

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15973

研究課題名(和文)高脂肪、高蛋白食及び高食塩食による糖尿病性腎症進展への影響に対するCTGFの意義

研究課題名(英文)The impact of CTGF on glomerular injury in diabetic mice fed high fat, high protein or high salt diet

研究代表者

石井 輝(Akira, Ishii)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40760153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病db/dbモデルマウスでは、高脂肪、高蛋白食負荷により腎臓の糸球体障害が進行した。これらの食餌への高食塩添加により糖尿病性腎臓病がさらに増悪し、高血圧をきたす可能性が示唆された。一方db/dbマウスにおけるConnective tissue growth factor (CTGF)の欠失により糖尿病性腎臓病の悪化は見られなかったものの、体重増加の抑制や糖代謝の改善に關与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、マウスモデルにおいて高脂肪、高蛋白食負荷により糖尿病性腎臓病の糸球体障害が進行し、これらの食餌への高食塩添加により糖尿病性腎臓病がさらに増悪する可能性が示唆された。このことは実臨床において、糖尿病性腎臓病の進行予防の目的に塩分制限や蛋白制限などの食事療法を推奨する科学的根拠となると考えられ、糖尿病性腎臓病進行予防による透析導入の遅延、さらには医療費の削減に寄与することが期待される。さらにCTGFの抑制が、糖代謝そのものを改善させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In db/db type 2 diabetic mice, high fat and high protein diet promote the glomerular injury. Salt addition to those diets can accelerate the exacerbation of Diabetic Kidney Disease (DKD). Although deletion of Connective tissue growth factor (CTGF) in db/db type 2 diabetic mice did not accelerate the exacerbation of DKD, db/db Rosa-CTGF cKO mice gained less body weights and exhibited improved insulin sensitivity compared to control mice.

研究分野：腎臓病学

キーワード：糖尿病性腎臓病 CTGF 高脂肪 高蛋白 高塩

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎臓病 (DKD) は透析導入患者の主要原疾患の第 1 位であり、DKD 進展に対する有効な予防策の構築は医療費抑制の観点からも喫緊の課題である。DKD を含めた腎臓病の進行予防には、塩分制限や蛋白制限などの食事療法が推奨される。しかしながら「高食塩や高脂肪、高蛋白が DKD の発症や進展にどのような影響をもたらすか」という問いについては機序を含めて十分に解明されていなかった。

Connective tissue growth factor (CTGF) は Transforming Growth Factor- β (TGF- β) により誘導される増殖因子で、強力な細胞外基質産生作用を有する。CTGF は TGF- β 1 や Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) と相互作用し、最終的に細胞外基質産生を促進する¹⁾。CTGF は様々な腎疾患で著明に増加し、DKD では腎臓系球体のポドサイトの CTGF 発現が亢進することが知られている。これまでに申請者らは CTGF 阻害が腎線維化を抑制することを報告した²⁾³⁾。さらにはポドサイト特異的 CTGF 過剰発現マウス (CTGF-Tg) を作製し、ストレプトゾトシン (STZ) により 1 型糖尿病を惹起すると、系球体のメサンギウム領域の拡大など DKD に特徴的な所見の増悪がみられ⁴⁾、このことから CTGF 過剰状態は DKD を悪化させることを明らかにした。STZ マウスならびに肥満 2 型糖尿病 *db/db* マウスに CTGF アンチセンスオリゴを導入した研究はすでに報告されているが、CTGF 抑制は 60% 程度で、尿中アルブミン排泄低下とメサンギウム基質の低下が認められている⁵⁾。しかしながら、とくに「2 型糖尿病による DKD の発症や進展に CTGF がどのような作用をもたらすか」という問いについては十分に解明されていなかった。そこで CTGF 抑制ならびに細胞特異的に CTGF を欠損させるため、申請者らは CTGF floxed マウスを作製した。この CTGF floxed/floxed (*fl/fl*) マウスを全身性の誘導可能な RosaCreERT² マウス (RCreERT²; Artemis 社より購入; 変異エストロゲン受容体と Cre recombinase のキメラ蛋白を全身で発現するマウス) と交配し、4-hydroxytamoxifen を投与することで、全身性誘導型 CTGF 欠損マウス (CTGF flox/flox, RosaCreERT2+ : Rosa-CTGF cKO) を作製し、CTGF 遺伝子発現は腎において 81% 低下することを報告した⁶⁾。

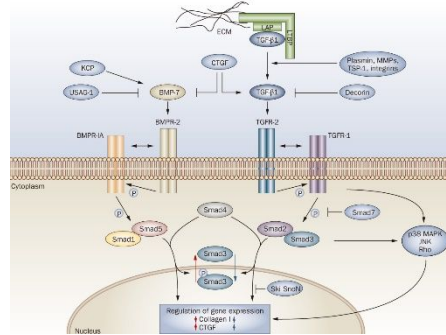


図 1 : 細胞外基質産生における CTGF の役割。CTGF は TGF- β と結合し TGF- β /Smad シグナルを増強し、その一方 BMP-7 シグナルを抑制し、細胞外基質産生作用を持つ。(Nat Rev Nephrol 6:643, 2010)

