

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591218

研究課題名(和文) 高度たんぱく質制限の尿細管オートファジー活性化を介した糖尿病腎症抑制機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism by which low protein diet suppresses progression of diabetic nephropathy through activation of autophagy in tubular cells

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病モデルであるWistar fatty (fa/fa)ラットの腎近位尿細管細胞では、mammalian target of rapamycin complex1 (mTORC1)の活性化によるオートファジー機構の低下に起因するミトコンドリア機能障害(断片化・膨化ミトコンドリアの蓄積)・酸化ストレス・炎症性変異が生じており、その結果、尿細管間質の線維化、尿細管細胞障害、アポトーシスの増加により腎機能低下が来される。高度低たんぱく質食(たんぱく質5%)は、mTORC1経路の低下とオートファジー機構の回復により尿細管細胞保護効果を発揮し、腎障害の進展を抑制する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In proximal tubule cells of Wistar fatty (fa/fa) rats, type 2 diabetes model, mitochondrial dysfunction such as fragmentation and swelling, oxidative stress and inflammation due to impairment of autophagy by activation of a mammalian target of rapamycin complex1 (mTORC1) exist, resulting in renal injuries including tubule-interstitial fibrosis, tubular cell injuries and apoptosis and decline of renal function. Advanced low-protein diet (including 5% protein) exhibits the tubule cell protective effects through reduction of mTORC1 activation and restoration of autophagy machinery, leading to suppression of progression of renal dysfunction.

研究分野：糖尿病 腎臓病

キーワード：糖尿病腎症 低たんぱく質食 オートファジー mTOR

1. 研究開始当初の背景

たんぱく質制限は、慢性腎臓病における腎機能低下の抑制に対する食事療法として推奨され、慢性腎不全症例に対して、現在、臨床の場でも実践されている。たんぱく質制限の慢性腎不全症例に対する、腎機能低下の抑制効果は、modification of diet in renal disease: MDRD 試験において、たんぱく質制限食群 (0.6-0.8g/kg/日) では、通常食群 (1.3g/kg/日) に比べて、糸球体濾過量 (GFR) の低下速度が僅かであるが減弱する (腎機能低下の抑制効果 -1.1ml/分/年) ことが示された (Klahr et al. N Engl J Med.1994,330:877-84)。しかし、糖尿病腎症に限れば、この MDRD の対象者に 2 型糖尿病症例は全体の約 3%しか含まれていないため、たんぱく質制限の腎症抑制効果は明らかではない。また、我が国で行なわれた多施設共同研究である「たんぱく質摂取制限の 2 型糖尿病性腎症に対する効果」では、摂取たんぱく質を通常たんぱく質食群 (1.2g/kg/日) とたんぱく質制限食群 (0.8g/kg/日) の 2 群間に分け、5 年にわたり追跡がなされたが、たんぱく質摂取量と腎機能低下抑制の間に差はなかったと報告されている (Koya et al. Diabetologia. 2009,52:2037-45)。一方、鳥居らは、Cr 3.0mg/dl 以上の糖尿病腎症による慢性腎不全を対象とした検討で、たんぱく質制限食 0.5g/kg/日は、尿蛋白の減少と透析療法への導入遅延をもたらしたが、0.6g/kg/日以上たんぱく質摂取ではこの効果は認めなかったと報告している (鳥居ら 糖尿病診療マスター 2008, 6:408-15)。しかし、この高度低たんぱく質食の栄養学的な安全性は確立されているとはいえない。このように、糖尿病腎症の腎機能低下に対する、たんぱく

質制限の効果は、現在のところエビデンスがないと言わざるを得ず、また、たとえば、たんぱく質制限が腎症の進展を抑制する効果を有するとしても、どの程度のたんぱく質制限が腎保護に必要なのか (現在、推奨されている 0.6-0.8g/kg/日では不十分なのか) どの時期からそれを施行すべきか、あるいは高度低たんぱく質の栄養学的安全性など解決すべき課題は多く、今一度、基礎的研究を含めて検証すべきであると考えられる。たんぱく質の過剰摂取は、糸球体高血圧を惹起するため、たんぱく質制限は、糸球体高血圧の是正等を介して、腎保護作用を有すると考えられているが (Brenner et al. New Engl J Med. 1982, 307: 652-659) 腎尿細管に対するその保護効果などについては明らかにはされておらず、たんぱく質制限による腎保護効果の発揮するさらなる詳細な分子的機序を解明することが必要である。

