

# 糖尿病性腎症進展過程におけるミトコンドリア酸化ストレス関与の意義

八田 秀一

糖尿病における臓器障害の発症・進展機構に酸化ストレスが関与していることが明らかとなっている。糖尿病性腎症進展過程における、活性酸素によるミトコンドリア機能異常、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の酸化的修飾の存在及びその意義について検討した。streptozotocin (STZ) 糖尿病モデルを作成し、まず高血糖状態下での糸球体内活性酸素発生について検討した。コントロール群 (C 群) と比較し、糸球体内での活性酸素発生の有意な増加を認めた。次に、核酸の酸化的修飾の状態を 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG) を指標として検討した。8-OH-dG の尿中排泄量は高血糖導入後、有意に増加した (C 群:  $325 \pm 34$  ng/日 vs.  $888 \pm 347$  ng/日  $p < 0.05$ )。腎組織における 8-OH-dG の局在を免疫組織化学により検討したところ、8-OH-dG の蓄積は主に糸球体上皮および内皮細胞に認められた。細胞内では主として細胞質に局在しており、mtDNA の酸化的障害の蓄積が推測された。mtDNA 遺伝子の発現変化を検討したところ、ミトコンドリア呼吸鎖 complex I, III 構成分子である NADH dehydrogenase 2 及び cytochrome b の遺伝子発現が糖尿病群において低下していた。

次に、培養糸球体上皮細胞を用いて、mtDNA の酸化的障害が細胞機能に与える影響について検討した。ミトコンドリア呼吸鎖酵素群 complex I 及び III の特異的阻害薬を用いたところ、細胞内に活性酸素産生の亢進を認めた ( $p < 0.05$ )。また、糸球体上皮細胞を活性酸素により処理したところ、ミトコンドリア膜電位の低下と apoptosis の誘導を認めた。

以上の結果より、糖尿病性腎症において、糸球体内での活性酸素産生の亢進と、その結果生じるミトコンドリア及び mtDNA の酸化的障害が、組織障害の進展に関与している事が明らかとなった。

(平成12年10月27日受理)

## Role of Mitochondrial and Mitochondrial DNA Damage Due to Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy

Hidekazu HATTA

Augmented oxidative stress induced by hyperglycemia possibly contributes to the pathogenesis of diabetic complications. We studied mitochondrial injury induced by hyperglycemia and its relevance to the development of diabetic nephropathy (DN) using a streptozotocin (STZ)-induced diabetic model. We examined mitochondrial oxidative damage and mitochondrial function relative to reactive oxygen species (ROS). ROS were generated in diabetic glomeruli. Urinary excretion

of 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG), which is a product and biomarker of oxidative DNA damage, significantly increased after induction of hyperglycemia by STZ. Immunohistochemical studies using the monoclonal antibody against 8-OH-dG revealed accumulations of 8-OH-dG mainly the cytosol of glomerular epithelial and endothelial cells. We examined the expression of the NADH dehydrogenase 2 and cytochrome b genes, which encode structural proteins consisting of complexes I and III, respectively. The expression of these genes was inhibited in STZ rats. We examined the effects of mitochondrial respiratory chain inhibitors on ROS production in rat glomerular epithelial cells (GECs). Rotenone and antimycin A, which inhibit complexes I and III, respectively, increased ROS production. The direct influence of ROS on the mitochondria was examined. Following the addition of hydrogen peroxide, the GECs showed loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ). Chromatin condensation and nuclear fragmentation of GECs were demonstrated following the addition of hydrogen peroxide.

These results indicated that oxidative injuries to the mitochondria and mtDNA play an important role in the development of DN through oxidative modification of mtDNA. (Accepted on October 27, 2000) *Kawasaki Igakkaishi* 27(1): 67-82, 2001

**Key Words** ① Diabetic Nephropathy ② Oxidative Stress  
③ Mitochondria ④ Mitochondrial DNA

## 緒 言

糖尿病の増加により、糖尿病性腎症は、末期腎不全の原因疾患の第一位を占めるに至り、近年の透析患者数の持続的増加の主要要因となっている。さらに、透析導入後も、その他の成因による腎不全患者と比較して、生命予後は明らかに不良である。糖尿病性腎症の成因を解明し、有効な治療法の開発が待たれている。

糖尿病の臓器障害発症・進展には、advanced glycation endproducts (AGE) の蓄積<sup>1)</sup>、ポリオール経路の活性化<sup>2)</sup>、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化<sup>3)</sup>、酸化ストレスの亢進<sup>4)</sup> が関与している。AGE 形成過程において活性酸素産生が亢進する事が知られていたが、高血糖によって直接、細胞内の酸化ストレスが亢進する事も報告された。酸化ストレスは AP-1 や NF- $\kappa$ B 等の転写因子の活性化を介して各種の遺伝子発現を制御し、血管合併症の発症・進展に重要な役割を果たしていると考えられている<sup>5), 6)</sup>。酸化ストレスによる修飾標的の生体分子として、これまで蛋白質や脂質が知られていたが<sup>7)~10)</sup>、近年、

DNA 等の核酸も酸化修飾を受ける事が判明した<sup>11)~14)</sup>。酸化修飾を受ける核酸としては、核内 DNA、細胞質内ヌクレオチド、ミトコンドリア DNA (mtDNA) がある。mtDNA は以下の理由により、酸化修飾を容易に受けることが報告されている。すなわち、ミトコンドリアでの酸化リン酸化による ATP 合成に際して、スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) が数%恒常的に遊離されており、ミトコンドリアが活性酸素の細胞内発生源となっていること<sup>15)~18)</sup>、また、mtDNA はヒストン等の保護蛋白との結合を欠き、核 DNA に比べ酸化修飾を受けやすいと考えられている。核酸は様々な酸化修飾を受けるが、中でも、グアニン塩基 8 位の炭素が水酸化されて生じた、8-OH-dG の生成が注目されている。癌や糖尿病においてその発症や病期の進行についての関与が報告されている<sup>11)~14), 19)</sup>。老化に伴い、mtDNA における 8-OH-dG の蓄積も明らかになっており、細胞老化との関与も報告されている<sup>20)</sup>。8-OH-dG 化が起こると、8-OH-dG に対して DNA 複製時に 50% の確率でアデニンが相補的に結合し、最終的に G : C から T : A の transversion が生じ、

point mutation が生成される<sup>21)</sup>。また 8-OH-dG の蓄積とともに mtDNA の delation が増加してくる事も報告されている<sup>20), 22)</sup>。mtDNA はミトコンドリア呼吸鎖酵素の一部とその翻訳にあずかる rRNA をコードしており、mtDNA の酸化的修飾とその結果生じる mtDNA の変異の蓄積により、酸化的リン酸化能の低下と ATP 合成の低下、ひいては細胞機能の低下を惹起しうることが容易に想像される。さらに、ミトコンドリアはエネルギー産生のものであると同時に、apoptosis の誘導過程にも関与していることが明らかになっている<sup>23), 24)</sup>。

本研究の目的は、糖尿病性腎症進展過程における、活性酸素によるミトコンドリア及び mtDNA の酸化的修飾の意義を明らかにする事にある。

## 材料と方法

### 1. streptozotocin 糖尿病モデルラットの作成

雄 Sprague-Dawley (S-D) ラット、生後10週齢(日本クレア社、大阪)を使用した。動物は一般飼料(MF-オリエンタル酵母)と飲料水を自由摂取させ、室温下に飼育した。糖尿病モデルは、エチルエーテル吸入麻酔下に streptozotocin (STZ) (Sigma 社, St. Louis, Mo) 60 mg/kg を静脈内注射し作成した。その後数回血糖値を測定し、いずれも 300 mg/dl 以上であることを確認した。対照群には同週令の S-D ラットを使用した。本実験は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No. 99-076)、川崎医科大学の動物実験指針に基づき実施された。

### 2. 培養糸球体上皮細胞

ラット腎糸球体より分離確立した糸球体上皮細胞を山辺英彰博士(弘前大学医学部第二内科)より供与いただき、実験に供した。細胞は敷石状の形態を示し、Fx1A 抗原およびサイトケラチン陽性であり糸球体上皮細胞であることを確認した。以後の継代培養は10% FCS 含有 RPMI-1640 を用いて、37°C、CO<sub>2</sub> 5% の条件にて行った。

