

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461219

研究課題名(和文) 脂肪酸バランスの是正を標的とした新規糖尿病性腎症治療の開発

研究課題名(英文) Fatty acid composition and diabetic nephropathy

研究代表者

金崎 雅美 (Kanasaki, Masami)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：30402720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では尿蛋白に付随し近位尿細管細胞に流入する「飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランス制御」が糖尿病腎症の治療標的と成り得るかを検討した。オメガ3系不飽和脂肪酸製剤の顕性蛋白尿期糖尿病性腎症に対する影響を検討した結果、同薬剤は尿蛋白量に影響を与えず腎機能低下速度の改善をもたらした。飽和脂肪酸を一価不飽和脂肪酸に変換する酵素SCD1の過剰発現細胞では細胞障害が軽減されたが、遺伝子改変マウスでは細胞保護効果は再現されなかった。SCD1遺伝子内一塩基多型と腎症予後との関連解析の結果、SCD1遺伝子内に腎症感受性遺伝子は存在しなかった。脂肪酸分画制御を標的とした腎症治療の確立には更なる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to identify the role of free fatty acid (FFA) composition in the progression of diabetic nephropathy, a leading cause of renal failure in Japan. Omega-3 unsaturated fatty acid prevented rapid renal function decline without affecting levels of proteinuria in the diabetic patients with overt proteinuria. SCD1 is a rate limiting enzyme converting saturated FFAs to monounsaturated FFAs. SCD1 overexpression in the cultured proximal tubular cells showed cell-protective role, however SCD1-transgenic animal show little renoprotective effect. We analyzed the relationship between the SNPs in SCD1 gene and the progression of diabetic nephropathy. However, we did not identify any relationship. Although, according to the result from clinical study, unsaturated FFAs may have a renoprotective role in diabetic nephropathy, further examination are needed to conclude the effectiveness of unsaturated FFAs on diabetic nephropathy

研究分野：腎臓内科

キーワード：糖尿病性腎症 脂肪酸 飽和脂肪酸 不飽和脂肪酸 蛋白尿

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症(腎症)は我が国の透析導入原疾患の第一位であり、今もなお新規治療法の開発が望まれている。腎症は微量アルブミン尿期から顕性蛋白尿期を経て、末期腎不全に至る進行性の病態である。集学的治療により尿蛋白の減少がもたらされ、腎予後が改善する症例がいる一方で、治療によっても尿蛋白が減少せず、末期腎不全に至る症例も未だ多く存在している。よって、これら治療抵抗性腎症に対する新規治療法の開発は重要な研究課題の一つである。この課題に対し、「尿蛋白に伴う腎脂肪酸毒性からの近位尿細管保護」を目指した基礎研究を進めてきた。これら一連の検討の中で、尿蛋白に付随し近位尿細管細胞に流入する「飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランス制御」が腎症における治療標的と成り得るとの知見を示した。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究ではまず、細胞実験ならびに動物実験を中心とした基礎研究により、近位尿細管細胞内の「飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランス制御」に関わる新規治療標的分子の同定を目指すと共に、現在既に治療抵抗性尿蛋白を呈する腎症症例を対象とした臨床研究にて、3系多価不飽和脂肪酸製剤による飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸バランスの是正が、尿細管障害の改善を伴う腎機能低下抑制効果を示しうるかを検討することとした。これらの研究を通じて、本研究では、治療抵抗性腎症における治療標的を「尿蛋白の量」から「尿蛋白の質」へ移し、持続する尿蛋白からの近位尿細管保護を目指した新規治療法の開発を目的とした。

(2) 「尿蛋白の量」を減少させることを主眼としたこれまでの腎症研究が一定の成果を示す一方で、尿蛋白を減少できない症例に対しては、次の有効な治療法を提案できず、末期腎不全への経過観察を余儀なくされている。本研究では、近位尿細管細胞における脂肪酸分画の是正を標的とした治療標的分子の同定を目指すと共に、現時点で既に次の治療法を提案することができていない治療抵抗性症例に対する治療法の一つとして、3系多価不飽和脂肪酸製剤の可能性を検討する。「尿蛋白の量」だけではなく、「尿蛋白の質」を制御することが、治療抵抗性症例に対する治療標的として重要であるという、腎症研究の新たな方向性を示す先駆的研究である。

