

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09718

研究課題名(和文) S-アデノシルメチオニン(SAM)代謝の変異の糖尿病腎症の病態に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of role of changing S-adenosylmethionine (SAM) metabolism for the pathogenesis of diabetic kidney disease

研究代表者

北田 宗弘 (KITADA, Munehiro)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40434469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：低蛋白質食(LPD)に対するメチオニン(Met)の添加は、LPDの2型糖尿病/肥満ラットの腎障害に対する腎保護効果を無効化したことから、LPDが低Met摂取を介して腎保護効果を発揮していることを見出した。Metは、S-アデノシルメチオニン(SAM)の蓄積を介して糖尿病ラットの腎障害につながる可能性があるが、これはSAM代謝酵素Gnmtの発現の低下に起因し、さらにTORC1の活性化とオートファジーの低下に関連していると考えられた。したがって、腎におけるGnmtの活性化は、腎内SAMレベルを減少するため、糖尿病性腎臓病の治療標的になる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床上、低蛋白質食は糖尿病性腎臓病を含む慢性腎臓病抑制の為の食事療法であるが、不適切な低蛋白質食は、蛋白質-エネルギーバランスの不均衡やカルシウムなどの栄養障害の危険を伴う。低メチオニン食や、メチオニン含有量が豊富な赤身肉などの動物性蛋白質の回避は、低蛋白質食の栄養障害の危険の軽減とともに低蛋白質食代替え食となる可能性がある。低メチオニン食は、健康的な代謝の維持、心血管疾患の抑制などの利点を提供することに加えて、糖尿病性腎臓病を有する2型糖尿病患者にとっての新規食事療法となり得る。しかし低メチオニン食が1日の糖尿病性腎臓病を抑制できるかについては更なる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：A low-protein diet (LPD) exerts the renoprotective effect through the suppression of mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and improvement of autophagy in Wistar fatty (fa/fa) rats (WFRs), type 2 diabetes/obesity. Results of metabolome analysis in blood of rats demonstrated that the levels of S-adenosylmethionine (SAM), metabolite of methionine (Met), is clearly increased in the blood of WFRs compared to non-diabetic control rats, and a LPD decreases it. In addition, the expression of glycine-N-methyltransferase (Gnmt), which is the main metabolic enzyme for SAM, is significantly decreased in the WFRs, compared to non-diabetic control rats. In the present study, we found that the addition of Met with the LPD abrogates the beneficial effects induced by the LPD in diabetic kidney. A LPD could exert a renoprotective effect through the suppression of mTORC1 and restoration of autophagy, which is associated with reduced levels of SAM due to low-Met intake, in diabetic kidney.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病性腎臓病 2型糖尿病ラット 低蛋白質食 メチオニン S-アデノシルメチオニン オートファジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

低蛋白質食(LPD)は、糖尿病性腎臓病を含む慢性腎臓病に対して腎保護効果を期待できる食事療法として認識されているが、その詳細な機序は明らかではない。以前我々は、LPDは、2型糖尿病/肥満 Wistar fatty(fa/fa)ラット(WFRs;DM)の腎における mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1)の活性化の抑制とオートファジーの改善を介して腎保護効果を発揮することをこれまで報告してきた(Kitadaら.Diabetologia. 2016)。それらラットにおける血漿メタボローム解析の結果、DMにてメチオン(Met)代謝産物 S-アデノシルメチオン(SAM)が非糖尿病(Cont)に比べ著明に増加し、LPDにて低下を認めたことから、糖尿病性腎臓病(DKD)の進展に Met/SAM代謝の変異が関与しているとの仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究では低蛋白質食の腎保護効果に関して、Met/SAM代謝の変異及び腎障害の進展機序をmTORC1とオートファジー制御の観点から解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