### 3. in vivo 活性酸素発生の検出

STZ 投与 2 週後、エチルエーテルの吸入麻酔後、ネンプタールによる腹腔内麻酔を施行し、腹部正中切開後、迅速に腎臓を摘出し、sieving 法にて糸球体を分離した。活性酸素発生の検討は細胞内で発生した活性酸素により酸化された緑色蛍光を発する dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA, Molecular Probes 社, Eugene, OR) により行った<sup>25)~27)</sup>。分離糸球体を 1 mM の DCFH-DA にて 37°C、40 分培養した。Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) にて洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-NT, Leica 社) にて観察した。各群間の比較は糸球体における平均蛍光強度にて行った。

### 4. 尿中 8-OH-dG 排泄量の定量

蓄尿は代謝ゲージを使用して、2, 4, 8 週、以後は 4 週おきに 20 週まで行った。採尿後遠心し、競合的 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (日本老化制御研究所, 袋井) を用いて尿中 8-OH-dG 排泄量を定量した。

### 5. 免疫組織学的検討

エチルエーテルの吸入麻酔後、ネンプタールによる腹腔内麻酔を施行しラットを屠殺した。腹部正中切開後、迅速に腎臓を摘出し腎皮質部を 4~5 mm 角に細切し、4% パラホルムアルデヒド (4% PFA) にて浸透固定、アルコールにて脱水後パラフィン包埋を行った。約 2 μm の切片を作成し、脱パラフィン後、マウス抗 8-OH-dG モノクローナル抗体 (日本老化制御研究所, 袋井)、家兎 copper/zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) 抗体 (StressGen Biotech. 社, Victoria, BC Canada)、及び、家兎 Manganese-SOD (Mn-SOD) 抗体 (StressGen Biotech. 社, Victoria, BC Canada) を一次抗体として用いて以下の如く酵素抗体法を行った。内因性 peroxidase を 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加 methanol で 30 分間非特異反応をブロックした後、一次抗体を室温にて 2 時間反応させた。次いで avidin-biotin complex 法 (Vector 社, Burlingame, USA) で反応させた後、5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えた 0.02% 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride にて発色させた。

免疫染色の結果を以下の方法で半定量的に評価した。各切片の糸球体20個を対象とし、8-OH-dGに関しては糸球体当り陽性細胞の占める割合を0から4に点数化(0, 0%; 1+, ≤25%; 2+, ≤50%; 3+, ≤75%; 4+, ≤100%), Mn-SODとCu/Zn-SODに関しては糸球体当りの陽性細胞数, 尿細管間質については各切片, 単位面積当りの染色領域を測定し(NIH image画像解析ソフト使用)コントロール群と比較した。

#### 6. 分離糸球体からのDNA抽出およびmtDNA修飾の検討

-80℃にて凍結保存しておいた分離糸球体にSTE溶液(100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4), 10% sodium dodecyl sulfate(最終0.5%), 10 mg/ml Proteinase K(最終0.5 mg/ml)を加え, 37℃で12時間以上インキュベートした。フェノール/クロロフォルム法にて除蛋白した溶液にエタノールを加え, DNAを析出した。さらに70%エタノールで洗浄後, TE溶液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)に溶解し以下の実験に供した。mtDNAには8-OH-dG化以外にも点変異, 欠失等の多様な障害が発生する事が知られており, これらを総括的に評価する方法として, Ballingerらによりミトコンドリア全塩基配列(whole mtDNA)を鋳型としたquantitative PCR(QPCR)法が開発されている<sup>28)~30)</sup>。これは, 鋳型DNA上に修飾塩基や塩基欠落部位などが存在すると耐熱性DNA polymeraseによる増幅効率が低下することを利用している。BamHI切断部がmtDNA上に1ヶ所しかないとを利用して, 核DNAを含めた抽出全DNA溶液についてそれぞれBamHI処理後, 0.6%アガロースゲルにて電気泳動, etidium bromideにて染色した後, densitometerを用いて抽出全DNA溶液中のmtDNA量を定量化した。この結果にもとづきPCRの鋳型となるmtDNA量を一定量に調節した後, 下記の方法でPCRを行った。

whole mtDNAを増幅するために以下の配列のプライマーを設計した<sup>31)</sup>。Forward primer: 5'-

CCT CCC ATT CAT TAT CGC CGC CCT TGC-3', Reverse primer: 5'-GAT GGG GCC GGT AGG TCG ATA AAG GAG-3'。wax (AmpliWax™ PCR Gem 100, Perkin Elmer社)を利用したHot start法でLong and Accurate-PCR(LA-PCR)法を用いてmtDNAの全塩基配列の増幅を行った。PCR tubeの下層に各プライマー0.2 μM, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 各dNTP 400 μMを加え総量20 μlとし, waxで下層を封入後, 上層に25 ngの鋳型mtDNA, 2.5単位のTaq DNA polymerase(LA Taq™, TaKaRa社), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, を加え, 総量30 μlに調整しPCRを行った。94℃ 1分間のinitial denaturation後に, denaturation (94℃ 30秒間), annealingおよびextension (68℃ 20分間)の反応を30サイクル(PTC-100, MJ Research社)行い, 最終extension (72℃ 10分間)にて反応を終了した。PCRの最終産物は0.6%アガロースゲル上で電気泳動後, etidium bromideで染色し可視化した。得られたPCR産物はLuminous Imager Ver. 2.0 デジタルイメージ解析ソフト(アイシンコスモス社)を用いて比較検討した。

#### 7. 糸球体におけるmtDNAのmRNA発現の検討

mtDNAはミトコンドリア呼吸鎖酵素遺伝子をコードしている。糖尿病腎糸球体におけるmtDNAにコードされるmRNA発現変化を検討した。

sieving法にて分離し-80℃にて凍結保存しておいた糸球体から, Acid Guanidinium Phenol Chloroform (AGPC)法でtotal RNAの抽出を行った<sup>32)</sup>。RNAはエタノールで沈殿した後, diethylpyro carbonate (DEPC)処理蒸留水で溶解した。

reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)法により, mtDNA遺伝子上に存在する2つの遺伝子, NADH dehydrogenase 2 (ND2)及びcytochrome b (cyt b)の発現を検討した。以下のプライマーを使用した。ND2: Forward primer; 5'-GCC GCC TAA TCA CGA CAC TT-3', Reverse primer;

5'-GCG AGT GAG AGT GTG TTG AT-3', cyt b: Forward primer; 5'-ACT CCT TTA TCG ACC TAC CG-3', Reverse primer; 5'-TAC GAC CCC TCC TAG TTT GT-3'. cDNA の合成は, 2  $\mu$ g の total RNA を鋳型として, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, random hexamer 2.5  $\mu$ M, 各 dNTP 1 mM, 7.5 単位の MuLV (Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase (Perkin Elmer 社) を加え, 総量 60  $\mu$ l に調整を行った. 42°C 30分間処理後, 99°C 5分間の加熱にて酵素の非活性化を行った. PCR 反応は 0.12  $\mu$ g の cDNA, 各プライマー 0.2  $\mu$ M, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.5 単位の Taq DNA polymerase (AmpliTaq, Perkin Elmer 社) を加え, 総量 20  $\mu$ l に調整し PCR を行った. 95°C 2分間の initial denaturation 後に, denaturation (95°C 1分間), annealing (56°C 1分間), extension (72°C 1分間) の反応を 33 (ND2) ないし 28 (cyt b) サイクル (PTC-100, MJ Research 社) 行い, 最終 extension (72°C 7分間) で反応を終了した. 増幅サイクル数は半定量的な評価に供するために, 20~35 サイクルの間で検討し, 上記サイクル数に決定した. RT-PCR の最終産物は 1.6% アガロースゲルにて電気泳動後, etidium bromide にて染色し, Luminous Imager Ver. 2.0 デジタルイメージ解析ソフトを用いて比較検討した.

8. ミトコンドリア呼吸鎖機能阻害剤による活性酸素産生の検討

糸球体上皮細胞を 25 cm<sup>2</sup> フラスコに  $1 \times 10^4$  / ml 培養し, 1% FCS 含有 RPMI-1640 培地で細胞周期同調を行った. 24時間後, rotenone 5  $\mu$ M (complex I 阻害剤), thenoyltrifluoroacetone 50  $\mu$ M (complex II 阻害剤, TTFA), antimycin A 10  $\mu$ M (complex III 阻害剤), (以上 Sigma 社, St. Louis, Mo) それぞれフラスコに添加し, 37°C, CO<sub>2</sub> 5% の条件で 3 時間培養した<sup>26)</sup>. PBS にて洗浄後, DCFH-DA 10  $\mu$ M 含有 RPMI-1640 に置換し 37°C, CO<sub>2</sub> 5% の条件で 40 分間培養した. 陽性コントロールとして過酸化水素 200  $\mu$ M 添加した細胞 (10分間) を用いた.