2. 研究の目的

以上の背景をふまえて、本申請研究は、

- (1) DKD 進展に高脂肪、高蛋白、高食塩食がもたらす影響を、*db/db* マウスを用いて解析し、「食」のどの成分が、疾患感受性に影響しうるかについて解明すること、さらに
- (2) *db/db*, CTGF flox/flox, RosaCreERT2+ (以下 *db/db* Rosa-CTGF cKO と表記) マウスを作製することで、DKD 進展への影響において CTGF が及ぼす意義を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) まず糖尿病状態で高脂肪食 (HF)、高蛋白食 (HP) が糖代謝や DKD に及ぼす影響を検討するため、C57BLKS バックグラウンドの *db/m* マウス及び *db/db* マウスにコントロール食 : 高炭水化物食 (HC)、高脂肪食、高蛋白食を 6 週齢より投与し、体重、摂餌量、血糖、蓄尿と血圧測定を行い、14 週齢まで観察を行った。観察終了後にマウスを屠殺し、HF、HP による腎系球体や尿管における組織変化、血液所見、尿所見、系球体や尿管での線維化、増殖、炎症、代謝にかかわる遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR を用いて解析した。次に高食塩食における DKD の疾患感受性変化を評価するため、上記の 3 種類の特殊飼料にそれぞれ 8% NaCl を添加した飼料を作成し、これらの飼料を *db/db* マウスに 6 週齢より投与し、上記の各種評価項目の測定を行った。

(2) さらに *db/db* マウスにおける DKD 進行への影響に対する CTGF の意義を検討するため、*db/db* Rosa-CTGF cKO を作製し、これに HC を負荷したのちに上記で記載した方法で各評価項目を測定した。本研究により DKD が CTGF 欠失により改善するかを検討することとした。

4. 研究成果

(1) コントロールの *db/m* マウスに HC、HF、HP を投与したところ、体重は HC 群と比較して、HF 群では有意に増加したが、HP 群とは明らかな差を認めなかった。尿量は有意に HP 群で増加し、尿中 Na 排泄量は HP 群で増加する傾向を認めた。一方 *db/db* 糖尿病モデルマウスでは、体重は HC 群に比して HF 群において体重増加を、HP 群においては体重減少を認めた。血糖は HC、HP 群に比して、HF 群において高値であった。血圧は 3 群間で明らかな差を認めなかった。尿量や尿中ナトリウム排泄量は HC 群と HF 群では差を認めなかったが、HP 群において有意に増加した。アルブミン尿は、HP 群で有意な増加を認めた(図 1)。組織学的解析では、糸球体のメサンギウム領域が HF、HP 群で有意に増加し、ポドサイト数は HF、HP 群で有意に減少した。この際、糸球体における Tgfb1、CTGF、Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1)、Collagen Type IV Alpha 3 Chain (Col4A3) 遺伝子発現は HC を負荷した *db/db* マウスにおいて *db/m* マウスに比較し亢進していた。一方 *db/db* マウスにおいて HF、HP を負荷した際の糸球体におけるこれらの遺伝子発現は、HC と比較し明らかな亢進を認めなかった。

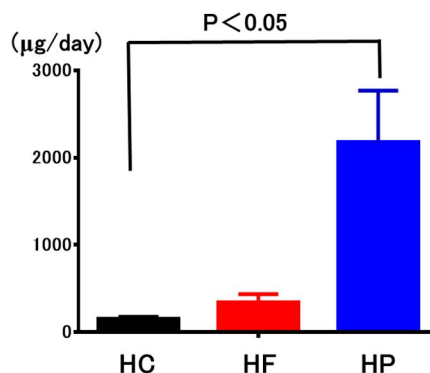


図 1 *db/db* マウスのアルブミン尿 HP(高蛋白食)群では HC(高炭水化物食:コントロール食)群に比べてアルブミン尿の増加を認めた。n=5.

次に、HC、HF、HP にそれぞれ NaCl を添加した飼料を作成し、これらの飼料を *db/db* マウスに投与し経時的に観察を行ったところ、HF 群で体重が有意に増加し、血糖は有意に上昇した。尿量、尿中 Na 排泄量は HP 群で増加した。さらに HF、HP 群では血圧が有意に上昇し、HP 群でアルブミン尿の有意な増加を認めた。組織学的解析では高食塩添加により、HP 群でメサンギウム領域がさらに増加、HF 群でポドサイト数はさらに減少した。この際、糸球体における Tgfb1、CTGF、MCP-1、Col4A3 遺伝子発現は、HF、HP を負荷した群で、HC 群と比較し亢進する傾向を認めた。

(2) *db/db* マウスでは、コントロールの *db/m* マウスと比較して糸球体 CTGF mRNA 発現が著明に増加していた。そこで次に *db/db* マウスの DKD 進行に対する CTGF の意義を検討するため、*db/db* Rosa-CTGF cKO を作製した。この際、全身誘導性 CTGF KO は C57BL/6J バックグラウンドであったため、C57BLKS に 6 回戻し交配を行った。*db/db* Rosa-CTGF cKO マウスでの腎臓や糸球体における CTGF 遺伝子発現は、40%程度抑制されていた。

