

Bilirubin and biliverdin protect rodents against diabetic nephropathy by downregulating NAD(P)H oxidase

藤井, 雅一
Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

<https://doi.org/10.15017/24683>

出版情報 : 九州大学, 2011, 博士 (医学), 論文博士
バージョン :
権利関係 : (C) 2010 International Society of Nephrology

和文レポート

ビリルビンおよびビリベルジンは NAD(P)H オキシダーゼを制御することにより
齧歯類における糖尿病性腎症に対して保護効果を示す

藤井雅一

要約

我々は先天的に高ビリルビン血症を示すジルベール症候群を併発した糖尿病患者において、腎疾患を含む糖尿病血管合併症の頻度が著しく低いことを見出し、これは糖尿病性腎症においてビリルビンが有益な効果を示すことを示唆しているものと考えられた。このことを直接的に検証するために、我々は遺伝的に高ビリルビン血症を示す Gunn j/j ラットとビリルビンの前駆体であるビリベルジンを投与した糖尿病 db/db マウスが腎症の進展に対し抵抗性があるか否かを検討した。相方の齧歯類モデル動物は TGF- β 1 とフィブロネクチンの発現正常化と共にメサンギウム領域の拡大に対して完全な保護効果が認められ、アルブミン尿の減少が確認された。同時に尿中と腎組織における酸化ストレスマーカーの正常化、および NAD(P)H オキシダーゼ構成蛋白の発現正常化が認められた。培養血管内皮細胞とヒトメサンギウム細胞においてビリルビンとビリベルジンは著明に NAD(P)H 依存性のスーパーオキシド産生を阻害し、そして高血糖およびアンギオテンシン 2 誘導の活性酸素種産生を阻害していた。総合的に我々の発見はビリルビンとビリベルジンが糖尿病性腎症に対する保護効果を示し、新たな抗酸化治療へ導かれるであろうことを示唆するものである。

諸言

世界的規模で糖尿病性腎症は末期腎不全の主要因となっている。最近の疫学的調査は糖尿病性腎症が心血管系イベントリスクの上昇とも関連があることを明らかにしている。要因となるメカニズムをターゲットにした治療方法を確立することは早急に必要とされている。近年、酸化ストレスが糖尿病性腎症を含めた糖尿病血管合併症の進展に重要な病原因子であるとみなされてきている(1-4)。これまでに累積したエビデンスにより、多くの酸化ストレスマーカーとなる、蛋白・脂質・DNA が糖尿病動物および患者の腎臓や血管組織において上昇していることが示されてきた(3-5)。しかしながら、様々な既知の抗酸化薬を用いたヒトでのトライアルでは、糖尿病性腎症に対する保護作用が示されることはなかった。ビリルビンは長年内因性抗酸化物質であると認識されてきた(6)。その構成はヘム異化を含

む律速酵素であり普遍的に発現したヘムオキシゲナーゼによって介在される。ヘムオキシゲナーゼはヘムの分解に関与し、ビリベルジン、第一鉄、一酸化炭素を産生する。その後ビリベルジンは速やかにビリベルジン還元酵素によってビリルビンへ変換される。最近、増加してきたエビデンスでは、ヘムオキシゲナーゼとその反応生成物であるビリルビンは、酸化ストレス障害に対する細胞保護作用を伴う内因性物質の役割を果たすであろうことを示唆している(7-9)。ビリルビンの抗酸化作用は非常に効率のよいラジカルスクランベージ作用によるものである(6)。一方、最近の報告では疎水性テトラピロール構造が NAD(P)H オキシダーゼの活性を阻害している可能性があることを示している(10,11)。特に、我々と他の研究者は NAD(P)H オキシダーゼの活性化が、糖尿病腎・血管組織における酸化ストレス上昇の主要因であろうことを示してきた(12-15)。このように我々は、ビリルビンには糖尿病性腎症において有効な薬効があるであろうと仮説をたてた。これに関連して我々は最近先天的に高ビリルビン血症を呈するジルベール症候群を伴った糖尿病患者において、腎症と他の血管合併症の罹患が有意に低値を示し、同様に酸化ストレスマーカーと炎症マーカーも低下していたことを報告した(16)。しかし、この関連研究は必ずしもビリルビンが、認められた糖尿病性腎症の低い罹患率の原因要素であるとは言いきれていない。そこで、この仮説を検証し基本的な分子メカニズムを調査するために我々は、<1>遺伝的に高ビリルビン血症を呈する Gunn ラットが糖尿病発症後の腎症進展に対して抵抗性があるか否か、<2>ビリルビンの前駆体であるビリベルジン投与が、げっ歯類の 2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウスにおける糖尿病性腎症に対して保護的であるか否か、についての検討を行った。基本的分子メカニズムについてはこれらの実験動物モデルと in vitro でも検討を行った。

結果

高ビリルビン血症 Gunn ラット

糖尿病発症後0, 8, 24週齢の実験的ラットの特質はTable1に記している。4週齢以降の Gunn j/j ラットおよびGunn j/+ラットの総ビリルビンレベルは一定の状態となる。糖尿病

発症8週目の総ビリルビン値は糖尿病および非糖尿病のGunn j/+ラットではそれぞれ0.15±0.02 mg/dlと0.18±0.04 mg/dlであった。一方、糖尿病および非糖尿病のGunn j/jラットはそれぞれ7.01±0.43 と 9.47±0.04 mg/dlであった(Table 1)。このようなGunn j/jラットにおける著しい血清ビリルビン値の上昇は、間接ビリルビンの上昇を反映したものである。

糖尿病発症後8(P<0.01)および、24(P<0.001)週間後の糖尿病Gunn j/+ラットは非糖尿病Gunn j/+ラットに比較すると尿中アルブミン排泄量は著しく増加していた。一方8(P<0.05), 24(P<0.001)週目の糖尿病Gunn j/jラットは糖尿病Gunn j/+ラットに比較すると、著明に低い尿中アルブミン排泄量であった(Figure 1)。

これら高ビリルビン血症の有効な薬効の基本的なメカニズムを調査するために、我々は全身的酸化ストレスマーカーである8-hydroxy-20-deoxyguanosine(8-OHdG)および8-epi-prostaglandin F2 α (8-epiPG F2 α)の尿中排泄量を測定した。尿中8-OHdGおよび尿中8-epiPG F2 α は8週目において非糖尿病Gunn j/+ラットよりも糖尿病Gunn j/+にて有意な上昇が認められた(Figure 2 a and b)。8週目における糖尿病により誘導された双方の酸化ストレスマーカーは糖尿病・高ビリルビン血症Gunn j/jラットにおいて完全に抑制されており、そのレベルは非糖尿病Gunn j/+ラットに相当するものであった。

24週目の腎糸球体および尿細管における8OHdG免疫染色では糖尿病Gunnj/+ラットの染色強度が非糖尿病Gunn j/+ラットよりも有意に強かった(Figure 2 c-f)。これらの糸球体と尿細管における8OHdG染色強度の増加は糖尿病Gunn j/jラットにおいて完全に抑制されており、そのレベルは非糖尿病Gunn j/+ラットに相当するものであった。

さらに我々は腎組織におけるNAD(P)Hオキシダーゼコンポーネント発現の検討を行った。NOX4の発現と限局性を調べるために免疫染色を行った。腎糸球体および尿細管におけるNOX4蛋白の染色強度は、非糖尿病Gunn j/+ラットに比較して糖尿病Gunn j/+ラットではその強度はより強いものであった(Figure 3 a and b)。NOX4蛋白発現は、ウェスタンブロットにおいて非糖尿病Gunn j/+ラットに比較して糖尿病Gunn j/+ラットの腎組織では有意に発現上昇していた(P<0.001 ; Figure 3 c)。これらの全ての変化は糖尿病Gunn j/jラ

ットにおいて非糖尿病Gunn j/+ラットレベルと同等に、完全に抑制されていた。

Real-time PCRではNOX4および他のコンポーネントであるp22phox, p47phoxのmRNAレベルでの発現は非糖尿病Gunn j/+ラットに比較して糖尿病Gunn j/+ラットの腎組織では有意に上昇していた(Figure 3 d-f)。これらの全ての変化は糖尿病Gunn j/j ラットにおいて非糖尿病Gunn j/+ラットレベルと同等に、完全に抑制されていた。

我々は糖尿病発症24週間後におけるメサンギウム領域の拡大に対する高ビリルビン血症の影響を検討した。糖尿病Gunn j/+ラットの糸球体構造は非糖尿病Gunn j/+ラットと比較してメサンギウム領域の拡大が促進されていた(Figure 4 a)。PAS(periodic acid-Schiff)染色陽性・非核メサンギウム領域は著明に糖尿病Gunn j/+ラット糸球体にて増加していた($p < 0.001$; Figure 4 b)。糖尿病Gunn j/j ラットでは完全にメサンギウム領域の拡大が抑制されていた。

我々はTGF- β 1とフィブロネクチン発現レベルに対する高ビリルビン血症の影響も調べた。TGF- β 1とフィブロネクチンmRNAおよび蛋白発現レベルは、非糖尿病Gunn j/+ラットに比較して糖尿病Gunn j/+ラットの腎組織では有意に上昇していた(Figure 4 c-f)。糖尿病Gunn j/j ラットでは上昇するTGF- β 1とフィブロネクチンは有意に抑制されていた。

db/dbマウスへのビリベルジン投与の検討

次に、我々はdb/dbマウスにおける、尿中アルブミン排泄、酸化ストレス、腎メサンギウム領域拡大に対するマウスへのビリベルジン投与が及ぼす影響について検討した。

2および12週間のビリベルジン経口投与(5mg/Kg)は体重・血糖値に有意な影響を及ぼさなかった(Table 2)。この経口でのビリベルジン投与量では有意に血清ビリルビン値を上昇させることはなかった。しかしながら同量での腹腔内投与を行った場合、血清ビリルビン値は投与30分後で若干の上昇を示し、6時間後には元のレベルへと速やかに戻った(data not shown)。

尿中アルブミン排泄量はビリベルジン投与開始2および12週間後のコントロールdb/+マウスに比較して、未治療db/dbマウスでは有意な上昇を認めた(Figure 5)。ビリベルジン投

与によってdb/dbマウスにおいて上昇していた尿中アルブミン排泄量は有意に低下していた。

双方の酸化ストレスマーカーは（8OHdG, 8-epiPG F_{2α}の尿中排泄量および免疫染色における8OHdG 腎組織含量）コントロールdb/+マウスに比較して、未治療db/dbマウスでは有意な上昇を認めた。ビリベルジンを投与することによりこれらの酸化ストレスマーカーはコントロールレベルにまで完全に正常化した(Figure 6 a-f)。我々はビリベルジンによる腎組織の細胞内スーパーオキシド産生に対する影響を、ジヒドロエチジウム(DHE)染色によって確認した。酸化されたDHEのシグナルは12週齢のコントロールマウスに比較して、db/dbマウスでは有意に高値を認めた(Figure 6 g-j)。ビリベルジン投与によって酸化DHEのシグナルはコントロールレベルへ完全に正常化した。そして我々は以前の記述のように(17)、ルシゲニン化学発光を用いることでNADPHオキシダーゼ活性を評価した。ビリベルジン投与により糖尿病で誘導された腎皮質NADPHオキシダーゼの活性化はコントロールレベルにまで著明に抑制された(Figure 6 k)。

さらに、NOX4蛋白発現レベルを調べるために免疫染色およびウェスタンブロットを行った。db/dbマウスの腎組織では著明にNOX4蛋白発現レベルは上昇していた。ビリベルジン投与によりdb/dbマウスにおける全てのこれらの変化は完全にコントロールレベルへと正常化した(Figure 7 a-c)。

NOX4と他のコンポーネントであるp22phox / p47phoxのmRNA発現レベルはコントロールdb/+マウスに比較して、db/dbマウスでは有意な上昇を認めた(P<0.05; P<0.05; P<0.05; Figure 7 d-f)。同様に、腎糸球体におけるNADPHオキシダーゼコンポーネントのmRNA発現はコントロールマウスに比較して、db/dbマウスでは有意な上昇を認めた(P<0.01; P<0.01; P<0.01; Figure 7 g-i)。これらの異常所見はビリベルジン投与によって完全に正常化した。我々はこれらの全てのグループ間でヘムオキシゲナーゼ-1のmRNAレベルを評価したが、著明な変化は見られなかった。

24週齢のdb/dbマウス腎組織において、TGF-β1(Figure 8 c and e)とフィブロネクチン(Figure 8d and f)のmRNA/蛋白 レベル双方の発現上昇を伴って、メサンギウム領域の拡

大が認められた ($P < 0.001$; Figure 8 a and b)。また、糸球体におけるmRNA発現についても同様な結果であった(Figure 8 g and h)。これらの異常所見はビリベルジン投与によって完全に抑制された。

in vitro におけるNAD(P)Hオキシダーゼ活性へのビリベルジンおよびビリルビンの影響

培養ヒトメサンギウム細胞におけるNAD(P)Hオキシダーゼ活性へのビリルビンおよびビリベルジンの影響はルシゲニン法によって評価された。48時間のビリベルジンおよびビリルビンの前処置によって、容量依存的にNAD(P)H活性は低下した(Figure 9 a and b)。さらに細胞内の酸化ストレスに関して、以前の記述通り2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)染色法を用いて評価した(18)。DCFDAはアンギオテンシン2(100nM)4時間、および高血糖(450mg/dl) 24時間負荷されたメサンギウム細胞において、コントロールレベルよりも細胞内酸化ストレスが上昇していた(Figure 9 c and d)。これらの細胞内酸化ストレスの上昇はビリルビンを1時間添加することによって、完全にコントロールレベルへと正常化した。

最後に培養ヒトメサンギウム細胞におけるNOX4 / TGF- β 1 / フィブロネクチン 発現へのビリベルジンおよびビリルビンの影響について検討した。アンギオテンシン2は時間依存性にNOX4 mRNA発現を上昇させた(Figure 10 a)。ビリルビンおよびビリベルジンは完全にNOX4 mRNA発現上昇を抑制したが、Nアセチルシステインと α リポ酸は最高濃度であっても発現抑制を示さなかった。NOX4蛋白発現についても同様にビリルビンおよびビリベルジンによって抑制されていた(Figure 10 b)。アンギオテンシン2により誘導されたTGF- β 1およびフィブロネクチン mRNA発現の上昇はNアセチルシステインと α リポ酸添加での抑制は認められなかったが、ビリルビンおよびビリベルジン添加では完全にmRNA発現が抑制されていた(Figure 10 c and d)。

考察

この研究では糖尿病性腎症におけるビリルビンの保護効果を明らかにするために、我々は最初にストレプトゾトシンによる糖尿病誘発ホモ接合体Gunnラットを用いた。このGunnラットはウリジン ジホスフェート グルクロノシル トランスフェラーゼ -1 (uridine diphosphate glucuronosyl transferase-1) の遺伝的欠損により間接ビリルビンの上昇を示す。この研究では高ビリルビン血症を呈する糖尿病Gunn j/jラットは正常ビリルビン糖尿病Gunn j/+ラットに比較して、有意に尿中アルブミン排泄量が低下していた。さらに糖尿病Gunn j/jラットは糖尿病発症後6カ月の時点で最も特徴的な糖尿病性腎症の形態的変化であるメサンギウム領域の拡大が認められなかったが、糖尿病Gunn j/+ラットでは典型的なメサンギウム領域拡大が認められていた。TGF- β は糖尿病における細胞外基質の集積と糸球体の拡大に関与する重要なサイトカインである(19)。我々は糖尿病Gunn j/+ラットにおいて、TGF- β と主要な基質蛋白であるフィブロネクチン発現が上昇するが、その変化は糖尿病Gunn j/jラットにて抑制されていたことも確認した。これらの所見は、Gunn j/jラットが糖尿病を発症した後に、糖尿病性腎症の機能的および形態的特徴へ進展するのに対して抵抗性をもちあわせていることを示唆している。次に我々はビリルビンの前駆体であるビリベルジンの投与による影響を齧歯類の2型糖尿病モデルであるdb/dbマウスを用いて評価した。ビリベルジンはビリルビンよりも比較的に水溶性を示すため、我々はビリルビンの代わりに経口的に5mg/Kgで投与した。この投与量での経口投与による血清ビリルビン値に有意な上昇は認められなかった。それでも、この研究では5mg/Kgのビリベルジン経口投与により、db/dbマウスにおけるアルブミン尿およびメサンギウム領域拡大に対する保護作用を示した。血清中のビリベルジンは速やかに細胞内へ入り、ビリベルジン還元酵素によって、ビリルビンへ変換される(20)。ビリベルジン投与によるその有益な効果は、外因性に投与されたビリベルジンから産生されるビリルビンにより、血清でのビリルビンおよびビリベルジン濃度が上昇するよりも、細胞内にてそれぞれのレベルが上昇するからであると考えられる。

この研究ではさらに全身的な酸化ストレスマーカー(尿中8OHdG排泄および尿中

8-epi-PGF2 α 排泄)・8OHdG免疫染色・(比較的腎組織での活性酸素に対して鋭敏な) DHEの酸化レベル等で評価することによって、注目すべきこれらの高ビリルビン血症およびビリベルジン投与による有益な効果のメカニズムは、酸化ストレスの抑制によるものであらうことが示唆された。ビリルビンはラジカル捕捉活性を有していることが認められており(6)、酸化ストレスの抑制は少なくとも部分的にラジカル捕捉活性によるものである可能性がある。特に糖尿病Gunn j/j ラットにおいては若干であるが、有意差をもって血清ビリルビン値が非糖尿病Gunn j/j ラットよりも低値となっている。このような糖尿病から誘導された血清ビリルビン値の低下は、ラジカル捕捉活性によってビリルビンが消費されたことに反映したものかもしれないが、この仮説を今後さらに明らかにしていかなければならない。

しかしながらさらに重要なことに、我々はビリベルジン投与が糖尿病腎組織、糸球体そしてヒトメサンギウム細胞において、NAD(P)Hオキシダーゼ構成蛋白(NOX4 / p22phox / p47phox)発現を低下させたことを初めて明らかにした。糖尿病において活性酸素種(ROS)の産生過多の源泉は正確には定義されていないが、我々と他の研究者らは非貪食細胞系のNAD(P)Hオキシダーゼが糖尿病動物および糖尿病患者の血管組織においてROS産生亢進の源泉であらうこと示してきた(12, 13, 15)。非貪食細胞系のNAD(P)Hオキシダーゼは、NOXファミリー蛋白(gp91phox, NOX1, NOX4)・p22phox・細胞質構成蛋白であるp47phox, p67phox, Rac or Rac2(21)により構成されている膜関連性シトクロームb558から成り立っている。NOX4アイソフォームは高発現しているのが発見された腎組織からクローニングされた(22, 23)。腎においてNOX4は主要なROS産生の源泉として、病理的状态の下で役割を果たしていることが示唆されてきた。我々は以前、STZ糖尿病誘発ラット腎でのROS産生の亢進は、NOX4発現の亢進がその重要な役割を果たしていることを報告した(24-26)。Gorinらは糖尿病腎におけるNOX4発現の上昇を明らかにし、さらにアンチセンス オリゴヌクレオチドによるNOX4ダウンレギュレーションにて完全にSTZ糖尿病誘発ラットの腎臓における酸化ストレスが減衰したことを明らかにした。総合的にこの論文における結果は、高ビリルビン血症およびビリベルジン投与によりNAD(P)Hオキシダーゼ構成蛋白(特

