

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：34605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18257

研究課題名(和文) EPAを用いた糖尿病性腎症の新規治療方法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic method for diabetic nephropathy by using eicosapentaenoic acid

研究代表者

安澤 俊紀 (Yasuzawa, Toshinori)

畿央大学・健康科学部・助手

研究者番号：80734425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症悪化の一因として内皮細胞間葉移行が考えられている。本研究では食品由来成分であるエイコサペンタエン酸(EPA)に着目し糖尿病性腎症の改善に対する影響を検討した。糖尿病誘発マウスにEPAを投与したところ腎線維化を抑制し腎機能を改善する可能性が示唆された。また、脂肪細胞の肥大化に伴い分泌される物質が血管内皮細胞の内皮細胞間葉移行を引き起こすことを明らかにした。さらに、EPAが脂肪細胞肥大化による内皮細胞間葉移行を抑制することを明らかにした。EPAは糖尿病性腎症における腎線維化を制御する食品成分として有効である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症患者の増加は非常に問題となっている。また、透析導入患者の原疾患としても糖尿病性腎症は増加しており、深刻な医療経済問題となっている。糖尿病性腎症の治療はRAS阻害薬を中心とした厳密な血圧管理や血糖管理、低蛋白質食、減塩食などである。実際の治療では糖尿病性腎症が進展するにつれ投薬量が多くなり、患者の服薬コンプライアンスに治療効果が左右される。本研究では、食品由来成分であるEPAが糖尿病性腎症の改善に有効である可能性を示し、糖尿病性腎症の腎線維化におけるEndMTに対するEPAの抑制効果も明らかにした。これは薬剤に頼らない糖尿病性腎症の新たな治療方法確立の基盤となり得る。

研究成果の概要(英文)：Endothelial to mesenchymal transition (EndMT) is considered as one of the causes of renal fibrosis in diabetic nephropathy. In this study, we investigated the effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on improving diabetic nephropathy. Present study showed that EPA suppressed renal fibrosis in diabetic mice and ameliorated renal function. Moreover, it was demonstrated that the substance secreted by the hypertrophy of adipocytes caused EndMT of vascular endothelial cells. Furthermore, it was clarified that EPA inhibited EndMT induced by adipocyte hypertrophy. Thus, EPA may be effective as food ingredient controlling progression of renal fibrosis in diabetic nephropathy.

研究分野：病態生理学

キーワード：糖尿病性腎症 血管内皮細胞 エイコサペンタエン酸 内皮細胞間葉移行 脂肪細胞 栄養学

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ライフスタイルの変化により糖尿病およびその合併症である糖尿病性腎症患者が急増し、国内外において問題となっている。さらに、糖尿病性腎症は透析導入原疾患の第一位となっており医療経済的にも問題である。しかしながら、糖尿病性腎症の根本的な治療法ははまだ確立されておらず確かな治療法の開発が急務である。糖尿病性腎症の進展には IV 型コラーゲンなどの細胞外基質の増生に伴うメサンギウム領域の拡大と間質を中心とした  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) の発現増加による腎線維化が重要な役割を担っている。糖尿病性腎症における腎線維化の一因として内皮細胞間葉移行 (Endothelial Mesenchymal Transition: EndMT) が考えられている。血管内皮細胞に糖尿病病態時の種々のストレスが加わると、接着因子である CD31 や VE-cadherin に代表される血管内皮細胞マーカーの発現が抑制され、 $\alpha$ -SMA や smooth muscle 22  $\alpha$  (SM22  $\alpha$ )、fibroblast specific protein-1 (FSP-1) に代表される間葉系細胞マーカーの発現が増加する。そして、血管内皮細胞は接着性を失い、運動性を獲得して間質部へ浸潤し腎線維化を進展させる。

### 2. 研究の目的

糖尿病およびその合併症である糖尿病性腎症患者の増加は問題となっている。現在、糖尿病性腎症の治療は血圧管理、血糖管理、低タンパク質食、減塩食などの治療が中心である。また、糖尿病性腎症が進展するにつれ投薬量が増加し、患者の服薬コンプライアンスに治療が左右される。従来から、エイコサペンタエン酸 (EPA) を多く含む魚油には腎保護作用があることが知られている。しかし、腎線維化の原因となる EndMT と EPA との関連は不明である。本研究では、食事由来成分である EPA に着目し、EndMT に及ぼす影響および EPA の糖尿病性腎症改善効果について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスにおける EPA の腎保護作用の検討

