

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282028

研究課題名(和文) 栄養応答シグナルの破綻による代謝疾患の発症機構の理解と制御手段の確立

研究課題名(英文) Alteration in nutrient sensing and metabolic diseases

研究代表者

古家 大祐 (KOYA, Daisuke)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70242980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：高カロリー食によって、肝細胞における栄養応答反応であるサーチュイン、オートファジー機構の破綻によって、代謝異常と非アルコール性脂肪肝炎が生じることを見出した。それら代謝異常と病理所見は、ケト原性アミノ酸負荷によるサーチュイン、オートファジー機構破綻の修復を介して改善した。さらに、カロリー制限に加えて、たんぱく質制限食が糖尿病状態におけるオートファジー機構の破綻を防ぐことによって、代謝異常のみならず、既に進行した腎障害を改善することを見出した。特に、代謝異常の改善はインスリン抵抗性の改善を伴っており、インスリン感受性臓器におけるオートファジーの関連が示唆される結果であった。

研究成果の概要(英文)：High-calorie diet caused deregulation of the nutrient sensing signaling such as sirtuin-autophagy, thereby resulting in metabolic abnormalities and non-alcoholic fatty liver disease. Those metabolic abnormalities and pathological findings were improved through normalization of sirtuin-autophagy dysregulation by treatment with ketogenic amino acid load. Furthermore, in addition to the calorie restriction, protein-restricted diet intervened autophagy dysregulation in diabetic condition in the kidney, especially proximal tubular cells, resulting in advanced renal pathologies. In particular, improvement of metabolic abnormalities were accompanied by an improvement in insulin resistance, which might be due to the normalization of autophagy dysregulation in insulin sensitivity organs. In conclusion, autophagy regulation could be a crucial therapeutic strategy for metabolic unhealth and its related organ injury.

研究分野：糖尿病学、腎臓病学

キーワード：オートファジー カロリー制限 たんぱく質制限 ケイ原性アミノ酸 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

平成 24 年 9 月総務省統計局からの報告では、65 歳以上の老年人口の総人口に占める割合は 24.1%となっている。この現状に加え少子化問題を考慮すると、20 年後には 30%強が 65 歳以上となり、わが国は超高齢化社会に突入する。こうした問題に対処するための重要な解決策は、高齢者が肉体的・精神的健康を維持して、個人としても社会においても生産的な老後を送ることである。したがって、加齢とともに近年の飽食時代に著増しているメタボリックシンドロームや糖尿病などの代謝疾患とそれに関連する QOL を損なう血管障害に対して、栄養応答の破綻が成因であるとの観点から、その分子機構を統合的に理解すること、さらにその成果に基づいて新たな治療法を講じていくことが、わが国にとって急務の課題である。

2. 研究の目的

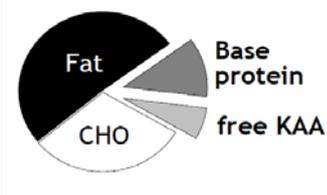
生体は様々な栄養応答シグナルによって恒常性を維持しているが、加齢および肥満によるその破綻は肝臓や脂肪細胞の慢性炎症とインスリン抵抗性を惹起する。その結果、加齢に伴い著増するメタボリックシンドロームや糖尿病に代表される代謝障害と様々な動脈硬化性疾患を併発して、個々の QOL を損なうとともに生命予後も悪化する。今回、栄養応答シグナルの破綻によるオートファジー機構の制御不全がこれらの健康障害を引き起こすと仮説し、検討を行う。本研究では、飽食の時代にある今、栄養シグナルの破綻を介する代謝疾患の分子基盤を解明するとともに、その対策を目指す。これら成果は、代謝疾患とそれによって引き起こされる動脈硬化性疾患のみならず、老化に伴う疾患の新たな治療法の開発に繋がり、わが国が直面している高齢化社会に新たな希望の光をもたらすと確信している。