にNOX4) 発現を抑制することが、糖尿病齧歯類の腎臓における酸化ストレスを抑制するのに重要な役割を果たしているであろうことを示唆している。また、我々は高ビリルビン血症およびビリベルジンのNAD(P)Hオキシダーゼ活性抑制効果をルシゲニン化学発光を用いて確認した。

血管組織における非貪食系細胞NAD(P)Hオキシダーゼの迅速な活性シグナル機構は十分に確立されている。生理的制御因子で最も重要なもののひとつがアンギオテンシン2である(28)。アンギオテンシン2は迅速にホスホライペースCを活性化し細胞内カルシウム濃度およびジアシルグリセロール濃度を上昇させることでプロテインカイネースCの活性化を引き起こしている。活性化したプロテインカイネースCはp47phoxをリン酸化し、NOX構成蛋白からの活性酸素のリリースを誘導する。我々と他の研究者らは、高血糖においてもプロテインカイネースC依存性のNAD(P)Hオキシダーゼ活性化による血管内皮細胞および血管平滑筋細胞からの活性酸素産生を刺激することを報告してきた(12-15)。糖尿病状態において、高血糖および局所レニン-アンギオテンシン系の活性は、糖尿病患者および動物の腎・血管組織における迅速なNAD(P)Hオキシダーゼ活性を誘導するであろう(29,30)。これまでの報告ではビリルビンの疎水性のテトラパイロール構造がcell free systemにおいて直接的にNAD(P)Hオキシダーゼ活性を抑制できることを証明している(10)。おそらく制御成分とNOXファミリーとの相互作用を抑制することによるものと考えられる。この研究で我々は、培養ヒトメサンギウム細胞におけるNAD(P)Hオキシダーゼ活性と、高血糖およびアンギオテンシン2誘導の活性酸素産生をビリルビン・ビリベルジンが抑制することを示した。ビリルビン・ビリベルジンのNAD(P)Hオキシダーゼ構成蛋白発現の抑制効果も同様に証明した。これら全ての知見はビリルビンとビリベルジンによるNAD(P)Hオキシダーゼ活性化と発現亢進の双方の阻害作用から、糖尿病腎での酸化ストレスを阻害しているであろうことを示唆している。さらにこの研究では、培養メサンギウム細胞において、最大濃度のNアセチルシステインと α リポ酸等他の抗酸化剤に比較して、よりビリルビンとビリベルジンはアンギオテンシン2誘導のNAD(P)Hオキシダーゼ・TGF- β 1・フィブロネクチン発現亢進予防に効果があったことを明らかにした。詳細なビリルビンとビリベルジンの有益

な効果の分子メカニズムは今後の研究で解明されるであろう。

高ビリルビン値を示す群は心血管系疾患および脳卒中の罹患率が低いというエビデンスが証明されている(31-33)。最近我々はジルベール症候群を併発した糖尿病患者における腎症および心血管系疾患の罹患率が著明に低値であったことを証明した(16)。ある報告では2型糖尿病患者における血清ビリルビン値と微量アルブミン尿との関連性を証明している(34)。これらの疫学的な知見である血清ビリルビンレベルと糖尿病性腎症の有病率の関係は、この我々の研究知見である高ビリルビン血症とビリベルジン投与が糖尿病性腎症に対して保護的であるという関係と一致するものである。

結論として、我々は高ビリルビン血症とビリベルジン投与は糖尿病動物モデルにおいて、酸化ストレス抑制（少なくとも腎NAD(P)Hオキシダーゼをダウンレギュレートすること）により糖尿病性腎症に対して保護作用があることを初めて証明した。この発見は早期糖尿病性腎症への新たな抗酸化治療へと導かれるであろう。

方法

動物

雄のホモ接合体Gunn j/jラットと週齢数の一致したヘテロ接合体Gunn j/+ラットはClea Japan, Tokyo, Japanから購入した。8週齢においてGunn j/jラットの半数(n=10)とGunn j/+ラットの半数(n=10)にそれぞれストレプトゾトシン(Sigma, St Louis, MO, USA)を80mg/Kg腹腔内投与した。投与1または2日後に高血糖が認められ糖尿病への進展が証明された(血清グルコースレベル>16.7 mmol)。雄のC57BL/KsJ db/dbマウスと週齢の一致したlean littermates db/+マウスはClea Japan, Tokyo, Japanから購入した。全てのマウスは九州大学動物センターSPFにて育てられた。飲水と通常の餌(Clea Japan)へのアクセスは自由であった。12週齢でdb/dbの半数(n=8)とdb/+の半数(n=8)を無作為に選び、ビリベルジン(5mg/Kg; Frontier Scientific, Logan, UT, USA)混餌群とした。もう半数は非混餌群として、2および12週間それぞれの餌を摂取させた。粉末にした餌は4°Cおよび遮光の状態での保存した。全てのプロトコールは九州大学動物実験委員会により審査・承認を得た。

ヒトメサンギウム細胞培養

正常ヒトメサンギウム細胞はLonza(Walkersville, MD, USA)から購入し、5%ウシ胎仔血清 / 50mg/mlゲンタマイシン / 50 μ g/ml アンホテリシンBを含んでいるBulletKitを用いて、加湿 / 5%CO₂ / 37°Cの条件で培養した。全ての検討はパッセージ4で行った。さらなる詳細はオンラインサプリメントに記す。

血液および尿の解析

総ビリルビンと直接ビリルビンの血清濃度が測定され、尿中微量アルブミンおよび尿中酸化ストレスマーカーを解析するために、代謝ケージを用いて24時間蓄尿の検体が採取された。よく攪拌した尿検体は7500g 5分間遠心を行い、解析時まで-80°Cにて保管された。これらの解析に関連する詳細はオンラインサプリメントに記す。

免疫染色化学

腎組織における8OHdGとNOX4の免疫染色は以前の記述の通りに行われた。方法はオンライン追加項に記す。

腎組織におけるDHE染色

腎組織における活性酸素種(ROS)を描出するためにDHE染色が以前の記述の通りに若干の手順の修飾を加えて行われた。詳細はオンライン追加項に要約す。

糸球体の単離

マウス糸球体の単離はDynabeads M-450 tosylactivated と Magnetic Particle Concentratorを用いて以前の記述通りに行われた。我々は若干手順を修飾した。詳細な方法はオンライン追加項に記す。

RNAの抽出と定量的rt-PCR

方法はオンライン追加項に記す。

形態学的検討

PAS陽性および非細胞領域をメサンギウム基質と決定した。詳細な方法はオンライン追加項に記す。

ウェスタンブロット解析

方法はオンライン追加項に記す。

NAD(P)H オキシダーゼ活性の測定

腎皮質組織とメサンギウム細胞ホモジネートにおけるNAD(P)Hオキシダーゼ活性はルシゲニン化学発光法によって評価された。細胞内酸化ストレスはDCFDA法によって測定された。相方の詳細な方法はオンライン追加項に記す。

統計学的解析

全てのデータは平均±SE.で示している。グループ間の解析はスチューデント t 検定を用いた。群間の多重比較は一元配置分散分析(フィッシャーの PLSD 法)を用いた。P<0.05 を統計的有意性とみなした。

開示

著者らは、いかなる利害対立も存在しないことを宣言する。

謝辞

この研究は文部科学省科学研究費助成事業(No.16590888)・先端融合医療領域イノベーション創出拠点の形成プログラムによって助成を受けた。

REFERENCES

1. Baynes JW: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40:405-412, 1991
2. Oberley LW: Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* 5:113-124, 1988
3. Ha H, Kim C, Son Y, *et al.*: DNA damage in the kidneys of diabetic rats exhibiting microalbuminuria. *Free Radic Biol Med* 16:271-274, 1994
4. Kakimoto M, Inoguchi T, Sonta T, *et al.*: Accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and mitochondrial DNA deletion in kidney of diabetic rats. *Diabetes* 51:1588-1595, 2002
5. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV: Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 10:339-352, 1991
6. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, *et al.*: Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235:1043-1046, 1987
7. Stocker R: Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radic Res Commun* 9:101-112, 1990
8. Abraham NG, Kappas A: Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic Biol Med* 39:1-25, 2005
9. Morita T: Heme oxygenase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1786-1795, 2005
10. Kwak JY, Takeshige K, Cheung BS, *et al.*: Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system. *Biochim Biophys Acta* 1076:369-373, 1991
11. Lanone S, Bloc S, Foresti R, *et al.*: Bilirubin decreases nos2 expression via inhibition of NAD(P)H oxidase: implications for protection against endotoxic shock in rats. *Faseb J* 19:1890-1892, 2005
12. Inoguchi T, Li P, Umeda F, *et al.*: 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* 49:1939-1945, 2000
13. Hink U, Li H, Mollnau H, *et al.*: Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 88:E14-22, 2001
14. Kim YK, Lee MS, Son SM, *et al.*: Vascular NADH oxidase is involved in impaired endothelium-dependent vasodilation in OLETF rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:522-527, 2002
15. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, *et al.*: Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol* 14:S227-232, 2003
16. Inoguchi T, Sasaki S, Kobayashi K, *et al.*: Relationship between Gilbert syndrome and prevalence of vascular complications in patients with diabetes. *Jama* 298:1398-1400, 2007
17. Li Y, Zhu H, Kuppusamy P, *et al.*: Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem* 273:2015-2023, 1998

18. Tsubouchi H, Inoguchi T, Sonta T, *et al.*: 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* 39:444-452, 2005
19. Ziyadeh FN: Role of transforming growth factor beta in diabetic nephropathy. *Exp Nephrol* 2:137, 1994
20. Stocker R: Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal* 6:841-849, 2004
21. Lassegue B, Clempus RE: Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R277-297, 2003
22. Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, *et al.*: A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem* 276:1417-1423, 2001
23. Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, *et al.*: Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8010-8014, 2000
24. Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, *et al.*: Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment. *Diabetologia* 46:1428-1437, 2003
25. Sonta T, Inoguchi T, Tsubouchi H, *et al.*: Evidence for contribution of vascular NAD(P)H oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity. *Free Radic Biol Med* 37:115-123, 2004
26. Fujii M, Inoguchi T, Maeda Y, *et al.*: Pitavastatin ameliorates albuminuria and renal mesangial expansion by downregulating NOX4 in db/db mice. *Kidney Int* 72:473-480, 2007
27. Gorin Y, Block K, Hernandez J, *et al.*: Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *J Biol Chem* 280:39616-39626, 2005
28. Griending KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, *et al.*: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:1141-1148, 1994
29. Inoguchi T, Nawata H: NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Curr Drug Targets* 6:495-501, 2005
30. Kitada M, Koya D, Sugimoto T, *et al.*: Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C-beta activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. *Diabetes* 52:2603-2614, 2003
31. Breimer LH, Wannamethee G, Ebrahim S, *et al.*: Serum bilirubin and risk of ischemic heart disease in middle-aged British men. *Clin Chem* 41:1504-1508, 1995
32. Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC, *et al.*: Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:250-255, 1996
33. Perlstein TS, Pande RL, Creager MA, *et al.*: Serum total bilirubin level, prevalent stroke, and stroke outcomes: NHANES 1999-2004. *Am J Med* 121:781-788 e781, 2008
34. Targher G, Bosworth C, Kendrick J, *et al.*: Relationship of serum bilirubin concentrations to kidney function and albuminuria in the United States adult population. Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2006. *Clin Chem Lab Med* 47:1055-1062, 2009

35. Chen HY, Chen TY, Lee MY, *et al.*: Melatonin decreases neurovascular oxidative/nitrosative damage and protects against early increases in the blood-brain barrier permeability after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res* 41:175-182, 2006
36. Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, *et al.*: A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol* 161:799-805, 2002

Fig.1

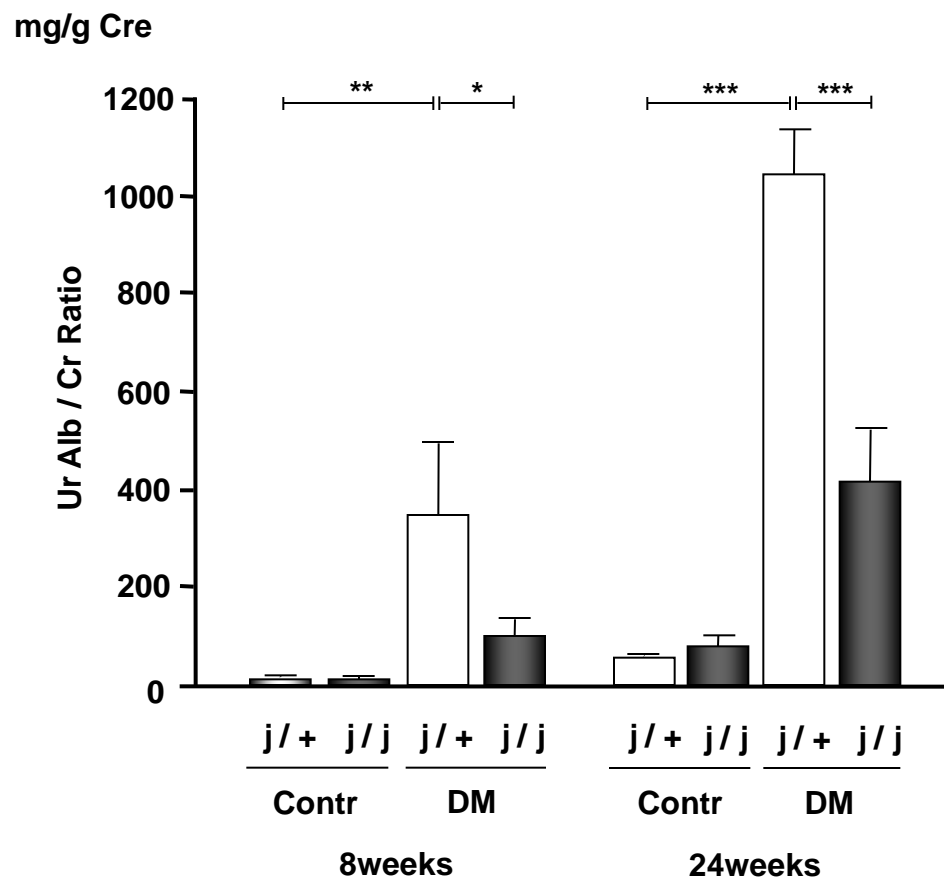


Fig.2

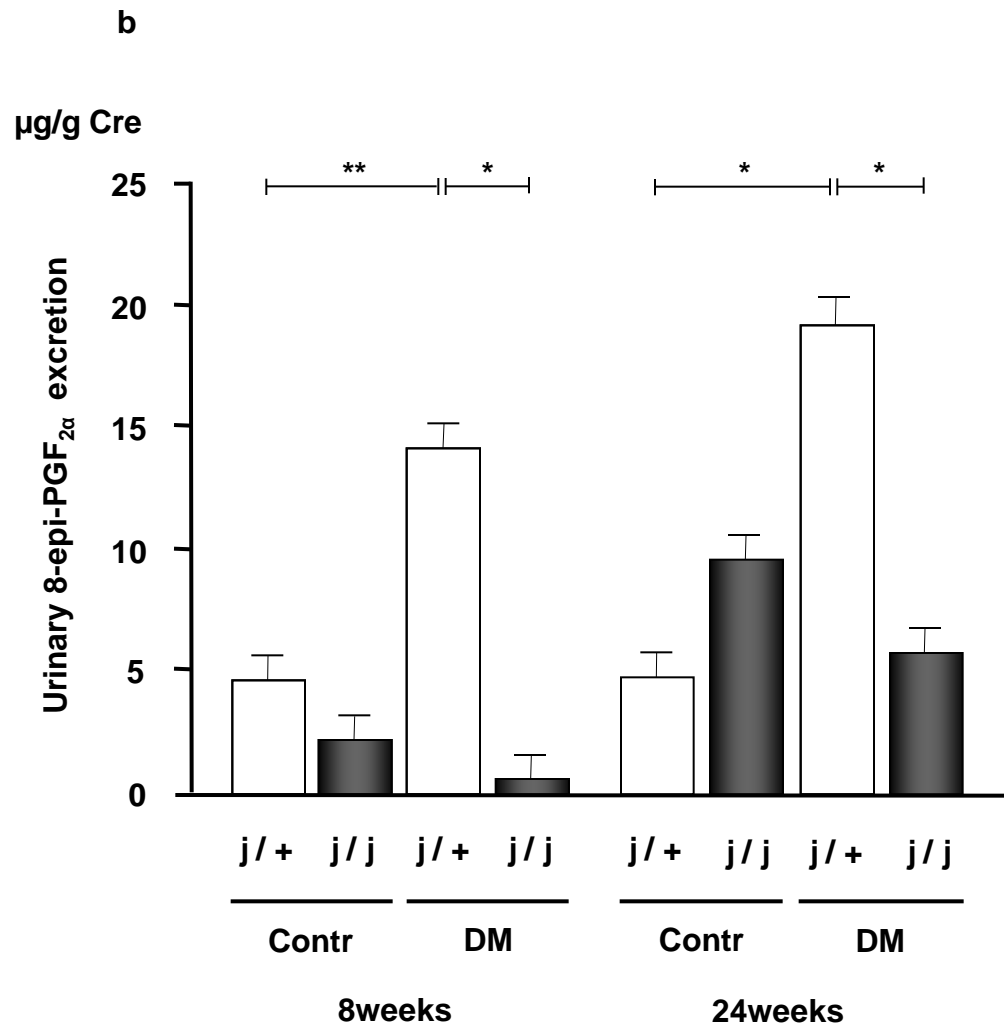
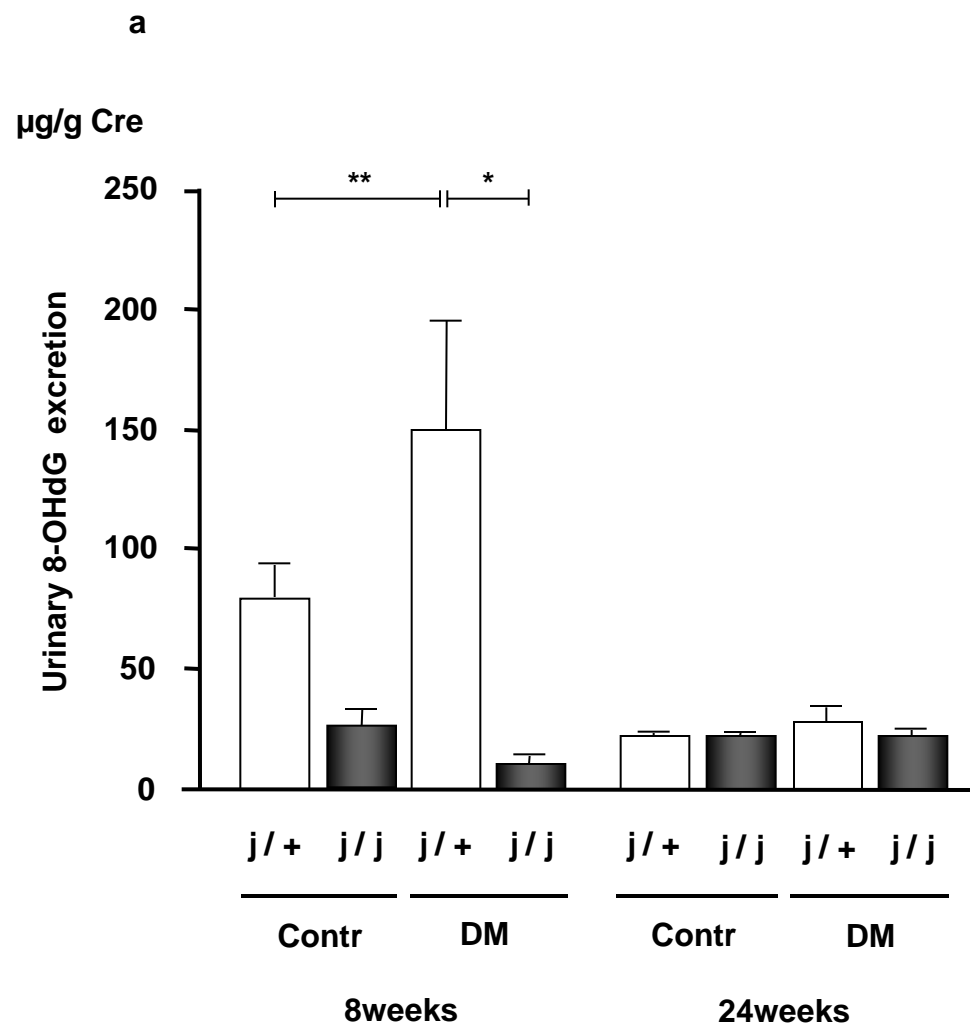


