

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670433

研究課題名(和文)ミトコンドリア・ダイナミクスを標的としたグレリンによる慢性腎臓病新規治療戦略

研究課題名(英文)The therapeutic strategy by Ghrelin targeting against mitochondria dynamics

研究代表者

脇野 修 (Wakino, Shu)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：50265823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：グレリン(Ghr)は腎障害をミトコンドリア(Mit)由来酸化ストレス低下を介して治癒する。一方腎障害におけるMitダイナミクスの意義が注目されている。糖尿病の腎障害において、Ghrの有効性を検証した。8週齢のC57BL/6マウスへストربتゾトシンを投与し糖尿病発症を確認した後、12週間 Ghr (300 µg/kg)を連日腹腔投与した。その結果Ghrが糖尿病におけるMitの膨化、クリステの断裂を軽快させた。GhrはMitのfissionおよびfusionに影響を与えなかったが、マイトファジー関連分子であるPINK1およびParkinの発現を上昇させた。グレリンが糖尿病性腎症の悪化を抑制する。

研究成果の概要(英文)：Ghrelin have protective effects against renal impairment by reducing renal mitochondria-derived oxidative stress and by improving mitochondrial function. Recent study revealed that mitochondria dynamics plays an important role in the initiation and progression of renal failure. We investigate the efficacy of Ghrelin for the treatment of diabetic kidney impairment. C57BL/6 mice at the age of 8 weeks were subjected to streptozotocin injection in order to render diabetic. After the onset of diabetes, Ghrelin at the dose of 300 µg/kg was administered by daily intraperitoneal injection. We found that swelling of mitochondria and the disruption of mitochondrial cristae in the kidney were ameliorated by the treatment with Ghrelin. Ghrelin increased the expressions of genes related to mitophagy including PINK1 and Perkin, although it did not have any effect on the genes related to mitochondria fission or fusion. We concluded that Ghrelin has renal protective effects in diabetic kidney disease.

研究分野：腎臓病学、内分泌学、代謝学、

キーワード：グレリン ミトコンドリア マイトファジ fission fusion

1. 研究開始当初の背景

心血管事故および腎障害の危険因子として慢性腎臓病 (CKD) の病態解明は急務である。申請者は CKD 進行に対する治療として抗酸化作用を有し消耗性の疾患に有効性の認められる内因性ペプチドの投与を模索してきた。その過程で我が国で発見された消化管ペプチドであるグレリン (Ghr) が腎障害をミトコンドリア (Mit) の機能改善、Mit 由来酸化ストレス低下を介して治癒することを見出した (2013, ASN 口頭発表、PLoS One in revision)。しかもグレリン受容体欠損マウス (Growth hormone secretagogue receptor GHSR 欠損マウス) では野生型マウス (WT) と比べ酸化ストレスが上昇し、腎機能が増悪することを認めた。電子顕微鏡では Mit の伸長が認められた (図 1)。すなわち内因性の Ghr は腎 Mit を標的とし腎保護効果を有するユニークなホルモンであることを発見した。

近年、CKDにおけるMitダイナミクス(動態)の意義が注目されている。Mitは癒合、分裂、自己消化(マイトファジー)を絶えず繰り返しているダイナミックな細胞内小器官である。糖尿病腎症においては糸球体足細胞におけるマイトファジーの障害と高血糖刺激による小分子G蛋白Rhoとその下流のRhoキナーゼの活性化による分裂促進が足細胞死を誘導する(Cell Metab 2012)。また分裂したMitはマイトファジーを誘導し、伸長したMitはマイトファジー抵抗性である(Nature Cell biology 2011)ことから糖尿病などの酸化ストレスが亢進する状況では癒合亢進はマイトファジー抑制となり酸化ストレスが蓄積する可能性が高くなる。実際伸長Mitの認められるGHSR欠損マウスでは酸化ストレスの亢進が認められる。したがってCKDの酸化ストレス亢進下でGhrの作用不足が共存するとCKDが増悪する可能性が示唆される。CKDでは不活性型のGhrであるDesacyl-Ghrの増加が認められ、Ghrの作用不足が腎臓で

