

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461361

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームにおける腎障害とVaspinの意義

研究課題名(英文)The role of vaspin in metabolic syndrome associated renal disease

研究代表者

中司 敦子(Nakatsuka, Atsuko)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：00625949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでにアディポカインであるvaspinを同定し、vaspinが脂肪細胞から血中へ分泌され、インスリン抵抗性や肥満・脂肪肝、動脈硬化を抑制することを明らかにした。本研究では肥満や糖尿病の病態におけるvaspinの腎臓への作用と機序について検討した。Vaspinトランスジェニック(Tg)およびノックアウト(Vaspin<sup>-/-</sup>)、野生型マウスを用いて、ストレプトゾトシンで糖尿病を誘発、また高脂肪高蔗糖食で肥満糖尿病モデルを作成し、腎病変について検討した。いずれのモデルにおいても、vaspinは尿細管細胞障害を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously identified an adipokine, vaspin. In this study, we checked the beneficial role of vaspin in renal injury of metabolic syndrome. Vaspin transgenic(Tg) and vaspin<sup>-/-</sup> mice were fed with high fat high sucrose (HFHS) diet. At 30 weeks of age, prominent vacuolation in the kidney tissues of vaspin<sup>-/-</sup> mice under HFHS diet are observed, and it is ameliorated in Tg mice. These vacuoles are toluidine blue positive and EM demonstrates lysosomal enlargement. TUNEL-positive apoptotic tubular cells increase in vaspin<sup>-/-</sup> mice fed with HFHS compared with Tg and wild type mice. Next, we investigated the streptozotocin(STZ) induced-diabetes model. In Tg mice, the dilatation and thinning of tubules induced by diabetes are ameliorated. TUNEL-positive apoptotic cells are increased in STZ induced diabetic vaspin<sup>-/-</sup> mice, while in Tg mice apoptosis was inhibited. It is suspected that vaspin ameliorate tubulointerstitial injury in diabetic and metabolic syndrome associated renal disease.

研究分野：代謝・糖尿病・腎臓

キーワード：メタボリックシンドローム 慢性腎臓病 アディポカイン

## 1. 研究開始当初の背景

平成22年度の国民栄養調査では、40歳から75歳の男性の2人に1人、女性の5人に1人がメタボリックシンドローム若しくは予備軍とされている。メタボリックシンドロームは内臓脂肪蓄積がその上流に存在し、肥満や高血圧、脂質異常症、糖尿病や動脈硬化などを引き起こし、心血管病や慢性腎臓病の合併が生命予後に大きく関与することからその対策は社会的・医療経済的に重要な課題である。さらに腎臓は尿検査や血中クレアチニン値測定を行わなければ初期病変を察知しにくく、自覚症状が出る頃には不可逆性の腎機能低下を呈しており、透析導入数の増加が抑制できないことも近年の問題である。メタボリックシンドロームの各構成要素は腎障害の発症・進展要素となり、その逆の関連も存在し悪循環を形成している。従って、この悪循環の遮断は治療戦略上も有用であり、アディポカイン vaspinに関する本研究を行うに至った。

## 2. 研究の目的

我々はアディポカインであるvaspinを発見し、肥満やインスリン抵抗性・脂肪肝を改善させることや、血管内皮細胞のアポトーシス抑制を介して動脈硬化を抑制することを明らかにし報告した(Diabetes 2012, Circ Res 2013)。また、種々の細胞ストレスにより小胞体から細胞表面に移動したGRP78に、vaspinが結合してAktリン酸化を始めとするシグナルを伝達することを解明した。近年メタボリックシンドロームが慢性腎臓病のリスクであり、逆に慢性腎臓病における腎性インスリン抵抗性や腎性脂質異常症などがメタボリックシンドロームを増悪させ、悪循環に至ることが注目されている。そこで、本研究ではvaspinによるメタボリックシンドロームや糖尿病における腎障害への作用の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

Vaspinトランスジェニック(Tg)、ノックアウト(vaspin<sup>-/-</sup>)、野生型マウスを用いて、ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病モデル、高脂肪高蔗糖(HF)食飼育肥満糖尿病モデルを作成し、腎病変について検討した。

