

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07861

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症発症メカニズムの解明と制御：コレステリルエステル蓄積からのアプローチ

研究課題名(英文) Elucidation and control of mechanism of diabetic nephropathy: an approach from cholesteryl ester accumulation

研究代表者

惠 淑萍 (Hui, Shu-Ping)

北海道大学・保健科学研究所・教授

研究者番号：90337030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、培養ヒト近位尿細管細胞を用いて、細胞内の脂肪蓄積とミトコンドリア機能への影響を検討し、糖尿病性腎症の発症メカニズムと制御の可能性を探ることを目的としている。我々の研究では、腎臓の脂質蓄積およびミトコンドリアに存在するカルジオリピンの減少が腎症の成因に関連している可能性があることが示唆された。本研究では食品の機能性成分がHK-2細胞の脂質蓄積を軽減し、ミトコンドリアの機能を回復することを明らかにした。脂質代謝の改善および細胞保護作用を示した食品に含まれる機能性成分は糖尿病腎症の予防と治療に役立つ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

糖尿病性腎症は末期腎不全の最大の原因疾患であるが根本的な治療法が確立されておらず、腎症の発症メカニズムの解明と制御が重要な課題である。我々は、コレステロールなどの脂質蓄積、およびそれらの蓄積による酸化ストレスの亢進がミトコンドリア機能の低下をもたらしたことが糖尿病腎症の成因に関与している可能性を明らかにした。本研究では、脂質代謝の改善および細胞保護作用を示した食品機能性成分は、透析導入原疾患の第一位を占める糖尿病腎症の予防と治療に役立つ可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research project is to use cultured human proximal tubular cells to examine the effects on intracellular fat accumulation and mitochondrial function, and to explore the mechanism of onset of diabetic nephropathy and the possibility of its control. Our study suggested that lipid accumulation in the kidney and decreased cardiolipin present in mitochondria may be related to the pathogenesis of nephropathy. This study revealed that functional components of foods reduce lipid accumulation in HK-2 cells and restore mitochondrial function. It has been suggested that functional ingredients contained in foods that improve lipid metabolism and protect cells may be useful in the prevention and treatment of diabetic nephropathy.

研究分野：脂質代謝学、糖尿病学、食品学

キーワード：糖尿病腎症 脂質蓄積 ミトコンドリア機能

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は、根本的な治療法が確立されていない末期腎不全の最大の原因疾患であり、腎症の発症メカニズムを解明して治療方法を開発することは重要な課題である。糖尿病腎症を含む慢性腎臓病 (CKD) 患者の尿脂質を網羅的に質量分析したところ、強いシグナルを示すことを見出した。また、尿脂質が尿アルブミンと関連しつつも、より直接的な役割を糖尿病性腎症の発症において果たす可能性を示唆している。更に、これまでの動物・細胞実験から、近位尿細管上皮細胞への脂肪酸流入が、脂肪滴を蓄積させ、ミトコンドリアに器質的傷害を誘起する知見を得た。

## 2. 研究の目的

糖尿病性腎症初期に近位尿細管細胞への不飽和脂肪酸流入と脂質蓄積を発端に始まり、ミトコンドリアを巻き込んで進行する酸化的悪性サイクルが細胞死を引き起こすと仮説を立てる。本研究課題はその仮説を検証し糖尿病腎症の制御手段を提案することを目的とする。

## 3. 研究の方法

まず、コレステロールエステル (CE)、およびトリグリセリド (TG) の内部標準 LC/MS 質量分析法の開発と改良を行う。また、ミトコンドリア内膜に特異的に存在する脂質であるカルジオリピン (CL) の LC/MS 質量分析法を構築する。なお、それら LC/MS 質量分析法をヒト近位尿細管上皮細胞 (HK-2) 中の脂質分析を応用する。さらに、HK-2 細胞の CE 合成系酵素と TG 合成系酵素の評価は遺伝子レベルで行い、機能性物質の有用性を検討する。

## 4. 研究成果

ヒト腎近位尿細管上皮細胞に脂肪酸添加を行い、オレイン酸 (FA 18:1)、リノール酸 (FA 18:2)、アラキドン酸 (FA 20:4)、エイコサペンタエン酸 (FA 20:5)、およびドコサヘキサエン酸 (FA 22:6) 添加群において、脂肪滴の形成を確認した。なお、脂肪酸の添加による脂肪滴形成時の CE を LC/MS 定量法によ

り分析した。同様に不飽和脂肪酸添加群においてC Eの有意な増加が確認された。さらに、C E代謝酵素とトリグリセリド(T G)の合成系酵素を評価した。HK-2細胞(健康成人腎臓由来の近位尿細管上皮細胞株)への脂肪酸の過剰流入により、Sterol regulatory element-binding proteinの発現が低下した。HK-2細胞への脂肪酸負荷により、Diacylglycerol acyltransferaseおよびAdipose triglyceride lipaseの変化はなかった。