存在する。以上より活性型Ghrの低下はCKD進行の増悪因子となり、Ghrの補充がCKD治療において有望視される。

一方申請者および共同研究者は近年各種病態におけるMitの意義につき検討を続けてきた。すなわち、これまで糖尿病とはじめとする生活習慣病の病態として、Mit機能失調に注目してきた(Mitsuishi Diabetes 2012, Mitsuishi BBRC 2011, Miyashita Diabetes 2012, Muraki J Appl Physiol 2012, Mitsuishi Am J Physiol 2013, Tamaki Kindey Int in press)。また急性腎障害(AKI)におけるMit、ペルオキシオーム機能破綻の重要性を報告した(Hasegawa JBC 2010, Ohshima JASN2011, Kinouchi Circ Res 2010)。さらに申請者は、先述のMit動態の調節因子であるRho/Rhoキナーゼ経路の作用について多数報告あり(Kanda Kidney Int. 2003, Wakino Circ Res. 2004, Kanda FASEB J. 2006, Hara Sci Signal, 2011, Tokuyama Int J Obes, 2012)。申請者はreviewを英文誌発表している(Wakino J Pharmacol Sci.2006; Wakino Drug News Perspect. 2005)。

以上の申請者のこれまでの業績、新たな研究データ、近年のRho/Rhoキナーゼの関与などMit動態の研究領域の発展を背景に肥満、糖尿病、腎硬化症の腎障害において、Mit動態を標的とするユニークなペプチドであるGhrがCKD治療戦略として有効かを検証することが本研究の目的である。

2. 研究の目的

慢性腎臓病 (CKD) の病態解明は急務である。申請者は我が国で発見された消化管ペプチドであるグレリン (Ghr) が Mit 由来酸化ストレスの低下を介して腎障害を治癒することを見出した (2013, ASN 口頭発表、PLoS One in revision)。しかも Ghr 受容体欠損マウス (GHSR 欠損マウス) では野生型マウス (WT) と比べ Mit の伸長が認められることを発見した。糖尿病腎症においては糸球体足細胞における Mit オートファジ (マイトファ

ジー)の障害と Rho キナーゼの活性化による Mit 分裂促進が細胞死を誘導する。したがって糖尿病腎症において Ghr 作用不足は Mit 癒合亢進、伸長化はミトファジー抑制となり酸化ストレスが蓄積する。Ghr の作用不足である CKD ではその補充が CKD 治療において有望である。申請者および共同研究者は各種病態における Mit の意義につき検討を続けてきた。さらに申請者は、Rho キナーゼ経路の作用について報告しており review を英文誌発表している。以上を背景にまず種々の腎障害モデルでの Ghr の腎保護作用を Mit 動態関連分子の発現、Mit 形態変化から検討し、GHSR 欠損マウスで確認し、Rho/Rho キナーゼ経路との関連も検討する。ヒト腎生検標本と血清および尿の Ghr、不活性型 Ghr のレベルとの関連を検討する。本研究は CKD を Mit 動態の異常と捉え、Ghr の腎保護効果を詳細に解明する学術的に新規性が高い研究である。得られた知見を臨床検体において検証し、CKD に対する新しい診断マーカーの発見、新しい治療モードの開発が可能となる。

3. 研究の方法

2 型糖尿病のモデルマウスである db/db マウスに 8 週齢から 16 週齢まで 8 週間に渡りグレリン(300 μ g/kg/day)を連日腹腔投与した。db/db マウスの対照群として m/m マウスを使用し、また、グレリン非投与群へは生理食塩水を連日腹腔投与した。腎機能や体重について検討した。

1 型糖尿病のモデルとして、8 週齢の C57BL/6 マウスヘストレプトゾトシン(STZ)50mg/kg を 5 日間連続で腹腔投与した。血糖値にて糖尿病発症を確認した後、12 週齢から 24 週齢まで 12 週間に渡りグレリン(300 μ g/kg/day)を連日腹腔投与した。腎機能および体重について検討した。

4. 研究成果

2 型糖尿病のモデルマウスである db/db マウスで検討を行った。16 週齢での尿検査では、

尿蛋白および尿アルブミンのグレリン投与による抑制効果は認めなかった。血液検査での UN、Cr でもグレリン投与による差は認めなかった。体重は、対照群である m/m マウスではグレリン投与による差はなかったが、db/db マウスではグレリン投与により体重が増加した。しかし、摂食量はグレリン投与でも変わらなかったため、グレリン投与による代謝の変化により体重が増加したことが示唆された。