糖尿病腎症を含む慢性腎臓病において、その腎不全進展への予後を規定する因子は、尿細管間質病変 (尿細管間質の線維化) の程度であると報告されており (Mimura et.al. Nat Rev Nephrol,2010 6:667-78)、その尿細管間質病変を阻止することが、糖尿病腎症の進展抑制への治療戦略として極めて重要である。

オートファジー機構は、生理的あるいは、病的状態において、障害されたミトコンドリアを含むオルガネラの除去など、細胞内新陳代謝をあげて、腎組織のホメオスターシス維持のためにその機能を発揮している (Kroemer et al. Mol Cell.2010, 40:280-93)。そして、そのオートファジー機構は、mTORC1 を含む栄養応答シグナルと細胞内ストレス (酸化ストレス・低酸素・小胞体ストレス・炎症) によるクロストークにて制御され

ているが、糖尿病状態では、栄養過剰系シグナルである mTORC1 の活性化が生じており、その結果、細胞内ストレスによるミトコンドリアを含む細胞障害に対する防御機構としてのオートファジー活性化が適切に行えない、すなわち、オートファジー活性化の調節不全が 2 型糖尿病腎症の進展に寄与している可能性が考えられる。

我々は以前、低酸素刺激に対するオートファジー機能の低下が、加齢腎で見られる尿細管障害あるいは腎機能低下に関与していることを報告した (Kume, Koya et al. J Clin Invest, 120:1043-55, 2010)。さらに、2型糖尿病モデル動物である、Wistar fatty (fa/fa) rats の腎近位尿細管において、非糖尿病 Wistar lean rats に比べて、オートファジー機能の低下 (p62蓄積及び、ミトコンドリア障害 (膨化・クリステの消失) がみられることを見出し (Kitada, Koya et al. Exp Diabetes Res. 2011)。

たんぱく質制限はアミノ酸制限であるが、一般的にアミノ酸の欠乏状態は、mTOR の抑制を介してオートファジーの促進刺激となることから、「たんぱく質制限が、栄養応答シグナルの変異の是正を介して、腎尿細管オートファジー機構の活性化を誘導し、2 型糖尿病腎症の進展を抑制する」との仮説を立てた。

2 . 研究の目的

2 型糖尿病腎症を含む、慢性腎臓病の末期腎不全への進展を抑制するため、たんぱく質制限による食事療法が推奨されているが、糖尿病腎症に対するその腎保護効果は明らかではない。また、腎保護効果の発現機序も十分に解明されていない。したがって、申請者は、2 型糖尿病腎症において、たんぱく質制限食

が腎症の進展を抑制し得るか、また、その分子生物学的機序 (特に、高度たんぱく質制限食の腎尿細管のオートファジー機構に与える効果について)、高度たんぱく質制限の栄養学的安全性を 2 型糖尿病動物 (Wistar fatty (fa/fa) ラット) を用いて明らかにする。

3 . 研究の方法

(1) 24 週齢雄 Wistar fatty (fa/fa) ラット (肥満 + 2 型糖尿病モデル) および非糖尿病 Wistar lean ラットを、通常食 (STD): たんぱく質 22.0%、脂質 5.4%、炭水化物 66.5%、カロリー 4.03kcal/g、あるいは、低たんぱく食 (LPD): たんぱく質 5.0%、脂質 10.0%、炭水化物 76.2%、カロリー 4.15kcal/g に分別し 20 週間後、以下について検証した。

- ・体重・血糖値・摂食量、血圧 (4 週間ごと) (tail cuff method による)

- ・腎重量、脂肪重量

- ・耐糖能: 腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT)、腹腔内インスリン耐容能試験 (IPITT) (介入終了時)

- ・腎機能・尿検査: 血中シスタチン C、尿アルブミン/Cr (UA/b) (開始時と終了時)、尿 L-FABP/Cr (UFAB) (開始時と終了時)

