

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16013

研究課題名(和文) 糖尿病腎症の発症と進展の抑制に関連するミオカインの同定とその機序の解明

研究課題名(英文) Identification of myokines that suppress the onset and progression of diabetic nephropathy and elucidation of its mechanisms

研究代表者

門野 至 (MONNO, Itaru)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：20814578

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)：我々は運動の腎保護効果について、特に尿細管間質障害の改善効果とその機序に関し明らかにすることを目的とした。2型糖尿病/肥満ラットにおいて、運動は炎症、酸化ストレス、ミトコンドリア異常、尿細管間質の線維化に対する改善効果を示した。引き続き、骨格筋におけるミオカイン分泌やエネルギー代謝の変化が、腎臓や骨格筋のミトコンドリアの恒常性維持に関わっているかについても解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病腎症(以下、腎症)は、末期腎不全へ至る慢性腎臓病(CKD)の主たる原疾患である。腎症に対する治療は、末期腎不全への進展ならびに心血管疾患の発症の抑制、つまり“心腎連関”を断ち切ることを目指して、食事・運動、種々の薬物療法により腎機能の悪化および動脈硬化の危険因子である血糖・血圧・脂質などの代謝障害を包括的に管理することが推奨されている。しかし、運動療法の腎保護効果を発揮する分子的機序は十分に解明されていない。今回我々は“筋腎連関”に着目し、運動が腎症の進展を抑制できる可能性を見出した。本研究をさらに発展させることができれば、腎症に対する運動療法の重要性が確固たるものになると考えている。

研究成果の概要(英文)：We aimed to clarify the renoprotective effect of exercise, particularly against diabetes-induced tubulointerstitial damage, and its molecular mechanism. In this study, we found that the exercise showed the improvement effects for inflammation, oxidative stress, mitochondrial abnormalities and tubulointerstitial fibrosis, in the kidney of type 2 diabetes/obesity rats. We are also analyzing whether changes in myokine secretion and energy metabolism in skeletal muscle are involved in maintaining mitochondrial homeostasis in the kidney and skeletal muscle.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糖尿病腎症 糖尿病 慢性腎臓病 運動療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病腎症(以下、腎症)は、末期腎不全へ至る慢性腎臓病(CKD)の主たる原疾患である。腎症を含むCKDでみられる腎機能の低下およびアルブミン尿/蛋白尿は、末期腎不全のみならず心血管疾患発症の危険因子であり、この腎障害と心血管疾患は、体液調節障害(高血圧、ナトリウム貯留)～血管内皮障害からの動脈硬化性疾患・心不全～貧血(腎性)による悪循環を形成すると考えられ、いわゆる“心腎連関”として認識されている(Gnanaraj et al. *Kidney Int.* 2013)。現在のところ、腎症に対する治療は、末期腎不全への進展抑制ならびに心血管疾患の発症抑制、つまり“心腎連関”を断ち切ることを目指して、食事・運動療法、さらに種々の薬物療法により腎機能の悪化および動脈硬化の危険因子である高血糖・高血圧・脂質異常症などの代謝障害を包括的に管理することが推奨されている。この包括的治療の中で、CKD患者に対する運動療法については、以前の“制限する”から“積極的に行う”ことを推奨すると転換された。運動療法は、これまでに透析患者における運動耐容能改善、Protein Energy Wastingの改善、たんぱく質異化抑制、QOL改善など有効性を発揮することが示され、さらに保存期CKD患者においても腎機能(糸球体濾過量; GFR)の改善を示す可能性を有することが報告されている。しかし、運動療法の腎保護効果を発揮する分子的機序は明らかではない。