In Vivo 実験:24週齢雄ラット(Wistar fatty (fa/fa)(糖尿病:DM), Wistar lean (非糖尿病コントロール:Cont)を、1)Cont, 2)DM+STD(標準食:蛋白質 23.84%,Met0.64%),3)DM+LPD(蛋白質 5.77%,Met 0.15%),4)DM+LPD+Met 添加食(標準食と同等:0.64%)に分別し20週間介入。体重,随時血糖値,腎重量,下肢筋重量,精巣上体/後腹膜脂肪重量,HbA1c,腎組織(マツトトリクロム MT,PAS 染色),Kidney injury molecule-1(Kim-1)免疫組織染色,電子顕微鏡下ミトコンドリア形態(近位尿細管細胞,腎SAM免疫組織染色,腎皮質SAM量(LC/MS/MS),尿中アルブミン/クレアチン(Cr)比(UACR),L-FABP/Cr比(ULFAB),8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)/Cr比,血中コレステロール(T-CHO),中性脂肪(TG),血中fibroblast growth factor21(FGF21),腎皮質SAM代謝酵素グリスリン N-メチルトランスフェラーゼ(Gnmt),Leucine carboxy methyltransferase1(LCMT1),メチル化protein phosphatase 2A(PP2A)発現(ウエスタンブロット:WB),mTORC1活性化(p-S6RP:WB),オートファジー-(p62:WB),3型コラーゲン・Kim-1・tumor necrosis factor-(TNF-)・CD68 mRNA発現(RT-PCR)を評価。Gnmt(-/-)マウス(B6.129-Gnmt<sup>tm1Cwa</sup>/J)/野生型マウスの腎皮質における48時間絶食誘発オートファジーをクロマチン50µg/g体重投与下にLC3I/II発現をWBにて評価。In Vitro 実験:培養human kidney 2(HK-2)細胞(腎近位尿細管細胞株)にハルクスの元,4mM SAMを添加し,メチル化PP2A,p-S6RP発現をWBにて評価。

### 4. 研究成果

#### (1)実験ラットの特徴(図1,2)

実験開始時,体重はDMラット3群間で有意差はなく,DM+STD群は,実験期間中DM+LPDとDM+LPD+Met群より体重増加した(図1A)。DM+LPD,DM+LPD+Met群の体重と精巣上体/後腹膜脂肪重量は,DM+STD群よりも有意に低かった(図1B,C)。DMラットでは,LPDとLP+Met食間に体重・精巣上体/後腹膜脂肪重量に差はなかった(図1B,C)。LPD,LP+Met食ともにDMラットの下肢筋重量に影響を与えなかった(図1D)。DM+LPD,DM+LPD+Met群の腎臓重量は,DM+STD群よりも有意に低かった(図1E,F)。DMラットでは,LPDとLP+Met食の腎臓重量に差はなかった(図1E,F)。DM+LPD群は,DM+STD群より自由摂食下でより低い血糖値を示した。一方,DM+LPD+Met群は,自由摂食下で血糖の高値を示し,DM+STD群と同等であった(図2A)。DMラットでは,LPDにより,自由摂食時の平均血糖値とHbA1cが改善された(図2B,C)。しかし,LP+Met食は,DM状態に対するLPDの効果を無効化し,HbA1cと平均血糖値の上昇を示した(図2B,C)。実験期間中の平均食物摂取量(g/日)は,DM+LPD,DM+LPD+Met群の両方で,DM+STD群と比べ減少した(図2B,C)。しかしDM+LPDとDM+LPD+Met群間の平均食物摂取量に差はなかった(図2D)。空腹時の血中T-CHO,TGも,Cont群と比較して,DM+STDで有意に上昇した(図2E,F)。DM+STD群のT-CHOの増加は,LPDにて低下したが,DM+LPD+Metでは上昇した。

LPD, LP+Met 食は, DM ラットの TG に差示さなかった(図 2E, F). 血漿 FGF21 は, DM+LPD 群で増加したが, LP+Met 食ではを低下した(図 2G). DM+STD 群における UACR, ULFAB 排泄量は, Cont 群と比べて増加したが, LPD は, DM ラットのそれらを低下した(図 2H, I). 一方, LP+Met 食は, DM ラットの UACR と ULFAB 排泄量に対する LPD の効果を無効化(図 2H, I). さらに, Cont 群と比べて, DM+STD 群では尿中 8-OHdG 排泄が増加し, LPD にて低下したが, DM+LPD+Met 群では増加した(図 2J).

### (2)腎線維症と尿細管細胞障害の変化(図 3)

尿細管間質領域の腎線維化, Kim-1 発現, 腎皮質における Col3, Kim-1, Cd68, Tnf- $\alpha$  の mRNA 発現は, Cont 群に比べて DM+STD 群で有意な増加を認めた. これら線維化, 尿細管障害, 炎症性変化は, LPD によって改善されたが, LP+Met 食では悪化した.