PBS にて洗浄後, トリプシン・EDTA にて剥離し, flow cytometry (Becton Dickinson 社) にて解析した. また, 共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-NT, Leica 社) にて観察した.

9. 活性酸素によるミトコンドリア膜電位変化

糸球体上皮細胞を 8 chamber-slide に  $1 \times 10^4$  / ml で培養し, 1% FCS 含有 RPMI-1640 培地に変え, 細胞周期同調を行った. 24時間後, 過酸化水素 200  $\mu$ M を添加し, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 時間後のミトコンドリア膜電位変化を membrane potential-sensitive dye である MitoSensor (CLONTECH 社) を用いて検討した. 蛍光顕微鏡 (LEITZ-DMRD, Leica 社) にて 10 視野観察し, 膜電位維持細胞数のカウントを行った.

10. 活性酸素による apoptosis の誘導

糸球体上皮細胞を上記と同様の条件で培養し, 24時間後, 過酸化水素 200  $\mu$ M を添加し, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4 そして 6 時間後の核形態変化を Hoecyst dye 33342 (Molecular Probes 社, Eugene, OR) を用いて検討した. 蛍光顕微鏡 (LEITZ-DMRD, Leica 社) にて 10 視野観察し, 核 chromatin 凝集細胞数のカウントを行った.

各群間の比較は Mann-Whitney U test で行った. p 値は 0.05 以下を有意とした.

## 結 果

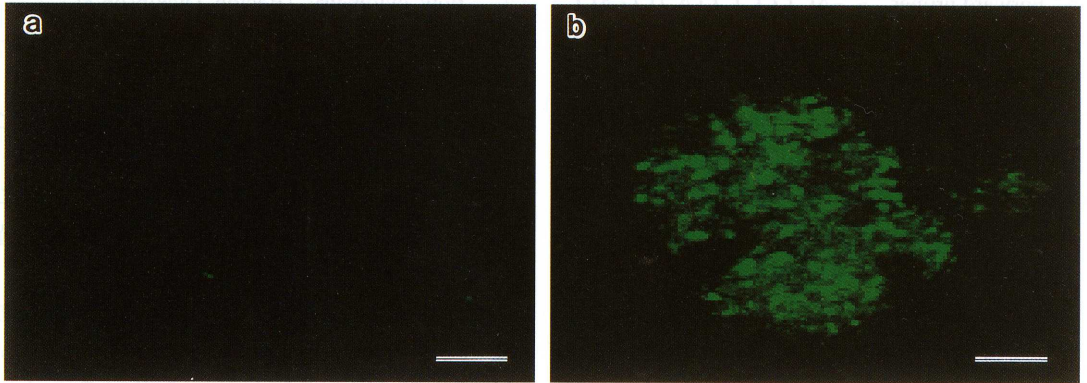
1. 糖尿病ラット糸球体における活性酸素の生成

活性酸素により緑色蛍光を発する DCFH-DA を用いて糸球体における活性酸素の生成を検討した. 共焦点レーザー顕微鏡における観察ではコントロール (**Fig. 1A a**) に比べ, 糖尿病腎糸球体において増強した蛍光が観察された (**Fig. 1A b**). 糸球体当りの平均蛍光強度の比較においてもコントロール群に比べ STZ 群では有意に増加を認めた (**Fig. 1B**).

2. 尿中 8-OH-dG 排泄量の測定

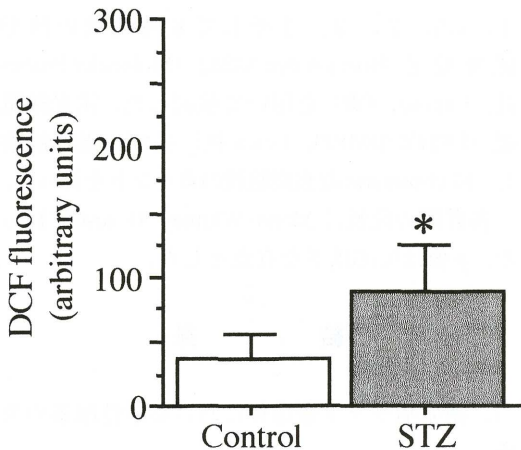
尿中 8-OH-dG 排泄量は加齢により増加することが知られているため age match させた各群

A



**Fig. 1.** Confocal analysis of ROS production in isolated glomeruli obtained from a control rat (a) and a STZ rat (b) 2 weeks following an injection of STZ (A). The DCF fluorescence of ROS production (B). A. DCFH-DA was added to the culture medium. After 40-min incubation, the glomeruli were examined under blue illumination by confocal microscopy. A strong green fluorescent color was observed in the isolated glomeruli of the STZ rat. All pictures were taken at the same magnification (bar = 100  $\mu$ m). B. The fluorescent intensity of isolated glomeruli from the STZ rat was significantly higher than that of isolated glomeruli from the control rat. Values are means  $\pm$  SD (n = 10). Significance values (\* $p$  < 0.0005) are determined vs. control.

B



のコントロールと比較した。高血糖導入後8週以降、コントロール群に比べ有意に尿中8-OH-dG排泄量の増加を認めた(Fig. 2)。

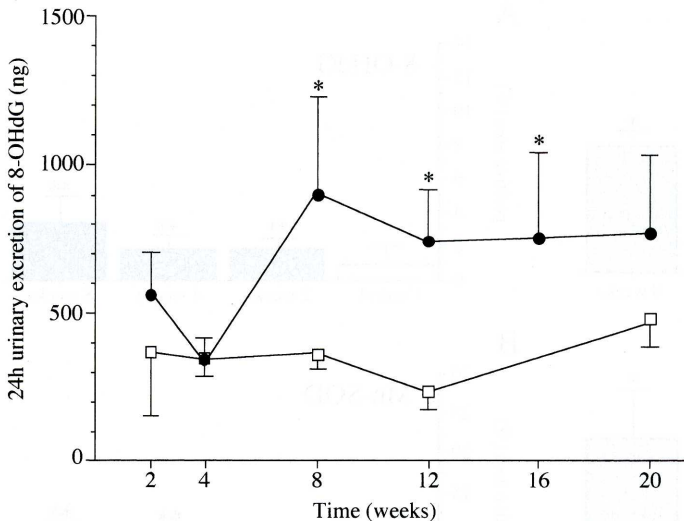
3. 腎組織における8-OH-dGの蓄積、SOD発現の免疫組織学的検討

8-OH-dGに関して、コントロール群では糸球体・尿細管間質ともに陽性細胞をほとんど認めなかった(Fig. 3A, B)。STZモデルでは糸球体・尿細管間質に陽性細胞が観察され、糸球体内では主に上皮細胞、内皮細胞に、尿細管間質では尿細管上皮細胞、尿細管周囲毛細血管内

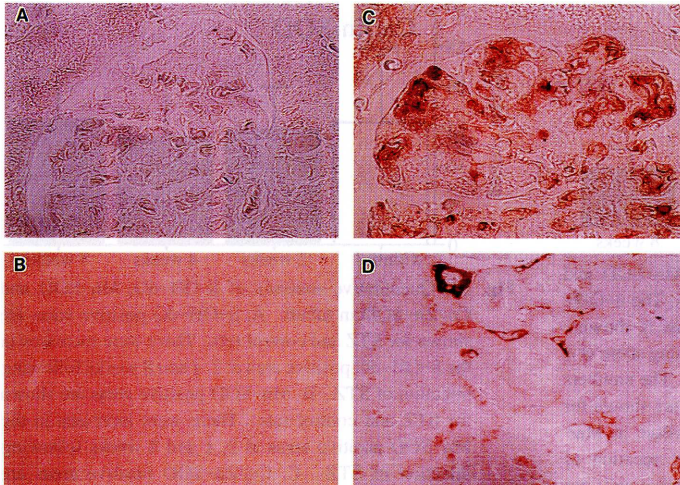
皮細胞に陽性所見を認めた(Fig. 3C, D)。強拡大で観察すると、核の染色は軽微で細胞質内に強い陽性所見を認め、8-OH-dGの蓄積が主としてmtDNAであることが推測された(Fig. 3C)。8-OH-dGの糸球体内陽性細胞数および尿細管間質の染色面積を経時的に比較した。糸球体内陽性細胞数はコントロール群と比較し4週目より(Fig. 4A)、尿細管間質ではコントロール群と比較し2週目より有意に増加を認めた(Fig. 5A)。