Fig. 2

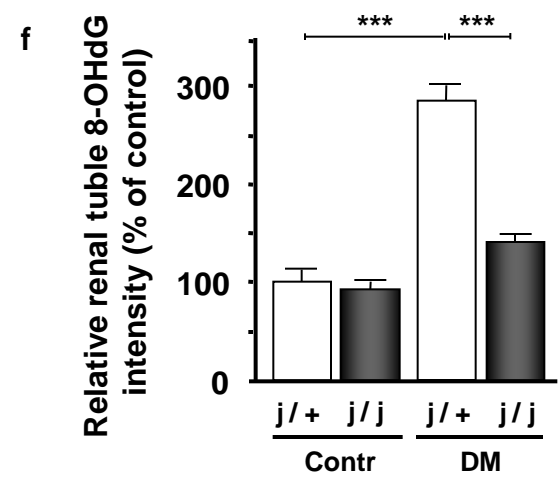
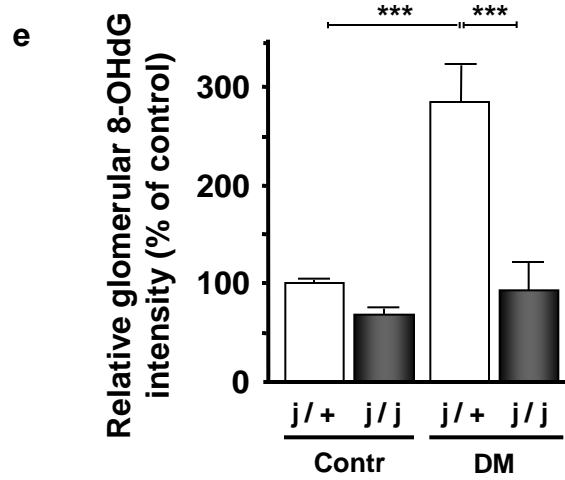
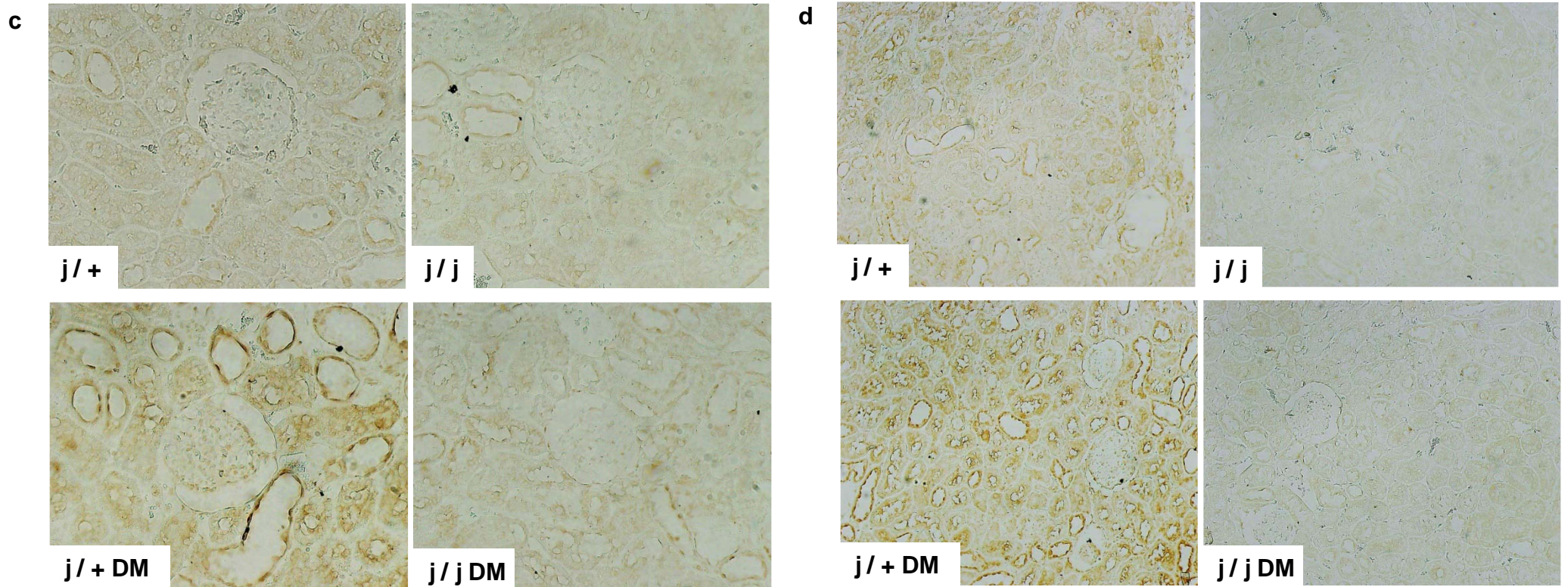


Fig.3

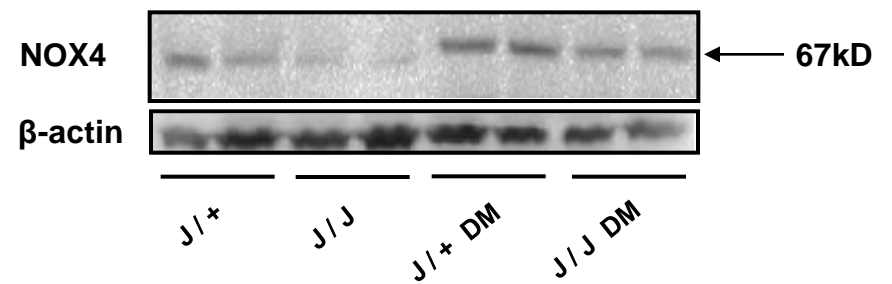
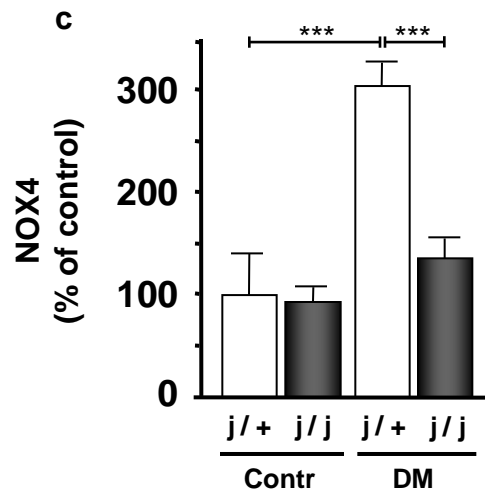
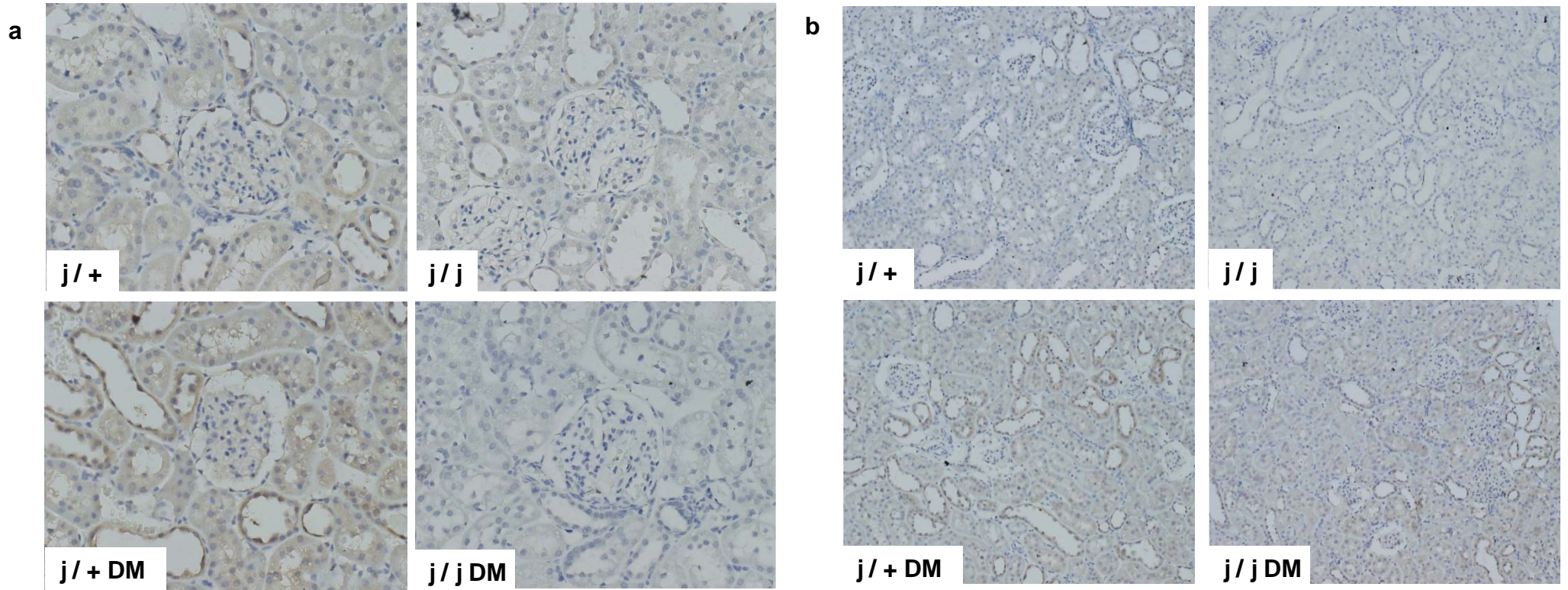


Fig.3

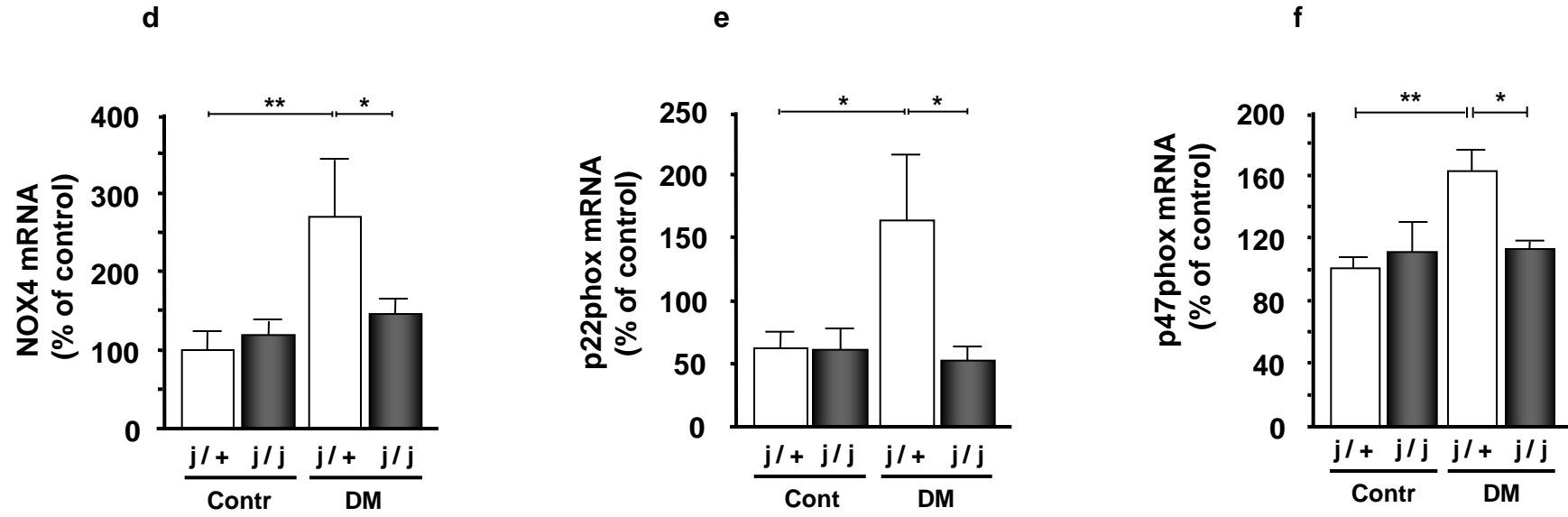
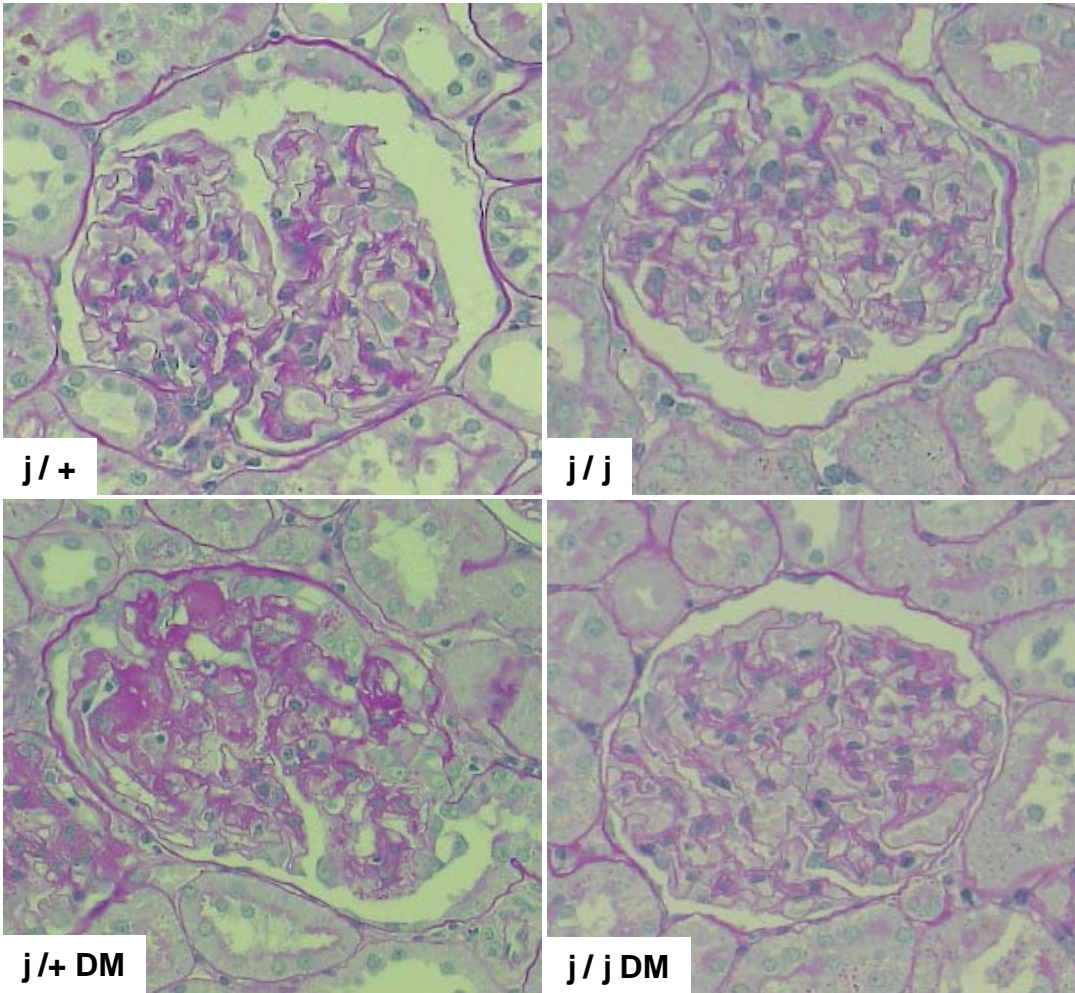


