

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19780218  
 研究課題名（和文） 新規ペプチドグレリンの腎臓における機能的意義—糖尿病モデルを用いた解析—  
 研究課題名（英文） Functions of novel peptide ghrelin in the kidney: analysis using diabetic model mice  
 研究代表者  
 矢吹 映 (YABUKI AKIRA)  
 鹿児島大学・農学部・准教授  
 研究者番号：10315400

## 研究成果の概要：

グレリンは胃で産生される新規のペプチドホルモンであるが、我々は腎臓にもグレリンが発現することを近年報告した。本研究では、2型糖尿病モデルである KK-*A<sup>y</sup>*/TaJcl マウスを使用して、腎臓における機能的意義を検索した。その結果、顕著な糖尿病性腎症を併発にも関わらず、グレリンの腎臓内発現は安定しているおり、さらにグレリンの投与によりその進行に抑制傾向が見られることが明らかになった。この結果から、グレリンは腎機能の保護に有益であることが示唆された。

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,300,000	330,000	2,630,000

## 研究分野：解剖学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：腎臓, グレリン, 糖尿病性腎症

## 1. 研究開始当初の背景

グレリンは1999年にラットおよびヒトの胃より発見された成長ホルモン分泌促進作用を有する新規ペプチドホルモンであり、近年、心血管保護、摂食調節、糖および脂質代謝など重要な機能が明らかにされ、治療への臨床的意義が注目されている。近年、我々は、胃だけでなく腎臓にもグレリンの産生能があり、遠位尿細管および集合管上皮の基底外側細胞

膜上にグレリンペプチドが存在することを突き止めた。その機能的役割には不明な点が多いが、心血管系で知られている臓器保護作用と同じく、腎臓においても腎機能の保護を担っていると考えられた。そこで、この仮説を証明すべく、糖尿病モデルマウスを用いる本研究を計画するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病モデルマウスを用いた解析により腎臓におけるグレリンの機能的意義を明らかにすることである。まず始めに、2型糖尿病モデルである KK-*A<sup>y</sup>*/TaJc1 マウスにおける糖尿病性腎症の病態を明らかにし、病態進行にともなう腎臓グレリンの発現動態を解明することを目的とした。次いで、グレリンの投与が糖尿病性腎症の進行におよぼす影響を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

2型糖尿病モデルである KK-*A<sup>y</sup>*/TaJc1 マウスと健常対照である C57BL/6Njcl マウスを 8, 12, 16 および 20 週齢 (各群 5 例) で検索した。採取した腎臓は中性緩衝ホルマリンにて固定した後、常法に従いパラフィン包埋し、光学顕微鏡および免疫組織化学的検索に供した。グルタルアルデヒドで固定した組織については、定法に従いエポキシ樹脂に包埋し、透過型電子顕微鏡的観察に供した。また、凍結組織については、プレプログレリン mRNA を検出するために RT-PCR 法を行なった。

さらに、KK-*A<sup>y</sup>* マウスを 3 群 (各群 5 例) に分け、各群を通常グレリン投与群 (40  $\mu$ g/kg, sc, bid), 低用量グレリン投与群 (4  $\mu$ g/kg, sc, bid), 生理食塩水投与群 (sc, bid) とした。投与は 16 から 20 週齢の 4 週間とし、投与後に採取した腎臓について形態学的検索を行なった。

### 4. 研究成果

KK-*A<sup>y</sup>* マウスの腎臓には、糖尿病の発症にともない、糸球体と尿細管間質に組織傷害が認められた。糸球体ではメサンギウム基質の増加や結節性変化が週齢を追うごとに重度になり、特に糸球体については、12 週齢以降、KK-*A<sup>y</sup>* が C57BL/6 に比べて顕著に傷害を受けていた (図 1)。尿細管間質では尿細管の傷害や間質の線維化が観察されたが、障害の程度は軽度であり、20 週齢まで C57BL/6 との間に明らかな差は認められなかった。尿細管間質傷害の活動性のマーカーとなる  $\alpha$ -平滑筋アクチンやビメンチンの免疫反応にも KK-*A<sup>y</sup>* と C57BL/6 との間に違いは認められなかった。シクロオキシゲナーゼ-2 に対して免疫組織

化学的に検索したところ、C57BL/6 の腎臓には陽性反応は認められなかったが、KK-*A<sup>y</sup>* マウスでは全ての週齢で遠位尿細管の緻密斑に明らかな陽性反応が認められた。さらに、レニンについて免疫組織化学的検索を行なった所、レニンは 16 週齢まで発現が上昇するが、20 週齢ではむしろ低下する傾向を示した。アンジオテンシン II に対する免疫染色を行なった結果、腎臓内に明らかな陽性反応は認められなかった。グレリンについて免疫染色を行なった結果、グレリンはすべてのマウスにおいて遠位尿細管および集合管上皮に発現しており、その局在や反応強度には糖尿病の進行にともなう明らかな変化が認められなかった (図 2)。また、前駆体であるプレプログレリンの mRNA 発現にも明らかな変化は認められなかった。

グレリンの投与実験は 40  $\mu$ g/kg と 4  $\mu$ g/kg の 2 通りの投与量で行ない、対象には溶媒である生理食塩水を 16 から 20 週齢まで投与した。実験期間中は、体重、摂食量、飲水量をモニターしたが、各群間に違いは認められなかった。腎臓の病態を検索した結果、全てのマウスで、前記と同様の糖尿病性腎症が併発しており、特に糸球体の傷害が高度であった。各群を比較すると、4  $\mu$ g 投与群では生理食塩水投与群との間に明らかな違いは認められなかった。一方、40  $\mu$ g 投与群でメサンギウム基質の増生といった糸球体の傷害が軽微な傾向が認められた (図 3)。