Mn-SODに関しては、コントロール群では糸球体内および遠位尿細管上皮細胞に陽性細胞が散見された(Fig. 6A, B)。STZモデルでは、糸球体上皮細胞に陽性細胞数の増加を認めた(Fig. 6C)。また尿細管上皮細胞においては、正常でも弱い発現を認める遠位尿細管のみならず近位尿細管においても強い発現を認めた(Fig. 6D)。同様に糸球体内陽性細胞数および尿細管間質の染色面積を経時的に比較した。糸球体内陽性細胞数はコントロール群と比較して8週目に(Fig. 4B)、尿細管間質ではコントロール群と比較し2週目より有意に増加を認めた(Fig. 5B)。

Cu/Zn-SODに関しては、コントロール群においてもSTZモデルにおいても、糸球体および尿



**Fig. 2.** 24 h urinary 8-OH-dG excretion in the STZ rats (●) and control rats (□). After eight weeks, a significant increase in the urinary 8-OH-dG levels of the STZ rat was observed in comparison with the controls. Values are means  $\pm$  SD ( $n = 5$ ). Significance values ( $*p < 0.05$ ) are determined vs. control (matched for age).



**Fig. 3.** Immunohistochemical detection of 8-OH-dG in control or STZ renal tissues (8 weeks following injection of STZ). No staining was observed in the control rat renal tissues (A, B). In the STZ rat renal tissues, strong staining of cells was seen mainly of the cytosol of glomerular epithelial/endothelial, tubular cells and the peritubular capillary (C, D). Original magnification  $\times 1000$  (A, C),  $\times 400$  (B, D).

細管上皮細胞に陽性細胞を認めた (Fig. 7A~D). コントロール群と STZ モデルとの間に有意な発現変化を認めなかった (Fig. 4C, 5C).

#### 4. QPCR 法による mtDNA 修飾の検討

mtDNA 上に修飾塩基や塩基欠落部位などの

変化が存在すると、耐熱性 DNA polymerase による増幅効率が低下することが報告されている<sup>28)~30)</sup>. コントロールと比較し有意差は認めないものの STZ モデル 8 週において、mtDNA の PCR 増幅効率は低下傾向を示していた (Fig. 8A, C). 抽出全 DNA Bam HI 消化後のアガロースゲル電気泳動像では、核 DNA はスミアとなるが、切断された mtDNA は一本の band として確認できる (Fig. 8B).

#### 5. mtDNA 由来の mRNA 発現の検討

mtDNA は酸化的リン酸化による ATP 産生の中心的役割を担っているミトコンドリア呼吸鎖酵素の遺伝子をコードしている。STZ モデルの糸球体において、ミトコンドリア呼吸鎖 complex I 構成分子である ND2 (Fig. 9) および complex III 構成分子である cyt b (Fig. 10) の遺伝子発現が抑制されていた。

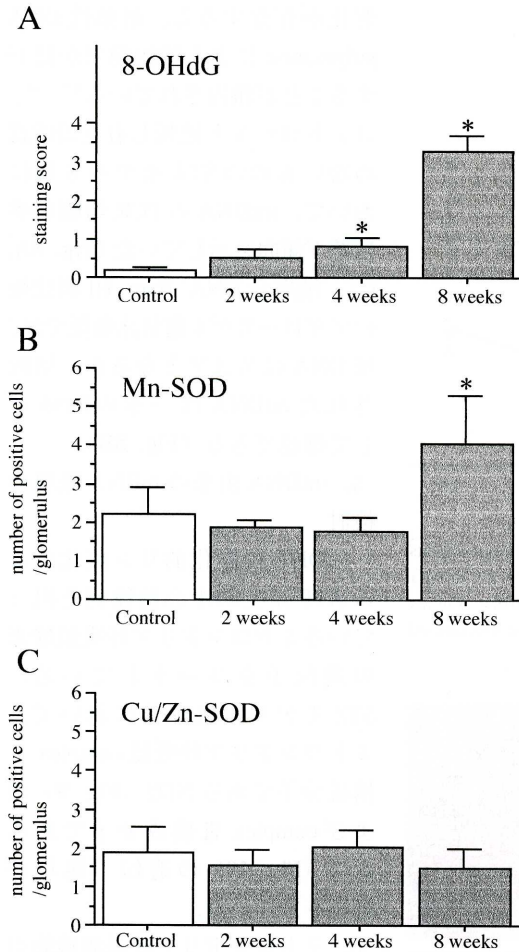
#### 6. ミトコンドリア呼吸鎖機能阻害剤による活性酸素産生の検討

ミトコンドリアにおける呼吸鎖酵素の機能抑制による活性酸素産生変化について検討した。antimycin A 添加 (Fig. 11A b) により、培養糸球体上皮細胞において、コントロール (Fig. 11A a) と比較して活性酸素の産生増加を認めた。flow cytometry による解析でも、rotenone, antimycin A 添加細胞ではコントロールと比較して

平均蛍光強度の有意な増加を認め、活性酸素産生増加が示された (Fig. 11B, C).

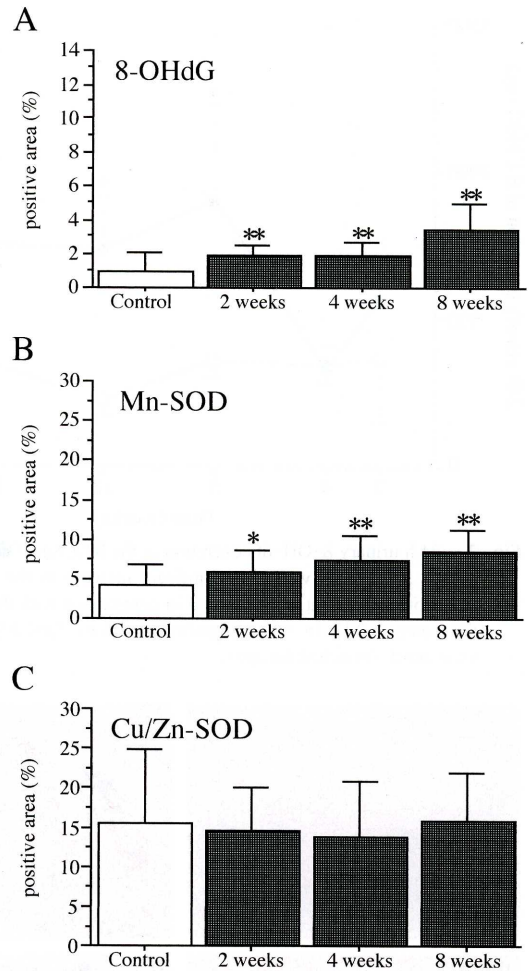
#### 7. 活性酸素によるミトコンドリア膜電位変化

ミトコンドリア膜間腔にはプロトンイオンの汲み上げにより形成される膜電位が存在する。



**Fig. 4.** Quantitative analyses of 8-OH-dG, Mn-SOD and Cu/Zn-SOD positive cells in glomeruli. A. The 8-OH-dG staining score for STZ and control rats is shown. There were increases in the 8-OH-dG staining score at 4 and 8 weeks following injection of STZ. B. The numbers of Mn-SOD positive cells per glomerulus are shown for STZ and control rats. There was an increase in Mn-SOD positive cells at 8 weeks following injection of STZ. C. The numbers of Cu/Zn-SOD positive cells per glomerulus are shown for STZ and control rats. There was no significant difference between the STZ rats and the control rats. Significance values (\* $p < 0.05$ ) are determined vs. control. Values are means  $\pm$  SD ( $n = 5$ ).

apoptosisの誘導過程においてこの膜電位が消失する事が示されている。正常糸球体上皮細胞においては膜電位の維持により蛍光色素がミトコンドリアに取り込まれ、オレンジ色の蛍光を発しているのが観察された (Fig. 12A a)。一方、過酸化水素 200  $\mu$ M 添加した糸球体上皮細胞



**Fig. 5.** Quantitative analyses of 8-OH-dG, Mn-SOD and Cu/Zn-SOD in tubuli. A. 8-OH-dG positive areas are shown for STZ and control rats. There were increases in the 8-OH-dG positive area at 2, 4 and 8 weeks following injection of STZ. B. Mn-SOD positive areas are shown for STZ and control rats. There were increases in the Mn-SOD positive areas at 2, 4 and 8 weeks following injection of STZ. C. Cu/Zn-SOD positive areas are shown for STZ and control rats. There was no significant difference between the STZ rats and the control rats. Significance values (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ ) are determined vs. control. Values are means  $\pm$  SD ( $n = 5$ ).