- ・血液検査: 糖代謝関連 (血糖値、インスリン値、糖化ヘモグロビン値)、脂質関連 (総コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸)

- ・腎組織学的評価 (線維化・尿細管障害): PAS 染色・マッソン/トリクローム染色・3 型コラーゲン mRNA 発現・Kim-1 免疫組織染色

- ・腎の炎症性変異: CD68 免疫組織染色, CD68, IL-6, TNF- α , MCP-1, TLR-2 mRNA 発現 (腎皮質)

- ・近位尿細管細胞における電子顕微鏡に

よるミトコンドリアの形態的観察

・アポトーシス：cleaved caspase3 ウエスタンブロット（腎皮質）

・オートファジー：p62 免疫組織染色

・mTORC1 シグナル関連：p-S6 リボソームマルプロテイン（p-S6RP）免疫組織染色およびウエスタンブロット（腎皮質）、p-Akt ウエスタンブロット（腎皮質）

(2) 低たんぱく質食による mTORC1 のシグナル伝達（p-S6RP, p-Akt）変異を、24週齢雄の糖尿病ラットに2週間低たんぱく質食を与えウエスタンブロットにて評価した。

4. 研究成果

体重、脂肪重量、腎重量、平均血圧：糖尿病ラット(DM)-STD 群では、非糖尿病コントロールラット（CONT）と比べ体重（CONT:DM-STD=537.7±32.3g:816.5±66.1g, n=7-9, p < 0.001）、脂肪重量（CONT:DM-STD =25.0±5.1:132.5±14.9g, n=7-9, p < 0.001）、腎重量（CONT:DM-STD =2.96±0.18:4.00±0.31g, n=7-9, p < 0.001）の増大を認めたと、DM-LPD 群では体重（DM:DM+LPD=816.5±66.1:724.5±57.0g, n=7-9, p < 0.05）、脂肪重量（DM:DM+LPD=132.5±14.9:105.2±11.8g, p < 0.01）、腎重量（DM:DM+LPD=4.00±0.31:2.16±0.18g, n=7-9, p < 0.01）ともに有意に減少した。平均血圧は4群間において差はなかった。摂食量は自由摂食下で、DM 群に比べ DM+LPD 群では食事介入実験期間中、平均 15.5%減少していた。

糖・脂質関連検査：DM-STD 群において CONT に比べ上昇した HbA1c 値（CONT:DM-STD=3.35±0.37:6.01±0.49%, p < 0.001）、CHO 値（CONT:DM-STD=92.±25.2:170.7±47.8mg/dl, p < 0.05）は LPD 群で有意に低下

(HbA1c

DM:DM+LPD=6.0±0.49:4.79±0.55%, p < 0.05)(CHO

DM:DM+LPD=170.7±47.8:87.4±36.2mg/dl, p)したが、ITT、GTT、IRI 値、TG 値、FFA 値は両群間で有意な差はなかった。

腎機能関連検査：食事介入開始時の UAlb/Cr 比および ULFAB/Cr は、それぞれ CONT 群 20.1±26.2μg/gCr(UAlb/Cr), 6.7±3.3μg/gCr(ULFAB/Cr) に対して、DM-STD 群 1048.4±1432.5μg/gCr, p < 0.05(UAlb/Cr), 44.8±24.4μg/gCr, p < 0.001(ULFAB)と有意に増加していた。介入 20 後においては、CONT 群に比べ DM-STD 群では UAlb/Cr 比（CONT:DM-STD

=1023.2±1151.0:12172.8±8557.3μg/gCr, p < 0.001) ULFAB/Cr 比（CONT:DM-STD =6.17±4.74:135.39±183.0μg/gCr, p < 0.05）、血漿シスタチン C 値（CONT:DM-STD=0.78±0.46: 1.73±0.43 mg/l, p < 0.001）の有意な増加を示した。

DM-LPD 群では DM-STD 群と比べ UAlb（DM-STD : DM+LPD 12172.8±8557.3 : 921.4±904.8μg/gCr, n=7-9, p < 0.001）・ULFAB（DM-STD : DM+LPD 135.4±183.0 : 6.44±7.58μg/gCr, n=7-9, p < 0.05）・シスタチン C 値（DM-STD : DM+LPD 1.73±0.43 : 1.01±0.43mg/l, n=7-9, p < 0.05）の有意な低下を認めた。