考察: 以上の実験成績から、KK-*A<sup>y</sup>* マウスの腎臓は糖尿病の進行にともない糸球体の傷害が重篤になることが明らかとなった。これには COX-2 の過剰発現が関与していることが明らかになったが、レニン-アンジオテンシン (RA) 系の開始および最終産物であるレニンとアンジオテンシン II の動態はこれに一致していなかった。このことから、KK-*A<sup>y</sup>* マウスの糖尿病性腎症の進行には腎臓内 RA 系の亢進ではなく、全身性 RA 系の亢進が関与していることが示唆された。全身性 RA 系の亢進は糖尿病性腎症の臨床例でも指摘されている現象であり、本マウスが糖尿病性腎症の解析に適したモデル動物であることが明らかになった。

このような糖尿病性腎症の進行にともな

い腎臓内グレリンがどのような動態を示すのかを検討した結果、グレリンにはその局在および発現量に変化が見られなかった。このことから、グレリンは腎機能が低下しても安定して発現することで、腎機能保護に重要な役割を担っていることが示唆された。

次いで、グレリンの投与を計画したが、グレリンには摂食や代謝を亢進させる作用があり、これが実験成績に影響を与えることが懸念された。そこで、投与量の検討したところ、マウスにおいては  $40 \mu\text{g}/\text{kg}$  の投与が摂食量に影響せずグレリンの作用を発揮することが報告されており、事実、本研究においても体重、摂食量、飲水量に影響は認められなかった。これを基準として投与を行なった結果、 $40 \mu\text{g}$  投与群において僅かながら糸球体の傷害が軽減される傾向が認められ、グレリンによる腎機能保護作用が示唆された。一方、 $4 \mu\text{g}$  まで投与量を落すと腎保護効果は認められず、低用量投与の効果は発揮されなかった。

本研究は、現代病とも言える糖尿病の合併症を予防するための重要な基礎研究として位置づけられる。糖尿病にともなう合併症は今後益々増加すると懸念されており、本研究の結果は、新規の治療・予防法につながる可能性をもつ重要な意義をもつと考える。今後、その生理学的、分子学的メカニズムについて更なる研究が必要であろう。

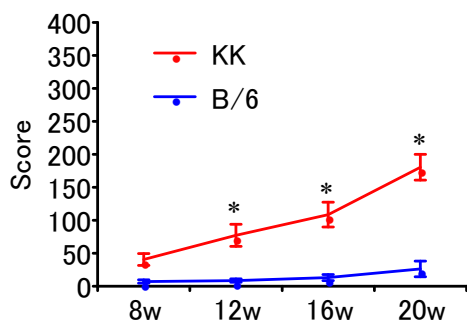


図1. 糸球体の傷害値.

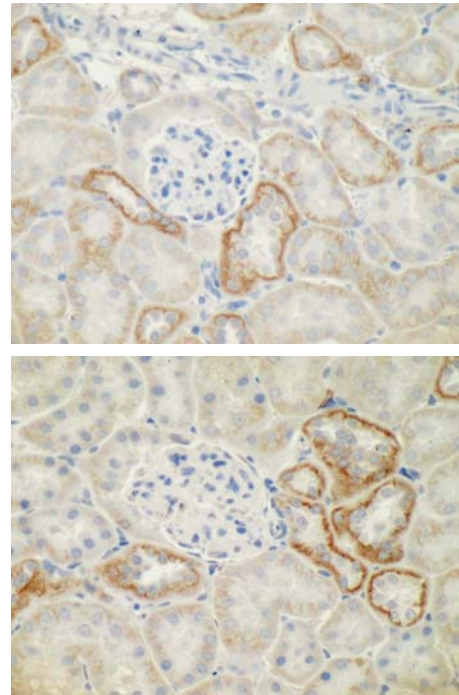


図2. グレリン免疫組織化学. 上段: 20週齢のC57BL/6. 下段: 20週齢のKK/Ay.

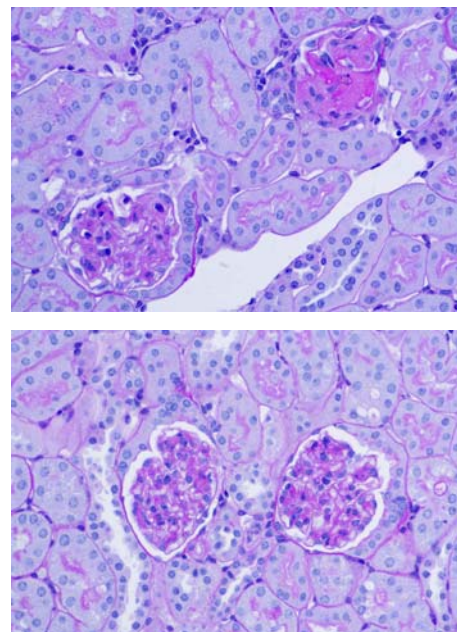


図3. KK/Ayマウスの腎臓. 上段: 生理食塩水投与群. 下段  $40 \mu\text{g}$  グレリン投与群.

## 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)

[学会発表] (計 2件)

1. 矢吹 映・大和 修・鈴木秀作: 2型糖尿病モデル KK-*A*<sup>Y</sup>マウスの腎臓の病態と COX-2の発現. 第26回九州実験動物研究会. 2008年11月15日. 佐賀

2. 矢吹 映・大和 修・田原口智士・御船弘治・鈴木秀作: 2型糖尿病モデル KK-*A*<sup>Y</sup>マウスの糖尿病性腎症と腎臓グレリンの動態. 第146回日本獣医学会. 2008年9月25日. 宮崎

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢吹 映 (YABUKI AKIRA)  
鹿児島大学・農学部・准教授  
研究者番号: 10315400

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者