



# A Possible Role of Thioredoxin Interacting Protein in the Pathogenesis of Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy

Hamada, Yasuhiro

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Date of Publication)

2012-04-19

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3991

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003991>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 2 9 】

氏 名・(本 籍) 濱田 康弘 ( 兵庫県 )  
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)  
学 位 記 番 号 博い第1827号  
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当  
学位授与の 日 付 平成19年3月25日

【 学位論文題目 】

A Possible Role of Thioredoxin Interacting Protein in the  
Pathogenesis of Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy  
(ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスの糖尿病性腎症における  
チオレドキシニンインタラクティブプロテインの役割)

審 査 委 員

主 査 教 授 南 康博  
教 授 横崎 宏  
教 授 藤澤 正人

## 背景

糖尿病性腎症は先進国において末期腎不全の最も主要な原因のひとつであり、透析導入原因疾患の第1位である。さらに現在においても糖尿病性腎症患者数は増加し続けている。したがって、患者の Quality of Life および医療経済的にも糖尿病性腎症の発症進展機序の解明、治療法の開発は急務である。しかしながら、持続アルブミン尿、糸球体基底膜の肥厚、糸球体メサンギウム領域の拡大を特徴とするこの疾患の発症進展メカニズムについては依然として不明な点が多い。

糖尿病状態に伴って引き起こされる生体内のさまざまな異常が糖尿病性腎症の発症進展に関与していると考えられるが、その中でも酸化ストレスが重要な役割を果たしているかもしれない。糖尿病においては糖化反応亢進、ポリオール代謝経路亢進、プロテインカインース C 活性化、NADPH オキシダーゼ活性化、ミトコンドリア電子伝達系亢進などにより活性酸素が生じやすい状態となっており、この活性酸素は腎糸球体メサンギウム細胞や血管内皮細胞といったさまざまな種類の細胞の障害を引き起こすことが知られている。

酸化ストレスに対する生体の防御システムとして抗酸化物質が存在し、細胞内のレドックスバランスを制御している。一方で、生体内には抗酸化物質に拮抗する物質の存在も知られている。チオレドキシニンインタラクティブプロテイン (Txnip) はそのような物質のうちのひとつであり、一重項酸素、ヒドロキシラジカル、過酸化水素を消去する働きを持つ抗酸化物質であるチオレドキシニンの働きを阻害する。In vitro の研究では高血糖により Txnip の発現が誘導されることが報告されている。そこで、今回われわれはストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病マウスを用いて糖尿病性腎症における Txnip の関与を検討した。

## 方法

8 週齢の雄性 C57BL/6 マウスを無作為に対照群と糖尿病群に分けた。糖尿病群にはストレプトゾトシンの投与を行い、対照群にはバッファーのみの投与を行った。ストレプトゾトシンまたはバッファー投与後 24 週間観察した。

体重、ヘモグロビン A1c (HbA1c) 値、一日尿中アルブミン排泄量、尿中 8-OHdG (酸化ストレスによる DNA 損傷のマーカー)、尿中アクロレイン (酸化ストレスによる脂質過酸化のマーカー) の測定をおこなった。また、腎臓の組織を

取り出し PAS 染色、PAM 染色にてメサンギウム領域拡大の評価を行い、さらに腎臓から RNA を抽出することにより細胞外マトリックス蛋白である 4 型コラーゲン、メサンギウム領域拡大に重要な役割を果たすと考えられている Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、および Txnip の発現量の変化をリアルタイム PCR を用いて確認した。

## 結果

ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスでは対照群のマウスに比べて、体重減少および HbA1c 値の高値がみられ、実験期間中、高血糖状態が持続していたと考えられた。

糖尿病性腎症の評価として、糖尿病性腎症の特徴である 1 日尿中アルブミン排泄量、腎肥大、メサンギウム領域の拡大について観察した。ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスでは対照群のマウスに比べて有意な尿中アルブミン排泄量増加、体重あたりの腎重量の増加、メサンギウム領域の拡大がみられた。また、同時に細胞外マトリックス蛋白であるコラーゲン IV、メサンギウム領域拡大を引き起こすような細胞外マトリックスリモデリングの主要な蛋白である TGF- $\beta$  の発現増加もみられた。

酸化ストレスのマーカーである尿中 8-OHdG および尿中アクロレインは対照群と比較して糖尿病群で有意な増加がみられた。さらに抗酸化物質チオレドキシニンに対する阻害作用を持つ Txnip の発現も糖尿病群において有意な増加がみられた。

