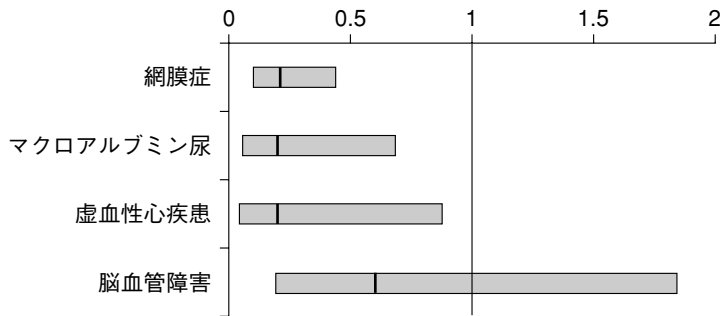
た, RNAi を用いた腎 NOX4 の発現抑制でも酸化ストレスの改善と組織異常の改善を認めることより¹⁰⁾, 腎症発症の成因としての NOX4 由来酸化ストレス亢進の重要性が示唆される。

腎組織レニン・アンジオテンシン系と酸化ストレス

糖尿病性腎症におけるレニン・アンジオテンシン (RAS) 系阻害薬の降圧効果を超えた臓器保護作用が臨床試験で示されている。一方, アンジオテンシン II (AT II) は AT1 受容体を介して細胞内カルシウムおよびジアシルグリセロールの上昇, それに続く PKC-NAD(P)H オキシダーゼ系の活性化を惹起することが知られている。われわれは, AT1 受容体拮抗薬 (ARB) 投与により, 糖尿病ラット腎における NOX4 の発現改善と並行して酸化ストレスの改善がみられることを示した¹¹⁾。一方, 糖尿病では血中 AT II 濃度は必ずしも上昇していないことより, 腎組織 RAS の活性化が推定された。組織 AT II 産生には, AT II 変換酵素も関与するが, ヒトやハムスターなどの種では, よりキマーゼの関与が重要と考えられている。われわれは, STZ 誘発糖尿病ハムスターの心腎血管系においてキマーゼ発現が増加していることを確認し, キマーゼ特異的阻害薬の腎症に対する効果を検討した。キマーゼ特異的阻害薬は, 血中 AT II 濃度には変化を及ぼさなかったが, 腎組織 AT II 濃度を改善することにより, 強力に NOX4 発現, 酸化ストレス, アルブミン尿, 腎組織異常を改善するという成績を得た¹²⁾。

酸化ストレスと腎症の関連を示すエビデンス

血清ビリルビンの強力な抗酸化作用は以前より知られていたが, 近年, 抗酸化酵素であるヘモオキシゲナーゼ-1 の組織保護作用が注目されるに及び, そのエフェクターとしてビリルビンが注目を集めている。われわれは, 肝でのビリルビン代謝酵素 uridine diphosphate-glucuronosyl transferase (UGT1A1) の先天的異常により血清間接型ビリルビンの軽度高値を示す体質性黄疸ジルベール症候群に着目した。われわれは, 糖尿病歴 5 年以上でジルベール症候群併発患者 96 例の血管合併症の発症頻度をジルベール症候群非併発の糖尿病患者 426 例と比較検討した。性, 血圧値, BMI, HbA_{1c}, 総コレステロール, LDL コレステロール, 中性脂肪, HDL コレステロールを含む多変量解析において, ジルベール症候群の併発は各合併症と有意な負の相関を認め, これらの因子で調整されたオッズ比は, 網膜症で



性別、年齢、BMI、収縮期血圧、拡張期血圧、HbA_{1c}値、LDLコレステロール値、総コレステロール値、血清中性脂肪値、HDLコレステロール値による補正

図2 体質性黄疸ジルベール症候群併発糖尿病患者における血管合併症のオッズ比 (文献13より引用, 改変)