次に、1 型糖尿病モデルとして STZ 投与マウスでの検討を行った。24 週齢での尿検査では尿アルブミンは STZ 投与の糖尿病発症で増加し、グレリンの長期投与でその増加が抑制された。尿蛋白でも、同様の傾向が見られた(有意差はなかった)。尿細管マーカーである NAG では、この傾向はなかった。血液検査では UN には STZ 投与で悪化し、グレリン長期投与により悪化が抑制される傾向にあった(有意差はなかった)。Cr には差を認めなかった。体重は STZ 投与による 1 型糖尿病発症により減少し、グレリンの長期投与によりその減少は抑制された。摂食量はグレリンの長期投与では変わなかった。これらにより代謝の変化によって体重減少を抑制したことが示唆された。また、糖尿病性腎症に対する腎保護効果の機序を解明すべく、24 週齢マウスの sacrifice 後の腎臓を電子顕微鏡で観察した。すると、糸球体では、STZ 投与の群では基底膜が肥厚して凹凸が見られるのに対し、グレリンの長期投与にてその変化が抑制された。また、STZ 投与の群では podocyte の open slit pore は減少し close slit pore は増加するが、これらの変化はグレリンの長期投与した群は弱い変化であった。尿細管細胞では、STZ 投与によりミトコンドリアが全体的に大きく swelling と呼べるような変化をきたしており、内部構造のクリステは粗雑な印象であった。

(1) 考察

消化管から主に分泌されるホルモンであるグレリンの長期投与を、腎代替療法導入の原因となる慢性腎障害で最も患者数が最も多い糖尿病性腎症のモデル動物で行い、腎機能保護の作用を検討した。

2型糖尿病モデルである db/db マウスでは腎機能保護の効果を認めなかったが、多重が増加しており、肥満の影響で糖尿病の病勢が悪化したことや、肥満性腎症の悪化を起し、グレリン投与による腎保護効果を相殺した可能性も否定できなかった。

1型糖尿病モデルである STZ 投与マウスにおいて、尿アルブミンの増加を抑制した。電子顕微鏡で、糸球体および尿細管にて糖尿病によると考えられる変化も抑制するという結果であった。これまで虚血再灌流や敗血症での AKI のモデル動物を用いて、グレリン投与による腎保護効果を示す報告はあった。また、慢性腎障害のモデル動物や人においてもグレリン投与する研究はあったが、投与期間が単回から2週間と短く、また評価項目が腎機能ではなく、体重や摂食量の増加であり、腎機能保護作用については差がなかったという報告や、言及されていない報告であった。今回の我々の研究で、グレリンの長期投与による安全性がモデル動物により示されたのは、グレリン投与を慢性腎障害悪化に対する新規治療戦略として確立する上で有用であったと考える。また、腎代替療法導入となる慢性腎障害で最も患者数が多いのが糖尿病性腎症である。この疾患モデルで、腎機能悪化の抑制効果を示せたことは、将来的に、グレリンを投与できる患者が多数になることにつながると考える。また、痩せを呈する STZ 投与マウスへグレリンの長期投与により、摂食量を変えないが体重は増えた。慢性腎障害をはじめ慢性疾患の多くは進行すると、Protein Energy Wasting(PEW)やカヘキシアの状態となり、体重は減少し、生命予後を短く

することが報告されている。グレリンの長期投与により、体重減少する慢性腎障害のモデル動物で体重増加を示せたことは、グレリン投与による腎機能保護だけでなく生命予後の延長にも寄与することに期待できる結果と考える。電子顕微鏡の観察では、STZ 投与した群で、糸球体では、基底膜が肥厚して凹凸が出現し、podocyte の open slit pore が減少し、close slit pore が増加したが、これらの変化をグレリンの長期投与により抑制した。この結果は、STZ 投与による尿アルブミンの増加、グレリン投与によるその抑制効果と一致する。また、STZ 投与で尿細管細胞のミトコンドリアの swelling 様の変化を認め、グレリン投与でこの変化は抑制された。ミトコンドリアの swelling は、マイトファジーやミトコンドリア生合成で生じると考えられており、急性腎障害の尿細管細胞内でもこの変化が起きていることが報告されている。我々の研究室では、糖尿病性腎症において尿細管の機能異常から糸球体の異常を及ぼすという尿細管糸球体連関の機序を報告した。この尿細管細胞ミトコンドリアの変化も、糖尿病性腎症の早期の変化と考えられ、機序の解析を進めている。