## 考察

今回の研究で、ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスの腎臓においてヒト糖尿病性腎症に特徴的であるアルブミン尿、腎肥大、メサンギウム領域の拡大がみられた。さらに、糖尿病性腎症の発症進展に重要な物質であるコラーゲン IV や TGF- $\beta$  の発現も増加していたことを確認した。これらの結果よりストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスはヒト糖尿病にみられる腎症を模倣しているよい動物モデルであることが確認された。

糖尿病状態では生体内で酸化ストレスが亢進することが知られているが、実

際に今回の実験においても酸化ストレスのマーカーである尿中 8-OHdG と尿中アクロレインのいずれのマーカーも上昇していることが観察された。すなわち、酸化ストレスと糖尿病性腎症の発症進展にはなんらかの関連があることが推察される。

生体内には酸化ストレスに対する防御システムが存在している。実際、糖尿病においては superoxide dismutase, glutathione peroxidase, カタラーゼといった活性酸素除去に働く物質が増加していることが報告されている。にもかかわらず、全身の酸化ストレスは増加したままである。チオレドキシシンも細胞内の抗酸化物質として重要であることが報告されている。近年、このチオレドキシシンの働きを阻害する物質として Txnip が同定された。本研究において、腎臓における Txnip の発現量を調べたところ対照群と比較して糖尿病群で有意な増加がみられた。すなわち、糖尿病状態で酸化ストレスが亢進する原因のひとつとして Txnip のような抗酸化物質の働きを阻害する物質が生体内で増加しているという可能性が考えられた。

本研究において、われわれはストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスの糖尿病性腎症において酸化ストレスの亢進に伴って Txnip の発現が増加していることを示した。Txnip を抑制することが糖尿病性腎症に対する有効な治療法となるかもしれない。

### 論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 1809 号	氏名	濱田 康弘
論文題目 Title of Dissertation	<p><b>A possible role of thioredoxin interacting protein in the pathogenesis of streptozotocin-induced diabetic nephropathy</b></p> <p>ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスの糖尿病性腎症におけるチオレドキシシンインタラクティブプロテインの役割</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 南 康博 Chief Examiner</p> <p>副査 横崎 六 Vice-Examiner</p> <p>副査 藤澤 正人 Vice-Examiner</p>		
審査終了日	平成 19 年 3 月 7 日		

(要旨は1, 000字~2, 000字程度)

67

18

Oxidative stress has been suggested to play an important role in the pathogenesis of diabetic nephropathy because it increases under diabetic conditions and is known to induce cellular dysfunction in a wide variety of cells. To protect against oxidative stress, cells possess defensive mechanisms such as intracellular antioxidants. Although it has been reported that central enzymes in the antioxidative defense mechanisms of the cell are induced under hyperglycemic conditions, the oxidative stress level remains high. On the other hand, there are endogenous inhibitors of antioxidants, such as thioredoxin interacting protein (Txnip). In the present study, the relationship between diabetic nephropathy and Txnip were examined by using streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice. Eight-week-old male C57BL/6 mice were treated with either STZ or citrate vehicle, and 24 weeks later, diabetic nephropathy and oxidative stress were assessed by biochemical analyses of urine and histological analyses of the kidneys. In addition, the expression of type IV collagen  $\alpha 1$  chain (Col4A1), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), and Txnip were evaluated by real-time polymerase chain reaction. Albuminuria, renal hypertrophy, and expansion of the mesangial area, which are the hallmarks of diabetic nephropathy, were confirmed in the diabetic mice. The mRNA expression of COL4A1 and TGF- $\beta$  was dramatically increased in diabetic mice in comparison with the control mice. Moreover, it was found that renal expression of Txnip increased drastically in diabetic mice, and that urinary excretion of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and acrolein adduct, which are oxidative stress markers,

deoxyguanosine and acrolein adduct, which are oxidative stress markers, were remarkably higher in diabetic mice than in the control mice, suggesting that diabetic conditions enhance the thioredoxin/Txnip interaction, leading to functional inhibition of the antioxidative function of thioredoxin. Collectively, these results also suggest that Txnip may be a therapeutic target in diabetic nephropathy.

The candidate, having completed studies on the role(s) of Txnip in the pathogenesis of streptozotocin-induced diabetic nephropathy, with a specialty in its function in oxidative stress during the development of diabetic nephropathy, and having advanced the field of knowledge in the area of pathology of diabetic complications, is hereby recognized as having qualified for the degree of Ph. D. (Medicine).