

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06876

研究課題名(和文) 高血糖時の分枝鎖アミノ酸代謝に着目した糖尿病性腎症発症機構の解明と予防法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of diabetic nephropathy pathogenesis and development of preventive methods focusing on the metabolism of branched-chain amino acids during hyperglycaemia.

研究代表者

久保 亜紀子 (Kubo, Akiko)

神戸大学・医学研究科・特命講師

研究者番号：50455573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アミノ酸代謝に着目し、イメージングメタボロミクス手法で糖尿病性腎症モデル動物の骨格筋と腎臓におけるエネルギー代謝を組織レベルでin situ解析し、高血糖によって変容しているアミノ酸代謝に着目した解析を行った。次に、1型糖尿病病態下の筋肉におけるアミノ酸代謝に着目し、低タンパク食および、高タンパク食を給餌した1型糖尿病モデルマウスの大腿四頭筋のメタボローム解析、および、大腿四頭筋と筋肉の培養細胞株であるC2C12から抽出したRNAのマイクロアレイ解析を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は、多岐に渡る慢性腎不全(CKD)の原因の中で最も多い。糖尿病性腎症における病変がどのようにして形成されるのかを代謝の側面から検討することは非常に重要な課題である。この研究では、高血糖下でのエネルギー代謝の解明のため、正常マウス及び、ストレプトゾトシン(STZ)投与により膵β細胞を破壊した1型糖尿病モデルマウスに高タンパク餌を与え、腎臓及びの筋肉のイメージングメタボロミクス解析、筋肉でのアミノ酸代謝解析、遺伝子発現解析を通して、1型糖尿病の病態時における代謝変化を把握し、病態形成のメカニズムの一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on amino acid metabolism and analysed energy metabolism in skeletal muscle and kidney of diabetic nephropathy model animals at the tissue level in situ by using imaging metabolomics techniques, focusing on amino acid metabolism altered by hyperglycaemia. Next, focusing on amino acid metabolism in muscle under the pathological condition of type I diabetes, metabolomic analysis of the quadriceps of type I diabetes model mice feeding a low-protein diet and a high-protein diet, and microarray analysis of C2C12 cell line and quadriceps were performed.

研究分野：代謝生化学

キーワード：1型糖尿病 代謝解析 糖尿病性腎症 イメージング質量分析 メタボロミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、患者数 1300 万人をこえる国民病である。多岐に渡る慢性腎不全(CKD)の原因の中で、糖尿病性腎症は 1998 年より透析導入原疾患として最多(2012 年では全透析事例の 44%)であり、様々な新規糖尿病薬の発売により血糖管理が改善しているにも関わらず、糖尿病性腎症による透析導入数は減少していない。糖尿病性腎症により透析を行っている患者数は国内でも 10 万人を超えており、深刻な問題となっているが、高血糖がどのような経路で糸球体や尿細管を機能不全に至らせているのかは諸説があり、直接治療に結びつく知見は報告されていない。そのため、現在は血糖値をコントロールすると同時に降圧剤を用いて血圧を下げ、低タンパク食を推奨することで腎症発症を遅らせる治療が主流である。このような背景から糖尿病性腎症における病変がどのようにして形成されるのかを代謝の側面から検討することは非常に重要な課題である

2. 研究の目的

このような背景から糖尿病性腎症における病変がどのようにして形成されるのかを代謝の側面から検討することは非常に重要な課題である。この研究では、高血糖下でのエネルギー代謝の解明のため、正常マウス及び、ストレプトゾトシン(STZ)投与により膵β細胞を破壊したⅠ型糖尿病モデルマウスに高タンパク餌を与え、腎臓及びの筋肉のイメージングメタボロミクス解析、筋肉でのアミノ酸代謝解析、遺伝子発現解析を通して、Ⅰ型糖尿病の病態時における代謝変化を把握し、病態形成の過程を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、アミノ酸代謝に注目し、イメージングメタボロミクス手法で糖尿病性腎症モデル動物の骨格筋と腎臓におけるエネルギー代謝を組織レベルで *in situ* 解析し、高血糖によって変容しているアミノ酸代謝に注目した解析を行った。具体的には、糖尿病性腎症発症過程における高血糖下での尿細管や糸球体でのエネルギー代謝変容の実態を解明するために、モデル動物に安定同位体標識化合物を投与し、筋肉、および腎臓におけるアミノ酸代謝経路の変化を解析した。次に、Ⅰ型糖尿病病態下の筋肉におけるアミノ酸代謝に注目し、低タンパク食および、高タンパク食を給餌したⅠ型糖尿病モデルマウスの大腿四頭筋のメタボローム解析、および、大腿四頭筋と筋肉の培養細胞株である C2C12 から抽出した RNA のマイクロアレイ解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 高タンパク餌で飼育したストレプトゾトシン(STZ)誘導Ⅰ型糖尿病性腎症発症モデル動物及び、比較用正常動物に ^{15}N で標識した BCAA を投与し、一定時間後に回収した臓器の ^{15}N 標識の代謝物を定量することで、組織中の細胞への BCAA の取り込み量、及び代謝物への変化量を計測した。また、同じモデル動物より、RNA を抽出し、qPCR 法でアミノ酸輸送体やアミノ酸代謝酵素の発現量を比較した。代謝物レベルの解析結果より、筋肉でのアミノ酸代謝、特に BCAA 代謝に大きな変化があり、筋肉で使われなかった余剰の BCAA が血液中に検出された。余剰の BCAA は腎排泄されるため、腎臓での BCAA 濃度が上昇していることも判明した。BCAA のうちロイシンは mTOR シグナルを増強することが知られており、腎症の発症をすすめる方向に関与する可能性が考えられた。遺伝子発現レベルの解析では、高タンパク給餌ストレプトゾトシン(STZ)誘導Ⅰ型糖尿病性腎症発症モデル動物では、正常動物と比較して筋肉におけるアミノ酸輸送体の遺伝子発現が減少しているおり、細胞内に取り込んだ BCAA の代謝酵素の遺伝子発現は BCAA 代謝を抑制する方向に変化していることがわかった。遺伝子発現の変化は、 ^{15}N 標識体の代謝変化量の解析結果と矛盾はなく、ストレプトゾトシン(STZ)誘導Ⅰ型糖尿病性腎症発症モデル動物では、筋肉における BCAA の取り込みと代謝の両方が正常動物と比較して減少していることが明らかとなった。