### (3)腎における Gnmt と SAM 発現の変化(図 4)

Gnmt 発現は, Cont 群と比較して DM+STD 群の腎皮質で減少した. LPD, LP+Met 食ともに DM ラットの Gnmt 発現レベルに影響を与えなかった. SAM 免疫組織染色強度は, Cont 群と比較して, DM+STD 群の腎尿細管細胞で増強し, LPD はそれを低下したが, LP+Met 食は増加した. DM+STD 群の腎皮質では, LCMT1 とメチル化 PP2A の発現が, Cont 群と比較して増加し, LPD は, それらを低下したが, DM+LPD+Met 群では増加した.

### (4)腎における mTORC1 経路活性化の変化(図 5)

DM+STD 群は, Cont 群と比較して腎尿細管の p-S6RP 発現の増加を示し, LPD はその発現を低下したが, LP+Met 食は, 増加した.

### (5)近位尿細管細胞(PTC)のミトコンドリア形態とオートファジーの変化(図 6)

DM+STD 群は, PTC のミトコンドリアの形態変化を示し, LPD はそれ改善したが, LP+Met 食は, ミトコンドリア形態的異常に対する LPD の効果を無効化した. p62 発現は, DM+STD 群の腎皮質で増強され, LPD は, それを低下したが, DM+LPD+Met 群は, その増加を示した.

### (6)培養 HK-2 細胞およびマウスの腎皮質におけるオートファジーと培養 HK-2 細胞におけるメチル化 PP2A・p-S6RP 発現に対する SAM の効果

SAM は, 培養 HK-2 細胞において, アミノ酸飢餓誘導性オートファジーを抑制した. さらに肝や腎などの臓器に SAM の蓄積を示す Gnmt(-/-)の腎皮質では, 野生型マウスと比較して, 48 時間の飢餓誘発性の腎皮質オートファジーが抑制された. さらに SAM は, 培養 HK-2 細胞においてメチル化 PP2A と p-S6RP の発現を増加した.

**結論:**本研究では, LPD に対する Met の添加は, LPD の 2 型糖尿病/肥満ラットの腎障害に対する腎保護効果を無効化し, LPD が低 Met 摂取を介して腎保護に有益な効果を発揮することを示した. つまり, Met は SAM の蓄積を介して糖尿病ラットの腎障害につながる可能性があるが, これは Gnmt の発現の低下に起因し, さらに mTORC1 の活性化とオートファジーの低下に関与していると考えられた. したがって, 腎における Gnmt の活性化は, 腎内 SAM レベルを減少するため, 糖尿病性腎臓病の治療標的になる可能性がある. さらに, Met は, LPD による血漿 FGF21 の増加を無効化し, 糖尿病+LPD における糖尿病状態を悪化させる. しかし, 低 Met 食が糖尿病における腎障害を LPD と同様に抑制できるかどうかを解明するには, さらなる研究が必要である.

Figure 1

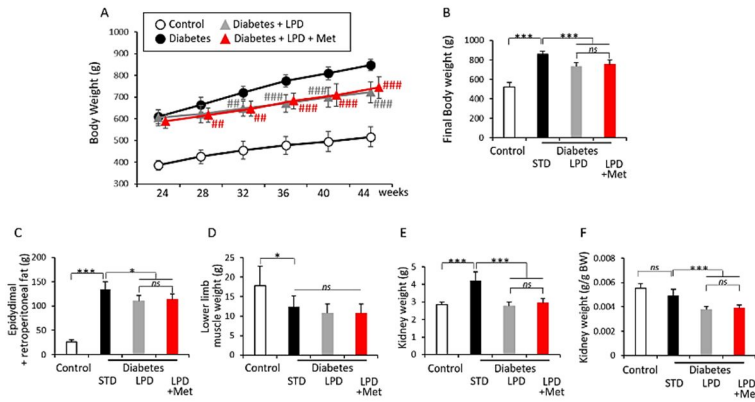


Figure 1: ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  vs DM, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs indicated groups, ns : not significant