胞では蛍光色素のミトコンドリアへの取り込みが消失し、細胞質内にdiffuseな緑色蛍光を発し、活性酸素による膜電位の低下が示された (Fig. 12A b)。また、膜電位が維持されていた細胞数は、過酸化水素添加後、経時的な減少が認められた (Fig. 12B)。



## 考 察

ミトコンドリアは酸化的リン酸化による細胞内エネルギー産生の場であると同時に、apoptosisによる細胞死も仲介する事が示されている。また酸化的リン酸化に際してミトコンドリア電子伝達系のcomplex IとIIIより漏出する電子が酸素分子を還元し、 $O_2$ が数%恒常的に産生されており、ミトコンドリアは細胞内の活性酸素発生源ともなっている。高糖濃度下で培養された血管内皮細胞ではミトコンドリアにおける活性酸素産生が亢進する事も報告されている<sup>33)</sup>。

糖尿病性腎症も含めて、進行性腎障害において活性酸素が病態形成に関与することが従来より知られていたが、活性酸素の腎組織内での産生を直接可視化することは困難であった。今回、活性酸素により緑色蛍光を発するDCFH-DAと共焦点レーザー顕微鏡とを利用することにより、高血糖下で糸球体内において活性酸素産生が亢進していることを、直接明らかにする事に成功した。

次いで、糖尿病モデル動物では、活性酸素による核酸の酸化的修飾産物である8-OH-dGの尿中排泄量が増加する事、腎組織内に8-

OH-dGが進行性に蓄積する事を明らかにした。細胞内局在は、主として細胞質でありmtDNAの酸化的修飾が示唆された。前述の如く、ミトコンドリア呼吸鎖において、 $O_2$ が数%恒常的に産生されていること、血管内皮細胞では高糖濃度負荷によりミトコンドリアにおける活性酸素産生が亢進する事も知られている。これらの知見も考え合わせると、糖尿病腎糸球体のミト

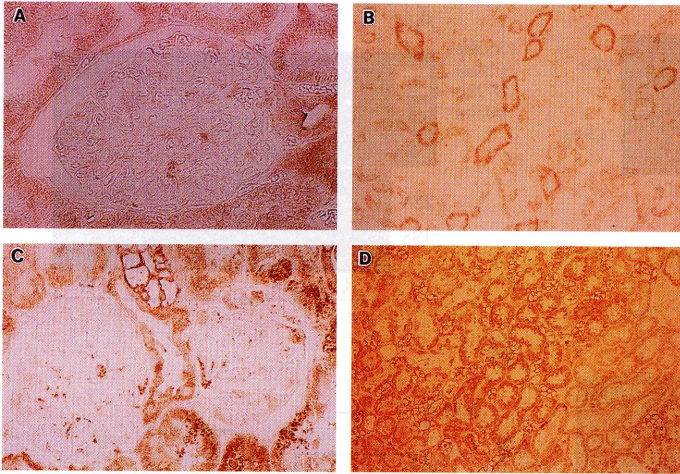


Fig. 6. Immunohistochemical detection of Mn-SOD in control or STZ renal tissues (8 weeks following injection of STZ). In the control rat renal tissues, weakly stained cells were observed (A, B), while in the STZ rat renal tissues, strongly stained glomerular epithelial and tubular cells were noted (C, D). Original magnification x1000 (A, C), x400 (B, D).

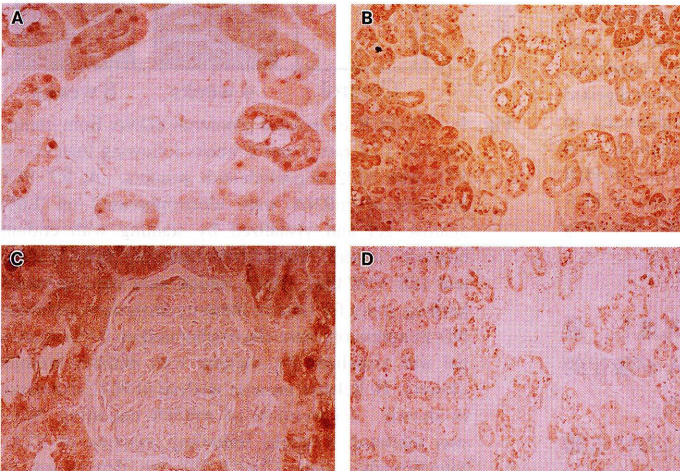
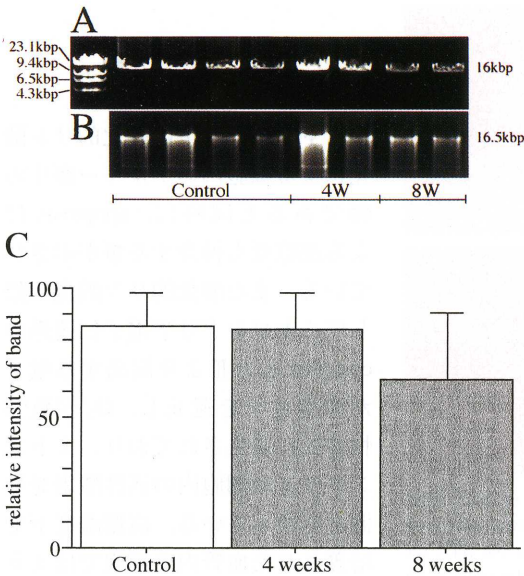


Fig. 7. Immunohistochemical detection of Cu/Zn-SOD in control or STZ renal tissues (8 weeks following injection of STZ). Stained cells were observed in the control and STZ renal tissues (A~D). Original magnification x400 (A, C), x100 (B, D).

### 8. 活性酸素による apoptosis の誘導

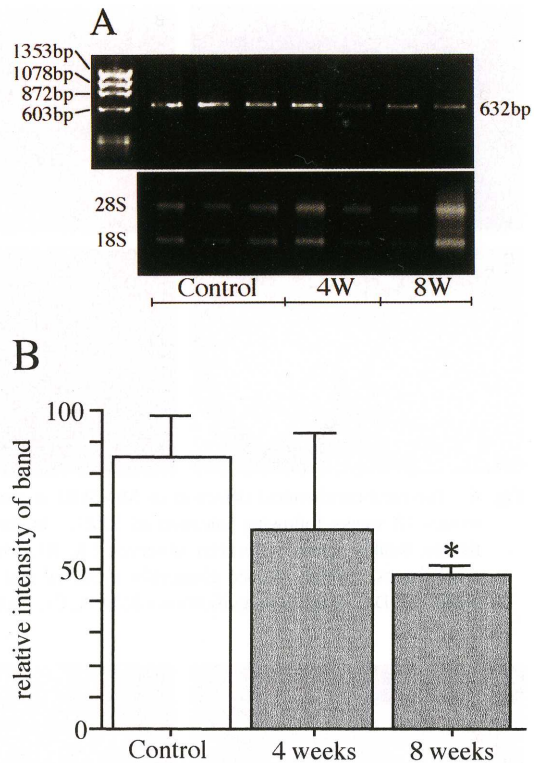
過酸化水素 200  $\mu$ M 添加後、核形態変化を観察したところ、コントロール (Fig. 13A a) と比較し、核 chromatin の凝集した apoptosis 像が認められた (Fig. 13A b, c). chromatin の凝集した apoptosis 細胞数は、過酸化水素添加後、経時的に増加が認められた (Fig. 13B).



