

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08319

研究課題名(和文)慢性腎臓病におけるインスリン抵抗性の発症機序解明と治療への応用

研究課題名(英文) Retention of acetylcarnitine in chronic kidney disease causes insulin resistance in skeletal muscle

研究代表者

小林 正貴 (Kobayashi, Masaki)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10195810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎不全(CKD)患者で合併するインスリン抵抗性(IR)の発症機序は未だ不明である。骨格筋ミトコンドリア(Mt)でアセチルCoA(AcCoA)が増加すると、細胞内代謝が停滞してIRが惹起されると考えられる。本研究では、CKD患者の腎機能低下に伴う血清AcCT濃度の有意な増加を確認した。また、骨格筋培養細胞では、アセチル基の転換酵素(CrAT)により、AcCTがAcCoAとCTへ逆変換され、Mt内AcCoAが蓄積する事で、IRが惹起される事を確認した。したがって、CKD患者では、血中で増加するAcCTが骨格筋Mt内でAcCoAの蓄積を引き起こしてIR発症をもたらす機序が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Insulin resistance (IR) occurs frequently in patients with chronic kidney disease (CKD), but the mechanisms are unclear. An increase in the mitochondrial acetyl-CoA (AcCoA) causes IR in skeletal muscles, and mitochondrial AcCoA level is regulated by carnitine acetyltransferase (CrAT) that exchanges acetyl-moiety between CoA and carnitine (CT). Present study evaluated hypothesis that retention of acetylcarnitine (AcCT) might cause IR in CKD patients. Serum AcCT concentration in CKD patients was significantly increased with reduction of renal function. AcCT treatments on cultured myotubes significantly inhibited insulin-dependent glucose uptake. The added AcCT was converted to CT via reverse CrAT reaction, and thus the AcCoA concentration and AcCoA/CoA ratio in mitochondria were significantly elevated. The results suggest that increased serum AcCT in CKD patients causes AcCoA accumulation in mitochondria, which leads to IR in skeletal muscle.

研究分野：腎臓病学

キーワード：CKD インスリン依存性 カルニチン

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) では、しばしばインスリン抵抗性 (IR) が合併し、それ自身 CKD 進行のリスクとなり、心血管イベントの発生率も高める。CKD による IR 発生機序は未だ不明であり、予防法や治療法は確立されていない。

我々は、CKD 患者において、血中アセチルカルニチン (AcCT) 濃度が増加し、HOMA-IR との間に正の相関が観察されることから、AcCT が IR の発症メカニズムに関与している可能性がある。AcCT は、骨格筋ミトコンドリア内での脂肪酸  $\beta$  酸化反応に必須であるカルニチン (CT) の代謝物である。脂肪酸は、CT と反応してアシルカルニチンを形成する事で、ミトコンドリア内膜を通過する。ミトコンドリアマトリックス内に取り込まれたアシルカルニチンは、遊離 CoA との反応でアシル CoA に転換される事で、CT が遊離される。ミトコンドリアでの  $\beta$  酸化により、アシル CoA は、アセチル CoA (AcCoA) に酸化され、TCA 回路でのエネルギー代謝に利用される。その際、TCA 回路での処理量を超える AcCoA は、ミトコンドリア内のカルニチンアセチルトランスフェラーゼ (CrAT) により、AcCoA のアセチル基と遊離 CT により、AcCT と遊離 CoA に転換される (CrAT の順反応)。生成された AcCT は、ミトコンドリアから血液中へ放出され、最終的に尿中へ排泄される。この反応は、ミトコンドリア内に AcCoA が過剰に蓄積すると、AcCoA を生成するエネルギー代謝経路に対し、フィードバック反応が働く事で停滞する事を防ぐためと考えられている。しかし、CrAT の反応は可逆性であるため、AcCT がミトコンドリア内に過剰に逆流すると、AcCoA が生成され、蓄積する可能性がある。そのため、我々は、血中の AcCT 濃度上昇が、ミトコンドリア内の AcCoA の蓄積をもたらし、解糖系を含むエネルギー代謝の停滞を引き起こし、最終的に IR を発症させるとの仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究では、CKD 患者で生じる原因不明の IR が、CKD 状態で上昇する血中 AcCT がインスリン依存性の骨格筋糖取込みを抑制するとする仮説を立証するために、CKD 患者における血中 AcCT 濃度の状態、及び、AcCT が IR を引き起こす機序について検討する事を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) CKD 患者における検討