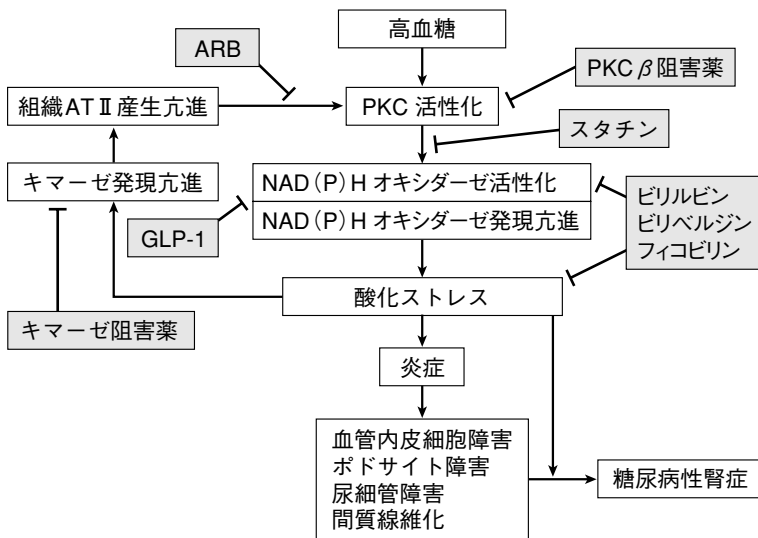


図3 糖尿病性腎症における酸化ストレス亢進機序とその機序をターゲットとした治療戦略

0.22 ($p < 0.01$), 虚血性疾患で 0.21 ($p = 0.04$), そしてマクロアルブミン尿で 0.20 ($p < 0.01$) と著明な低下を認めた(図2)¹³). また, ジルベール症候群併発糖尿病患者の酸化ストレス指標の尿中 8-OHdG および炎症指標の血清高感度 CRP 濃度は, 非ジルベール症候群併発群に比し有意に低値であった。

以上より, ジルベール症候群併発糖尿病患者において, 網膜症, 冠動脈心疾患および蛋白尿の発症頻度はきわめて低率であることを初めて示した。酸化ストレスと合併症の関連を示すヒトでの有力なエビデンスと考えられる。

抗酸化からみた腎症治療戦略

われわれは, 腎 NAD(P)H オキシダーゼ活性化機序を標

的とした腎症治療戦略を提唱してきた¹⁴)。NAD(P)H オキシダーゼ活性化機序を標的とした抗酸化治療の腎症に対する有用性について, われわれの動物実験の成績を紹介する(図3)。

1. スタチン

スタチンはメバロン酸代謝を抑制し, コレステロール合成を抑制するとともにゲラニルゲラニルピロリン酸の生成を抑制する。前述した制御蛋白低分子量 GTP 結合蛋白 Rac の活性化には, ゲラニルゲラニル化により膜にアンカーされることが必要であることより, スタチンは Rac のゲラニルゲラニル化抑制作用により, 高グルコースによる血管壁 NAD(P)H オキシダーゼの活性化を抑制する可能性が推定される。実際, スタチンは糖尿病における酸化ストレス亢進を *in vitro* および *in vivo* で改善し⁸), db/db マウス腎障害に対するピタバスタチンの効果の検討でも, 腎 NOX4 発現および腎組織酸化ストレスの改善と並行して, アルブミン尿および腎メサンギウム基質増加などの組織学的異常も改善した⁶)。

2. ARB およびキマーゼ阻害薬

前述したように, 腎組織 RAS 活性化による Ang II 産生亢進または受容体活性化を抑制し, NAD(P)H オキシダーゼの活性化・発現亢進を抑制し腎保護効果を示す^{11,12})。

3. ビリルビン

STZ にて糖尿病を誘発された体質性黄疸 Gunn ラットでは, NOX4 発現亢進, 酸化ストレス亢進, および腎症発症のすべてが抑制されること, また, ビリルビン前駆物質ビリベルジンを db/db マウスに投与すると, やはり NOX4 発現亢進, 酸化ストレス亢進, および腎症発症の抑制がみられることを示した¹⁵)。また, 藻類スピリリナより抽出精製したフィコビルンはビリベルジンときわめて類似した構造をもち, db/db マウスの腎症を改善することを示した(論文準備中)。

4. PKCβ 阻害薬

糖尿病血管壁では, 種々ある PKC アイソフォームのなかでも PKCβ2 の優位の増加が推定されており¹⁶), PKCβ アイソフォーム特異的阻害薬 LY33531 を実験糖尿病動物に投与したところ腎や網膜における機能異常¹⁷)および組織

変化を改善したこと、また、臨床治験でもその有用性を示す成績が報告されているが¹⁸⁾、臨床応用まではいまだ至っていない。その機序の少なくとも一部に抗酸化作用も関与していることが上述したように推測される。

5. GLP-1 アナログ

インクレチン関連薬が臨床応用可能となり臨床の場で血糖降下薬として急速に普及しているが、われわれは、GLP-1 アナログが腎心血管に存在する GLP-1 受容体を介して細胞内 cAMP 濃度上昇、それに続くプロテインキナーゼ A (PKA) 活性化により血糖低下作用を介さずに直接 NAD(P)H オキシダーゼ活性を抑制し、STZ 誘発糖尿病ラットにおける腎症を改善することを示した(論文投稿中)。