実験動物として雄性 C57BL/6 マウスを用いた。0.05 M クエン酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解したストレプトゾトシンを 5 日間マウスの腹腔内に投与 (50 mg/kg BW/day) し、糖尿病を誘発した。マウスは、非糖尿病対照群、糖尿病高脂肪食群 (脂質エネルギー60%)、糖尿病高脂肪食 EPA 群 (EPA 1000 mg/kg BW/day) の 3 群に分けた。EPA 投与前および EPA 投与 15 週目に 24 時間蓄尿を行い尿中アルブミン排泄量を測定した。EPA 投与 19 週目に、血液および腎臓を採取し実験に供した。腎臓組織学的解析として Periodic acid-Schiff (PAS) 染色を行い糸球体面積の測定を行った。また腎線維化に関与している  $\alpha$ -SMA のタンパク質発現量および IV 型コラーゲン mRNA 発現量を解析した。

#### (2) 高グルコース刺激による培養血管内皮細胞の EndMT に及ぼす EPA の影響

EndMT が生じると血管内皮細胞は接着性を失い、運動性を獲得することで遊走能が上昇するため培養血管内皮細胞を用いて細胞遊走能測定を行った。血管内皮細胞はマウス由来血管内皮細胞である b.End3 を使用した。遊走能の測定は、ポアサイズ 8.0  $\mu$ m の細胞培養インサートを用いた二槽培養法により行った (図 1)。インサート内に血管内皮細胞を播種し 24 時間培養後、正常グルコース培地 (5.6 mM グルコース) あるいは高グルコース培地 (25 mM グルコース) に交換し 24 時間培養後、インサート下面に遊走した細胞数を計測した。また、EPA (50  $\mu$ M) 添加の有無による遊走細胞数を計測した。血管内皮細胞マーカーである CD31、間葉系細胞マーカーである SM22  $\alpha$ 、 $\alpha$ -SMA の発現をウエスタンブロット法により測定した。また、リン酸化 Erk1/2 の発現量も測定した。

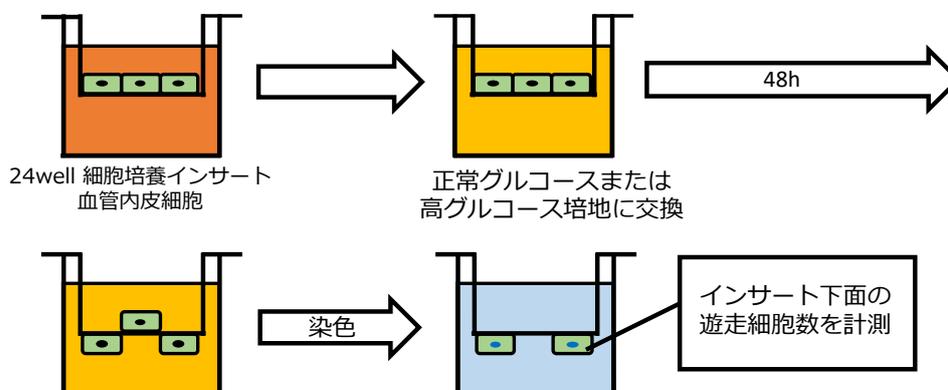


図 1 細胞培養インサートによる細胞遊走能の測定

細胞培養インサートに血管内皮細胞を播種し、各培地に交換後 48h 培養しインサート下面に遊走した細胞数を計測した。

### (3) 脂肪細胞の肥大化による EndMT 誘導作用および EPA の効果の検討

脂肪細胞の肥大化は肥満や糖尿病と関連していることが知られているため、脂肪細胞が血管内皮細胞の EndMT へ及ぼす影響を検討した。脂肪細胞としてマウス由来 3T3-L1 細胞を脂肪細胞へと分化誘導し分化誘導後 2 日ごとに脂肪細胞の培養液を回収し血管内皮細胞への刺激に用いた (図 2)。脂肪細胞の分化の程度は oil red O 染色により脂肪細胞内の油滴を染色することで確認した。脂肪細胞分化誘導後の培養液を用いて血管内皮細胞の遊走能に及ぼす影響を細胞培養インサートを用いた二槽培養法により評価した。また、CD31 および SM22 $\alpha$  発現はウエスタンブロット法により測定した。