**Fig. 8.** Quantitation of mtDNA damage in isolated glomeruli obtained from control rats and STZ rats 4 and 8 weeks following an injection of STZ. A. The PCR products of mtDNA (16.0 kb fragment) were electrophoresed on 0.6% agarose gel and visualized by staining with etidium bromide. B. To ensure quantitative condition, DNA (including nuclear DNA and mtDNA) was digested by the BamHI restriction enzyme, electrophoresed on 0.6% agarose gel and visualized by staining with etidium bromide. C. Relative intensity analysis of PCR products of mtDNA is shown. The amounts of PCR products of mtDNA declined at 8 weeks following injection of STZ.

コンドリアにおいて活性酸素産生が亢進し、最も近傍に存在する核酸として mtDNA が酸化的に障害されている事が強く示唆された。

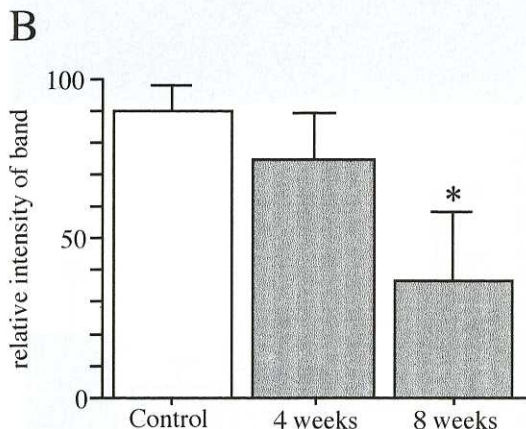
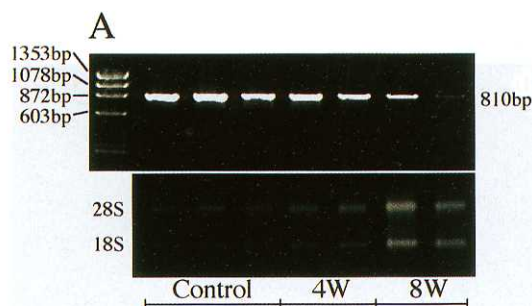
糖尿病腎系球体ミトコンドリア内における酸化ストレスの亢進は、活性酸素消去系酵素の変動によっても示唆された。生体内には活性酸素消去系酵素として SOD, カタラーゼ, グルタチオンペルオキシダーゼおよびグルタチオンなどが存在し、細胞内における酸化還元の恒常性を維持している。Mn-SOD 遺伝子はミトコンドリア移行配列を有しており、ミトコンドリア内のレドックス制御に重要な役割を果たしていると考えられている。Mn-SOD ノックアウトマウス細胞では、核 DNA に比較して mtDNA に有意に 8-OH-dG 化が認められ、さらにミトコンドリア機能も低下していた<sup>34)</sup>。糖尿病腎組



**Fig. 9.** RT-PCR of isolated glomeruli cDNA from control rats and STZ rats 4 and 8 weeks following injection of STZ with ND2 oligonucleotide primers. A. RT-PCR products of mRNA were electrophoresed on 1.6% agarose gel and visualized by staining with etidium bromide (upper). Total RNAs including 28S (4718bp) and 18S (1874bp) rRNA, which were used as house-keeping genes for relative intensity analysis to quantitate ND 2 expression, were electrophoresed on 0.8% agarose gel and visualized by staining with etidium bromide (lower). B. Relative intensity analysis of ND 2 expression is shown. Expression of mRNA encoding ND 2 was inhibited, 8 weeks following injection of STZ. Significance values (\* $p < 0.05$ ) are determined vs. control.

織において、細胞質における活性酸素消去系酵素である Cu/Zn-SOD の発現変化はほとんど認められなかったが、ミトコンドリア内活性酸素消去系酵素である Mn-SOD の発現が有意に増強していた。

mtDNA の酸化的障害は、mtDNA によりコードされる遺伝子の発現異常を惹起することが推測される。mtDNA はミトコンドリア呼吸鎖酵素の一部と、その翻訳に参与する rRNA をコードしている。mtDNA によりコードされる、ミ



**Fig. 10.** RT-PCR of isolated glomeruli cDNA from control rats and STZ rats 4 and 8 weeks following injection of STZ with *cyt b* oligonucleotide primers. **A.** RT-PCR products of mRNA were electrophoresed on 1.6% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide (upper). Total RNAs including 28S (4718bp) and 18S (1874bp) rRNA, which were used as house-keeping genes for relative intensity analysis to quantitate *cyt b* expression, were electrophoresed on 0.8% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide (lower). **B.** Relative intensity analysis of *cyt b* expression is shown. Expression of mRNA encoding *cyt b* was inhibited, 8 weeks following injection of STZ. Significance values (\* $p < 0.05$ ) are determined vs. control.

トコンドリア呼吸鎖 complex I, III 構成分子である, ND2 および *cyt b* の mRNA 発現を検討したところ, 糖尿病糸球体においてその発現が抑制されていた。

さらに, mtDNA の発現異常はミトコンドリア呼吸鎖機能の異常を惹起することが推測される。糸球体上皮細胞を用い, ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達阻害を行うことで, ミトコンドリアでの活性酸素産生が亢進することが明らかとなった。ミトコンドリア呼吸鎖機能異常により

電子伝達が障害されると停滞した電子が漏出し,  $O_2$  産生が増加するものと考えられる。

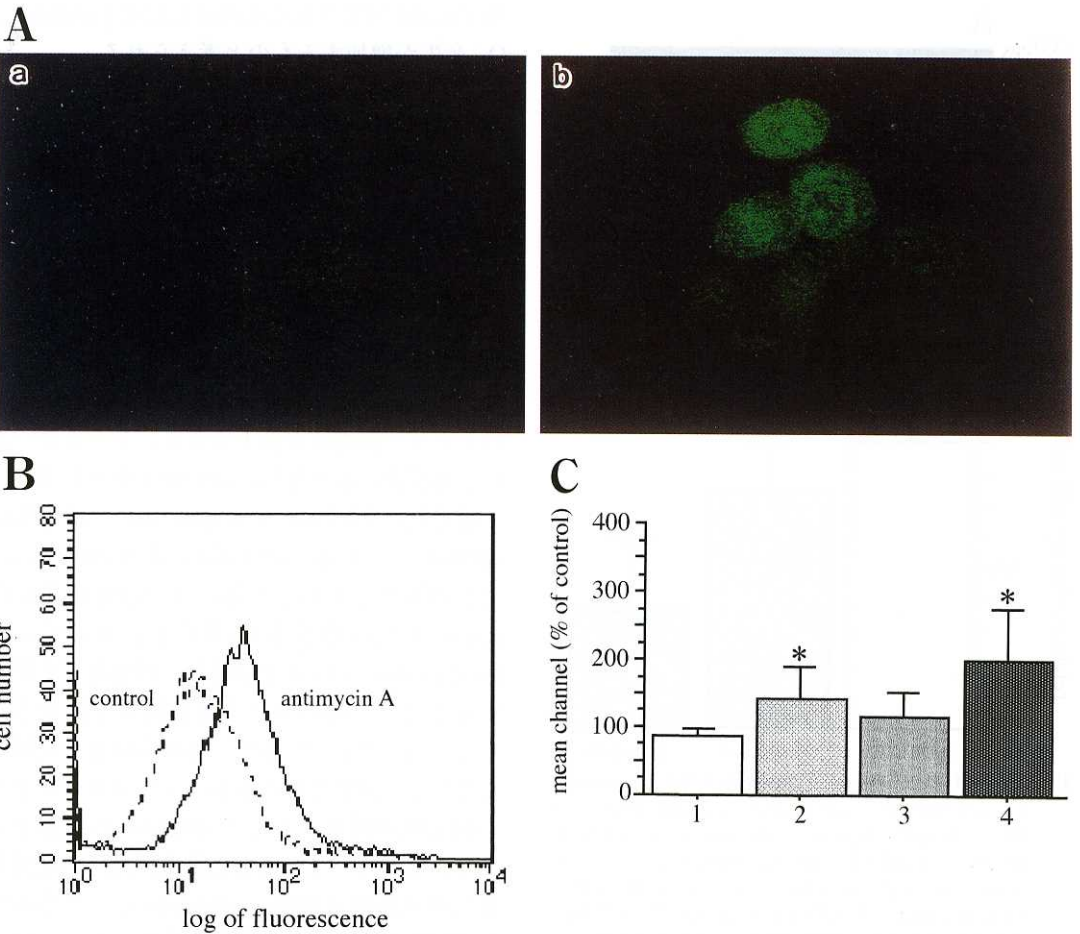
以上の結果を総合すると, 活性酸素により生じる mtDNA 酸化的修飾と mtDNA 遺伝子発現異常に基づき, ミトコンドリア呼吸鎖機能が低下し, ミトコンドリアにおける活性酸素産生がさらに増加するという, vicious cycle が形成されることが示唆される。