Figure 2

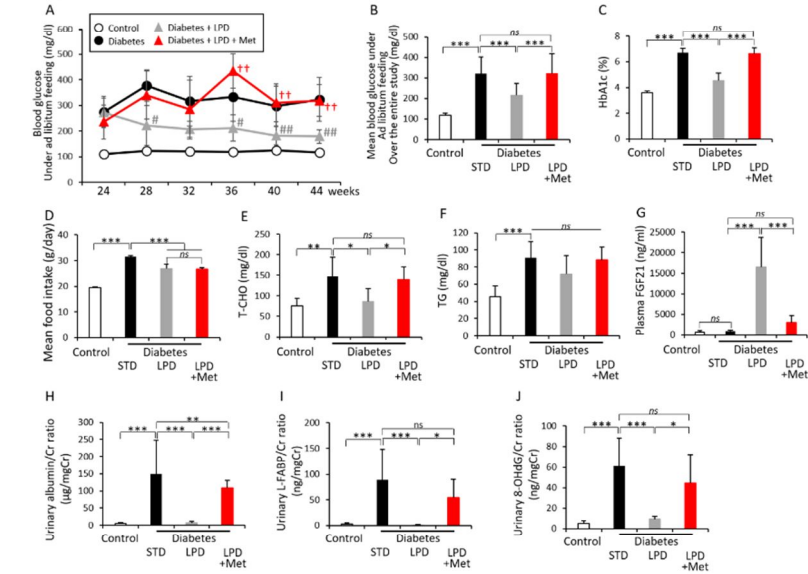


Figure 2: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs DM, †† $p < 0.01$  vs DM+LPD, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs indicated groups. ns : not significant

Figure 3

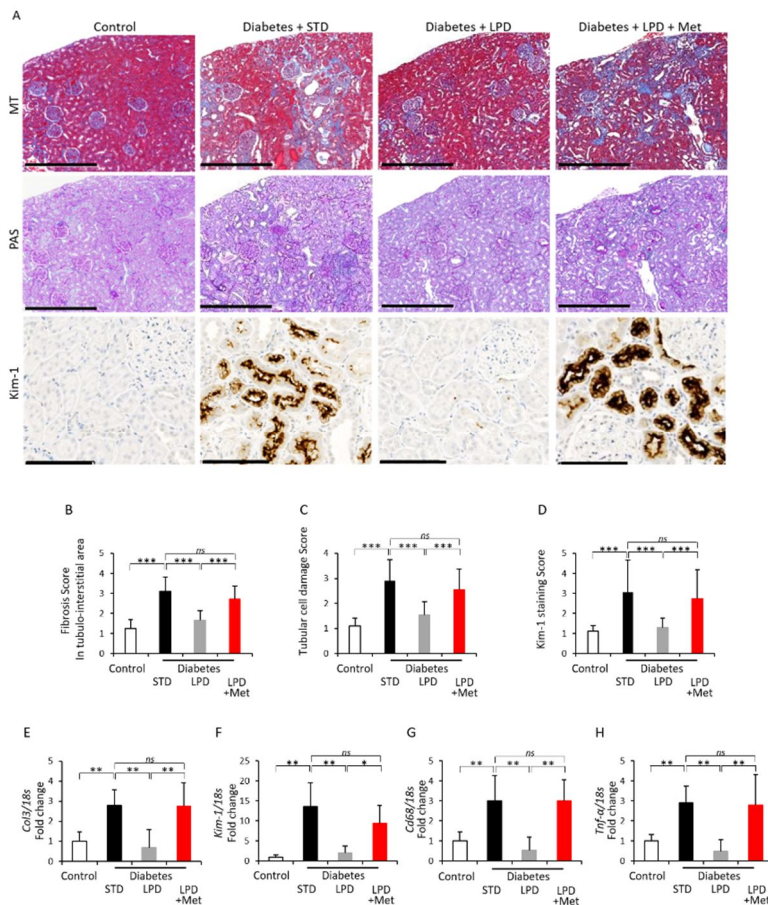


Figure 3: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs indicated groups. ns : not significant.