各分化日数ごとに培養液を回収し、血管内皮細胞への刺激に利用

図 2 3T3-L1 細胞の分化誘導・維持および培養液回収のスケジュール

## 4. 研究成果

### (1) ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスにおける EPA の腎保護作用の検討

腹腔内グルコース負荷試験を行った結果、対照群と比較し糖尿病高脂肪食群において血糖値の有意な上昇が確認された。EPA 投与による血糖値への影響は認められなかった。尿中アルブミン排泄量においては対照群と比較し糖尿病高脂肪食群で有意な増加が認められた。一方、糖尿病高脂肪食群と比較して糖尿病高脂肪食 EPA 群において有意な尿中アルブミン排泄量の減少が認められた。腎臓組織学的解析として行った PAS 染色の結果、対照群と比較し糖尿病高脂肪食群で有意な糸球体面積の増加が認められ、糖尿病高脂肪食群と比較し糖尿病高脂肪食 EPA 群で有意な減少が認められた。腎皮質中の  $\alpha$ SMA タンパク質発現は対照群と比較し糖尿病高脂肪食群で有意に増加したが、EPA の投与により有意に低下した。IV 型コラーゲン mRNA 発現量は対照群と比較し糖尿病高脂肪食により有意に増加したが、糖尿病高脂肪食 EPA 群では糖尿病高脂肪食群と比較し有意に減少した。 $\alpha$ SMA や IV 型コラーゲンの増加はメサンギウム領域の拡大や腎線維化と関連しており、糖尿病マウスにおいて EPA は糸球体の肥大化や線維化を抑制することでアルブミン尿を改善したと考えられ、EPA の腎保護作用が示唆された。

### (2) 高グルコース刺激による培養血管内皮細胞の EndMT に及ぼす EPA の影響

正常グルコース培地 (5.6 mM) と比較して高グルコース培地 (25 mM グルコース) で培養した血管内皮細胞の遊走能は有意に増加し、EPA の添加は高グルコースによる遊走能の増加を有意に抑制した。正常グルコース培地あるいは高グルコース培地で培養した血管内皮細胞の CD31 発現に有意な変化は認められなかった。 $\alpha$ SMA および SM22 $\alpha$  発現は正常グルコースに比較し高グルコースで上昇傾向を示し、EPA の添加で減少傾向を示したが有意な差は認められなかった。EndMT に関与している細胞内シグナルの一つである Erk1/2 のリン酸化を検討したところ、正常グルコースと比較して高グルコース有意な増加が認められた。高グルコースと EPA 添加を比較すると EPA 添加により減少傾向を示したが有意な差は認められなかった。

### (3) 脂肪細胞の肥大化による EndMT 誘導作用および EPA の効果の検討

3T3-L1 細胞の分化誘導後 oil red O 染色により細胞内への油滴蓄積を確認したところ、分化日数が進むにつれて油滴の肥大化が認められた。脂肪細胞培養液で刺激した血管内皮細胞の遊走細胞数はコントロールと比較して増加したが、遊走細胞数の増加は脂肪細胞の肥大化に伴い上昇した。次に、脂肪細胞培養液で刺激した血管内皮細胞における内皮細胞マーカーおよび間葉系細胞マーカーの発現を解析した結果、CD31 発現量はコントロールと比較し有意に減少し、SM22 $\alpha$  発現量の有意な増加が認められた。また、リン酸化 Erk1/2 発現も脂肪細胞培養液の刺激による有意な増加が確認された。さらに、動脈硬化や線維化との関連が深い plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) の発現量も増加が認められた。一方で、EPA は脂肪細胞培養液による遊走細胞数の増加、CD31 発現量の減少、SM22 $\alpha$  発現量の増加のいずれにも改善効果を示した。さらに、リン酸化 Erk1/2 の増加、PAI-1 の増加を抑制することも明らかにした。これらの結果から脂肪細胞の肥大化は血管内皮細胞の EndMT を誘導することが示され、EPA は脂肪細胞肥大化による血管内皮細胞の EndMT を抑制すると考えられた。