また予備実験では、尿細管間質病変に対するvaspinの改善作用が示唆されたため、近位尿細管細胞に着目する。培養近位尿細管(HK2)細胞に、高糖濃度、インスリン、アルブミン、小胞体ストレス誘導物質(tunicamycinやthapsigargin)、飽和脂肪酸(パルミチン酸)を添加して、細胞障害・アポトーシス機構を解明した。さらにvaspinを添加して、vaspinの細胞保護作用と、その作用機序を検討した。

## 4. 研究成果

(1) HFHS 飼育肥満糖尿病モデルを用いた検討

HF食飼育vaspin<sup>-/-</sup>マウスの腎尿細管に著しい空胞形成を認め、Tgマウスでは抑制されていた。この空胞はトルイジンブルーで染色され、電顕ではライソゾームの拡大であった。また、尿細管におけるTUNEL陽性アポトーシス細胞がvaspin<sup>-/-</sup>マウスで増加し、Tgマウスでは尿細管細胞のアポトーシスの抑制が観察された。

(2) STZ誘発糖尿病モデルを用いた検討

STZで誘発した糖尿病マウスの糸球体肥大や尿細管腔の拡大・尿細管細胞菲薄化は、Tgマウスで軽減し、vaspin<sup>-/-</sup>マウスで増悪していた。また、尿細管細胞のアポトーシスはvaspin<sup>-/-</sup>マウスで増強し、Tgマウスで抑制されていた。

(3) HK2細胞を用いた検討

HK2細胞に高糖濃度、高浸透圧、インスリン、アルブミン、小胞体ストレス誘導物質(tunicamycin)、パルミチン酸添加による刺激を行い、小胞体ストレス応答関連分子やライソゾーム関連分子、アポトーシス関連分

子の発現をウエスタンブロットで観察した。Tunicamycin添加により、GRP78発現やeIF2 $\alpha$ リン酸化は亢進し、小胞体ストレス誘導性アポトーシスに関連する分子の発現も増強した。Vaspinを添加すること、これらの発現増強が抑制された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Antiobesity Action of ACAM by Modulating the Dynamics of Cell Adhesion and Actin Polymerization in Adipocytes. Murakami K, Eguchi J, Hida K, Nakatsuka A, Katayama A, Sakurai M, Choshi H, Furutani M, Ogawa D, Takei K, Otsuka F, Wada J. *Diabetes*. 65:1255-1267, 2016. (査読有) doi: 10.2337/db15-1304.
2. Insufficiency of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase is risk for lean non-alcoholic steatohepatitis. Nakatsuka A, Matsuyama M, Yamaguchi S, Katayama A, Eguchi J, Murakami K, Teshigawara S, Ogawa D, Wada N, Yasunaka T, Ikeda F, Takaki A, Watanabe E, Wada J. *Sci Rep*. 6: 21721, 2016. (査読有) doi: 10.2337/db15-1304. (the top 100 read Scientific Reports articles in 2016.)
3. Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial Dysfunction in Diabetes. Wada J and Nakatsuka A. *Acta Med Okayama*. 70:151-158, 2016. (査読有)
4. Translocase of inner mitochondrial membrane 44 alters the mitochondrial fusion and fission dynamics and protects from type 2 diabetes. Wang Y, Katayama A, Terami T, Han X, Nunoue T, Zhang D, Teshigawara S, Eguchi J, Nakatsuka A,

Murakami K, Ogawa D, Furuta Y, Makino H, Wada J. *Metabolism*. 64(6):677-88, 2015. (査読有) doi: 10.1016/j.metabol.2015.02.004.

5. Identification of circulating miR-101, miR-375 and miR-802 as biomarkers for type 2 diabetes. Higuchi C, Nakatsuka A, Eguchi J, Teshigawara S, Kanzaki M, Katayama A, Yamaguchi S, Takahashi N, Murakami K, Ogawa D, Sasaki S, Makino H, Wada J. *Metabolism*. 64(4):489-97, 2015. (査読有) doi: 10.1016/j.metabol.2014.12.003.