Fig.4

a



b

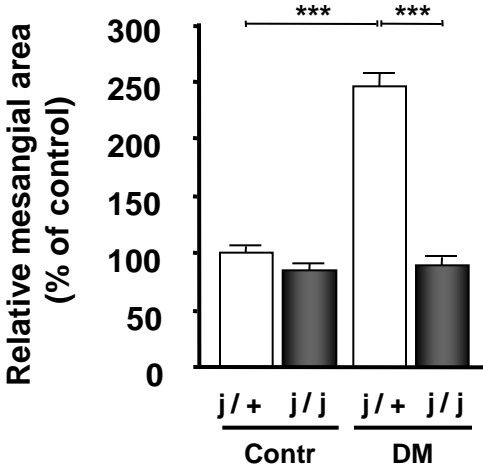


Fig.4

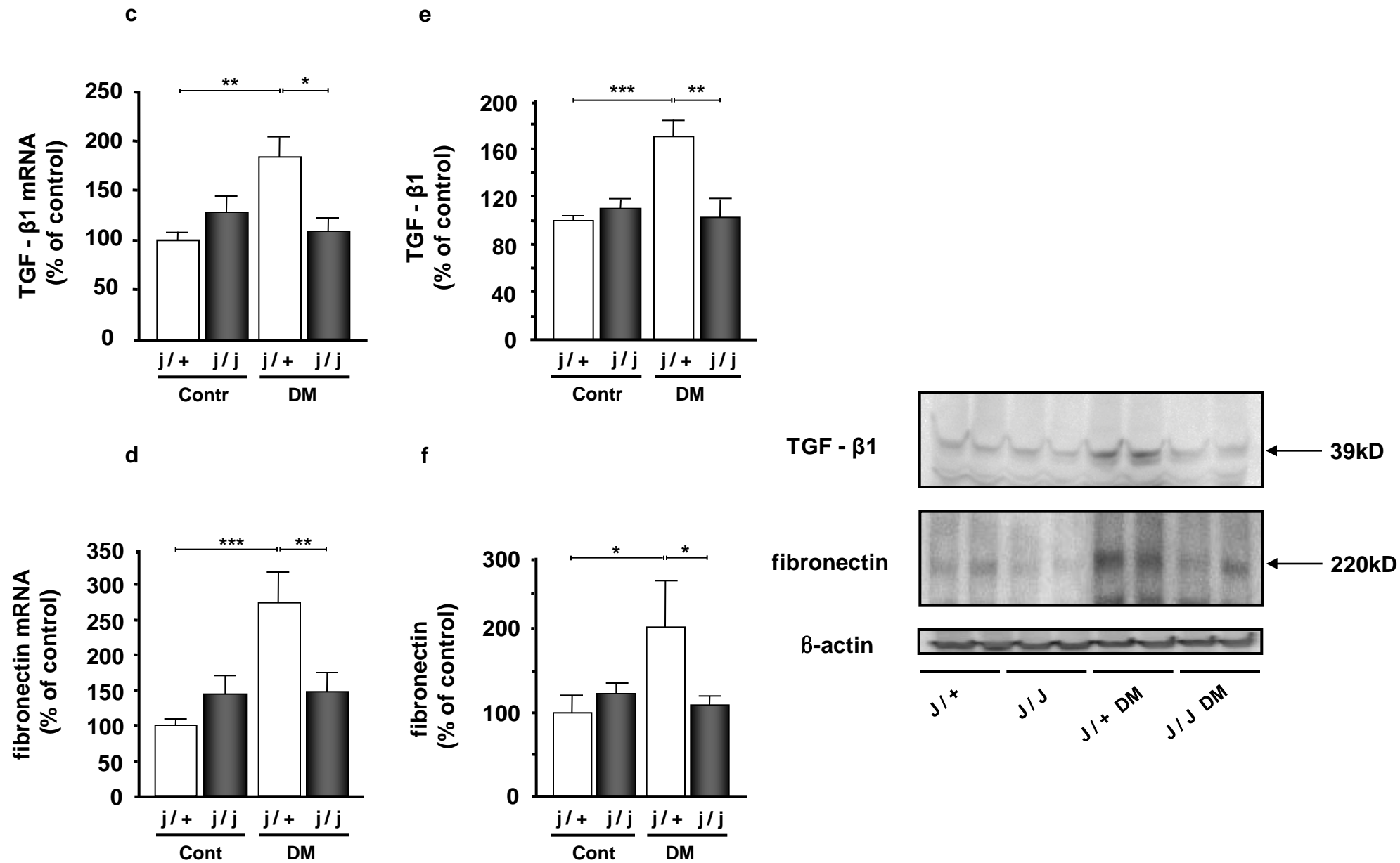


Fig.5

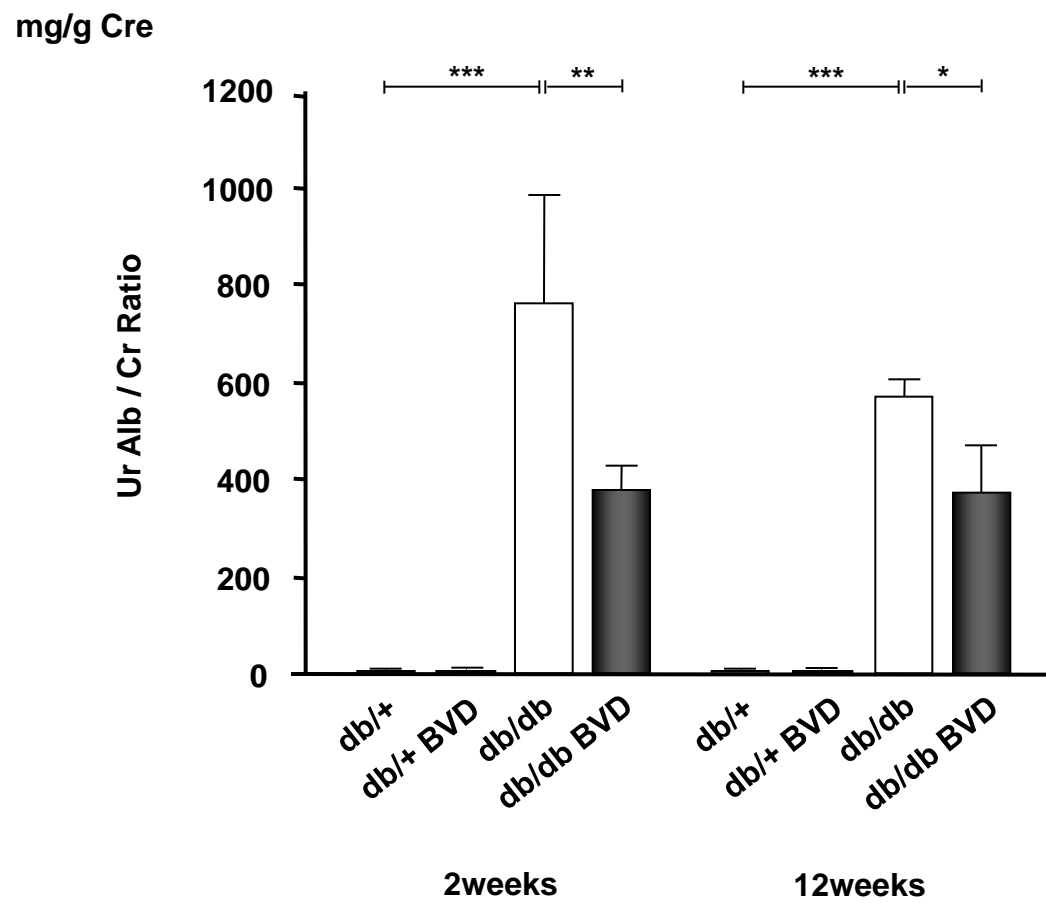


Fig.6

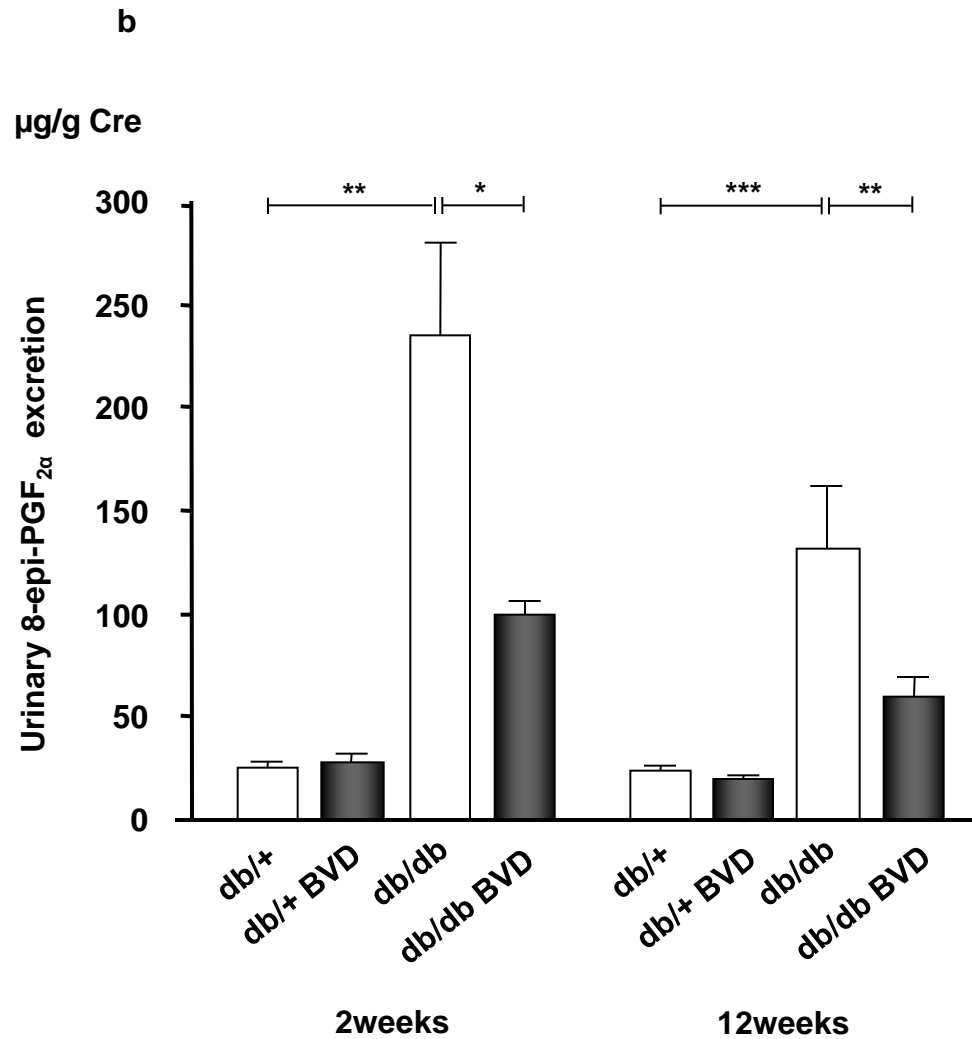
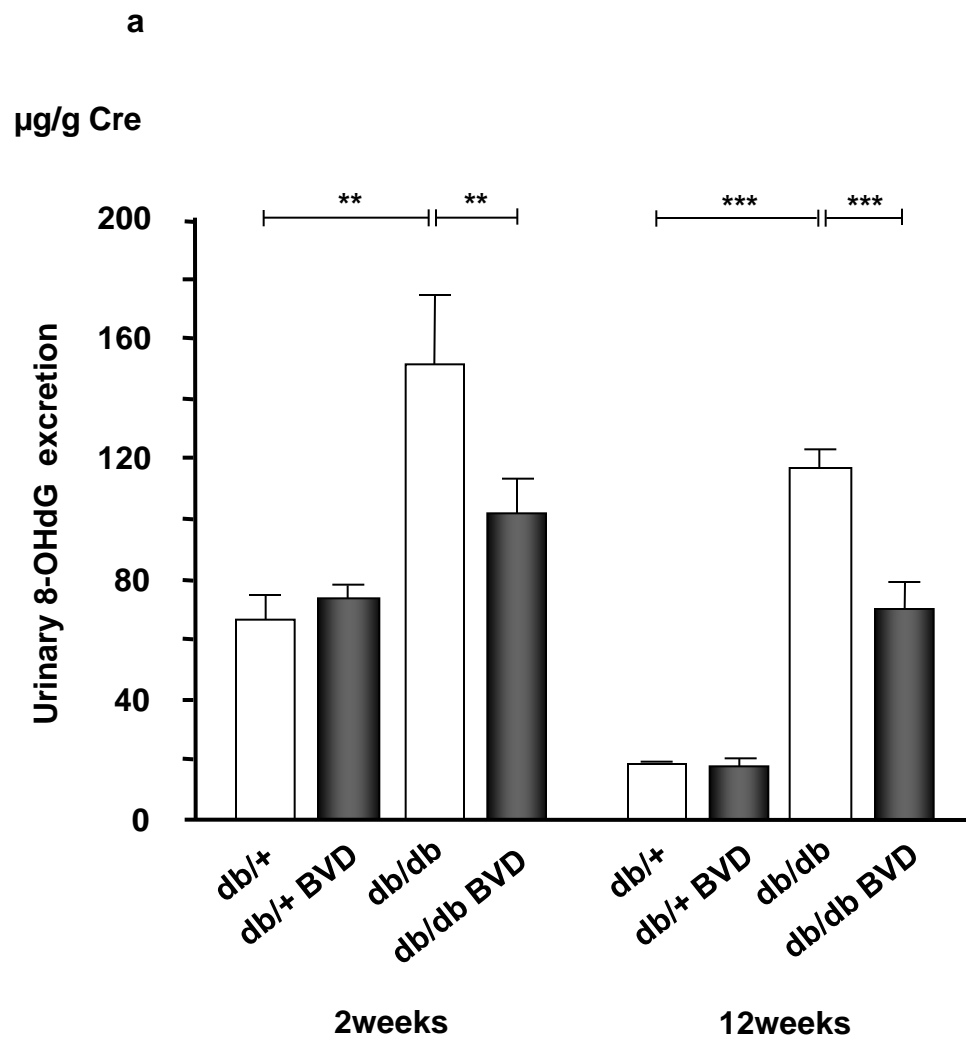


Fig.6

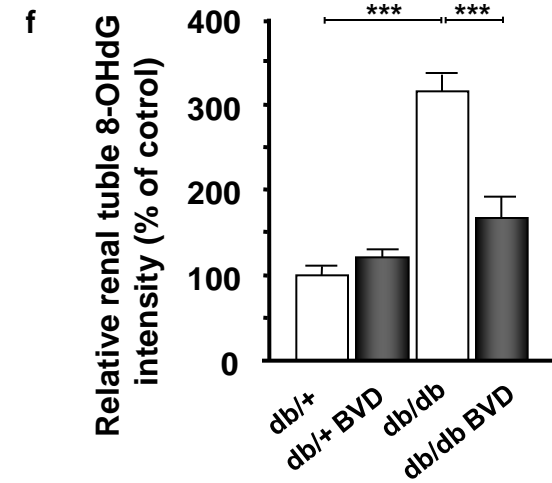
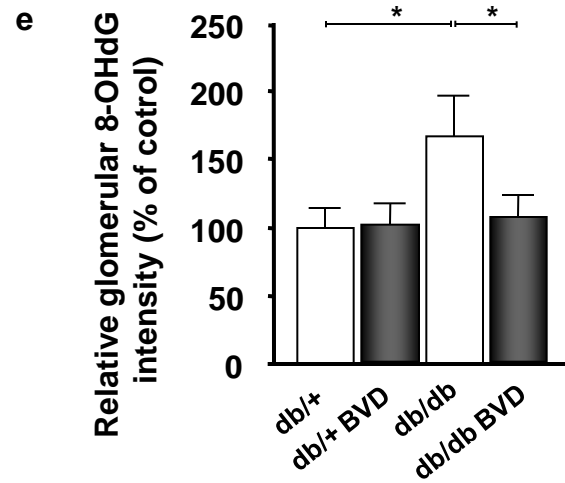
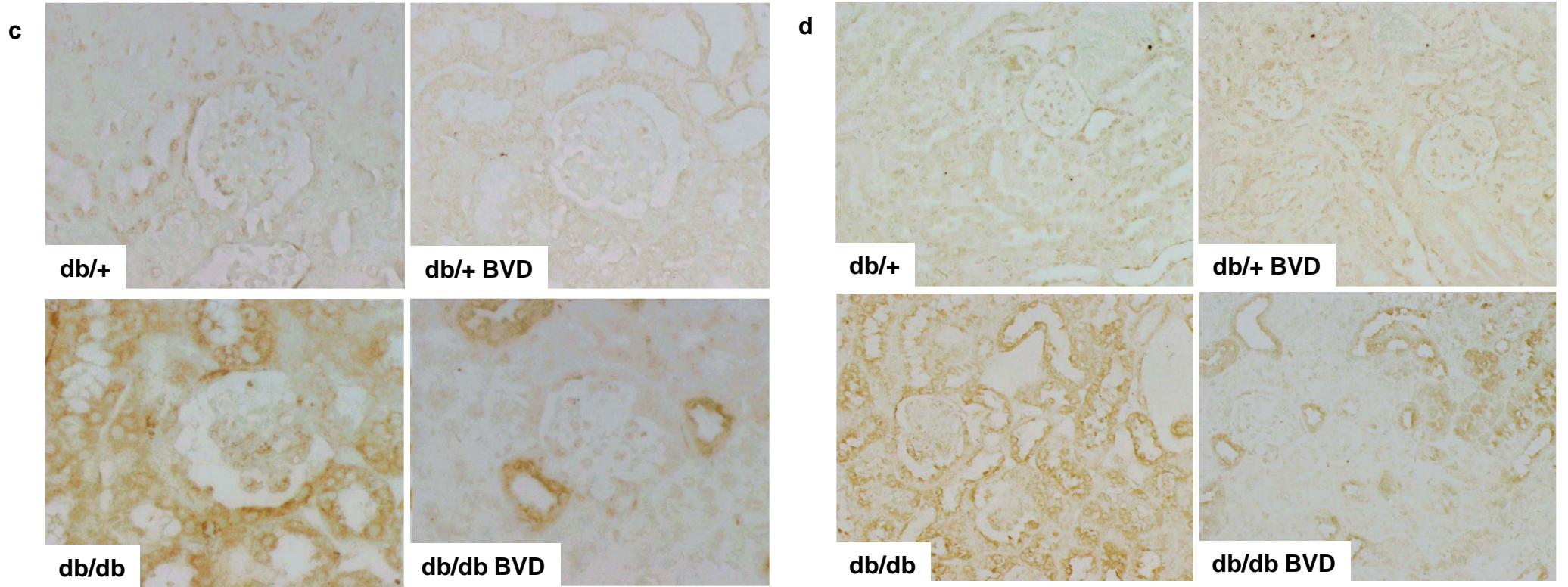