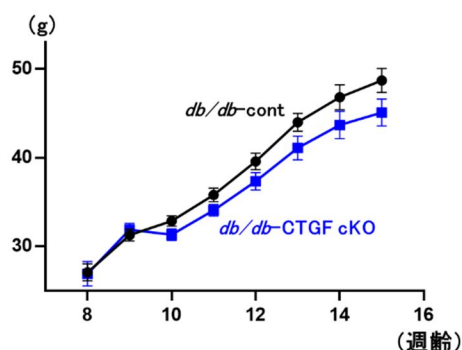


図 2 *db/db*-CTGF cKO マウスの体重変化 *db/db*-CTGF cKO マウスではコントロールマウスに比べて体重増加の抑制を認めた。n=11.

そこでこの *db/db* Rosa-CTGF cKO に HC を負荷すると、*db/db*、CTGF flox/flox, ++ (コントロール) と比較し、体重増加が抑制される傾向を認め(図 2)、血糖(図 3)、血圧(図 4)、および尿量がそれぞれ有意に低下した。この際グルコース負荷試験では耐糖能が改善し、インスリン負荷試験ではインスリン感受性が亢進していた。アルブミン尿は、*db/db* Rosa-CTGF cKO マウスでは、コントロールマウスと比較し明らかな変化を認めなかった。またこの際、Rosa-CTGF cKO マウスでの腎臓や糸球体における Tgfb1、MCP-1、Collagen Type I Alpha 1 Chain (Col1A1)、Fibronectin (Fn) 遺伝子発現は、コントロールマウスと比較して明らかな変化を認めなかった。

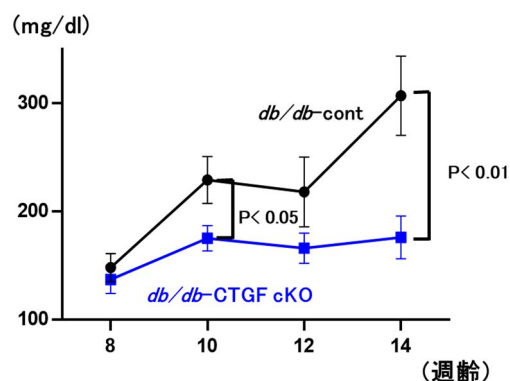


図 3 *db/db*-CTGF cKO マウスの血糖変化 *db/db*-CTGF cKO マウスではコントロールマウスに比べて血糖の低下を認めた。n=11.

研究成果のまとめ

以上(1)(2)の研究結果から、2型糖尿病 *db/db* モデルマウスでは、高脂肪、高蛋白食負荷により糸球体障害が進行した。これらの食餌への高食塩添加により DKD がさらに増悪し、高血圧をきたす可能性が示唆された。一方 *db/db* マウスにおける CTGF の欠失によりアルブミン尿は抑制されなかったものの、体重増加の抑制や糖代謝の改善に関与する可能性が示唆された。

<引用文献>

- Boor, *et al. Nat Rev Nephrol.* 2010 6:643-56.
Yokoi, *et al. Am J Physiol* 2002 282:F933-42.
Yokoi, *et al. J Am Soc Nephrol.*
2004;15:1430-40.
Yokoi, *et al. Kidney Int.* 2008;73:446-55.
Guha, *et al. FASEB J.* 2007;21:3355-68
Toda, Ishii *et al. Sci Rep.* 2017;7:42114.

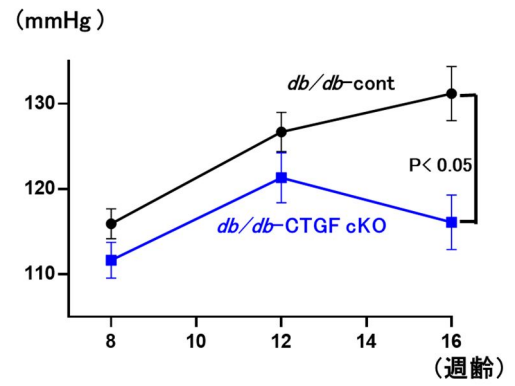


図4 *db/db-CTGF cKO* マウスの血圧変化
db/db-CTGF cKO マウスではコントロール
マウスに比べて血圧の低下を認めた。n=11.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井 輝、横井秀基、中田紘介、金子恵一、北井悠一郎、森 慶太、戸田尚宏、大崎啓介、半田貴也、佐藤有紀、柳田素子
2. 発表標題 2型糖尿病モデルマウスにおける高脂肪、高蛋白に追加した高食塩食の血圧や糸球体障害に対する意義の検討
3. 学会等名 第54回高血圧関連疾患モデル学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井 輝、半田貴也、大崎啓介、森 慶太、戸田尚宏、中田紘介、金子恵一、北井悠一郎、佐藤有紀、柳田素子、横井秀基
2. 発表標題 2型糖尿病肥満マウスにおけるCCN2の糖代謝、糖尿病性腎臓病に及ぼす影響
3. 学会等名 第11回CCNファミリー研究会
4. 発表年 2019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