腎組織の線維化、尿細管障害：マッソントリクローム染色による尿細管間質および糸球体の線維化は、CONT に比して DM-STD 群においては著明に尿細管間質および糸球体の線維化は改善した。また DM-STD 群で増加した腎皮質 3 型コラーゲンの mRNA 発現も同様に DM-LPD 群で低下した。尿細管障害スコア、Kim-1 免疫組織染色強度、腎皮質 Kim-1 mRNA 発現はいずれも DM-STD 群では CONT と比較

して増加し、DM-LPD 群で低下した。

炎症性変異：CD68 免疫組織染色強度、腎皮質 CD68、MCP-1、IL-6、TNF- α 、TLR2 mRNA 発現は CONT に比べて DM-STD 群で有意に増加し、DM-LPD 群で改善を認めた。

ミトコンドリア形態的変異、アポトーシス：DM-STD 群では、近位尿細管細胞におけるミトコンドリアの断片化および膨化の増加、腎皮質における cleaved caspase3 発現の増加（アポトーシスの増加）を認めたが、DM-LPD 群で改善した。

オートファジー、mTOR シグナルの変異：DM-STD 群では、CONT 群に比し、p62・p-S6RP 免疫染色強度の増強を認めるが、DM-LPD 群にて改善した。DM 群にて増加する腎皮質 p-S6RP 発現の増加は、STD→LPD に飼料をスイッチ 2 週間後で減少したが、DM-STD 群と DM-LPD 群間で p-Akt 発現に差はなかった。

結論：以上より、2 型糖尿病ラットの尿細管細胞では、mTORC1 の活性化を介したオートファジー機構の低下と、それに起因するミトコンドリア障害・酸化ストレス・炎症・アポトーシスの増加が生じているが、低たんぱく質食（たんぱく質制限）は、mTORC1 の低下とオートファジー機構の回復を誘導することで、障害を受けたミトコンドリアの除去と細胞機能の恒常性を維持し、2 型糖尿病による腎機能障害を改善する可能性が示唆された。

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 23 件)

1. Kume S, Koya D, Uzu T, Maegawa H. Role of nutrient-sensing signals in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Biomed Res Int*. 2014;2014:315494.
2. Yasuda M, Tanaka Y, Kume S, Morita Y, Chin-Kanasaki M, Araki H, Isshiki K, Araki S, Koya D, Haneda M, Kashiwagi A, Maegawa H, Uzu T. Fatty acids are novel

nutrient factors to regulate mTORC1 lysosomal localization and apoptosis in podocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jul;1842(7):1097-108.

3. Kume S, Yamahara K, Yasuda M, Maegawa H, Koya D. Autophagy: emerging therapeutic target for diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2014 Jan;34(1):9-16.
4. Kitada M, Kanasaki K, Koya D. Clinical therapeutic strategies for early stage of diabetic kidney disease. *World J Diabetes*. 2014 ;5(3):342-56
5. Kitada M, Kume S, Koya D. Role of sirtuins in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014 ;23(1):75-9
6. Koya D, Kitada M, Kume S, Kanasaki K. Interventions against nutrient-sensing pathways represent an emerging new therapeutic approach for diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol*. 2014 ;18(2):210-3.
7. Yamahara K, Yasuda M, Kume S, Koya D, Maegawa H, Uzu T. The role of autophagy in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Diabetes Res*. 2013;2013:193757.
8. Yamahara K, Kume S, Koya D, Tanaka Y, Morita Y, Chin-Kanasaki M, Araki H, Isshiki K, Araki S, Haneda M, Matsusaka T, Kashiwagi A, Maegawa H, Uzu T. Obesity-mediated autophagy insufficiency exacerbates proteinuria-induced tubulointerstitial lesions. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Nov;24(11):1769-81.
9. Takeda N, Kume S, Tanaka Y, Morita Y, Chin-Kanasaki M, Araki H, Isshiki K, Araki S, Haneda M, Koya D, Kashiwagi A, Maegawa H, Uzu T. Altered unfolded protein response is implicated in the age-related exacerbation of proteinuria-induced proximal tubular cell damage. *Am J Pathol*. 2013 Sep;183(3):774-85.
10. Xu L, Kanasaki M, He J, Kitada M, Nagao K, Jinzu H, Noguchi Y, Maegawa H, Kanasaki K, Koya D. Ketogenic essential amino acids replacement diet ameliorated hepatosteatosis with altering autophagy-associated molecules. *Biochim Biophys Acta*. 2013 ;1832(10):1605-12
11. Kitada M, Kume S, Takeda-Watanabe A, Tsuda S, Kanasaki K, Koya D: Calorie restriction in overweight males ameliorates obesity-related metabolic alterations and cellular adaptations through anti-aging effects, possibly including AMPK and SIRT1 activation. *Biochim Biophys Acta*. 2013 ; 1830(10): 4820-7
12. Kitada M, Koya D. Renal protective effects of resveratrol. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:568093
13. Kitada M, Koya D. SIRT1 in Type 2 Diabetes: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Diabetes Metab J*. 2013 ;37(5):315-25
14. Kume S, Kitada M, Kanasaki K, Maegawa H, Koya D. Anti-aging molecule, Sirt1: a novel therapeutic target for diabetic nephropathy. *Arch Pharm Res*. 2013 ;36(2):230-6.