## 3. 研究の方法

(1) 糖尿病状態で認める腎内 SCD1 発現の低下が脂肪酸結合アルブミンによる尿細管障害に及ぼす影響を、近位尿細管細胞特異的 SCD1 欠損マウスを作製し検討する。

(2) 近位尿細管細胞特異的 SCD1 過剰発現マウスを作製し、糖尿病状態においても SCD1 発現を維持することで、脂肪酸結合アルブミンによる尿細管障害の増悪を抑制しうるかを検討する。

(3) ヒト糖尿病コホートを用い、ヒト SCD 遺伝子(ヒトでは SCD1 と SCD5)内に存在する一塩基多型解析(SNPs)を行い、SCD の腎症感受性遺伝子としての可能性を検討する。

(4) 尿中脂肪酸/アルブミン比の増加や尿中飽和脂肪酸分画の増加が腎症における尿細管障害の悪化と関連しうるかを、治療抵抗性腎症症例、非腎症症例の尿検体を用い比較検討する。

(5) 治療抵抗性腎症症例において、3系多価不飽和脂肪酸の経口投与による血中・尿中脂肪酸バランスの是正が、尿細管障害や腎機能低下速度の改善をもたらすかを検討する。本研究は高中性脂肪を対し、3製剤を内服されている腎症症例に対する後ろ向き観察研究である。対象患者は投与開始前、血糖コントロール良好(HbA1c<7.0)、レニンアンジオテンシン系阻害薬内服中、尿中蛋白排泄 0.5g/日以上、顕性 2 型糖尿病性腎症(eGFR>30)を有する外来症例を対象とした。ただし、担癌患者を含む腎症以外の明らかな他臓器合併症を有する患者は対象外とした。評価項目として、血中脂肪酸分画の変化、尿細管障害マーカー(尿中 2 ミクログロブリン、尿中 NAG、尿中 L-FABP、尿中 Ngal)の測定、eGFR 低下速度の解析を行う。(倫理委員会承認番号: 24-119)

## 4. 研究成果

(1) SCD1 を近位尿細管細胞特異的に過剰発現する遺伝子改変マウスならびに欠損する遺伝子改変マウスを作製した。ウェスタンブロット法、免疫染色により SCD1 発現の過剰発現ならびに消失がそれぞれの遺伝子改変マウスにおいて確認された。

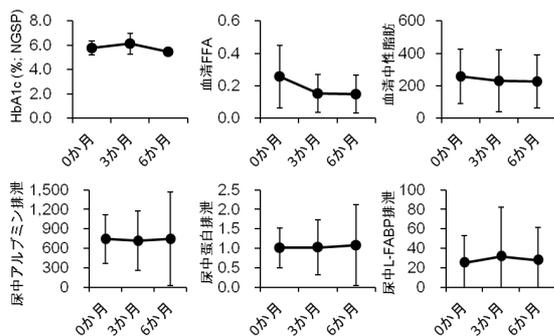
(2) これらのマウスはともに正常の発育を示し、通常飼育条件で腎臓における大きな表現系を示さなかった。これらのマウスに対し糖尿病状態で増加する脂肪酸結合アルブミンによる尿細管障害モデルを惹起したが、細胞実験で示された SCD1 の腎保護効果は再現されなかった。