東京医科大学茨城医療センターの糖尿病患者・透析患者を除く CKD 患者 75 名 (慢性糸球体腎炎 36 名、IgA 腎症 15 名、高血圧性腎症 8 名、ループス腎炎 5 名、膜性腎症 4 名、多発性嚢胞腎 3 名、ANCA 関連血管炎 2 名、巣状糸球体硬化症:1 名、尿細管間質性腎炎 1 名; 男女比 42/33, 平均年齢  $62.5 \pm 1.6$  歳) と、健康対照群として、健康診断受検者 48 名 (非 CKD; 男女比 26/22, 平均年齢  $34.5 \pm 8.3$  歳) を対象に、インフォームドコンセントを得て、臨床検査で採取した血清

の検査未使用分を回収し、サンプルとして用いた。

LC-MS/MS 装置を用いて血清中の CT 濃度と AcCT 濃度を、酵素法により血清中クレアチン濃度を測定した。血清クレアチン濃度、年齢、性別にて、推定糸球体濾過率 (eGFR) を算出した。実験計画は、東京医科大学茨城医療センターの臨床研究倫理審査委員会にて承認された (承認番号 12-34)。

### (2) 骨格筋培養細胞における検討

AcCT の IR 発症機序を検討するため、マウス C2C12 筋芽細胞とヒト筋芽細胞を用いた。マウスとヒトの筋芽細胞をコンフルエントに達するまで増殖させた後、分化誘導培地で 5 日間培養して得られる筋管細胞を実験に用いた。

筋管細胞における IR への AcCT 添加の評価には、2-デオキシグルコース (2DG) 代謝速度測定キット (Cosmo Bio 社) を用いた。マウスとヒトの筋管細胞に、0, 50, 100, 300  $\mu\text{M}$  の AcCT を添加し 24 時間後に、インスリン依存性の 2DG 細胞内取込量を測定した。

添加 AcCT の筋管細胞内動態 (CT への変換) の評価に、CT の安定同位体である三重水素体 ( $d_3$ )、ならびに、AcCT 非安定同位体 ( $d_0$ ) を用いた。マウス筋管細胞に、50  $\mu\text{M}$  の CT- $d_3$  と共に、0~300  $\mu\text{M}$  の AcCT- $d_0$  を添加し 24 時間後に、ミトコンドリア内の CT- $d_3$  量、AcCT- $d_3$  量、CT- $d_0$  量、AcCT- $d_0$  量を測定した。CT と AcCT の定量は、LC-MS/MS 装置を用いて行った。

AcCT 添加がミトコンドリア内の AcCoA 量の変化に及ぼす影響を評価するために、マウス筋管細胞に、0~300  $\mu\text{M}$  の AcCT を添加し、24 時間後に AcCoA 量と遊離 CoA 量を、LC-MS/MS 装置にて測定し、ミトコンドリア内の AcCoA 濃度の遊離 CoA 濃度に対する比 (AcCoA/CoA 比) を算出した。

ミトコンドリア CrAT 活性に及ぼす AcCT の影響を評価するため、マウス筋管細胞よりミトコンドリアを単離し、ホモジネート後、試験管内で 500  $\mu\text{M}$  AcCT と 500  $\mu\text{M}$  CoA 存在下で、20 分間までインキュベーションし、5 分毎の AcCoA と遊離 CT の生成量を、LC-MS/MS 装置にて測定した。

## 4. 研究成果

図1に、CKD 患者と対照群における血清 CT 濃度と血清 AcCT 濃度、ならびに、CKD 患者における血清 AcCT 濃度と腎機能との相関関係を示した。血清 CT 濃度には、対照群と CKD 患者間で差は見られなかった (図1A)、血清 AcCT 濃度では、対照群と比較して、CKD 患者で有意な増加が確認された (図1B)。また、CKD 患者において、腎機能の指標である eGFR 値と血清 AcCT 濃度との間に、有意に負の相関関係があった ( $r^2=0.27074$ ,  $P<0.0001$ )。一方、血清 CT 濃度には、eGFR 値との間に相関関係はみられなかった。