以上、糖尿病性腎症における NAD(P)H オキシダーゼ活性化機序をターゲットとした種々の薬剤の有効性を動物モデルで示した。

おわりに

糖尿病性腎症の発症および進展阻止のためには、高血糖の是正を中心に、高血圧、高脂血症の是正が試みられているが、いまだ糖尿病性腎症による透析導入は著減していない。糖尿病性腎症の成因に基づく新たな特異的治療薬の開発が期待される。

本稿においては、糖尿病性腎症発症・進展における酸化ストレスの重要性、その発生機序、その機序をターゲットとした抗酸化療法の可能性を示した。臨床応用可能な治療法への発展が期待される。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文献

1. Ha H, Kim C, Son Y, Chung MH, Kim KH. DNA damage in the kidneys of diabetic rats exhibiting microalbuminuria. *Free Radic Biol Med* 1994 ; 16 : 271.
2. Kakimoto T, Inoguchi T, Sonta T, Yu HY, Imamura M, Etoh T, Hashimoto T, Nawata H. Accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and mitochondrial DNA deletion in kidney of diabetic rats. *Diabetes* 2002 ; 51 : 1588.
3. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu H, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000 ; 49 : 1939-1945.
4. Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J, Sumimoto H, Nawata H. Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment. *Diabetologia* 2003 ; 46 : 1428-1437.
5. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Kakimoto M, Yu H, Y, Utsumi H, Sonoda N, Sumimoto H, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Nawata H. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species production in vascular tissues of diabetes : role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol* 2003 ; 14 : 227-232.
6. Fujii M, Inoguchi T, Maeda Y, Sasaki S, Sawada F, Saito R, Kobayashi K, Sumimoto H, Takayanagi R. Pitavastatin ameliorates albuminuria and renal mesangial expansion via down-regulation of NOX4 in db/db mice. *Kidney Int* 2007 ; 72 : 473-480.
7. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 9889.
8. Tsubouchi H, Inoguchi T, Sonta T, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H. Statin attenuates high glucose-induced and diabetes-induced oxidative stress *in vitro* and *in vivo* evaluated by electron spin resonance measurement. *Free Radic Biol Med* 2005 ; 39 : 444-452.
9. Ohshiro Y, Ma RC, Yasuda Y, Hiraoka-Yamamoto J, Clermont AC, Isshiki K, Yagi K, Arikawa E, Kern TS, King GL. Reduction of diabetes-induced oxidative stress, fibrotic cytokine expression, and renal dysfunction in protein kinase Cbeta-null mice. *Diabetes* 2006 ; 55 : 3112-3120.
10. Gorin Y, Block K, Hernandez J, Bhandari B, Wagner B, Barnes JL, Abboud HE. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 39616.
11. Sonta T, Inoguchi T, Matsumoto S, Yasukawa K, Inuo M, Tsubouchi H, Sonoda N, Kobayashi K, Utsumi H, Nawata H. *In vivo* imaging of oxidative stress in the kidney of diabetic mice and its normalization by angiotensin II type 1 receptor blocker. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ; 330 : 415-422.
12. Maeda Y, Inoguchi T, Takei R, Sawada F, Sasaki S, Fujii M, Kobayashi K, Urata H, Nishiyama A, Takayanagi R. Inhibition of chymase protects against diabetes-induced oxidative stress and renal dysfunction in hamsters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010 ; 299 : F1328-1338.
13. Inoguchi T, Sasaki S, Kobayashi K, Takayanagi R, Yamada T. Relationship between Gilbert syndrome and prevalence of vascular complications in patients with diabetes. *JAMA* 2007 ; 298 : 1398-1400.
14. Inoguchi T, Nawata H. NAD(P)H oxidase activation : a potential target mechanism for diabetic vascular complications, pro-

- gressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Curr Drug Targets* 2005 ; 6 : 495-501.
15. Fujii M, Inoguchi T, Sasaki S, Maeda Y, Zheng J, Kobayashi K, Takayanagi R. Bilirubin and biliverdin protect rodents against diabetic nephropathy by downregulating NAD(P)H oxidase. *Kidney Int* 2010 ; 78 : 905-919.
 16. Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL. Preferential elevation of protein kinase C beta isoform betaII and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats : differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 11059-11063.
 17. Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Feener EP, King GL. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC β inhibitor. *Science* 1996 ; 272 : 728-731.
 18. He Z, King GL. Can protein kinase C beta-selective inhibitor, ruboxistaurin, stop vascular complications in diabetic patients? *Diabetes Care* 2005 ; 28 : 2803-2805.