以上の結果より本研究において、EPA は糖尿病マウスの腎機能悪化を抑制することを示し、その作用の一部には EPA による抗 EndMT 効果の関与が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mima Akira, Yasuzawa Toshinori, Nakamura Tomomi, Ueshima Shigeru	4. 巻 10
2. 論文標題 Linagliptin affects IRS1/Akt signaling and prevents high glucose-induced apoptosis in podocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62579-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 YASUZAWA Toshinori, MIMA Akira, UESHIMA Shigeru	4. 巻 65
2. 論文標題 Antithrombotic Effect of Oral Administration of Mozuku (<i>Cladosiphon okamuranus</i>, Brown Seaweed) Extract in Rat	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 171 ~ 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.65.171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 安澤 俊紀, 中村 友美, 黄 禾甯, 美馬 晶, 上嶋 繁	4. 巻 28
2. 論文標題 脂肪細胞の内皮間葉移行(EndMT)誘導作用とエイコサペンタエン酸(EPA)の効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本病態生理学会雑誌 = Japanese journal of pathophysiology	6. 最初と最後の頁 17 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mima Akira, Yasuzawa Toshinori, King George L., Ueshima Shigeru	4. 巻 8
2. 論文標題 Obesity-associated glomerular inflammation increases albuminuria without renal histological changes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS open bio	6. 最初と最後の頁 664-670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Tomomi Nakamura, Toshinori Yasuzawa, Akira Mima, Shigeru Ueshima
2. 発表標題 Eicosapentaenoic acid suppresses Endothelial-to-Mesenchymal Transition of vascular endothelial cells induced by substances secreted by the progress of adipocyte hypertrophy
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安澤 俊紀, 中村 友美, 美馬 晶, 上嶋 繁
2. 発表標題 脂肪細胞の内皮間葉移行 (EndMT) 誘導作用とエイコサペンタエン酸 (EPA) の効果
3. 学会等名 第29回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 友美, 安澤 俊紀, 上嶋 繁
2. 発表標題 がん細胞の転移に及ぼすコリアンダーの影響について
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 忍海辺 結実, 豊田 啓士, 蒲 尚子, 松田 邦子, 安澤 俊紀, 佐藤 隆夫, 伊藤 龍生
2. 発表標題 慢性肝疾患モデルを用いた初期肝線維化の病理学的解明
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安澤俊紀、美馬晶、上嶋繁
2. 発表標題 糖尿病マウスの腎機能に及ぼすエイコサペンタエン酸の影響
3. 学会等名 第18回抗加齢医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村友美、安澤俊紀、上嶋繁
2. 発表標題 コリアンダーがマウス由来メラノーマ細胞 (B16F10) の転移能に及ぼす影響
3. 学会等名 第28回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安澤俊紀、美馬晶、上嶋繁
2. 発表標題 肥満が糸球体の炎症とアルブミン尿に及ぼす影響について
3. 学会等名 第28回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshinori Yasuzawa, Akira Mima, Mayuko Akada, Osamu Matsuo, Shigeru Ueshima
2. 発表標題 Glomerular inflammation induced by obesity results in albuminuria without histological changes
3. 学会等名 the 8th International Congress of Pathophysiology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akira Mima, Toshinori Yasuzawa, Shigeru Ueshima
2. 発表標題 Eicosapentaenoic acid-mediated inhibition of endothelial-to-mesenchymal transition decreases mesangial expansion and albuminuria in diabetic kidney disease
3. 学会等名 American Society for Cell Biology/ European Molecular Biology Organization 2018 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshinori Yasuzawa, Yoshie Sumikawa, Osamu Sakai, Shigeru Ueshima
2. 発表標題 Loss of GPx4 in vascular endothelial cells induces accumulation of lipid peroxide and cell death
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黄 禾甯、安澤 俊紀、上嶋 繁
2. 発表標題 がん細胞の浸潤に及ぼすパクチー抽出物の効果
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akira Mima, Toshinori Yasuzawa, George L King, Shigeru Ueshima
2. 発表標題 Obesity-associated glomerular inflammation increases albuminuria without renal histological changes
3. 学会等名 International Diabetes Federation 2017 Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安澤 俊紀, 酒井 修, 住川 淑絵, 上嶋 繁
2. 発表標題 グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx4)の減少による血管内皮細胞の障害とそれを改善する物質の探索
3. 学会等名 日本病態生理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安澤 俊紀, 木戸口 こころ, 住川 淑絵, 上嶋 繁
2. 発表標題 米抽出物の培養ヒト結腸がん細胞(Caco 2)遊走能抑制効果
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安澤 俊紀, 木戸口 こころ, 住川 淑絵, 上嶋 繁
2. 発表標題 米抽出物の新たな機能性の探索
3. 学会等名 第17回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----