サルコペニアは高齢者に高率に併発し、筋肉量の減少と運動耐容能の低下は、予後不良と密接に関連している(Arango-Lopera et al. *J Nutr Health Aging.* 2013)。また、糖尿病患者および保存期CKD患者では、サルコペニアを高率に併発することが知られており(Roshanravan et al. *Am J Kidney Dis.* 2017)、サルコペニアを有する患者は、QOLの低下に加えて予後不良である。運動療法は、サルコペニアの進展阻止に最も有用であるが、腎および心血管保護効果も期待できる。近年、骨格筋は様々なサイトカイン、成長因子など(ミオカインと呼ばれる)を分泌する内分泌臓器であり、分泌されたミオカインは肥満の改善、抗動脈硬化、神経細胞の成長・修復効果等を発揮することが報告されているが(Pedersen et al. *Nat Rev Endocrinol.* 2012)、ミオカインの腎構成細胞に対するその効果は明らかではない。糖尿病状態では、ミトコンドリア恒常性維持の破綻・ミトコンドリア機能の低下に起因する酸化ストレス、さらに微小炎症が腎構成細胞・骨格筋・心血管細胞において亢進することが、インスリン抵抗性の増強を含む糖尿病の悪化とともに、心腎連関の形成に寄与していると考えられる。したがって、各組織におけるミトコンドリアの恒常性維持が抗酸化・抗炎症を介して、腎および心血管保護、インスリン抵抗性の改善につながる可能性がある。我々もまた、これまでに2型糖尿病ラット(Zucker Diabetic Fatty Rat)の腎尿細管細胞において、Sirt3活性の低下に起因したミトコンドリア機能低下および酸化ストレスの亢進が腎症の進展に関与することを明らかにした(Ogura et al. *Redox Rep.* 2018)。運動療法の腎臓における抗炎症・抗酸化ストレスならびに詳細な分子学的機序に関しては十分に解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、運動療法の腎保護効果について、2型糖尿病/肥満ラットを用い、特に尿細管間質障害の改善効果とその機序に関し、抗炎症・抗酸化ストレスの観点から明らかにすることを目的とする。加えて、ミオカインや筋肉におけるエネルギー代謝の変化が、腎臓や筋肉のミトコンドリアの恒常性に関わっているかについても検証する。

### 3. 研究の方法

- (1) 34週齢の雄性2型糖尿病/肥満Wistar fatty ratsを運動群(Run; WF-R)、安静群(Control; WF-C)に、雄性非糖尿病/非肥満Wistar lean ratsを安静群(Control; WL-C)に分ける。
- (2) 運動実験に用いる装置はトレッドミル(夏目製作所 KN-73)とし、その速度は13m/min(WF ratsの安静時心拍数を20-30%増加させる程度の強度)に設定し、34-35週齢の2週間、週3回、1回15分の走行練習をさせる。本番は36-44週齢の8週間、週5回、1回30分の走行を行う。
- (3) 血糖値、体重、摂餌量を週1回測定する。44週齢で代謝ケージを用い蓄尿を行う。
- (4) 45週齢にsacrificeし、運動負荷群と安静群で各臓器や測定マーカーを比較する。

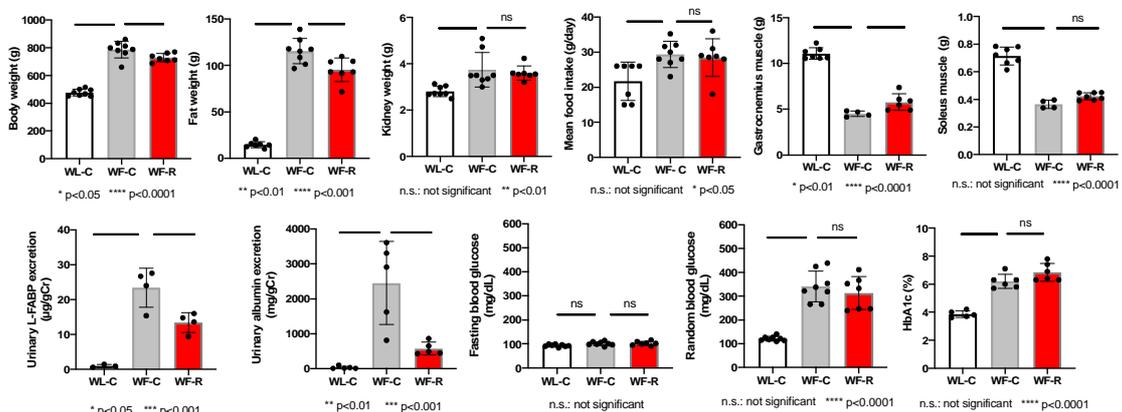
体重・摂餌量・腎臓/脂肪/腓腹筋/ヒラメ筋重量・空腹時/随時血糖値・HbA1c値  
腎臓における炎症および酸化ストレス、組織学的評価