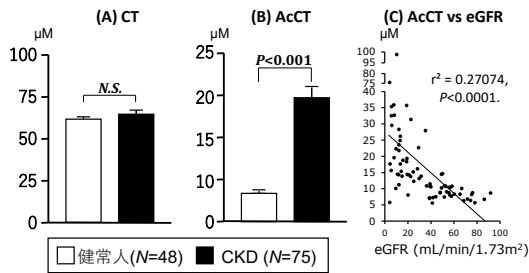


図1. CKD患者と対照群における血清CT・AcCT濃度の比較とCKD患者における血清AcCT濃度と腎機能との関係。(A)血清CT濃度の対照群とCKD患者間の比較。(B)血清AcCT濃度の対照群とCKD患者間の比較。(C)CKD患者における血清AcCT濃度とeGFRとの関係。棒グラフの値は、平均±標準誤差で表示。CT: カルニチン, AcCT: アセチルカルニチン, eGFR: 推算糸球体濾過量)

図2に、マウスとヒトの筋管細胞におけるAcCT添加が、インスリン依存性糖取込みに及ぼす影響について示した。マウス筋管細胞(図2A)とヒト筋管細胞(図2B)共に、添加したAcCT濃度依存的に、インスリン存在下での細胞内への糖(2DG)の取込み量が、有意に減少した。

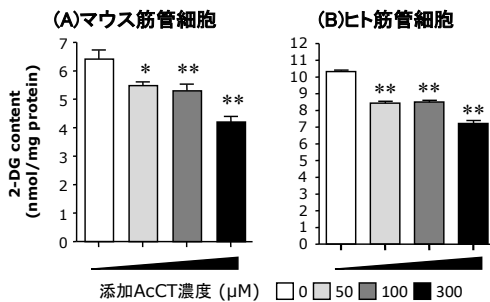


図2. 骨格筋培養細胞におけるAcCT添加によるインスリン依存性糖取込みの低下。マウスC2C12筋管細胞(A)とヒト筋管細胞(B)に、AcCT(0-300μM)を添加し、インスリン存在下での2DGの細胞内への取込み量を測定した。グラフの値は、平均±標準偏差で表示。\*P<0.05, \*\*P<0.01は、0μM添加条件との比較。2DG: 2-デオキシグルコース, AcCT: アセチルカルニチン。

図3に、マウス筋管細胞に添加されたAcCTがミトコンドリア内においてCTへ逆転換される変化を示した。細胞にAcCT(非重水素体d0)を添加すると、濃度依存的にミトコンドリア内のAcCT-d0体濃度が有意に増加した(図3B)。それに伴い、添加したAcCT-d0からCrATの逆方向の転換反応により生じるCT-d0体濃度も、AcCT-d0添加濃度依存的に有意に増加し、その増加は、AcCT-d0体よりも高かった(図3A)。一方、AcCT-d0体と共に添加したCT三重水素体(d3)体のミトコンドリア内濃度は、AcCT-d0体添加濃度依存的に有意に低下し(図3C)、CT-d3体由来のAcCT-d3体も有意に低下した(図3D)。

図4に、マウス筋管細胞にAcCTを添加した際のミトコンドリア内AcCoAと遊離CoAの濃度比(AcCoA/CoA比)を測定した結果を示した(図4A)。ミトコンドリアAcCoA/CoA比は、添加AcCT濃度依存的に増加し、300 μM AcCTの添

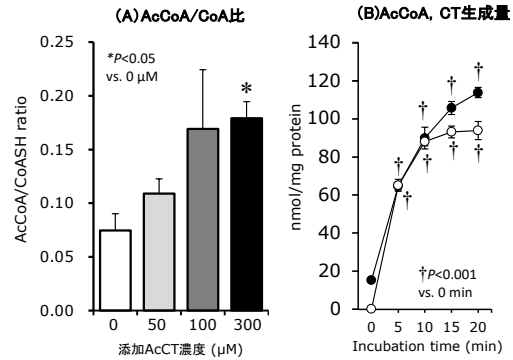


図4. マウス筋管細胞におけるAcCT添加によるミトコンドリア内AcCoA/遊離CoA比とミトコンドリア内CrAT活性への影響。マウス筋管細胞に、AcCT(0-300μM)を添加した後、ミトコンドリア内のAcCoAと遊離CoAを測定し、AcCoA/遊離CoAを算出した(A)。マウス筋管細胞よりミトコンドリアを単離し、ホモジネート後に500μM AcCTと500μM遊離CoAと共にインキュベーションし、AcCoA量と遊離CT量を測定した(B)。グラフの値は、平均±標準誤差(A)と平均±標準誤差(B)で表示。AcCoA: アセチルCoA, CoA: 遊離CoA, CT: 遊離カルニチン, CrAT: カルニチンアセチルトランスフェラーゼ