(3) SCD1 遺伝子内に存在する一塩基多型 (SNPs) と腎症予後との関連解析を行ったが、SCD1 遺伝子内に腎症感受性遺伝子は存在しなかった。

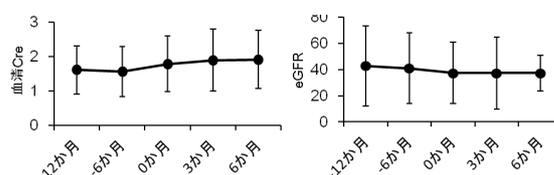
(4) 尿中脂肪酸/アルブミン比の増加や尿中飽和脂肪酸分画の増加が腎症における尿細管障害の悪化と関連するかを、治療抵抗性腎症症例、非腎症症例の尿検体を用い比較検討したが、尿中脂肪酸濃度は尿蛋白排泄量 3g 以上の症例でのみ検出可能であり、現在の臨床検査による検査感度ではこれらを検討しえないことが明らかとなった。今後、感度を改善した尿中脂肪酸濃度の測定方法の開発を目指す必要があることが示された。

(5) 3 製剤内服後の各種臨床評価項目の推移を図 2 に示す。投与開始後、血清中の 3 脂肪酸分画は有意に増加した。一方、飽和脂肪酸分画の有意な減少が認められ、3 製剤による脂肪酸分画の是正が確認された。

投与開始後、HbA1c に大きな変動はみられなかったが、血清脂肪酸 (FFA) ならびに血清中性脂肪の有意な低下が認められ、脂質異常の改善が認められた。一方、尿中アルブミン、尿中蛋白、尿中 L-FABP と、糸球体病変ならびに尿細管病変の程度を反映する各種指標には大きな変動は認められなかった。



オメガ 3 系不飽和脂肪酸製剤の顕性蛋白尿期糖尿病性腎症の腎機能に及ぼす影響を検討した結果、3 製剤内服前後の血清 Cre 値、eGFR の推移を図に示す。投与前 6 カ月間で上昇傾向にあった血清 Cre 値、下降傾向にあった eGFR は投与後 6 カ月後に横ばいとなり、投与後に腎機能障害の進展が抑制される結果となった。



(6) 細胞実験ならびに 3 系多価不飽和脂肪酸の経口投与による臨床研究からは不飽

和脂肪酸投与による腎症改善効果を示すことができた。これは現在治療法を提示できていない治療抵抗性牽制蛋白尿を有する糖尿病症例に対する新たな治療法としての期待を示すものである。しかし一方で、遺伝子改変マウスを用いた検討ではこれらの腎保護効果を確認することはできなかった。これらの矛盾点の解明ならびに更なる臨床応用への可能性の確立のためには更なる検討が必要である。

## 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)

Tagawa A, Yasuda M, Kume S, Yamahara K, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S, Koya D, Asanuma K, Kim EH, Haneda M, Kajiura N, Hayashi K, Ohashi H, Ugi S, Maegawa H, Uzu T. Impaired Podocyte Autophagy Exacerbates Proteinuria in Diabetic Nephropathy. *Diabetes*. 2016 Mar;65(3):755-67. doi: 10.2337/db15-0473. (査読あり)

Tanaka Y, Kume S, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S, Ugi S, Sugaya T, Uzu T, Maegawa H. Renoprotective effect of DPP-4 inhibitors against free fatty acid-bound albumin-induced renal proximal tubular cell injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Feb 12;470(3):539-45. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.109. (査読あり)

Takagi A, Kume S, Kondo M, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S, Koya D, Haneda M, Chano T, Matsusaka T, Nagao K, Adachi Y, Chan L, Maegawa H, Uzu T. Mammalian autophagy is essential for hepatic and renal ketogenesis during starvation. *Sci Rep*. 2016 Jan 6;6:18944. doi: 10.1038/srep18944. (査読あり)

Araki S, Haneda M, Koya D, Kondo K, Tanaka S, Arima H, Kume S, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Ugi S, Kawai H, Araki H, Uzu T, Maegawa H. Urinary Potassium Excretion and Renal and Cardiovascular Complications in Patients with Type 2 Diabetes and Normal Renal Function. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Dec 7;10(12):2152-8. doi: 10.2215/CJN.00980115. (査読あり)