1. 炎症評価；腎皮質におけるcluster of differentiation 68(CD68)、tumor necrosis factor- (TNF- ), interleukin-6(IL-6)、toll like receptor 2 (TLR2)、toll like receptor 4 (TLR4) [ RT-PCR ]、CD68免疫組織染色
2. 酸化ストレス評価；腎皮質におけるnitrotyrosine [ 免疫組織染色、immunoblot (IB) ]
3. 組織学的評価  
Masson 's Trichrome 染色、collagen, type , alpha 1 (Col3 1) RT-PCR ;  
腎繊維化、尿細管障害、糸球体硬化(メサンギウム領域)  
Kim-1 免疫組織染色；尿細管障害
4. 腎機能検査；尿アルブミン排泄量、尿 L-FABP 排泄量  
腎臓におけるミトコンドリア恒常性破綻の解析；電子顕微鏡による形態評価  
腎臓におけるアポトーシス関連評価；cleaved caspase 3 (IB)  
ヒラメ筋における DNA アレイ

#### 4 . 研究成果

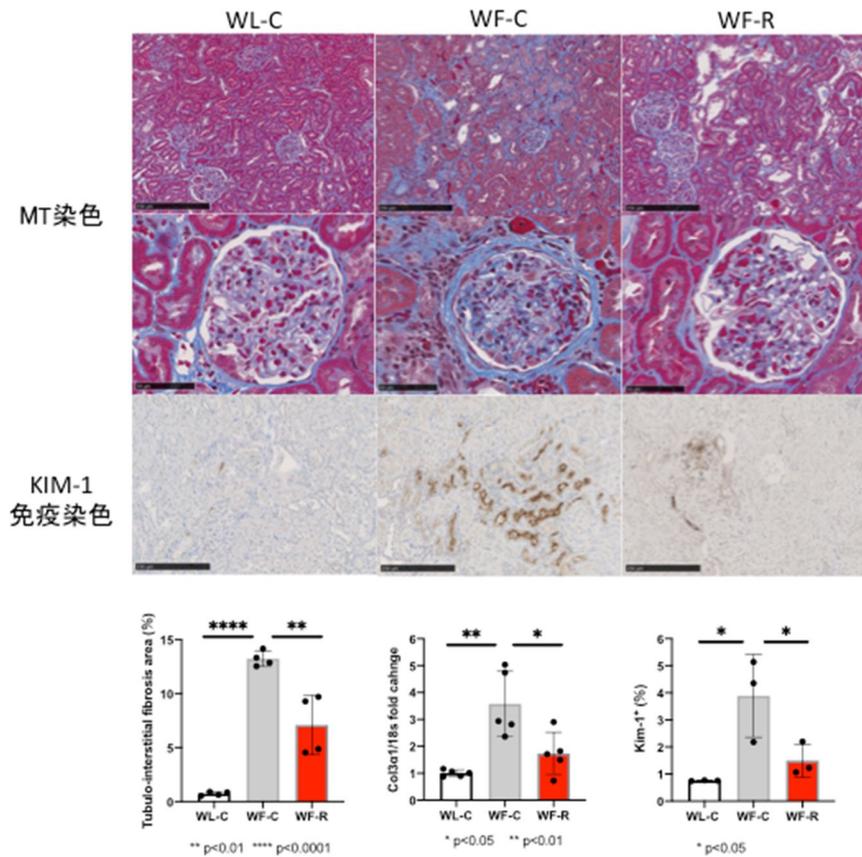
体重・脂肪/腎重量・摂餌量/随時血糖/HbA1c・尿中アルブミンおよび尿細管障害マーカーである L-FABP 排泄量は、非糖尿病/非肥満 WL-C 群と比較して、糖尿病/肥満 WF-C 群で有意な増加を認め、腓腹筋/ヒラメ筋重量は WL-C 群に比べて、WF-C 群で有意に減少したことから、糖尿病/肥満ラットでは摂餌量・脂肪量・体重の増加、腎肥大、アルブミン尿・尿細管障害、下肢骨格筋量の低下を呈することがわかった。一方、運動 WF-R 群では WF-C 群と比較して、腎重量・摂餌量・血糖・HbA1c に差は認められなかったが、脂肪量・体重・アルブミン尿・L-FABP 排泄量は減少、腓腹筋/ヒラメ筋重量は増加傾向を示し、運動による体組成変化と血糖非依存的な腎保護効果が示唆された(図1)。