(2) 図 1 に示す実験系で、Ⅰ型糖尿病マウスと比較群を各群 4 匹ずつ作製し、低タンパク食、高タンパク食を給餌し、それから大腿四頭筋をサンプリングした。組織サンプルのメタボローム解析では、糖代謝、アミノ酸代謝などに関連する生体代謝物の濃度を示すデータが得られた。本研究ではアミノ酸代謝に注目し、各群のマウスの大腿四頭筋のメ

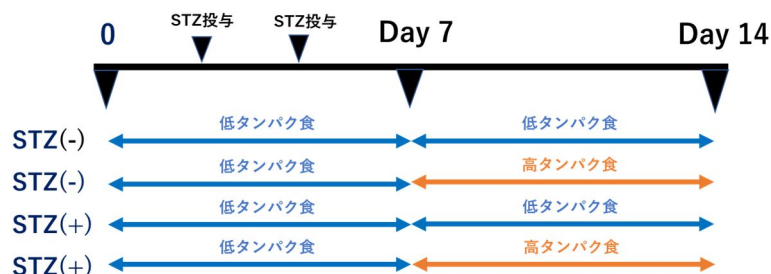


図 1 マウスの作製法, 上から順に低タンパク食給餌 WT マウス, 高タンパク食給餌 WT マウス, 低タンパク食給餌 STZ マウス, 高タンパク食給餌 WT マウス

タボロームデータを t 検定により有意水準 5% で比較した。低タンパク食を給餌した WT マウス (低タンパク WT マウス) と低タンパク食を給餌した STZ マウス (低タンパク STZ マウス) のメタボロームデータの比較 (図 2) では、グリシン (Gly)、プロリン (Pro)、グルタミン (Gln) の濃度が低タンパク STZ マウスの方で有意に高かった。またプロリンの誘導体の 1 つのヒドロ

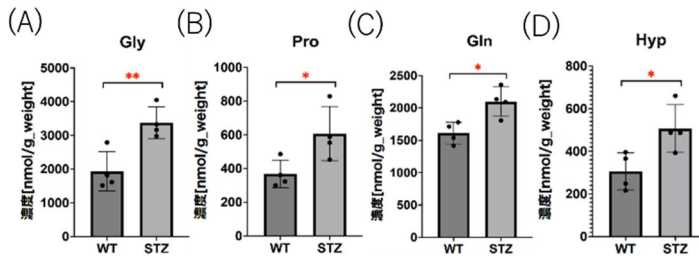


図 2 低タンパク WT マウスと低タンパク STZ マウスのメタボロームの比較結果. *: $p < 0.05$. **: $p < 0.01$.

キシプロリン (Hyp) も低タンパク STZ マウスの方で有意に高かった。グリシン、アラニン、プロリン、ヒドロキシプロリンといったアミノ酸・アミノ酸誘導体から構成されるタンパク質にコラーゲンがある。特にヒドロキシプロリンは生体内のコラーゲンが分解されることによって生じる代謝物であり、食餌には含まれていないアミノ酸である。そしてコラーゲンは哺乳類に最も多いタンパク質である。腱や軟骨、筋肉といった組織に多く含まれていて、全タンパク質の 25~35% を占めている。主な役割はそれらの組織の形態・機能を維持することである。