Figure 4

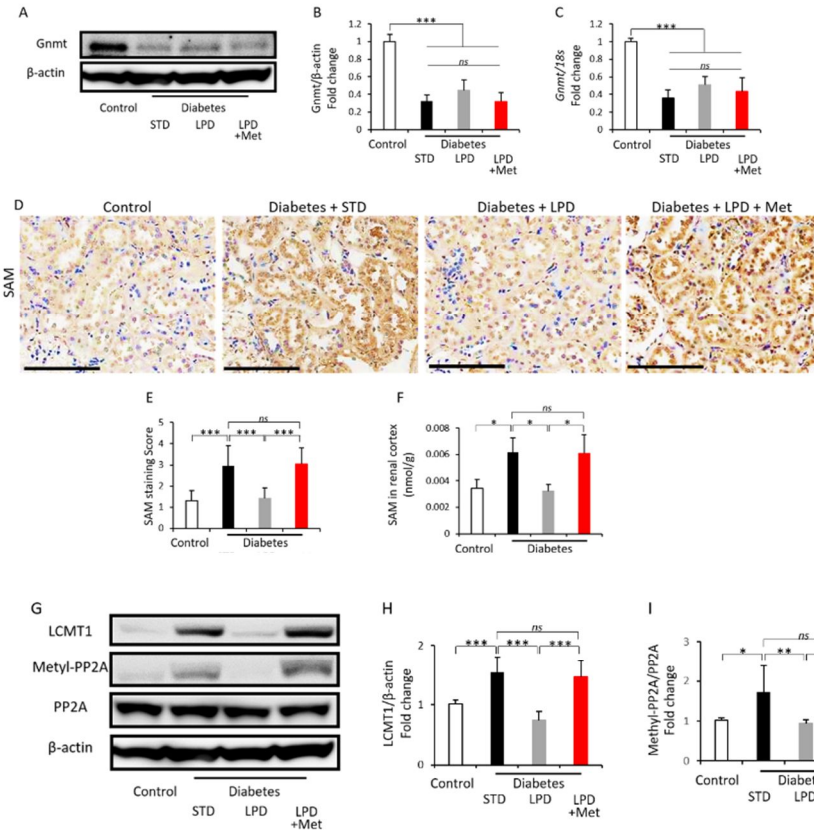


Figure 4 \*\*\* $p < 0.001$  vs indicated groups. ns: not significant

Figure 5

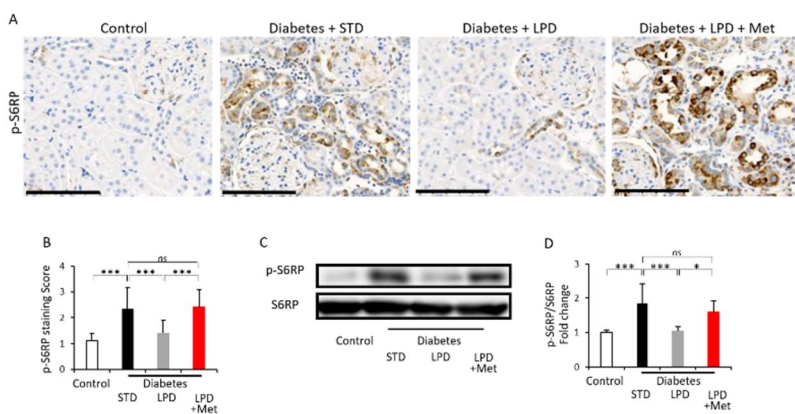


Figure 5 \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs indicated groups. ns: not significant