図 1



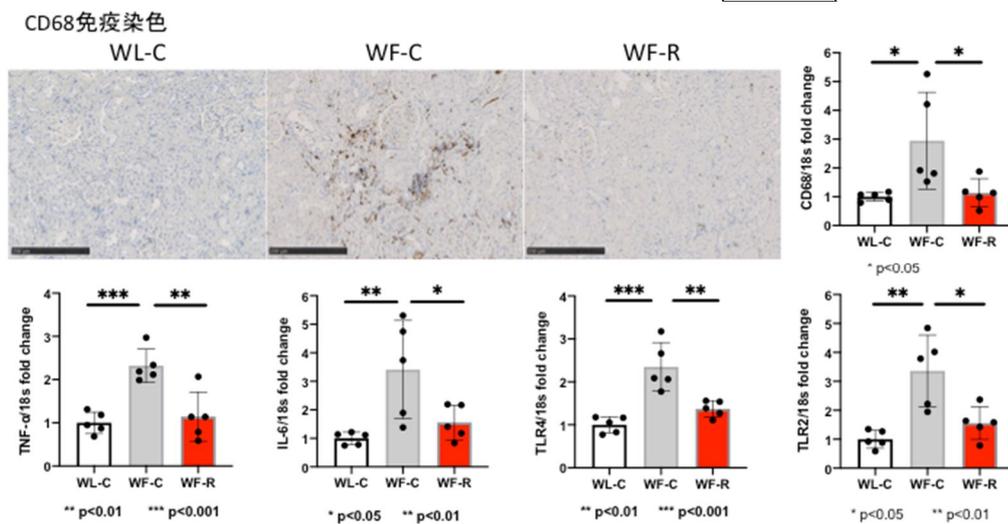
また、WF-C 群の腎臓では WL-C 群に比べて、尿細管間質における MT 染色域と腎皮質における Col3 1 mRNA 発現、尿細管障害マーカーである Kim-1 の免疫組織染色域の有意な増加を認め、糖尿病/肥満ラットの腎臓では尿細管間質障害・線維化を起こしていることが確認された。WF-R 群ではこれらの変化が改善されており、運動が糖尿病腎において尿細管障害の軽減と抗線維化効果を有する可能性を得た(図 2)。