次に、低タンパク食摂取時にはコラーゲンを構成するアミノ酸が筋肉で増えていたことが分かったので、筋肉の培養細胞株である C2C12 を、正常状態の低グルコース、インシュリン添加あり (LG, ins(+))、および、I 型糖尿病状態を再現した高グルコース、インシュリン添加なし培地 (HG, ins(-)) で培養し、細胞から回収した RNA に関して、コラーゲン関連遺伝子の発現量を qPCR やマイクロアレイで解析した。qPCR で解析対象とした遺伝子は型コラーゲンをコードしている遺伝子 (Col6a1, Col6a2, Col6a3)、コラーゲンの分解に関係する可能性のある遺伝子 (Ctsb, Ctsd, Ctsk, Ctsl, Ctss, Mmp2, Mmp9, Mmp13, Mmp14)、コラーゲンの生成に関係する可能性のある遺伝子 (P4ha1, P4ha2, P4ha3, P4hb, Pdia3, Pdia5)、それらの反応を制御する因子をコードする遺伝子 (Timp1, Timp2, Timp3, Timp4, Pcolce) である。

型コラーゲン遺伝子については、Col6a1、Col6a2、Col6a3 のいずれの遺伝子の発現量も HG, ins(-) の培地で培養した型糖尿病モデル細胞の方が有意に多かった。コラーゲン分解系の遺伝子については、Ctsd、Ctss、Mmp2、Mmp9、Mmp14 の発現量は型糖尿病

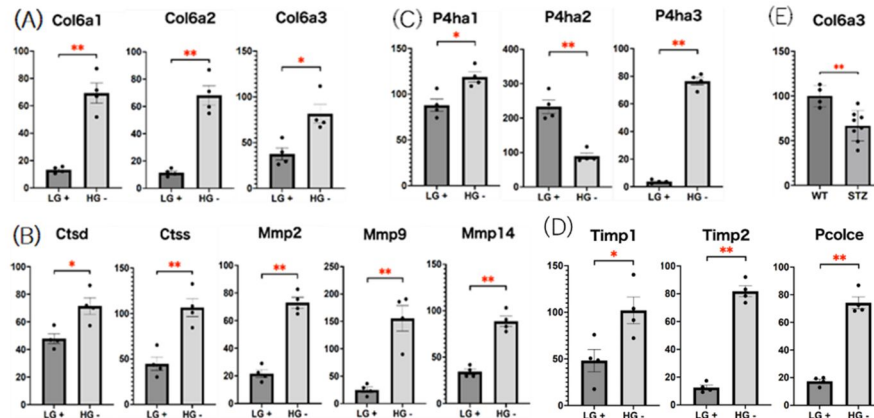


図 3 qPCR による、C2C12 細胞でのコラーゲン関連遺伝子発現の解析 (A)-(D) LG, ins(+), HG, ins(-) 条件での遺伝子発現量の変化、未分化細胞での発現量を 100 として割合換算した。(A) 型コラーゲン遺伝子、(B) コラーゲン分解系遺伝子、(C) コラーゲン生成系遺伝子、(D) コラーゲン代謝制御系遺伝子、(E) WT マウスと STZ マウスでの遺伝子発現量の変化、WT マウス (濃い灰色)、STZ マウス (薄い灰色)、WT マウスでの発現量を 100 として割合換算した。

モデル細胞の方が有意に多かった。コラーゲン生成系の遺伝子については、P4ha1、P4ha3 の発現量は型糖尿病モデル細胞の方が有意に多かった。一方 P4ha2 の発現量は型糖尿病モデル細胞の方が有意に少なかった。コラーゲンの生成や分解の制御因子の遺伝子については、Timp1、Timp2、Pcolce の発現量が型糖尿病モデル細胞の方が有意に多かった。

低タンパク条件下でのマウス大腿四頭筋のメタボローム解析の結果と、C2C12 細胞の遺伝子発現解析の結果を合わせて考察すると、(高グルコース、インシュリン添加なしで培養した) 型糖尿病モデル細胞で型コラーゲン遺伝子そのものの発現量だけでなく、分解系、生成系の遺伝子発現、さらにそれらの制御系の遺伝子発現すべてで多くなっていたことから、コラーゲンの代謝が活性化されていることが遺伝子レベルで明らかであり、低タンパク餌を給餌されている I 型糖尿病モデルマウスの大腿四頭筋において、コラーゲンの分解産物である特徴的なアミノ酸が増加していたことと整合性があった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akihito Hishikawa, Kaori Hayashi, Akiko Kubo, Kazutoshi Miyashita, Akinori Hashiguchi, Kenichiro Kinouchi, Norifumi Yoshimoto, Ran Nakamichi, Riki Akashio, Erina Sugita, Tatsuhiko Azegami, Toshiaki Monkawa, Makoto Suematsu, Hiroshi Itoh	4. 巻 24
2. 論文標題 DNA repair factor KAT5 prevents ischemic acute kidney injury through glomerular filtration regulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.103436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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	宮下 和季 (Miyashita Kazutoshi) (50378759)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師（非常勤） (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関