Fig.6

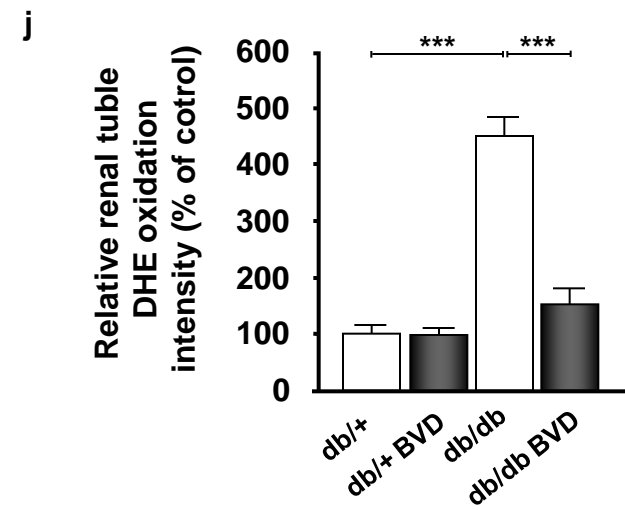
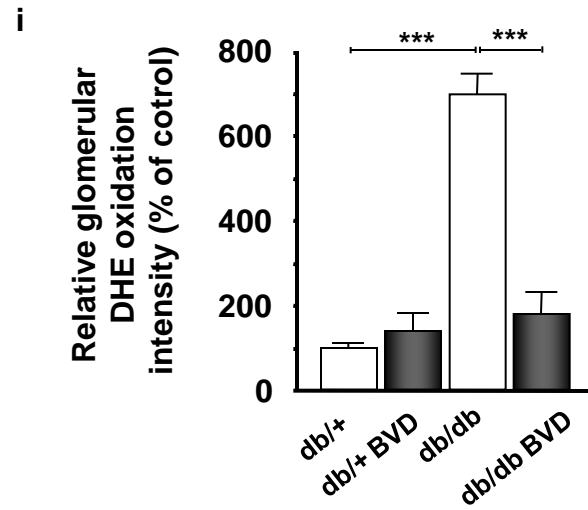
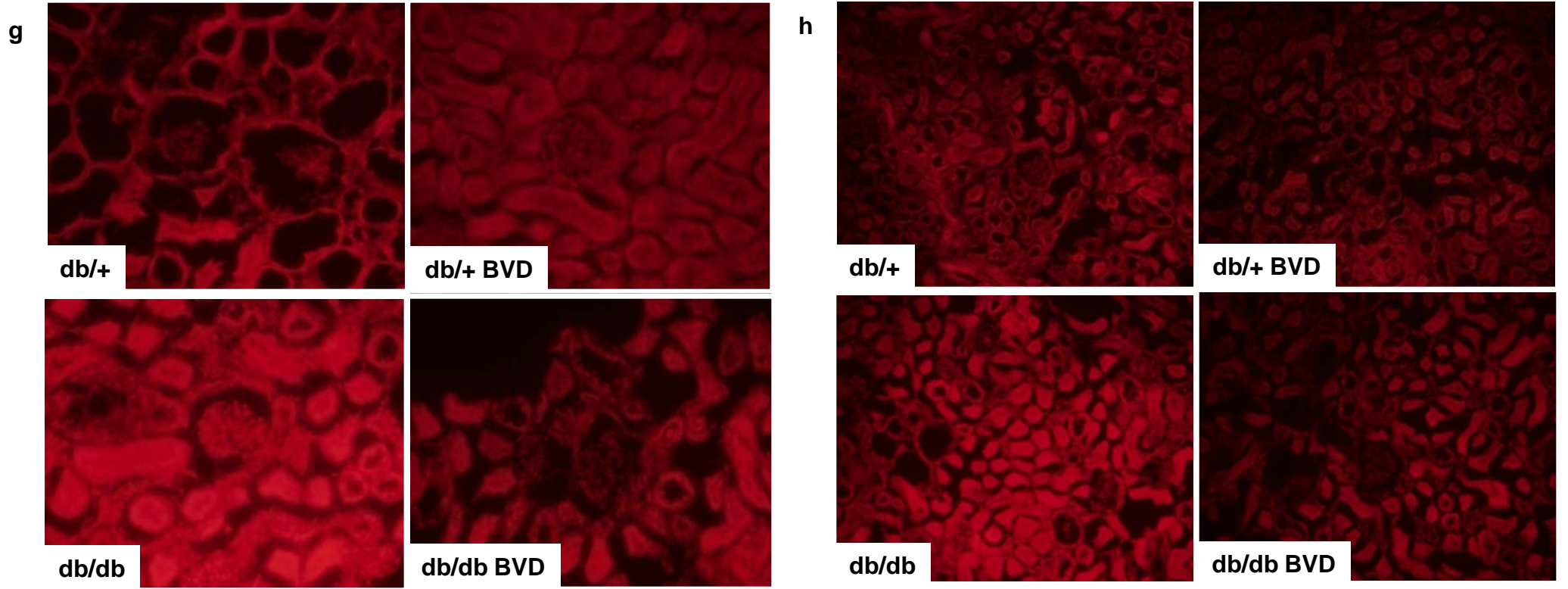


Fig.6

k

Biliverdin(BVD)	-	-	+	-	+	-
Lucigenin	+	+	+	+	+	+
NADPH	-	+	+	+	+	+
DPI	-	-	-	-	-	+

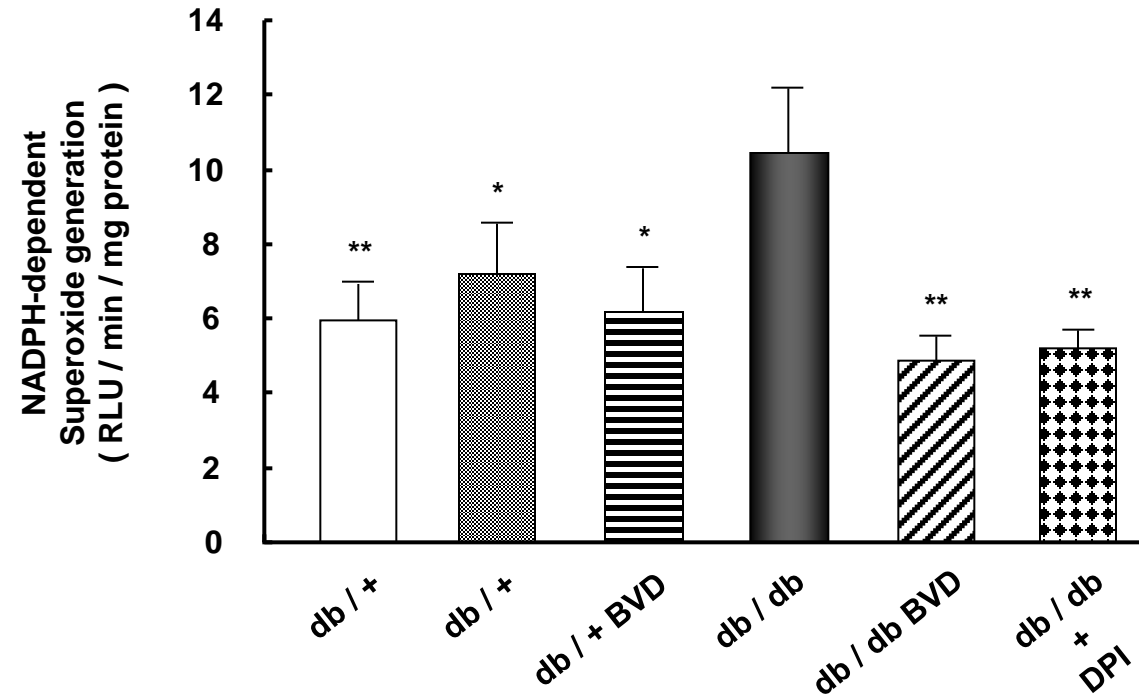
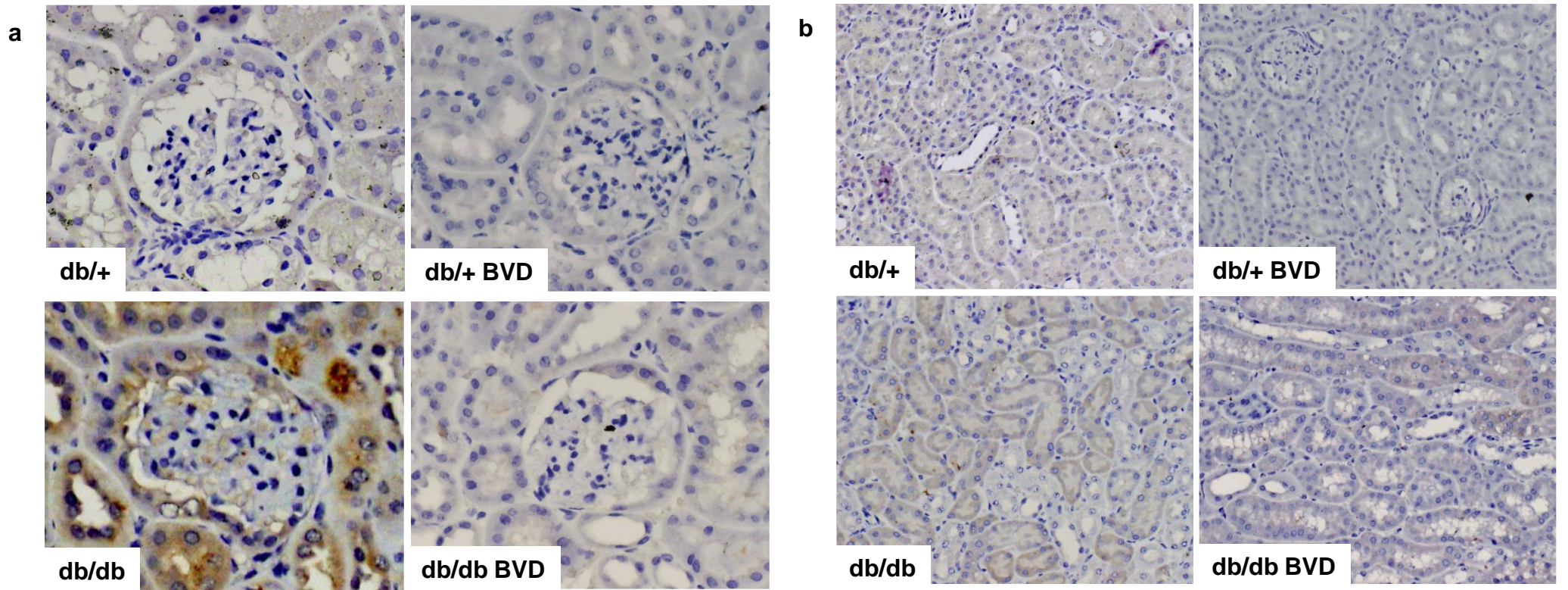


Fig.7



c

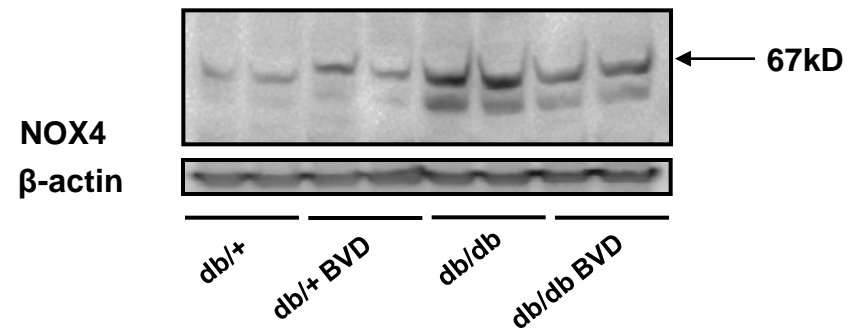
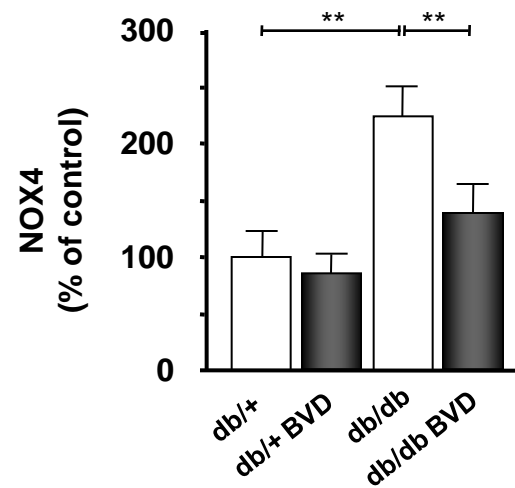


Fig.7

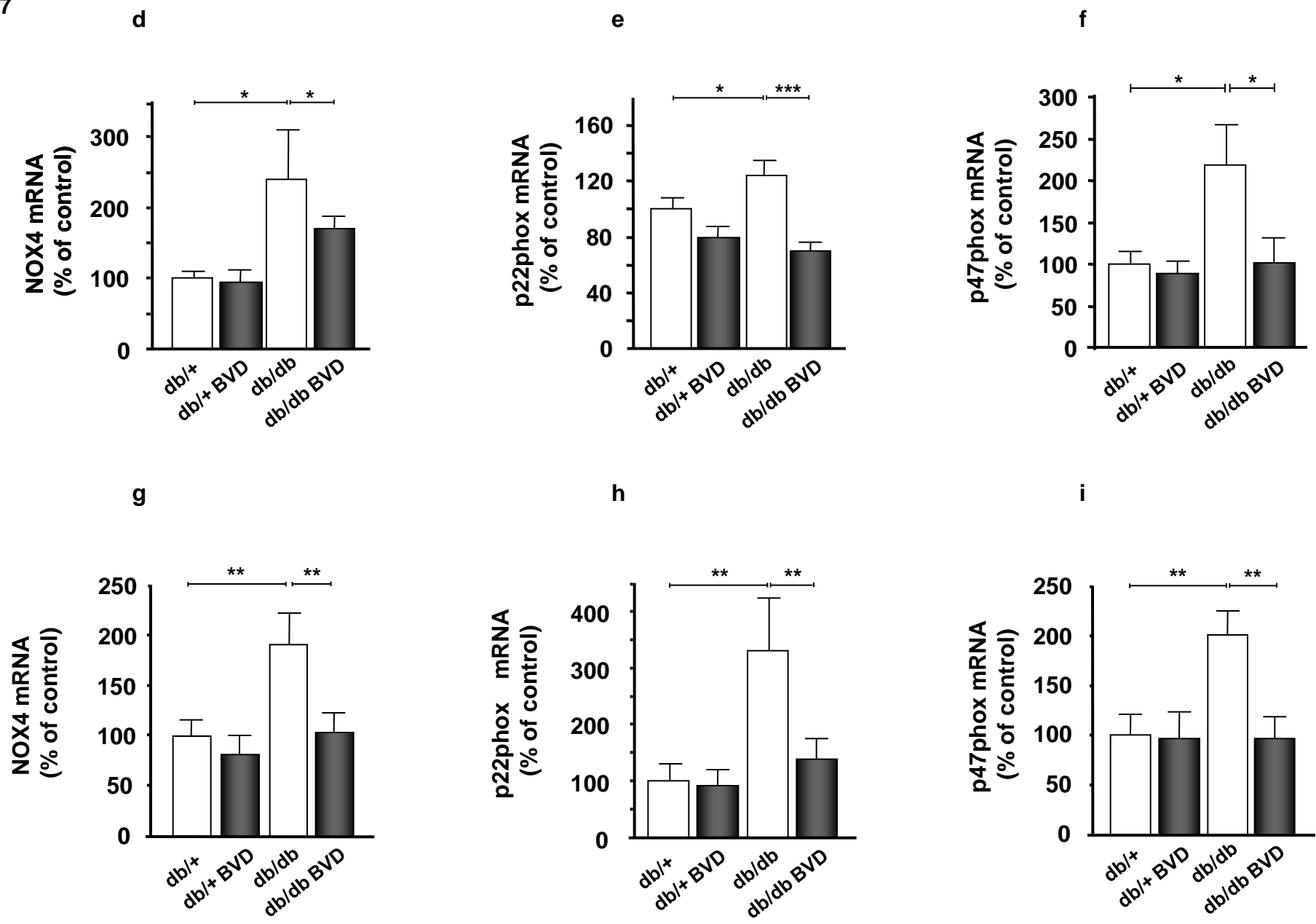
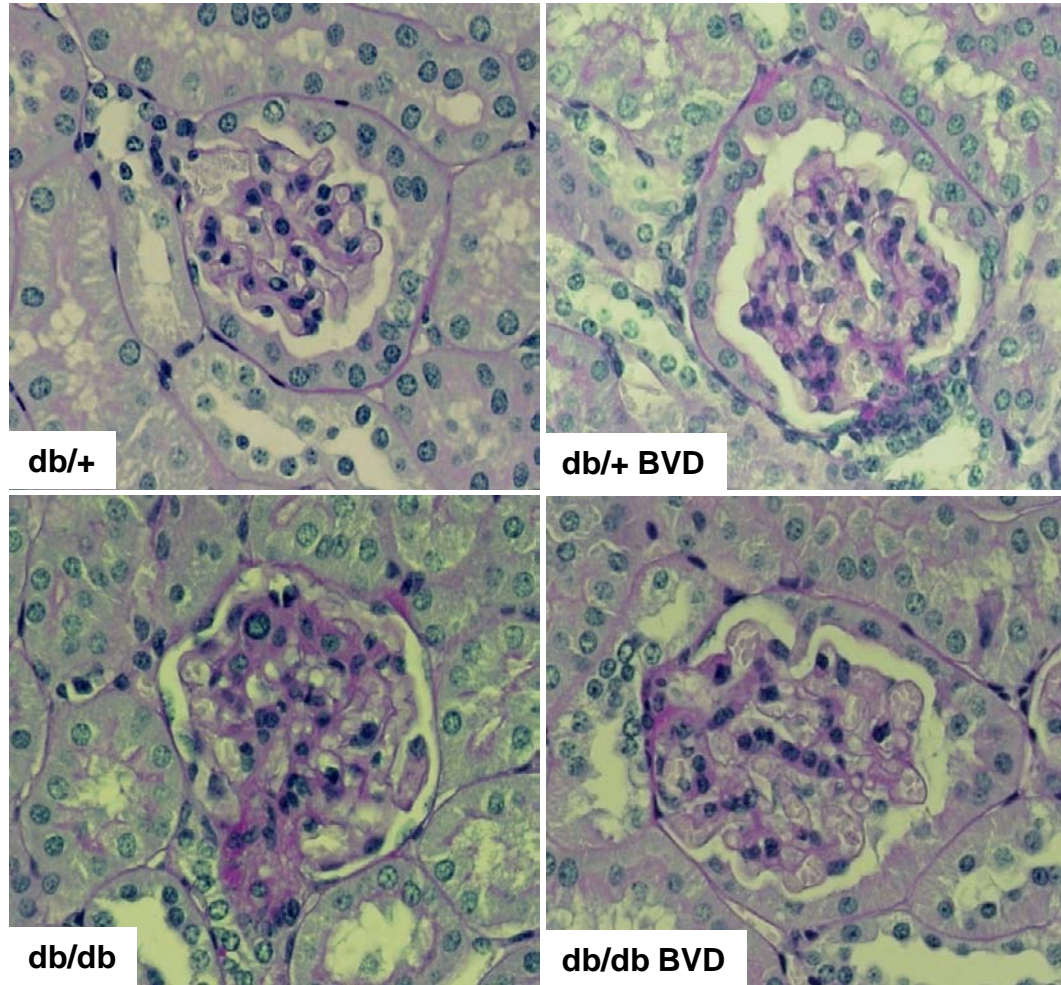