3. 研究の方法

(1) 8 週齢の C57/B16 マウスを、①通常食、②高脂肪食 (脂質 50%/総エネルギー比)、③高脂肪食+ケト原性アミノ酸負荷 (leucine,

isoleucine, valine, lysine and threonine、図 1) に分け 16 週間飼育して、経時

図 1. ケト原性アミノ酸食の組成



的に糖負荷試験と最終には肝臓の組織検査と栄養応答シグナルを検討した。また、8 週間高脂肪食負荷後に、高脂肪食+ケト原性アミノ酸負荷にて介入して、非アルコール性脂肪肝炎、代謝異常が改善するかを糖負荷試験、肝臓組織所見、栄養応答シグナルにて検討した。

(2) 24 週齢の肥満 2 型糖尿病ラット (Wistar Fatty rat) に、通常食 (Protein 23.84%, Lipid 16.8%, Carbohydrate 59.36%, Energy 3.55kcal/g; STD)、低たんぱく質食 (Protein 5.77%, Lipid 16.48%, Carbohydrate 77.75%, Energy 3.54kcal/g; LPD) にて 20 週間介入して、代謝検査 (HbA1c、インスリン値、シスタチン C)、組織検査 (Masson-Trichrome 染色, PAS 染色, Kim-1 免疫染色, 電子顕微鏡検査, CD68 免疫染色) と、栄養応答シグナル (mTOR 経路: p-S6RP 免疫染色, オートファジー関連: p62 免疫染色)、アポトーシス関連: cleaved caspase3 を検討した。一部のラットには、30%カロリー制限を行い組織検査を行った。さらに、LC3-GFP トランスジェニックマウスを用い、オートファジーの可視化した。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食負荷によって、栄養応答シグナルのリン酸化 AMPK、sirt1 発現の減弱がみられたが、ケト原性アミノ酸負荷によってそれらシグナルの変異の改善とともに、mTOR 活性

の減弱もみられた(図2)。組織学的にも、

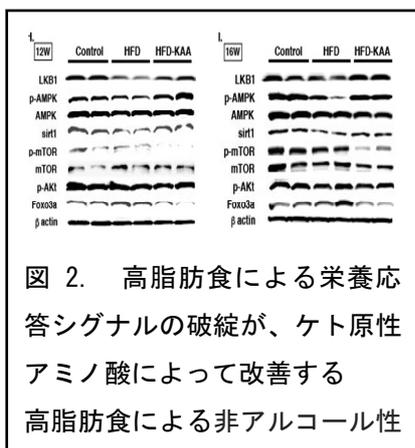


図 2. 高脂肪食による栄養応答シグナルの破綻が、ケト原性アミノ酸によって改善する
高脂肪食による非アルコール性

脂肪肝炎の改善(図3)、代謝異常の改善がみられた。さらに、既に、脂肪肝炎を呈した高脂肪食負荷マウスに対して、ケト

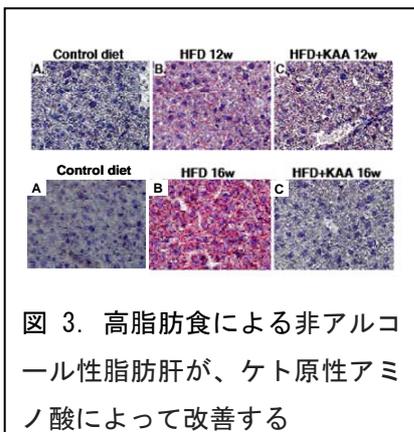


図 3. 高脂肪食による非アルコール性脂肪肝が、ケト原性アミノ酸によって改善する

原性アミノ酸負荷にて介入したところ、栄養応答シグナルの変異の改善とともに、代謝異常と脂肪肝炎の改善もみられた。以上の結果から、ケト原性アミノ酸によって、高脂肪食時におけるオートファジーの低下が非アルコール性脂肪肝形成と耐糖能異常に重要な役割を演じていること、さらにケト原性アミノ酸による栄養応答シグナルの破綻の改善が、オートファジー機構を介して、非アルコール性脂肪肝形成と耐糖能異常を改善しえることが明らかとなった。

(2) 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)の増大を認めたが、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UA1b/Cr比およびULFAB/Crは、それぞれCONT群20.1±26.2μg/gCr(UA1b/Cr),

6.7±3.3μg/gCr(ULFAB/Cr)に対して、DM-STD群1048.4±1432.5μg/gCr, p<

0.05(UA1b/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UA1b/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±0.43mg/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UA1b(DM-STD:DM+LPD12172.8±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