6. Beneficial impact of Gpnmb and its significance as a biomarker in nonalcoholic steatohepatitis. Katayama A, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Teshigawara S, Kanzaki M, Nunoue T, Hida K, Wada N, Yasunaka T, Ikeda F, Takaki A, Yamamoto K, Kiyonari H, Makino H, Wada J. *Sci Rep*. 5:16920, 2015 (査読有) doi: 10.1038/srep16920.

7. Pemt deficiency ameliorates endoplasmic reticulum stress in diabetic nephropathy. Watanabe M†, \*Nakatsuka A†, Murakami K, Inoue K, Terami T, Higuchi C, Katayama A, Teshigawara S, Eguchi J, Ogawa D, Watanabe E, Wada J, Makino H.( †; equally contribution). *PLoS One*. 9(3):e92647, 2014. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0092647.

8. Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. Terami N, Ogawa D, Tachibana H, Hatanaka T, Wada J, Nakatsuka A, Eguchi J, Horiguchi CS, Nishii N, Yamada H, Takei K, Makino H. *PLoS One*. 9(6):e100777, 2014. (査読有) doi:

10.1371/journal.pone.0100777.

9. Nuclear hormone receptor expression in mouse kidney and renal cell lines. Ogawa D, Eguchi J, Wada J, Terami N, Hatanaka T, Tachibana H, Nakatsuka A, Horiguchi CS, Nishii N, Makino H. PLoS One. 9(1):e85594, 2014. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0085594.

10. Serum vaspin levels are associated with physical activity or physical fitness in Japanese: a pilot study. Miyatake N, Wada J, Nakatsuka A, Sakano N, Teshigawara S, Miyachi M, Tabata I, Numata T. Environ Health Prev Med. 19:200-206, 2014. (査読有) doi: 10.1007/s12199-013-0375-1.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Atsuko Nakatsuka, A protective role of vaspin against proximal tubular cell injuries in diabetes mellitus, Keystone Symposia, Diabetes(J3), 2017 年 1 月, Keystone conference center, Colorado, USA

2. 中司敦子, Vaspin の肥満書における腎障害抑制機序の解明、第 37 回日本肥満学会、2016 年 10 月 7 日、東京ファッションタウン (東京)

3. 中司敦子, 糖尿病性腎症における Vaspin の意義、第 59 回日本腎臓学会総会、2016 年 6 月 17 日、横浜パシフィコ (横浜)

4. 中司敦子, 糖尿病性腎症における Vaspin の意義、第 59 回日本糖尿病学会総会、2016 年 5 月 10 日、国立京都国際会館 (京都)

5. Atsuko Nakatsuka, American Diabetes Association's 75th Scientific Sessions, PEMT deficiency promotes steatohepatitis through sustained apoptosis via clathrin heavy chain-p53 mediated transcriptional mechanisms, 2015 年 6 月 The Boston Convention and Exhibition Center, USA

〔図書〕(計 5 件)

1. 中司敦子, 和田淳, 日本腎臓学会, 日本腎臓学会誌, 糖尿病性腎症の基礎研究, 2017、

58-64

2. 中司敦子, 和田淳, 日本臨床 74 巻増刊号 1, 新時代の臨床糖尿病学 (上) - より良い血糖管理をめざして - . 血糖制御に関わる臓器・関連因子 脂肪細胞, 2016, 258-262,

3. 中司敦子, 和田淳, 医薬ジャーナル社, 糖尿病腎症の治療のポイント 糖尿病腎症進展のメカニズム, 2016, 22-27

4. 中司敦子, 和田淳, 医歯薬出版株式会社, 臨床栄養, 肥満関連腎臓病 2015, 441-444

5. 中司敦子, 和田淳, 新興医学出版社, Modern Physician, 肥満に起因する疾患の検査, 治療のポイントは? - 体重減少の効果を中心に - 慢性腎臓病 (CKD) 2015, 216-218

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

報道関連情報:

日本経済新聞 2016 年 5 月 9 日「脂肪肝酵素も一因に」で、Sci Rep. 6: 21721, 2016. の研究成果に関する報道。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中司 敦子 (NAKATSUKA Atsuko)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号: 00625949

(2) 研究協力者

和田 淳 (WADA Jun)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・腎・免疫・内分泌代謝内科学・教授