Fig.8

a



b

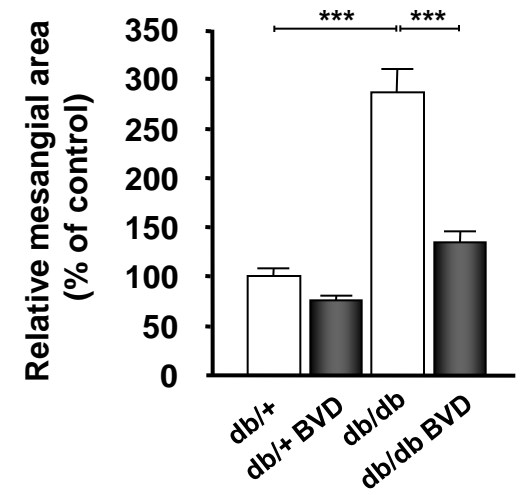


Fig.8

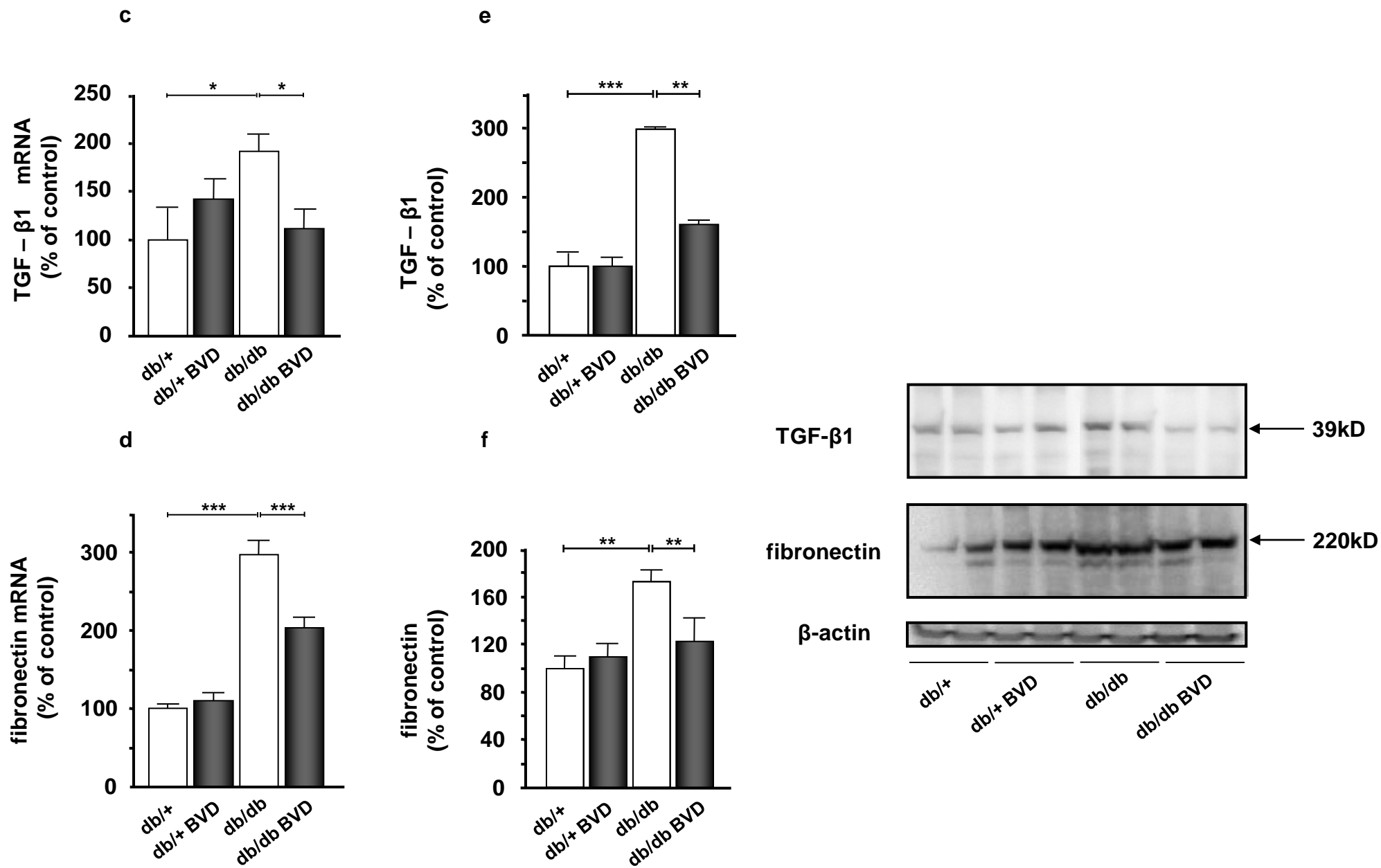


Fig.8

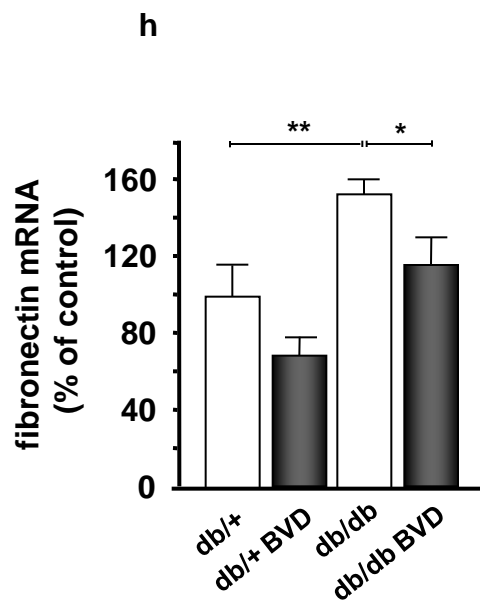
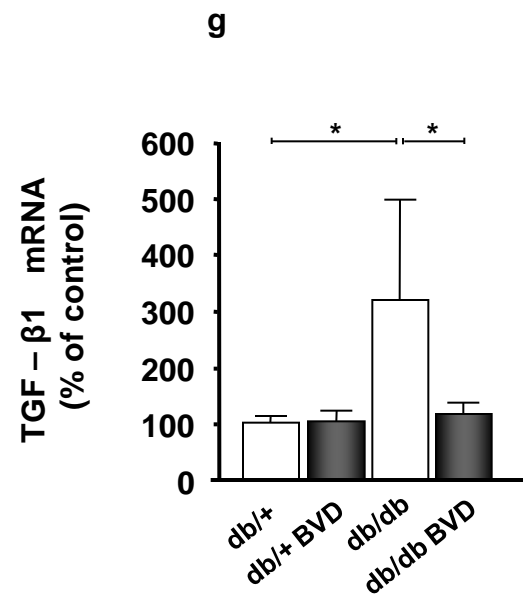
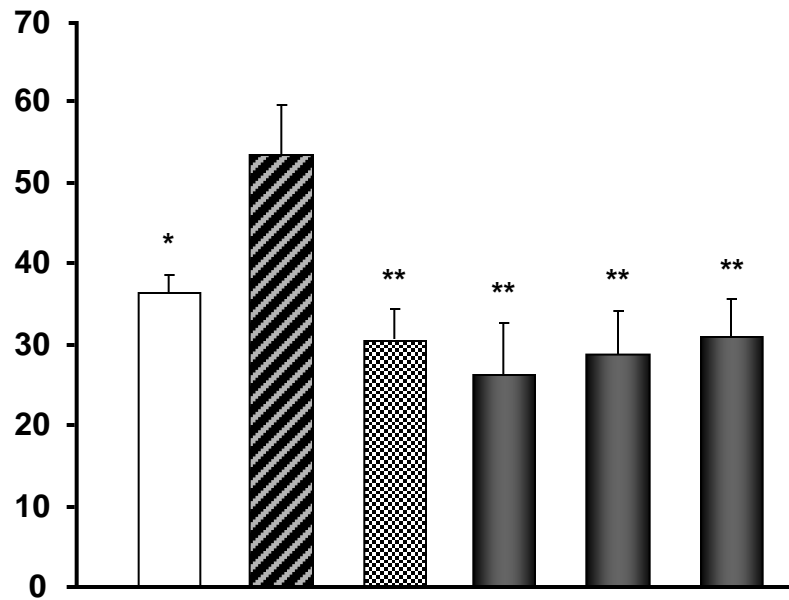


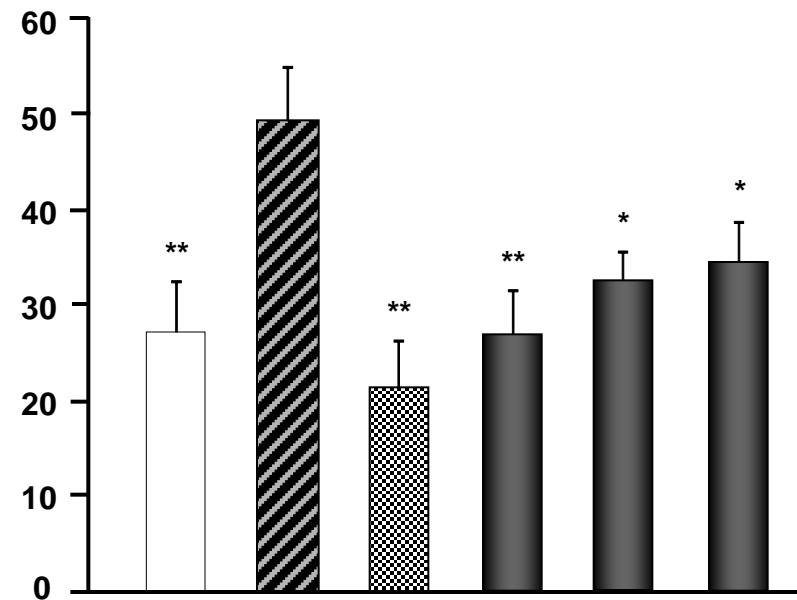
Fig.9

a



Lucigenin	+	+	+	+	+	+
NADPH	-	+	+	+	+	+
DPI	-	-	10 μ M	-	-	-
Bilirubin	-	-	-	10 μ M	1 μ M	100 nM

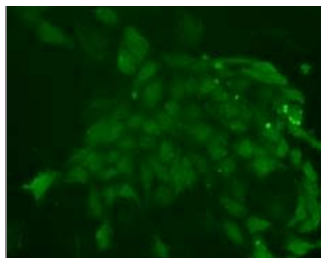
b



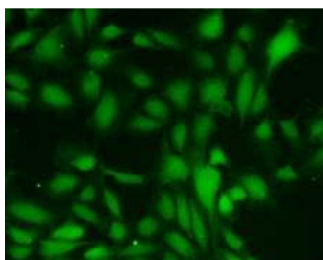
Lucigenin	+	+	+	+	+	+
NADPH	-	+	+	+	+	+
DPI	-	-	10 μ M	-	-	-
Biliverdin	-	-	-	10 μ M	1 μ M	100 nM

Fig.9

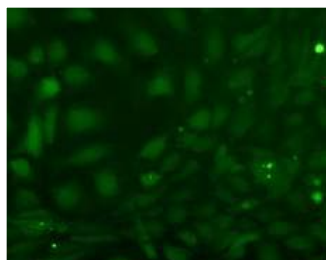
c



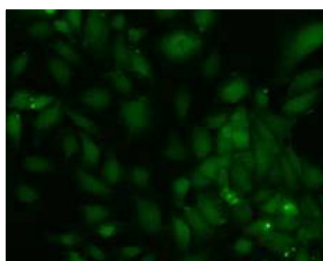
Control



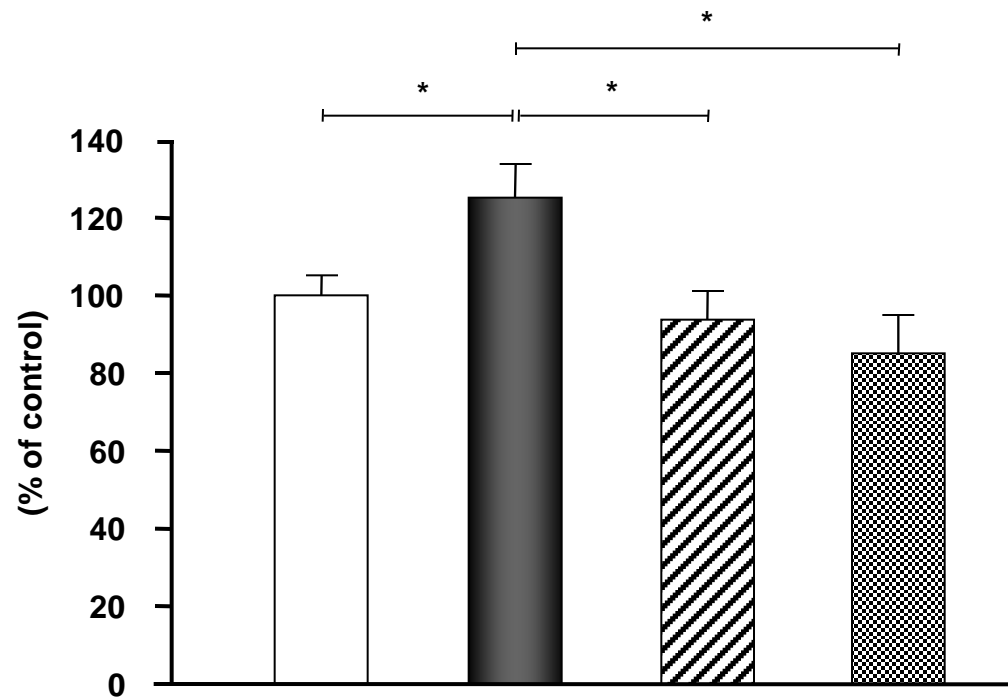
Ang II



Ang II + Bilirubin



Ang II+ DPI



Ang II (100nM)	-	100nM	100nM	100nM
Bilirubin	-	-	10μM	-
DPI	-	-	-	10μM

Fig.9

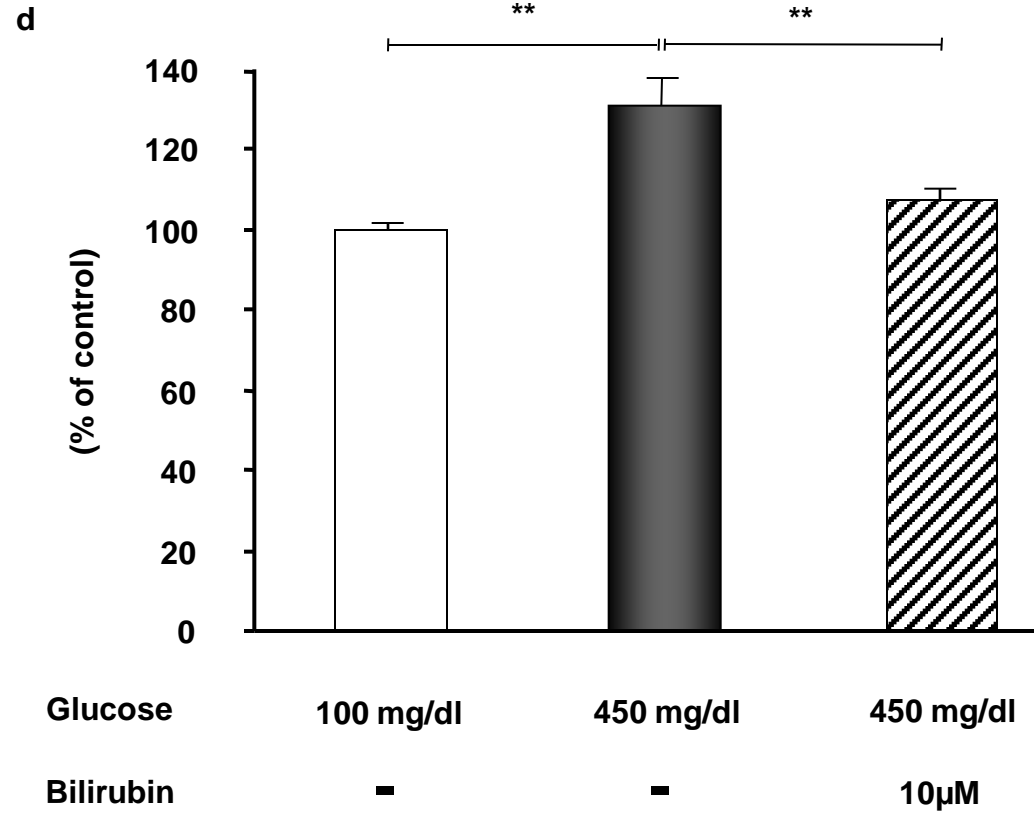


Fig.10 a

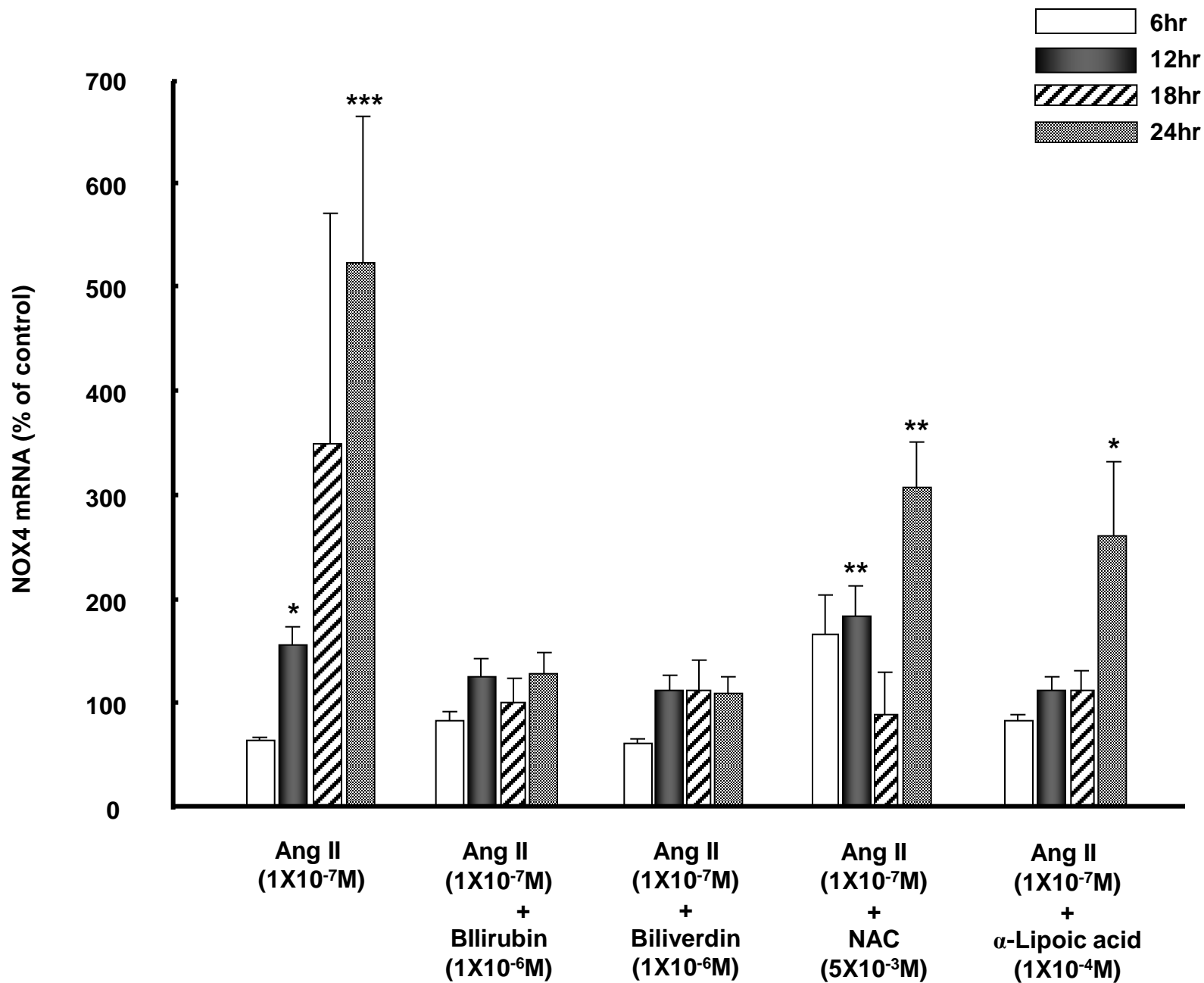
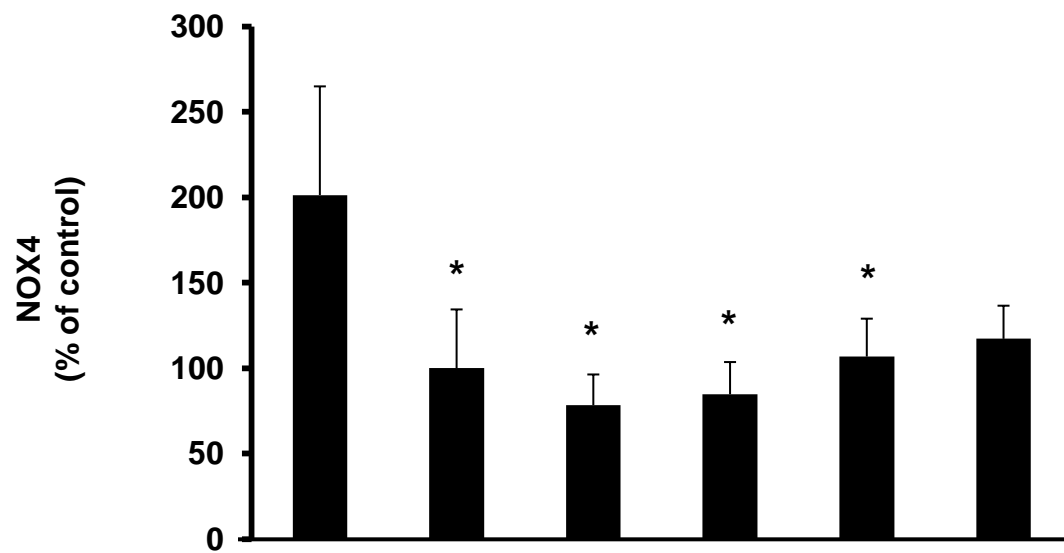
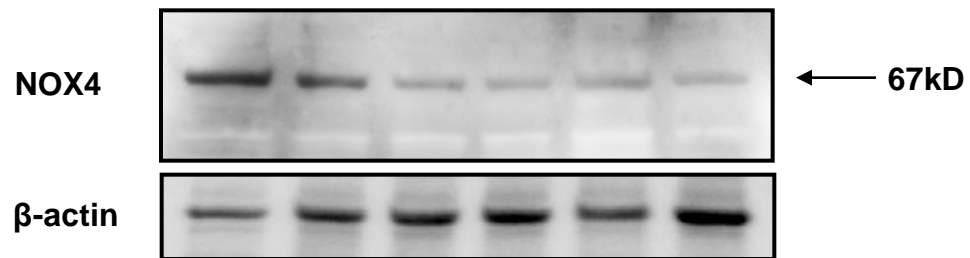