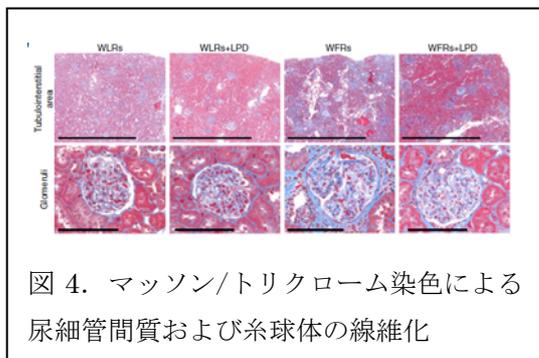


図4. マッソン/トリクローム染色による尿細管間質および糸球体の線維化

線維化は改善した(図4)。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-1mRNA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の変異、アポトーシス：

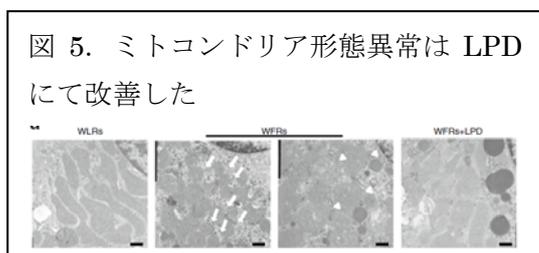


図5. ミトコンドリア形態異常はLPDにて改善した

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(図5)。

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。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した。

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9件)

- ① Kitada M, Ogura Y, Suzuki T, Sen S, Lee SM, Kanasaki K, Kume S, Koya D. A very-low-protein diet ameliorates advanced diabetic nephropathy through autophagy induction by suppression of the mTORC1 pathway in Wistar fatty rats, an animal model of type 2 diabetes and obesity. *Diabetologia*. 2016 Jun;59(6):1307-17. doi: 10.1007/s00125-016-3925-4. 査読有
- ② Otoda T, Kanasaki K, Koya D. Low-protein diet for diabetic nephropathy. *Curr Diab Rep*. 2014;14(9):523. doi: 10.1007/s11892-014-0523-z. 査読有
- ③ Kitada M, Kume S, Koya D. Role of sirtuins in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014 Jan;23(1):75-9. doi: 10.1097/01.mnh.0000437330.85675.ac. 査読有
- ④ Kitada M, Koya D. Renal protective

- effects of resveratrol. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:568093. doi: 10.1155/2013/568093. 査読有
- ⑤ Kitada M, Koya D. SIRT1 in Type 2 Diabetes: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Diabetes Metab J*. 2013 Oct;37(5):315-25. doi:10.4093/dmj.2013.37.5.315. 査読有
- ⑥ Kitada M, Koya D. The use of calorie restriction mimetics to study aging. *Methods Mol Biol*. 2013;1048:95-107. doi: 10.1007/978-1-62703-556-9_8. 査読有
- ⑦ 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 Oct;1830(10):4820-7. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.06.014. 査読有
- ⑧ 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 Oct;1832(10):1605-12. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.05.003. 査読有
- ⑨ 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 Feb;124(3):153-64. doi:

10.1042/CS20120190. 査読有

[学会発表] (計 3件)

- ① 北田宗弘、古家大祐. 糖尿病腎症の治療(食事療法を中心に) 第30回日本糖尿病合併症学会 2015年11月28日 ウィンク愛知(愛知県名古屋市)
- ② Daisuke Koya. High fat diet-induced hepatosteatosis was ameliorated by the treatment with ketogenic aminoacid 2015ICOMS Korea 2015年11月14日 Walkerhill Hotel (Seoul, Korea)
- ③ 北田宗弘、渡邊愛、小倉慶雄、鈴木妙子、金崎啓造、西澤誠、中川淳、古家大祐 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 第58回日本糖尿病学会 2015年5月23日 ぱしふいっくびーなす(山口県下関市)

[その他]

<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~endocrin/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古家 大祐 (KOYA, Daisuke)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70242980

(2) 研究分担者

北田 宗弘 (KITADA, Munehiro)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40434469

金崎 啓造 (KANASAKI, Keizo)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 60589919