近年, ミトコンドリアは apoptosis の誘導過程にもミトコンドリア膜電位の変化を介して関与していることが明らかになっている<sup>35)</sup>。ミトコンドリア膜電位が低下すると, シトクローム C が細胞質に放出され, caspase 9 や 3 を活性化し最終的に inhibitor of caspase activated DNase (ICAD) から遊離した CAD により apoptosis による細胞死が実行される。また活性化された caspase 3 は細胞接着に深くかかわっている focal adhesion kinase を分解し, 細胞接着を阻害することで apoptosis による細胞死を促進させることも示されている<sup>36)</sup>。培養糸球体上皮細胞を用いて, 過酸化水素添加によるミトコンドリア膜電位の低下, さらに apoptosis の誘導を認めた。我々は, これまでに糸球体硬化の進展過程に糸球体構成細胞の apoptosis による持続的な細胞死が関与していることを明らかにしている<sup>37), 38)</sup>。ミトコンドリアへの酸化ストレスの亢進は, ミトコンドリア膜電位低下を介して apoptosis を惹起することで, 糖尿病性腎症の進展に関与していることが示唆された。

本研究で得られた知見は, 糖尿病性腎症の進展メカニズムに新たな洞察を与えるものであり, 同時に, 末期腎不全第一位の原因疾患であり難治性疾患である糖尿病性腎症に対する治療戦略を構築する上でも示唆に富むものである。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 直接の御指導, 御検閲を賜りました川崎医科大学内科学(腎)教室 柏原直樹教授に深甚なる謝意を表わすとともに, 実験について御助言, 御協力いただいた同 佐々木環助教授ならびに



**Fig. 11.** Confocal and flow cytometry analyses of ROS production in rat glomerular epithelial cells (GECs) induced by mitochondrial respiratory chain inhibitors with DCFH-DA. A. Control (a) and antimycin A (b). GECs were pretreated for 3-h with antimycin A. DCFH-DA was added to the culture medium. After 40-min incubation, the GECs were examined under blue illumination by confocal microscopy. In the GECs preincubated with antimycin A, a strong green fluorescent color was observed (b). Original magnification x1000. B. C. Typical histograms of ROS production, and the mean channels with flow cytometry. GECs were pretreated for 3-h with mitochondrial respiratory chain inhibitors (1 : control, 2 : rotenone, 3 : thenoyltrifluoroacetone, 4 : antimycin A). DCFH-DA was added to the culture medium. After 40-min incubation, the GECs were collected and analyzed with flow cytometry. Rotenone and antimycin A, which inhibit complexes I and III, respectively, increase ROS production. Values are means  $\pm$  SD (n=4). Significance values (\* $p$ < 0.05) are determined vs. control.

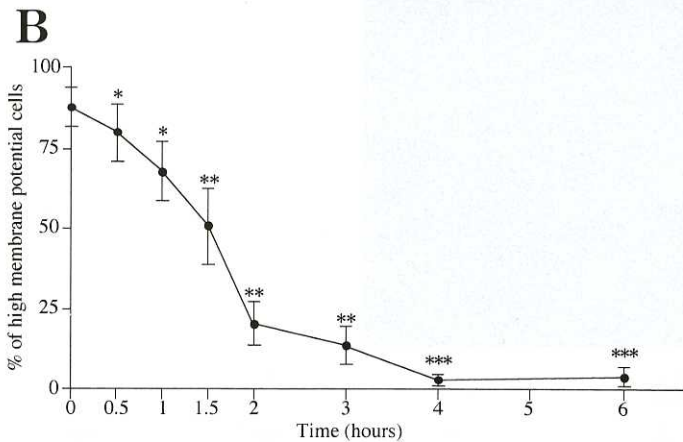
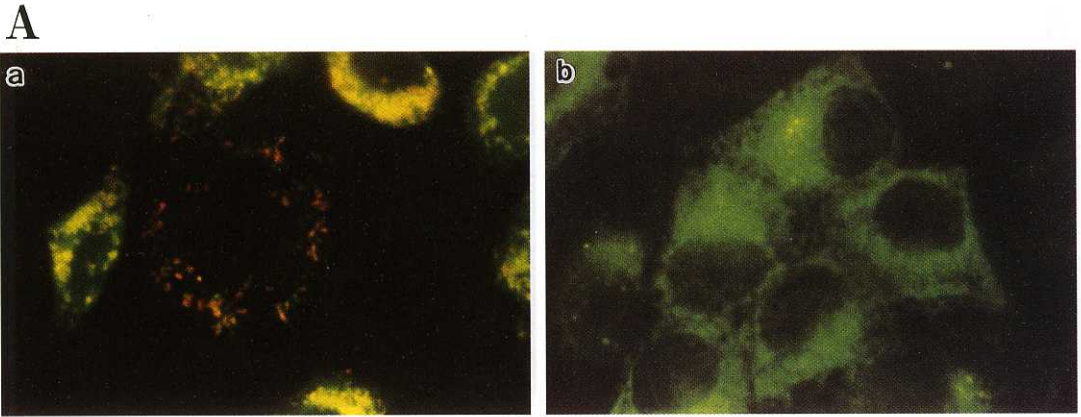
同教室員の皆様方に厚くお礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第33回アメリカ腎臓学会(2000年, トロント)において発表(口演)した。

本研究の一部は文部省科学研究費(No. 11671062)の援助で行った。

### 文 献

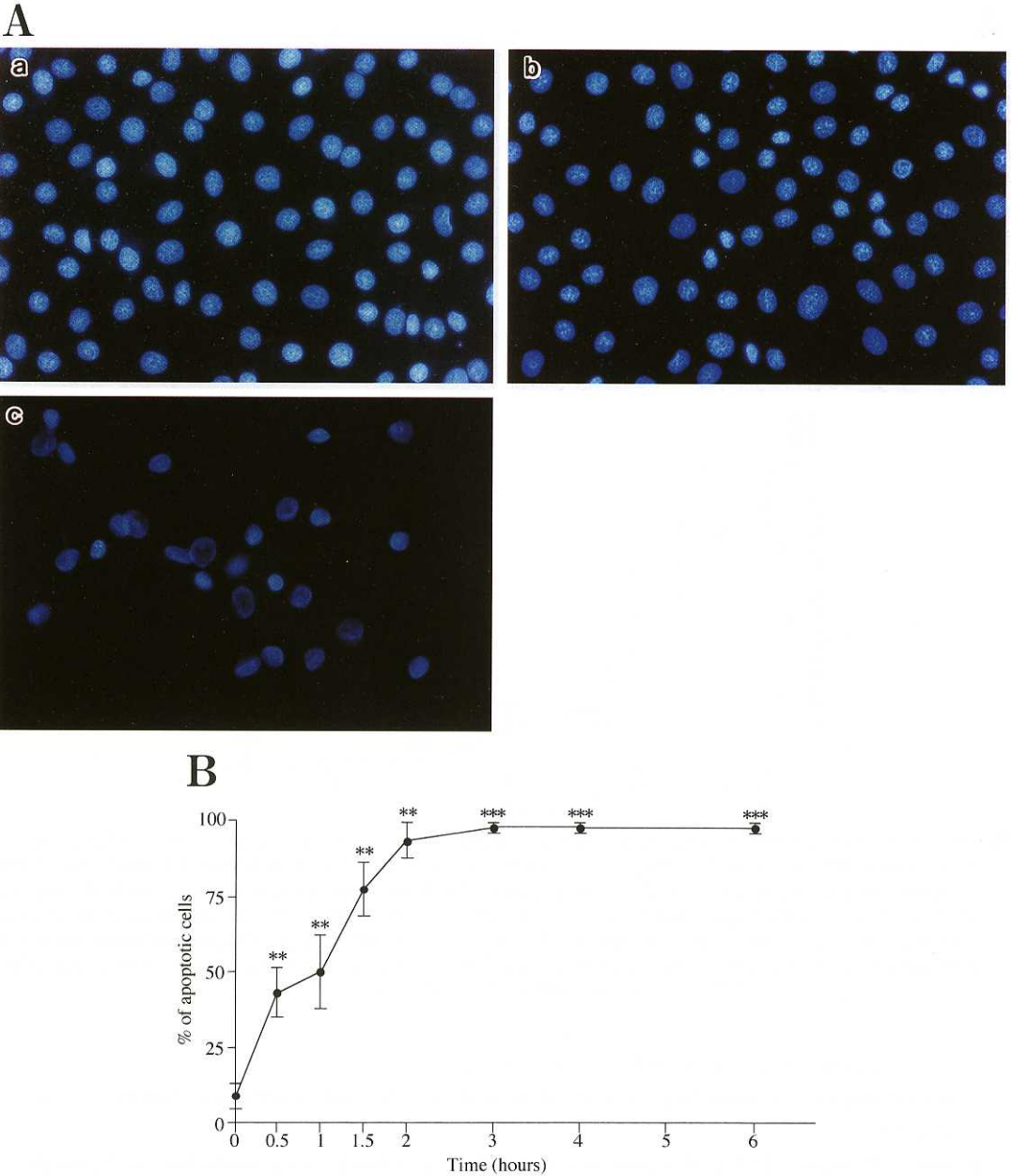
- 1) Brownlee M, Cerami A, Vlassara H : Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. N Engl J Med 318 : 1315 - 1321, 1988
- 2) Greene DA, Lattimer SA, Sima AA : Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis



**Fig. 12.**  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced changes in mitochondrial membrane potential of GECs. A. Fluorescent micrographs of Control (a) and GECs were treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 2 hours (b). Note the loss of yellow-orange mitochondrial staining, representing membrane potential-sensitive dye aggregates that accumulate at high membrane potential, in treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  compared with the control. Original magnification  $\times 1000$  (a, b). B. Time course of the decline in mitochondrial membrane potential of GECs detected by membrane potential-sensitive dye. The rate of decline in the mitochondrial membrane potential of GECs had already increased at 30 minutes after the addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Values are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Significance values (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.0005$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ) are determined vs. control.

of diabetic complications. *N Engl J Med* 316 : 599–606, 1987

- 3) Koya D, King GL : Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47 : 859–866, 1998
- 4) Baynes JW, Thorpe SR : Role of oxidative stress in diabetic complications : a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48 : 1–9, 1999
- 5) Kashihara N, Watanabe Y, Makino H, Wallner EI, Kanwar YS : Selective decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans under the influence of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 6309–6313, 1992
- 6) Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, Yamasaki Y, Ota Z : Reactive oxygen species induce apoptosis in cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 7 : 2357–2363, 1996
- 7) Nath KA, Croatt AJ, Hostetter TH : Oxygen consumption and oxidant stress in surviving nephrons. *Am J Physiol* 258 : F1354–1362, 1990
- 8) Hahn S, Kummerle NB, Chan W, Hisano S, Saborio P, Krieg RJ Jr, Chan JC : Glomerulosclerosis in the remnant kidney rat is modulated by dietary alpha-tocopherol. *J Am Soc Nephrol* 9 : 2089–2095, 1998



**Fig. 13.**  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced apoptosis in rat glomerular epithelial cells. A. Fluorescent micrographs. GECs were treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 0 (a), 1 (b) or 2 hours (c). Original magnification  $\times 400$  (a~c). B. Time course of apoptosis detected by nuclear DNA staining. The rate of apoptosis had already increased at 30 minutes after the addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Values are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Significance values ( $*p < 0.0005$ ,  $**p < 0.0001$ ) are determined vs. control.

- 9) Miyake Y, Yamamoto K, Tsujihara N, Osawa T : Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids* 33 : 689-695, 1998
- 10) Bulucu F, Vural A, Aydin A, Sayal A : Oxidative stress status in adults with nephrotic syndrome. *Clin Nephrol* 53 : 169-173, 2000
- 11) Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, Nishiyama Y, Yoshida A, Uchida K, Hiai H, Ochi H, Osawa T : Quantitative

- immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1 : its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest* 76 : 365-374, 1997
- 12) Fung H, Kow YW, Van Houten B, Mossman BT : Patterns of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA and indications of oxidative stress in rat and human pleural mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos. *Carcinogenesis* 18 : 825-832, 1997
  - 13) Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T : Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 347 : 444-445, 1996
  - 14) Leinonen J, Lehtimäki T, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Ochi H, Laippala P, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Alho H : New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 417 : 150-152, 1997
  - 15) Turrens JF, Boveris A : Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191 : 421-427, 1980
  - 16) Wei Y, Scholes CP, King TE : Ubisemiquinone radicals from the cytochrome b-c1 complex of the mitochondrial electron transport chain--demonstration of QP-S radical formation. *Biochem Biophys Res Commun* 99 : 1411-1419, 1981
  - 17) Konstantinov AA, Peskin AV, Popova EYU, Khomutov GB, Ruuge EK : Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 894 : 1-10, 1987
  - 18) Cino M, Del Maestro RF : Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria : the effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia. *Arch Biochem Biophys* 269 : 623-638, 1989
  - 19) Hinokio Y, Suzuki S, Hirai M, Chiba M, Hirai A, Toyota T : Oxidative DNA damage in diabetes mellitus : its association with diabetic complications. *Diabetologia* 42 : 995-998, 1999
  - 20) Hayakawa M, Hattori K, Sugiyama S, Ozawa T : Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 189 : 979-985, 1992
  - 21) Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP : Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349 : 431-434, 1991
  - 22) Suzuki S, Hinokio Y, Komatu K, Ohtomo M, Onoda M, Hirai S, Hirai M, Hirai A, Chiba M, Kasuga S, Akai H, Toyota T : Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 45 : 161-168, 1999
  - 23) Ueda S, Nakamura H, Masutani H, Sasada T, Yonehara S, Takabayashi A, Yamaoka Y, Yodoi J : Redox regulation of caspase-3 (-like) protease activity : regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c. *J Immunol* 161 : 6689-6695, 1998
  - 24) Bialik S, Cryns VL, Drincic A, Miyata S, Wollowick AL, Srinivasan A, Kitsis RN : The mitochondrial apoptotic pathway is activated by serum and glucose deprivation in cardiac myocytes. *Circ Res* 85 : 403-414, 1999
  - 25) Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ : Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75 : 241-251, 1993
  - 26) Quillet-Mary A, Jaffrezou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J, Laurent G : Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272 : 21388-21395, 1997
  - 27) Aoyagi K, Akiyama K, Tomida C, Gotoh M, Hirayama A, Takemura K, Ueda A, Nagase S, Koyama A, Narita M : Imaging of hydroperoxides in a rat glomerulus stimulated by puromycin aminonucleoside. *Kidney Int Suppl* 71 : S153-155, 1999
  - 28) Yakes FM, Van Houten B : Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 514-519, 1997
  - 29) Ballinger SW, Van Houten B, Jin GF, Conklin CA, Godley BF : Hydrogen peroxide causes significant mitochondrial DNA damage in human RPE cells. *Exp Eye Res* 68 : 765-772, 1999
  - 30) Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, Yakes FM, Van Houten B, Ballinger CA,

- Freeman BA, Runge MS : Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res* 86 : 960-966, 2000
- 31) Ehlers RA, Hernandez A, Bloemendal LS, Ethridge RT, Farrow B, Evers BM : Mitochondrial DNA damage and altered membrane potential ( $\Delta\Psi$ ) in pancreatic acinar cells induced by reactive oxygen species. *Surgery* 126 : 148-155, 1999
- 32) Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 : 156-159, 1987
- 33) Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M : Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404 : 787-790, 2000
- 34) Williams MD, Van Remmen H, Conrad CC, Huang TT, Epstein CJ, Richardson A : Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J Biol Chem* 273 : 28510-28515, 1998
- 35) 柏原直樹 : アポトーシス-進行性腎障害における意義-医学のあゆみ 193 : 26-31, 2000
- 36) Levkau B, Herren B, Koyama H, Ross R, Raines EW : Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp 125 FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 187 : 579-586, 1998
- 37) Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, Yamasaki Y, Ota Z : Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int* 49 : 103-111, 1996
- 38) Kashihara N, Sugiyama H, Makino H : Mechanisms for induction of apoptosis and glomerular disease. *Nephrol Dial Transplant* 14 : 52-54, 1999