Fig.10 b



Angiotensin II	+	-	+	+	+	+
Biliverdin	-	-	+	-	-	-
Bilirubin	-	-	-	+	-	-
NAC	-	-	-	-	+	-
α -LA	-	-	-	-	-	+

Fig.10 c

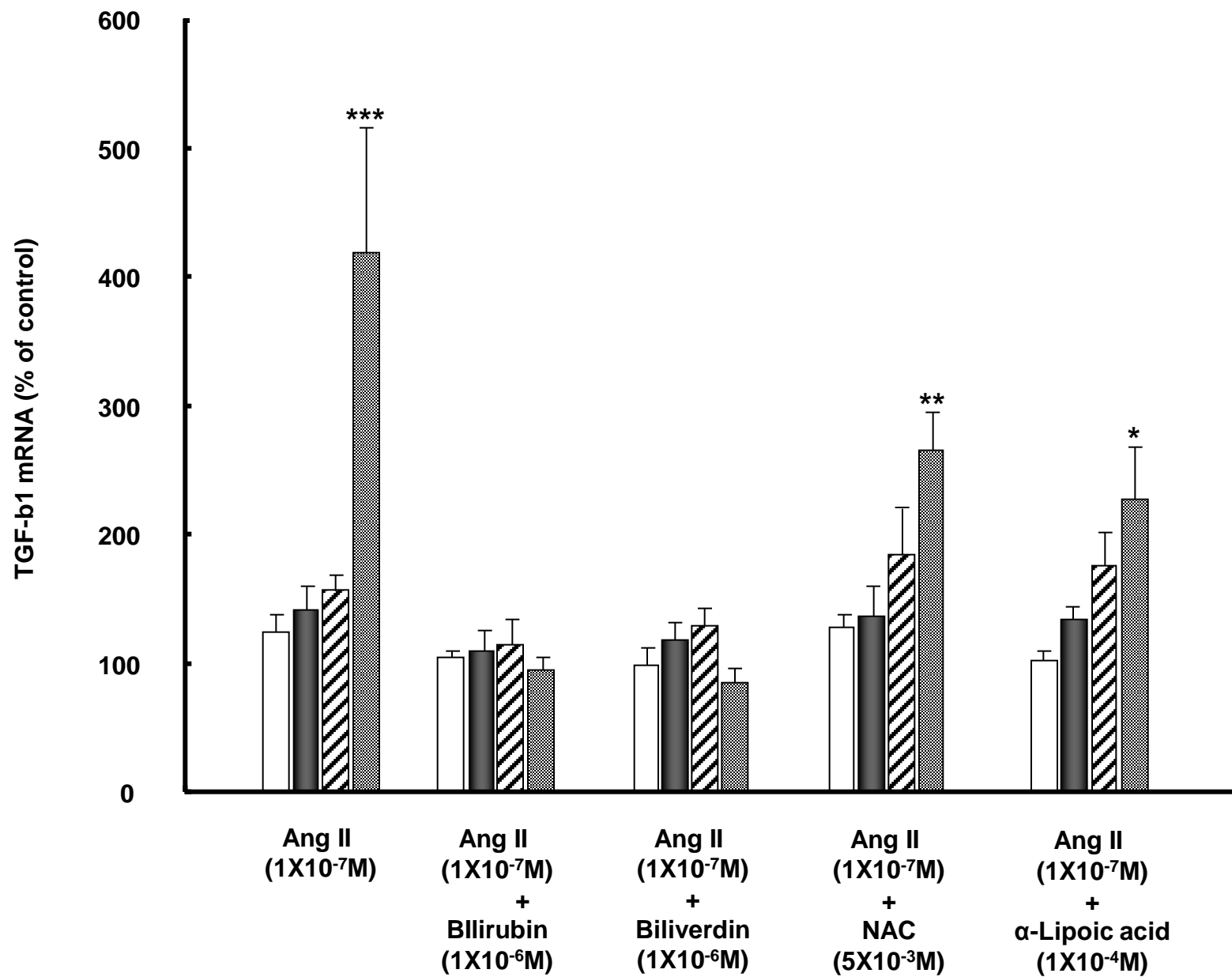


Fig.10 d

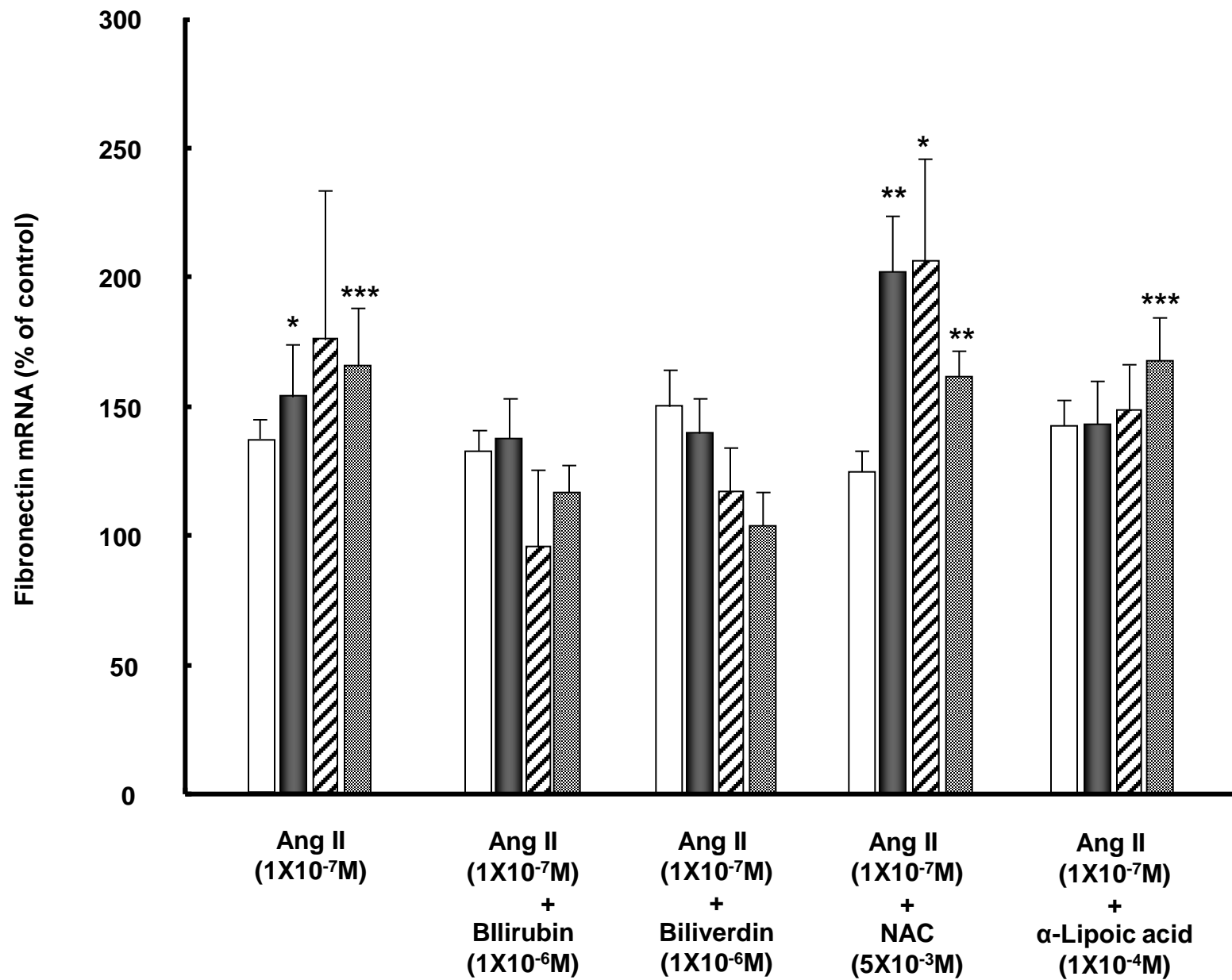


Table.1 Body weights, blood glucose and serum total / direct bilirubin levels in Gunn j/+ and j/j rats at baseline, 8 weeks and 24 weeks after STZ-injection.

	j / +	j / +	j / j	j / j
	Contr (n=10)	DM (n=10)	Contr (n=10)	DM (n=10)
Weight (g)				
0w	264.0±3.6	262.5±7.4	248.0±3.5	230.0±9.8
8w	439.0±3.6	278.8±11.1 #	400.0±5.9	219.3±16.6 ##
24w	548.5±11.0	287.0±9.7 #	444.4±6.8	225.0±19.4 ##
Blood glucose level (mg/dl)				
0w	123.6±2.1	123.9±6.9	123.1±3.7	117.8±9.6
8w	107.9±3.3	550.9±28.4 #	113.0±1.0	518.3±15.8 ##
24w	188.9±12.2	556.3±11.1 #	178.9±9.5	524.4±20.8 ##
Serum total bilirubin level (mg/dl)				
8w	0.18±0.04	0.15±0.02	9.47±0.04	7.01±0.43 ##
Serum direct bilirubin level (mg/dl)				
8w	0.06±0.01	0.07±0.03	0.64±0.03	0.51±0.03

Data are means±SE. # <0.001 vs j / + Contr; ## < 0.001 vs. j / j Contr

Table.2 Body weights, blood glucose and serum total / direct bilirubin levels in db/+ and db/db mice at baseline, at 2 weeks and 12 weeks after treatment.

	db/+ (n=8)	db/db (n=8)	db/+ + BVD (n=8)	db/db + BVD (n=8)
Weight (g)				
0w	28.4±0.4	50.2±0.5 #	29.9±0.7	51.4±0.6 ##
2w	29.7±0.4	51.5±0.5 #	29.8±0.5	51.6±0.4 ##
12w	32.1±0.7	53.9±1.1 #	33.0±0.7	52.9±0.6 ##
Blood glucose level (mg/dl)				
0w	124.6±4.8	474.6±20.5 #	131.3±6.1	483.0±11.2 ##
2w	145.8±3.5	545.9±16.6 #	121.3±8.4	530.1±22.7 ##
12w	154.2±4.4	574.6±13.2 #	145.8±3.5	522.4±43.5 ##
Serum total bilirubin level (mg/dl)				
0w	0.74±0.08	0.70±0.05	0.74±0.07	0.76±0.06
2w	0.98±0.03	0.99±0.04	0.95±0.03	0.98±0.03
Serum direct bilirubin level (mg/dl)				
0w	0.26±0.05	0.24±0.03	0.25±0.02	0.26±0.02
2w	0.22±0.02	0.20±0.02	0.21±0.03	0.21±0.02

Data are means±SE. # < 0.01 vs. non-treated db /+, ## < 0.01 vs. treated db /+

図表の説明

Fig.1

糖尿病発症後 8, 24 週齢のホモ接合体(n=10)およびヘテロ接合体(n=10)の Gunn ラットにおける尿中微量アルブミン/クレアチニン比。24 時間蓄尿検体は代謝ケージにて採取された。よく攪拌した尿検体は 7500g 5 分間遠心を行い、解析時まで-80℃にて保管された。尿中微量アルブミン/クレアチニン比(mg/g creatinine)は方法で記述している通りに測定した。結果は平均値±SE で示す。*P<0.05; **P<0.01; *** P<0.001. Contr, 非糖尿病群。DM, ストレプトゾトシン誘導による糖尿病群。Ur Alb/Cr, 尿中アルブミン/クレアチニン比。

Fig.2

糖尿病発症後 8, 24 週齢のホモ接合体(n=10)およびヘテロ接合体(n=10)の Gunn ラットにおける尿中酸化ストレスマーカー。(a) 尿中 8-hydroxy-20-deoxyguanosine (8-OHdG)排泄 (µg/g creatinine)、(b) 尿中 8-epi-prostaglandin F2α(8-epi-PGF2α)排泄 (µg/g creatinine)、は方法で記述している通りに測定した。結果は平均値±SE で示す。*P<0.05; **P<0.01; ***腎 8OHdG 免疫染色解析。腎 8OHdG 含量は免疫染色によって解析された。非糖尿病ヘテロ接合体群(Gunn j/+), 糖尿病ヘテロ接合体群(Gunn j/+), 非糖尿病ホモ接合体群(Gunn j/j), 糖尿病ホモ接合体群(Gunn j/j)の(c)糸球体 (d)尿細管の代表的な画像を示している。(e)腎糸球体と(f)尿細管における 8OHdG の免疫染色強度は Scion imaging software(Scion, Frederick, MD)を用いて半定量的解析を行った。結果は非糖尿病ヘテロ接合体 Gunn j/+ラットレベルに対しての平均パーセンテージ±SE で示す。*** P<0.001. Contr, 非糖尿病群。DM, ストレプトゾトシン誘導による糖尿病群。

Fig.3

腎組織における NOX4 蛋白の免疫染色解析。写真は(a)糸球体と(b)尿細管の代表的画像を示しており、それぞれのグループ(n=10)において同様の結果が得られている。NOX4 蛋白レベルはウェスタンブロットにより解析した。(c)写真は腎組織におけるウェスタンブロッ

トの代表的画像である。NOX4 蛋白レベルは β アクチンで補正し、結果はコントロールの非糖尿病ヘテロ接合体 Gunn j/+ラットレベルに対しての平均パーセンテージ \pm SE で示す。
*** P<0.001.

腎組織における NOX4、p22phox、p47phox mRNA レベルを示す。トータル RNA は糖尿病発症後 24 週齢のそれぞれのグループ(n=10)のラット腎から抽出した。(d,e,f)NOX4、p22phox、p47phox mRNA レベルは real-time RT-PCR にて測定された。mRNA レベルは β アクチンで補正し、結果はコントロールの非糖尿病ヘテロ接合体 Gunn j/+ラットレベルに対しての平均パーセンテージ \pm SE で示す。*P<0.05; **P<0.01 Contr, 非糖尿病群。DM, ストレプトゾトシン誘導による糖尿病群。

Fig.4

(a,b)ホモ接合体およびヘテロ接合体の Gunn ラットにおけるメサンギウム領域拡大。糖尿病発症 24 週後に腎組織切片に PAS 染色を行った。写真は非糖尿病ヘテロ接合体群(Gunn j/+)(n=10)、糖尿病ヘテロ接合体群(Gunn j/j)(n=10)、非糖尿病ホモ接合体群(Gunn j/j)(n=10)、糖尿病ホモ接合体群(Gunn j/j)(n=10)からの検体で代表的な画像を示している。Scion imaging software(Scion, Frederick, MD)を用いて半定量的解析を行った。結果は非糖尿病ヘテロ接合体 Gunnj/+ラットレベルに対しての平均パーセンテージ \pm SE で示す。

*** P<0.001. (c,d,e,f) TGF- β 1 とフィブロネクチン mRNA および蛋白レベル。トータル RNA と蛋白は糖尿病発症後 24 週齢のそれぞれのグループ(n=10)のラット腎から抽出した。(c,d) TGF- β 1 とフィブロネクチン mRNA レベルは real-time RT-PCR にて測定された。mRNA レベルは β アクチンで補正し、結果はコントロールの非糖尿病ヘテロ接合体 Gunnj/+ラットレベルに対しての平均パーセンテージ \pm SE で示す。(e,f) TGF- β 1 とフィブロネクチンの蛋白レベルはウェスタンブロットにて解析した。写真は腎組織における TGF- β 1 とフィブロネクチンのウェスタンブロットの代表的画像である。蛋白レベルは β アクチンで補正し、結果はコントロールの非糖尿病ヘテロ接合体 Gunnj/+ラットレベルに対しての平均パーセンテージ \pm SE で示す。*P<0.05; **P<0.01; *** P<0.001. Contr, 非糖

尿病群。DM, ストレプトゾトシン誘導による糖尿病群。

Fig.5

db/+(n=8), db/db(n=8) マウスにおけるビリベルジン治療による尿中微量アルブミン/クレアチニン比への影響。ビリベルジンは 5mg/Kg の投与量で db/db, db/+マウスの 12 週齢から 2 週間および 12 週間投与した。24 時間蓄尿検体は代謝ケージにて採取された。よく攪拌した尿検体は 7500g 5 分間遠心を行い、解析時まで -80°C にて保管された。尿中微量アルブミン/クレアチニン比は方法で記述している通りに測定した。*P<0.05; **P<0.01; *** P<0.001. BVD, ビリベルジン治療群。Ur Alb/Cr, 尿中アルブミン/クレアチニン比。

Fig.6

ビリベルジン治療による尿中 8OHdG 排泄、8-epi-PGF2 α 排泄への影響。(a)尿中 8OHdG (μ g/g creatinine)、(b) 尿中 8-epi-PGF2 α (μ g/g creatinine)排泄は 2 および 12 週間の治療の後に方法に記述した通りに測定した。結果は平均値 \pm SE で示す。

(全てのグループは n=8) *P<0.05; **P<0.01; *** P<0.001.