(2) 結論

我々は1型糖尿病モデル動物にグレリンを長期投与することで、糖尿病性腎症の悪化を抑制する効果があることを示した。この研究結果よりグレリンの長期投与は糖尿病性腎症をはじめとする慢性腎障害患者に対し、腎機能悪化の抑制、生命予後の延長を期待できる新規治療戦略となりうると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

1. 脇野 修, 藤村 慶子, 伊藤 裕, Basic nephrology 分子生物学(生化学・遺伝学・発生学・再生医療ほか) グレリンによる慢性腎臓病新規治療戦略, Annual

Review 腎臓、査読なし、2016 巻、2016、
47-53

〔学会発表〕(計7件)

1. 脇野 修、中谷 英章、藤村 慶子、篠塚 圭祐、伊藤 裕、心血管系ペプチドのトランスレー 1 . ショナルリサーチ グレリンの腎保護作用と慢性腎臓病患者への応用、第 19 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会(招請講演)、2015 年 12 月 10 日~2015 年 12 月 12 日、神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)
2. 田蒔 昌憲、宮下 和季、脇野 修、三石 正憲、林 晃一、伊藤 裕、グレリンによるミトコンドリアエピゲノム制御を介した CKD モデルマウスの身体能力改善、2015 年 6 月 5 日~2015 年 6 月 7 日、日本腎臓学会学術総会、名古屋国際会議場、(愛知県、名古屋市)
3. 藤村 慶子、脇野 修、長谷川 一宏、水口 斉、篠塚 圭祐、林 晃一、伊藤 裕、消化管ペプチド Ghrelin の酸化ストレス抑制を介した腎保護作用、2015 年 6 月 5 日~2015 年 6 月 7 日、日本腎臓学会学術総会、名古屋国際会議場、(愛知県、名古屋市)
4. 浦井 秀徳、神田 武志、徳山 博文、脇野 修、伊藤 裕、グレリン受容体の血中脂質への影響、第 52 回日本臨床分子医学会学術総会、2015 年 4 月 10 日~2015 年 4 月 11 日、みやこメッセ(京都府京都市)
5. 田蒔 昌憲、宮下 和季、脇野 修、三石 正憲、林 晃一、伊藤 裕、慢性腎臓病の腎筋連関による身体能力低下と消化管ホルモングレリンの治療効果、第 52 回日本臨床分子医学会学術総会、2015 年 4 月 10 日~2015 年 4 月 11 日、みやこメッセ(京都府京都市)
6. 脇野 修、藤村 慶子、篠塚 圭祐、徳山 博文、林 晃一、伊藤 裕、消化管ホルモン Ghrelin の腎臓における作用、第 18 回日本心血管内分泌学会、2014 年 11 月 21

日~2014 年 11 月 22 日、横浜開港記念
会館、(神奈川県、横浜市)

7. 藤村 慶子、脇野 修、篠塚 圭祐、徳山 博文、林 晃一、伊藤 裕、消化管ペプチド Ghrelin の腎臓における生理的意義、第 57 回日本腎臓学会学術総会、2014 年 7 月 4 日~2014 年 7 月 6 日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:糖尿病性腎症予防治療薬

発明者:伊藤 裕

権利者:脇野 修、中谷 英章、藤村 慶子、篠塚 圭祐、寒川 賢治

番号:特願 2015 - 187969

出願年月日:2015 年 9 月 25 日

国内外の別:国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

脇野 修 (Shu Wakino)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号:50265823

(2)研究分担者

篠塚 圭祐 (Keisuke Shinozuka)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号:00594558

伊藤 裕 (Hiroshi Itoh)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号:40252457

(3)連携研究者

なし