Figure 6

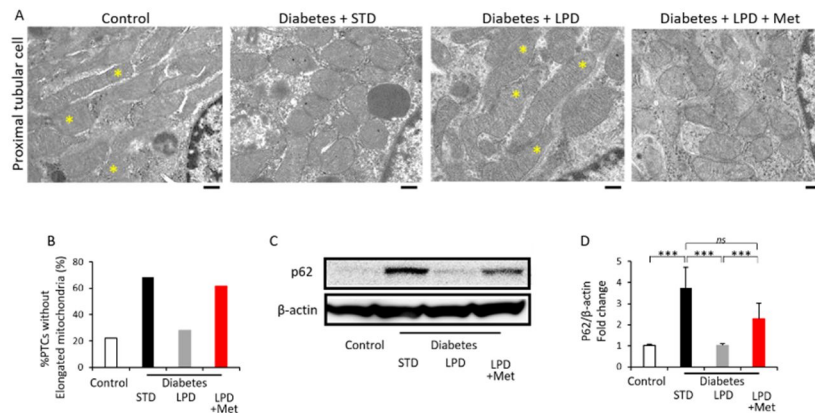


Figure 6 \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs indicated groups. ns: not significant.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kitada M, Ogura Y, Monno I, Xu J, Koya D.	4. 巻 12
2. 論文標題 Methionine Abrogates the Renoprotective Effect of a Low-Protein Diet Against Diabetic Kidney Disease in Obese Rats With Type 2 Diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging(Albany NY)	6. 最初と最後の頁 4489-4505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.18632/aging.102902.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitada M, Ogura Y, Monno I, Koya D.	4. 巻 43
2. 論文標題 The Impact of Dietary Protein Intake on Longevity and Metabolic Health	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EBiomed	6. 最初と最後の頁 632-640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.ebiom.2019.04.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Xu J, Kitada M, Koya D.	4. 巻 1866
2. 論文標題 The Impact of Mitochondrial Quality Control by Sirtuins on the Treatment of Type 2 Diabetes and Diabetic Kidney Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.	6. 最初と最後の頁 165756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165756.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitada M, Ogura Y, Monno I, Koya D.	4. 巻 10
2. 論文標題 Sirtuins and Type 2 Diabetes: Role in Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Endocrinol (Lausanne).	6. 最初と最後の頁 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3389/fendo.2019.00187.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kitada M, Ogura Y, Monno I, Koya D.	4. 巻 10
2. 論文標題 A Low-Protein Diet for Diabetic Kidney Disease: Its Effect and Molecular Mechanism, an Approach From Animal Studies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nutrients.	6. 最初と最後の頁 554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3390/nu10050544.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitada M, Ogura Y, Suzuki T, Monno I, Kanasaki K, Watanabe A, Koya D.	4. 巻 15
2. 論文標題 A Low-Protein Diet Exerts a Beneficial Effect on Diabetic Status and Prevents Diabetic Nephropathy in Wistar Fatty Rats, an Animal Model of Type 2 Diabetes and Obesity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nutr Metab (Lond).	6. 最初と最後の頁 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1186/s12986-018-0255-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kitada M, Ogura Y, Suzuki T, Monno I, Kanasaki K, Watanabe A, Koya D.	4. 巻 22
2. 論文標題 Cyclic and Intermittent Very Low-Protein Diet Can Have Beneficial Effects Against Advanced Diabetic Nephropathy in Wistar Fatty (Fa/Fa) Rats, an Animal Model of Type 2 Diabetes and Obesity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nephrology (Carlton).	6. 最初と最後の頁 1030-1034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/nep.13152.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogura Y, Kitada M, Xu J, Monno I, Koya D	4. 巻 in press
2. 論文標題 CD38 inhibition by apigenin ameliorates mitochondrial oxidative stress through restoration of the intracellular NAD <sup>+</sup> /NADH ratio and Sirt3 activity in renal tubular cells in diabetic rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging(Albany NY)	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北田宗弘、古家大祐
2. 発表標題 糖尿病性腎臓病における食事療法を考える～蛋白質の量と質の観点から～
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北田宗弘、小倉慶雄、門野至、古家大祐
2. 発表標題 2型糖尿病/肥満ラットにおける腎尿細管Gnmt低下とメチン代謝産物SAMの蓄積は糖尿病性腎臓病の病態形成に関与している
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北田宗弘、古家大祐
2. 発表標題 摂取蛋白質の“量”と“質”の観点から糖尿病性腎臓病に対する食事療法を考える
3. 学会等名 第34回日本糖尿病合併症学会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北田宗弘、古家大祐
2. 発表標題 糖尿病性腎臓病における食事療法を考える～低蛋白質（蛋白質制限）食を中心に～
3. 学会等名 第30回日本糖尿病性腎症研究会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 北田宗弘、古家大祐
2. 発表標題 Low-protein diet for diabetic nephropathy
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 北田宗弘	4. 発行年 2019年
2. 出版社 内分泌・糖尿病・代謝内科	5. 総ページ数 5
3. 書名 特集 健康長寿を目指した食事療法の設定根拠と実際 糖尿病性腎症患者の食事療法 低蛋白質食を中心に	

1. 著者名 北田宗弘	4. 発行年 2019年
2. 出版社 月刊糖尿病	5. 総ページ数 6
3. 書名 特集 糖尿病の食事療法を極める 蛋白質の摂取量と糖尿病の管理 糖尿病性腎症における低蛋白質食を考える	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古家 大祐  (KOYA Daisuke)  (70242980)	金沢医科大学・医学部・教授    (33303)	