15. Kitada M, Kume S, Takeda-Watanabe A, Kanasaki K, Koya D. Sirtuins and renal diseases: relationship with aging and diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)*. 2013 ;124(3):153-64.
16. Kanasaki K, Kitada M, Kanasaki M, Koya D. The biological consequence of obesity on the kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Nov;28 Suppl 4:iv1-7.
17. 北田宗弘, 久米真司, 古家大祐 老年医学の展望 腎臓の老化に対するカロリー制限の効果 日本老年医学会雑誌 2013 Vol.50, No.6, 734-739, 2013
18. Kanasaki K, Kitada M, Koya D. Pathophysiology of the aging kidney and therapeutic interventions. *Hypertens Res*. 2012 ;35(12):1121-8
19. Takeda-Watanabe A, Kitada M, Kanasaki K, Koya D : SIRT1 inactivation induces inflammation through the dysregulation of autophagy in human THP-1 cells. *Bio chem Biophys Res Commun*. 2012 ;427(1):191-6.
20. Xu L, Kanasaki K, Kitada M, Koya D. Diabetic angiopathy and angiogenic defects. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012 ;5(1):13.
21. Tanaka Y, Kume S, Kitada M, Kanasaki K, Uzu T, Maegawa H, and Koya D: Autophagy as a Therapeutic Target in Diabetic Nephropathy. *Exp Diabetes Res*, 2012:628978
22. Kume S, Uzu T, Maegawa H, Koya D. Autophagy: a novel therapeutic target for kidney diseases. *Clin Exp Nephrol*. 2012 Dec;16(6):827-32.
23. Kume S, Thomas MC, Koya D. Nutrient sensing, autophagy, and diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2012 Jan;61(1):23-9.

〔学会発表〕(計 3 件)

第 58 回日本腎臓学会学術集会 北田宗弘 たんぱく質制限による 2 型糖尿病腎尿細管におけるミトコンドリアの断片化と融合バランスの是正と腎保護効果 (2015 年 6 月 6 日 名古屋国際会議場 愛知県名古屋市)

第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 北田宗弘 たんぱく質制限の 2 型糖尿病ラット腎症に対する腎保護効果 (2015 年 5 月 23 日 海峡メッセ下関他 山口県下関市)

第 55 回日本腎臓学会学術集会 北田宗弘 2 型糖尿病腎症における高度たんぱく質制限の腎保護効果と糖・脂質代謝への影響 (2012 年 6 月 3 日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 2 件)

1. 北田宗弘, 古家大祐 腎疾患と Sirt1-尿細管間質病変における役割 Annual Review 2015 137-142 中外医学社
2. Kitada M, Koya D The use of calorie restriction mimetics to study aging Biological Aging: Methods and Protocols Second Edition (Trygve O. Tollefsbol Editor), 95-107, Humana Press, 2013

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

古家 大祐 (KOYA, Daisuke)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 70242980

(3)連携研究者

久米 真司 (KUME, Shinji)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号 : 00452235