図 2

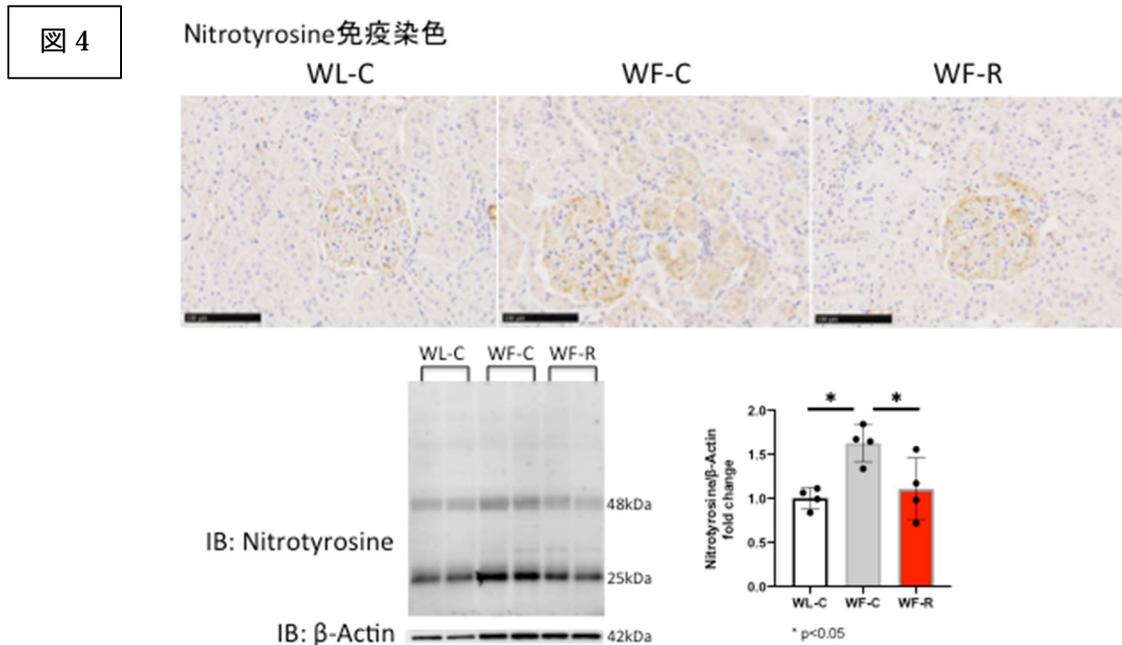


次に組織炎症に関し、腎組織像・各炎症メディエーターの mRNA 発現を調べた。WF-C 群の腎臓では WL-C 群と比較して、腎皮質における炎症マーカーである CD68 免疫組織染色域と CD68、TLR4、TLR2、TNF- mRNA 発現の有意な増加を認め、糖尿病/肥満ラットの腎臓では尿細管間質の炎症を起こしていることが確認された。WF-R 群ではこれらの変化が改善されており、運動が糖尿病腎において抗炎症効果を有する可能性を得た(図 3)。

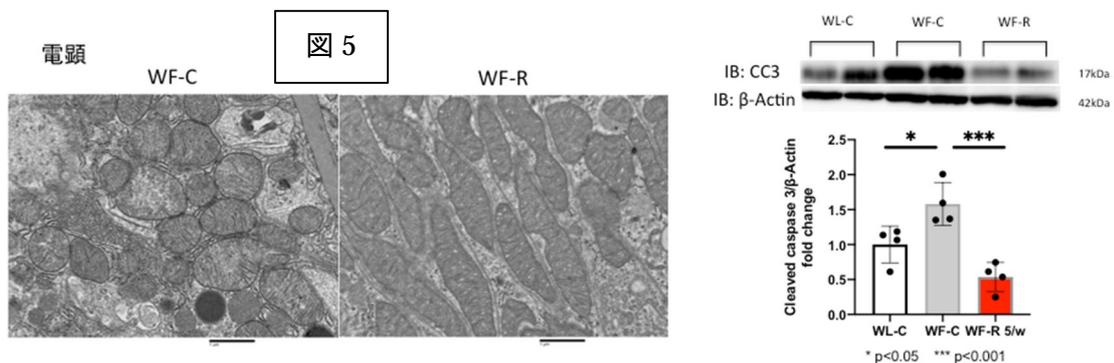
図 3



さらに、酸化ストレスマーカーである nitrotyrosine に関し、腎皮質における免疫組織染色と mRNA 発現、IB について調べた。WF-C 群の腎臓では WL-C 群と比較して、その免疫組織染色域と mRNA 発現、IB においても有意な増加を認めたことから、糖尿病/肥満状態における酸化ストレスの増強が本実験で用いた WF rats においても生じていることが示された。WF-R 群ではこれらの変化が改善し、運動が糖尿病腎において抗酸化ストレス効果を有する可能性を得た(図 4)。



電子顕微鏡下における近位尿細管細胞内のミトコンドリアの形態観察では、WF-C 群ではミトコンドリアの膨化、断片化あるいはクリステの不明瞭化などの形態異常を認めた。また、WF-C 群は WL-C 群と比較して、腎皮質における cleaved caspase 3 (IB) は有意に増加しアポトーシスを起こしていることが確認された。以上より、糖尿病/肥満ラットの腎臓ではミトコンドリア形態異常とアポトーシスを起こしていることが確認された。WF-R 群では WF-C 群と比較して、cleaved caspase 3 (IB) は有意に減少したことから、運動には一定のミトコンドリア形態異常改善効果に加え、アポトーシス改善効果を有する可能性を得た(図 5)。



本研究では 2 型糖尿病/肥満モデルラットの腎臓では尿細管間質障害および線維化、近位尿細管細胞における炎症・酸化ストレスとミトコンドリア形態異常を認め、アポトーシスも確認された。運動はこれらを改善する効果を有する可能性を示した。その機序としては糖尿病/肥満ラットの腎臓におけるオートファジーの改善やミオカインの腎保護的效果などを仮説として挙げ、研究を続けている。ヒラメ筋の DNA アレイ評価に関しては、現時点で脂質代謝関連遺伝子に着目して解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 門野 至、小倉 慶雄、北田 宗弘、Xu Jing、古家 大祐
2. 発表標題 運動負荷は2型糖尿病/肥満ラット腎における炎症を軽減する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年～2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------