Tanaka Y, Kume S, Araki H, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki S, Nakagawa F, Koya D, Haneda M, Maegawa H, Uzu T. 1-MethylNicotinamide ameliorates

lipotoxicity-induced oxidative stress and cell death in kidney proximal tubular cells. *Free Radic Biol Med.* 2015 Dec;89:831-41. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.414. (査読あり)

Yasuda-Yamahara M, Kume S, Yamahara K, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S, Koya D, Haneda M, Ugi S, Maegawa H, Uzu T. Lamp-2 deficiency prevents high-fat diet-induced obese diabetes via enhancing energy expenditure. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Sep 18;465(2):249-55. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.010. (査読あり)

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. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.04.001. (査読あり)

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. doi: 10.1681/ASN.2012111080. (査読あり)

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. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.05.026. (査読あり)

〔学会発表〕(計 8 件)

安田 真子, 久米 真司, 中澤 純, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 荒木 信一, Paul Saftig, 宇津 貴, 前川 聡. シャペロン介在性オートファジー欠損は高脂肪食負荷肥満糖尿病の発症を抑制する. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015 年 5 月 21 日、山口

桑形 尚吾, 久米 真司, 中澤 純, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 荒木 信一, 古家 大祐, 羽田 勝計, 宇津 貴, 前川 聡. 糖尿病性腎

症における近位尿細管障害を mTORC1 依存性に制御する新規 microRNAs の同定. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015 年 5 月 21 日、山口

田中 裕紀, 久米 真司, 中澤 純, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 荒木 信一, 古家 大祐, 羽田 勝計, 宇津 貴, 前川 聡. NAD代謝関連酵素 Nicotinamide n-methyltransferase(NNMT)は糖尿病性腎症の脂肪酸結合アルブミンによる近位尿細管障害を抑制する. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015 年 5 月 21 日、山口

小野 真也, 安田 真子, 久米 真司, 関根 理, 中澤 純, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 荒木 信一, 古家 大祐, 羽田 勝計, 宇津 貴, 前川 聡. 糸球体上皮細胞の機能維持における蛋白 O-GlcNAc 修飾の役割. 第 58 回日本腎臓学会学術総会, 2015 年 6 月 5 日、名古屋

田川 安都子, 安田 真子, 久米 真司, 中澤 純, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 荒木 信一, 古家 大祐, 羽田 勝計, 宇津 貴, 前川 聡. 糸球体上皮細胞におけるオートファジー不全是糖尿病性腎症における蛋白尿を増悪させる. 第 58 回日本腎臓学会学術総会, 2015 年 6 月 5 日、名古屋

高木 彩乃, 久米 真司, 中澤 純, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 荒木 信一, 宇津 貴, 前川 聡. 飢餓時の糖新生ならびにケトン産生における肝腎オートファジーの役割. 第 58 回日本腎臓学会学術総会, 2015 年 6 月 5 日、名古屋

高木 彩乃, 久米 真司, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 一色 啓二, 荒木 信一, 茶野 徳宏, 柏木 厚典, 宇津 貴, 前川 聡. 飢餓時の糖新生ならびにケトン産生におけるオートファジーの役割. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014 年 5 月 22 日、大阪

安田 真子, 田川 安都子, 久米 真司, 田中 敬, 金崎 雅美, 荒木 久澄, 一色 啓二, 荒木 信一, 古家 大祐, 羽田 勝計, 柏木 厚典, 宇津 貴, 前川 聡. 糸球体上皮細胞オートファジー不全是糖尿病性腎症における蛋白尿を増悪させる. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014 年 5 月 22 日、大阪

〔その他〕  
研究室ホームページ  
<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmed3/snai/kenkyu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金崎 雅美 (KANASAKI, Masami)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30402720

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宇津 貴 (UZU, Takashi)  
滋賀医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：20422884

前田 士郎 (MAEDA, Shiro)  
独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学  
学研究センター・チームリーダー  
研究者番号：50314159

(1) 研究協力者

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