加にて、非添加と比較して有意な増加が見られた。また、図4Bに、マウス筋管細胞ミトコンドリアのCrAT活性に対するAcCT添加の影響を示した。単離したミトコンドリアへAcCT(500 μM)と遊離CoA(500 μM)を添加し、20分までインキュベーションした結果、AcCoA生成量と遊離CT生成量がインキュベーション時間依存的に有意に増加した。

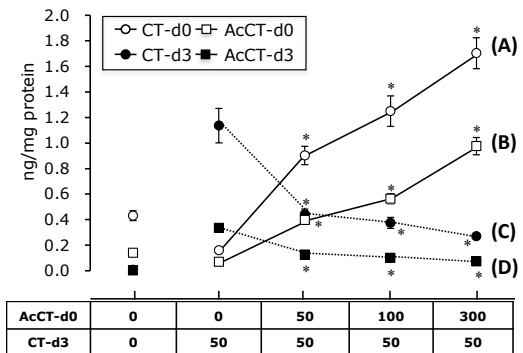


図3. マウス筋管細胞における添加AcCTのミトコンドリア内でのCTへの転換。マウス筋管細胞に、50μM CT安定同位体(d3体)と共に、AcCT(非同位体d0体)(0-300μM)を添加した後、ミトコンドリア内の添加したAcCT-d0体由来のCT-d0体(A: CrAT逆反応)、添加したAcCT-d0体(B)、添加したCT-d3体(C)、添加したCT-d3体由来のAcCT-d3体(D: CrAT順反応)を測定した。グラフの値は、平均±標準誤差で表示。\*P<0.01は、0μM AcCT-d0/50μM CT-d3添加条件との比較。AcCT: アセチルカルニチン, CT: カルニチン, d0: 非重水素体, d3: 三重水素体。

以上の結果をまとめると、対照群と比較し、CKD患者では、血清AcCT濃度が有意に増加しており、その増加は、腎機能の悪化に有意に伴っていた(図1)。

骨格筋培養細胞を用いて検討した結果、AcCTにより、IRが誘発された(図2)。骨格筋細胞へ添加されたAcCTは、ミトコンドリア内でCTに転換される事が確認された(図3)。また、AcCT添加濃度依存的にミトコンドリア内

AcCoA/CoA 比が有意に増加した(図4A)。さらに、単離ミトコンドリアにおいて、AcCT が、CrAT による逆反応 (AcCT + 遊離 CoA → AcCoA + 遊離 CT) を促進する事が確認された(図4)。

以上の結果から、CKD 患者では腎機能の低下に伴う AcCT 尿排泄不全によって増加する血中 AcCT が、ミトコンドリア内での CrAT の反応を逆方向に促進し AcCoA を増加させる事で、IR を惹起させている可能性が示唆された。この機序が、CKD 患者で観察される原因不明の IR の発症メカニズムの一端である事が推測される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Miyamoto Y, Miyazaki T, Honda A, Shimohata H, Hirayama K, Kobayashi M. Retention of acetylcarnitine in chronic kidney disease causes insulin resistance in skeletal muscle. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 59(3):199-206, 2016. (査読有り)

[学会発表] (計2件)

1. Miyamoto Y, Miyazaki T, Honda A, Shimohata H, Hirayama K, Kobayashi M. Retention of acetylcarnitine in chronic kidney disease causes insulin resistance in skeletal muscle. Kidney Week 2015. November 3-8, 2015. San Diego, CA. USA.
2. 宮本和宜, 宮崎照雄, 本多彰, 下畑誉, 小林正貴. 慢性腎臓病 (CKD) の骨格筋糖代謝に対する血中アセチルカルニチン (AcCT) 濃度上昇の関与. 第 7 回三大学交流セミナー. 2月16日, 2015年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

小林 正貴 (KOBAYASHI, Masaki)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10195810

##### (2)研究分担者

本多 彰 (HONDA, Akira)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10468639

下畑 誉 (SHIMOHATA, Homare)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 90516030

宮崎 照雄 (MIYAZAKI, Teruo)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60532687

(3)連携研究者

なし