腎 8OHdG 免疫染色解析。腎 8OHdG 含量は免疫染色によって解析された。写真は未治療 db/+マウス群(n=8)、未治療 db/db マウス群(n=8)、ビリベルジン治療 db/+マウス群(n=8)、ビリベルジン治療 db/db(n=8)群の(c)糸球体 (d)尿細管の代表的な画像を示している。(e)腎糸球体と(f)尿細管における 8OHdG の免疫染色強度は Scion imaging software(Scion, Frederick, MD)を用いて半定量的解析を行った。結果は未治療 db/+マウスレベルに対しての平均パーセンテージ \pm SE で示す。*P<0.05; *** P<0.001.

腎組織における ROS 産生に対するビリベルジン治療の影響を DHE 染色により描出した。写真は未治療 db/+マウス群(n=8)、未治療 db/db マウス群(n=8)、ビリベルジン治療 db/+マウス群(n=8)、ビリベルジン治療 db/db マウス群(n=8) の(g)糸球体 (h)尿細管の代表的な画像を示している。(i,j)腎糸球体および尿細管における DHE 酸化の発光強度は Scion imaging software(Scion, Frederick, MD)を用いて半定量的解析を行った。結果は未治療

db/+マウスレベルに対しての平均パーセンテージ±SE で示す。 *** P<0.001.

(k)未治療 db/+マウス群(n=8)、未治療 db/db マウス群(n=8)、ビリベルジン治療 db/+マウス群(n=8)、ビリベルジン治療 db/db 群(n=8)の腎皮質における NADPH オキシダーゼ活性分析。5 分間バックグラウンドの割合を規定した後に NADPH が加えられ、Flex Station3 によりルシゲニン化学発光の上昇をモニターした。結果は平均値±SE で示す。 *P<0.05; **P<0.01. vs. 未治療 db/db マウス群

Fig.7

腎組織におけるビリベルジン治療による NOX4 蛋白発現レベルへの影響。腎組織における NOX4 蛋白発現レベルの免疫染色による解析。写真は**(a)**糸球体と**(b)**尿細管の代表的画像を示しており、それぞれのグループ(n=8)において同様の結果が得られている。

(c)NOX4 蛋白レベルをウェスタンブロットにより解析した。NOX4 蛋白レベルは β アクチンで補正し、結果は未治療 db/+マウスレベルに対しての平均パーセンテージ±SE で示す。 *** P<0.001.

腎組織における NOX4、p22phox、p47phox mRNA レベルを示す。トータル RNA は 12 週間のビリベルジン治療後のそれぞれのグループ(n=8)のマウス腎から抽出した。 **(d,e,f)** mRNA レベルは real-time RT-PCR にて測定された。NOX4、p22phox、p47phox mRNA レベルは β アクチンで補正し、結果は未治療 db/+マウスレベルに対しての平均パーセンテージ±SE で示す。(全てのグループは n=8) *P<0.05; *** P<0.001. 腎糸球体における NOX4、p22phox、p47phox mRNA レベルを示す。トータル RNA は 12 週間のビリベルジン治療後の腎糸球体から抽出した。 **(g,h,i)**それぞれの腎糸球体から抽出された NOX4、p22phox、p47phox mRNA レベルは real-time RT-PCR にて測定された。mRNA レベルは β アクチンで補正し、結果は未治療 db/+マウスレベルに対しての平均パーセンテージ±SE で示す。(全てのグループは n=8) **P<0.01.

Fig.8

(a,b)ビリベルジン治療によるメサンギウム領域拡大への影響。12 週間の治療の後に腎切片

へ PAS 染色を行った。写真は未治療 db/+マウス群(n=8)、未治療 db/db マウス群(n=8)、ビリベルジン治療 db/+マウス群(n=8)、ビリベルジン治療 db/db マウス群(n=8) の代表的な画像を示している。メサンギウム領域の半定量的解析。結果は未治療 db/+マウスレベルに対しての平均パーセンテージ±SE で示す。*** P<0.001. **(c,d,e,f)** TGF-β1 とフィブロネクチン mRNA および蛋白レベル。トータル RNA と蛋白は 12 週間のビリベルジン治療後のそれぞれのグループ(n=10)のマウス腎から抽出した。(すべてのグループは n=8) **(c,d)** TGF-β1 とフィブロネクチン mRNA レベルは real-time RT-PCR にて測定された。mRNA レベルは β アクチンで補正し、結果は未治療 db/+マウスレベルに対しての平均パーセンテージ ±SE で示す。 **(e,f)** TGF-β1 とフィブロネクチンの蛋白レベルはウェスタンブロットにて解析した。写真は腎組織における TGF-β1 とフィブロネクチンのウェスタンブロットの代表的画像である。蛋白レベルは β アクチンで補正し、結果は未治療 db/+マウスレベルに対しての平均パーセンテージ±SE で示す。 *P<0.05; **P<0.01; *** P<0.001.

腎糸球体における TGF-β1 とフィブロネクチン mRNA 発現レベル。 **(g,h)** 腎糸球体から抽出された TGF-β1 とフィブロネクチン mRNA は real-time RT-PCR にて測定された。mRNA レベルは β アクチンで補正し、結果は未治療 db/+マウスレベルに対しての平均パーセンテージ±SE で示す。 *P<0.05; **P<0.01.

Fig.9

(a) ビリルビンと **(b)** ビリベルジンの培養ヒトメサンギウム細胞における NAD(P)H オキシダーゼ活性への影響。ビリルビンまたはビリベルジンは 48 時間それぞれの濃度でインキュベートした。5 分間バックグラウンドの割合を規定した後に NADPH が加えられ、Flex Station3 によりルシゲニン化学発光の上昇をモニターした。結果は平均値±SE で示す。 *P<0.05; **P<0.01. vs. NADPH 培養ヒト大動脈内皮細胞における **(c)** アンジオテンシン 2 および **(d)** 高血糖刺激による ROS 産生上昇に対するビリルビンの影響は 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)染色によって評価された。得られた蛍光画像はフォトショップソフトを用いてグレースケールへ変換し、蛍光強度は NIH イメージソフ

トを用いることで定量化した。結果はコントロール群に対しての平均パーセンテージ \pm SE
で示す。*P<0.05; **P<0.01.

Fig.10

ビリルビンとビリベルジンの培養ヒトメサンギウム細胞におけるアンジオテンシン 2 (100 nmol/l) 刺激による (a) NOX4 / (c) TGF / (d) フィブロネクチン mRNA 発現への影響。抽出された mRNA は real-time RT-PCR にて測定された。mRNA レベルは β アクチンで補正し、結果は未治療コントロールに対しての平均パーセンテージ \pm SE で示す。*P<0.05; **P<0.01; *** P<0.001. (b) NOX4 蛋白レベルはウェスタンブロットにて解析した。蛋白レベルは β アクチンで補正し、結果はコントロールレベルに対しての平均パーセンテージ \pm SE で示す。*P<0.05 vs Ang II

研究デザインおよび方法

ヒトメサンギウム細胞・培養

ほぼコンフルエントの状態となったヒトメサンギウム細胞(NHMC)の細胞増殖を停止および同期させるために24時間 BulletKitでインキュベートした。この後に5%FBSとアンギオテンシン2(AngII)100nMを加えた新しいBulletKitへメディアウム交換した。NHMCへAngIIと同様に1 μ Mビリルビン(Sigma, St Louis, MO)、1 μ Mビリベルジン、5mM Nアセチルシステイン(Sigma, St Louis, MO)、100 μ M α -リポ酸 (Sigma, St Louis, MO)をそれぞれ添加し、6, 12, 18 24 時間インキュベートした。

血液・尿検査

血清総ビリルビン・直接ビリルビン濃度は市販の測定キットを用いて測定した(Wako, Osaka, Japan)。尿中アルブミン濃度はラット・マウス アルブミンELISAキットにて測定(AKRAL-120 or 121; Shibayagi, Gunma, Japan)。酸化ストレスによるDNA損傷から生じる主要な産物である尿中8-OHdGは、DNAグアニン塩基の8ヒドロキシレーション(水酸化)後に酵素的切断で生じるものである。以前報告したのと同様に、競合的ELISAキット(8OHdG Check; Japan Institute for the Control of Aging, Fukuroi, Japan)を用いて測定した(4)。尿中8-epi-PGF₂ α 濃度は尿中イソプラスタンELISAキット(MED.DIA s.r.l., Italy)を用いて測定した。これらの尿の検討結果は尿中クレアチニン値による補正を行っている。

免疫組織染色

腎組織の8-OHdGとNOX4の免疫染色は以前の報告同様に行った(24)。腎組織の8-OHdGの陽性領域はフォトショップのソフトを用いてグレースケールに変換し、8-OHdG陽性領域の明度はScion imaging software(Scion, Frederick, MD)を用いて定量的解析を行った。8-OHdG陽性領域の半定量的解析を行うために切片をコード化し、実験プロトコールと無関係な観察者によりとり行うようにした。マウス・ラットはそれぞれ4つの実験群に分けら

れ、30箇所糸球体と尿細管領域を観察し、形態計測解析のために平均化していった。

腎組織におけるジヒドロエチジウム(DHE)染色

腎糸球体と尿細管でのROSを描出するためにDHE (Invitrogen, Carlsbad, CA)染色を行った。(dimethyl sulfoxideで100 mg/mlとして4°C保存。使用直前にPBSを用いて 2.5 μ g / μ l へ希釈。)ワーキング溶液をホイルで遮光した1mlシリンジへ移し、イソフルラン麻酔下マウスへ300 μ lを頸静脈より静脈投与した。DHE投与90分後に麻酔下マウスの左心室より4%ホルムアルデヒド40mlを灌流させた。固定の後、腎臓を15 μ mの厚さでスライスしスライドグラスに載せた。これらの切片は蛍光顕微鏡にて観察した(BZ-9000, Keyence, Osaka, Japan)。エチジウムブロマイドの検出のために、励起510-550nmと発光>580nmを蛍光顕微鏡にて評価した。DHE酸化領域の画像はフォトショップのソフトを用いてグレースケールに変換し、強度はScion imaging software(Scion, Frederick, MD)を用いて定量的解析を行った。DHE酸化領域の発光強度の半定量的解析を行うために切片をコード化し、実験プロトコールと無関係な観察者によりとり行うようにした。マウス・ラットはそれぞれ4つの実験群に分けられ、30箇所の糸球体と尿細管領域を観察し、形態計測解析のために平均化していった。

糸球体単離

マウスの糸球体単離は以前に報告された通りにとりおこなった(36)。マウスを麻酔し、8 x 10⁷ Dynabeads M-450 tosylactivated (DynaL A.S., Oslo, Norway)を40mlのPBSで希釈し、左心室より還流した。腎臓を摘出し、1mm³四方のミンチにし3mgのCollagenase Aと300ug Deoxyribonuclease I(RocheDiagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を3ml HBSS(Invitrogen, Grant Island, NY)へ混合し、37°C30分間で軽くかき混ぜてインキュベートした。コラゲナーゼによって消化された組織は扁平なすりこぎを用いて丁寧に100 μ mのcell strainer(BD Bioscience, Stockholom, Sweden)へ圧迫して通した。通過した細胞はもう一度新たなcell strainerを圧迫せずに通過させ、そのcell strainerを10mlのハンクス液で洗浄した。細胞懸濁液は200g 5分で遠心分離した。上清を除去し細胞のペレットを2ml

のハンクス液でサスペンドした。最後にダイナビーズを含んでいる糸球体はMagnetic Particle Concentrator (DynaLab A.S., Oslo, Norway)によって集められた。液体の吸引の後に、チューブの壁を300 μ lのハンクス液で洗浄し糸球体を回収した。吸引された液体は再利用し、上記の手順を少なくとも5回は繰り返して行った。

RT-PCR

Total RNAはIsogen(Nippon Gene, Tokyo, Japan),を用いて凍結腎検体から抽出した。また、ヒトメサンギウム細胞とマウス糸球体においてはRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA)を用いて抽出した。抽出した4 μ gのRNAはSuperscript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて一本鎖cDNAへ変換した。mRNA発現レベルはBio-Rad Chromo 4/Opticon system の機器により、iTaq SYBR Green mix (Bio-Rad, Hercules, CA)を用いてquantitative RT-PCRを行い定量した。プライマーは以下の通りである。

ラット:

NOX4, 5'-GGGCCTAGGATTGTGTTTGA-3' (sense) and

5'-CTGAGAAGTTCAGGGCGTTC-3' (antisense);

p22phox, 5'-TGTTGCAGGAGTGCTCATCTGTCT-3' (sense) and

5'-AGGACAGCCCGGACGTAGTAATTT-3' (antisense);

p47phox, 5'-AGCTCCCAGGTGGTATGATG-3' (sense) and

5'-ATCTTTGGCCGTCAGGTATG-3' (antisense);

TGF- β 1, 5'-ATACGCCTGAGTGGCTGTCT -3'(sense) and

5'-TGGGACTGATCCCATGATT -3' (antisense);

fibronectin, 5'-GAAAGGCAACCAGCAGAGTC -3'(sense) and

5'-CTGGAGTCAAGCCAGACACA -3' (antisense);

β -actin, 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC -3'(sense) and

5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3' (antisense).

マウス:

NOX4, 5'-ATTTGGATAGGCTCCAGGCAAAC-3' (sense) and
5'-CACATGGGTATAAGCTTTGTGAGCA-3' (antisense);
p22phox, 5'-TGGCTACTGCTGGACGTTTCAC-3' (sense) and
5'-CTCCAGCAGACAGATGAGCACAC-3' (antisense);
p47phox, 5'- ATACTTCAACGGCCTCATGG-3' (sense)
and 5'-CTGTTCCCGAACTCTTCTCG -3' (antisense);
TGF- β 1, 5'-GCAGTGGCTGAACCAAGGA -3'(sense) and
5'-GCAGTGAGCGCTGAATCGA -3' (antisense);
fibronectin, 5'-ACATGGCTTTAGGCGGACAA -3'(sense)
and 5'-ACATTCCGGCAGGTATGGTCTTG -3' (antisense);
 β -actin, 5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGA -3'(sense)
and 5'-GCTGGAAGGTGGACAGTGAG-3' (antisense).

ヒト:

NOX4, 5'- CTTCGGTTGGTTTGCAGATT-3' (sense) and
5'- TGGGTCCACAACAGAAAACA-3' (antisense);
TGF- β 1, 5'- TCTCCGACCTGCCACAGAT-3'(sense) and
5'- GTATCCCACGGAAATAACCTAGATG-3' (antisense);
fibronectin, 5'- ACCAACCTACGGATGACTCG-3'(sense) and
5'- GCTCATCATCTGGCCATTTT-3' (antisense);
 β -actin, 5'- GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'(sense) and
5'- AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3' (antisense).

それぞれのmRNA発現レベルはハウスキーピング遺伝子の β アクチンによって補正している。

形態学的検討

それぞれの切片は糖尿病発症後24週目Gunnラットのホモ接合体とヘテロ接合体から取り出してきたものおよび、24週齢のdb/db, db/+マウス(12週間の治療後の検体)から取り出してきたものである。糸球体の形態解析のために切片へPAS染色が行われた。メサンギウム基質はメサンギウム領域におけるPAS陽性で核のない領域とした。PAS陽性・無核領域の画像はフォトショップのソフトを用いてグレースケールに変換し、強度はScion imaging software(Scion, Frederick, MD)を用いて定量的解析を行った。メサンギウム領域拡大の半定量的解析を行うために切片をコード化し、実験プロトコールと無関係な観察者によりとり行うようにした。マウス・ラットはそれぞれ4つの実験群に分けられ30箇所糸球体を観察し、形態計測解析のために平均化していった。

ウェスタンブロット

NOX4, TGF- β 1, fibronectinのウェスタンブロットを行うため、腎組織を溶解バッファー(0.25 M sucrose, 1 mM EDTA)に入れホモジナイズして、5分間16000rpm遠心した。蛋白濃度はBCATM Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, IL, USA)を用いて測定した。SDSポリアクリルアミドゲル(7.5% for NOX4 and TGF- β 1 : 5% for fibronectin) の各レーンへ50-100 μ gの蛋白をアプライした。そして、PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA)へ転写した。非特異的結合域のブロッキングの後、rabbit polyclonal anti-NOX4 (1:1500 ; ab60940; Abcam), rabbit polyclonal anti-TGF- β 1 (1:1000 ; ab53169; Abcam, Cambridge, UK), mouse monoclonal anti-fibronectin (1:2500 ; #610077; BD Bioscience, San Jose, CA)のそれぞれの抗体を4°Cオーバーナイトにてインキュベートした。二次抗体として、HRP結合したsheep anti-mouse IgG antibody (1:5000; Amersham Pharmacia Biosciences, Buckinghamshire, UK) または donkey anti-rabbit IgG antibody (1:5000; Amersham Pharmacia Biosciences, Buckinghamshire, UK)を使用した。描出にはECL Plus system (Amersham Pharmacia Biosciences, Buckinghamshire, UK)を使用した。

フリーラジカルの測定

正常ヒトメサンギウム細胞(NHMC)はLonza (Walkersville, MD)から購入した。NHMCは5%FCS加BulletKit(Lonza)で培養した。実験にはPassage2-4の細胞を使用した。細胞で産生されたスーパーオキシドアニオンルシゲニン化学発光によって検討した。各濃度のビリルビン・ビリベルジンをNHMCへ添加し48時間培養した。それらをトリプシンにて剥がし、モディファイドしたHEPESバッファーにてホモジナイズした。以下を含む < (mmol/L) NaCl 140, KCl 5, MgCl₂ 0.8, CaCl₂ 1.8, Na₂HPO₄ 1, HEPES 25, and 1% glucose (pH 7.2)> 。マウスからの腎皮質組織は上記のバッファーを用いてホモジナイズし、16,000rpmで15分遠心した。記録の直前にNADPH (100 μM) と 暗順応したルシゲニン (10 μM)を細胞および組織のホモジネートへ加えた。発光は10分間10秒おきに測定され、relative light unitsで表された。実験はそれぞれトリプリケートで行われた。それぞれの実験でポジティブコントロールとしてNADPHを添加し、化学発光の記録を行う前にDPI(10 μM)が加えられた。スーパーオキシド産物は蛋白1gあたりのrelative light unitsで表している。蛋白濃度はBCATM Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, IL, USA)を用いている。

細胞内のROS産生はDCF-DA (Molecular Probes, Eugene, OR) 染色法にて評価した。細胞がほぼコンフルエントになった時点で、1%FBS / 100mg/dl グルコース加のDulbecco's modified Eagle's mediumへメディウムを交換し、24時間培養した。その後予め設定した間隔でテストメディウムへ交換し、phenol-red free Hanks液で洗浄した。その後（フリーに細胞を通過して細胞内のオキシダントと相互作用し、蛍光化合物DCFを形成する）非蛍光化合物のDCF-DA(2 μM)を添加した。20分後DCF蛍光のデジタル画像は蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan)で撮影。488nm励起光(アルゴンレーザー)、515nm発光フィルターを用いた。得られた蛍光画像はフォトショップソフトを用いてグレースケールへ変換し、蛍光強度はNIHイメージソフトを用いることで定量化した。