自家合成したC Lを内標準物質に、高分解能質量分析装置であるOrbitrapを用いて半定量的C L分析法を構築した。その分析法をHK-2細胞(健康成人腎臓由来の近位尿細管上皮細胞株)のC L測定に応用したところ、C Lを33分子種検出した。コントロール群では分子種C L 70:4とC L 72:5が多く検出された。各脂肪酸を負荷したところ、C Lではコントロールと比較して減少傾向にある分子種も多く見られた。各C L分子種の総和を脂肪酸添加群ごとに比較したところ、コントロールと比較して不飽和脂肪酸添加群において減少が見られた。また、C Lの過酸化物であるC L-OOHの分布を確認した。C L-OOH 72:4、72:6、72:8の3分子種が検出された。FA 18:1、18:2、20:4を添加した際にC L-OOHの有意な増加が見られた。なお、HK-2細胞の各脂肪酸添加群におけるC EとC L分子種の総和の関連についても検討した。総C Eと総C Lの間に負の相関が見られたが、有意ではなかった。

ヒト近位尿細管上皮細胞において、フラジンの脂質に対する細胞レベルと細胞小器官レベルの両方での調節を調べ、フラジンによる脂質代謝改善効果を発見した。フラジンは、HK-2細胞中のT G含有量を低下させ、T Gプロファイルをチェンジさせ、脂肪酸組成の特性を改善した。また、フラジンは脂肪滴に対しても多次元の調節効果を示した。脂肪滴の染色では、フラジンが効率的に脂肪滴の中性脂肪含有量を17.4~53.9%削減し、脂肪滴のサイズを10.0~35.3%縮小した。ナノエレクトロスプレーイオン化質量分析でも、フラジンが脂肪滴中T G含量の減少および脂肪滴のサイズの縮小効果を示した。そのメカニズムを解明するために脂質代謝に関連する遺伝子発現を調べたところ、フラジンは、脂肪分解酵素であるATGLのmRNA発現量を増加させ、脂肪酸の合成酵素であるのmRNA発現量を低下させたことがわかった。フラジンには脂質分解の促進と脂質生成の阻害作用があることを明らかにした。なお、フラジンはHK-2細胞およびミトコンドリア保護機能を有することも示唆した。脂質代謝の改善および細胞保護作用を示した食品機能性成分のフラジンは糖尿病腎症の予防と治療に役立つ可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wu Xun-Zhi, Ho Hsin-Jung, Eguchi Miki, Chen Zhen, Chiba Hitoshi, Hui Shu-Ping	4. 巻 56
2. 論文標題 Flazin improves mitochondrial dynamics in renal tubular epithelial cells under oxidative stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Food Bioscience	6. 最初と最後の頁 103378 ~ 103378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fbio.2023.103378	査読の有無 有
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 Zhen Chen, Rojeet Shrestha, Xiaoyue Yang, Xunzhi Wu, Jiaping Jia, Hitoshi Chiba, Shu-Ping Hui	4. 巻 11
2. 論文標題 Oxidative Stress and Lipid Dysregulation in Lipid Droplets: A Connection to Chronic Kidney Disease Revealed in Human Kidney Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox11071387	査読の有無 有
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 Wu Xunzhi, Chen Zhen, Wu Yue, Chen Yifan, Jia Jiaping, Shen Nianqiu, Chiba Hitoshi, Hui Shu-Ping	4. 巻 14
2. 論文標題 Flazin as a Lipid Droplet Regulator against Lipid Disorders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1501 ~ 1501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu14071501	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 Wu Y, Chen Z, Jia J, Chiba H, Hui SP	4. 巻 10
2. 論文標題 Quantitative and Comparative Investigation of Plasmalogen Species in Daily Foodstuffs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods10010124	査読の有無 有
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 Sakurai T, Chen Z, Yamahata A, Hayasaka T, Satoh H, Sekiguchi H, Chiba H, Hui SP.	4. 巻 online ahead of print
2. 論文標題 A mouse model of short-term, diet-induced fatty liver with abnormal cardiolipin remodeling via downregulated Tafazzin gene expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Food Agric	6. 最初と最後の頁 jsfa.11144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jsfa.11144	査読の有無 有
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 Tamai Y, Chen Z, Wu Y, Okabe J, Kobayashi Y, Chiba H, Hui SP, Eguchi A, Iwasa M, Ito M, Takei Y	4. 巻 135
2. 論文標題 Branched-chain amino acids and l-carnitine attenuate lipotoxic hepatocellular damage in rat cirrhotic liver.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomed Pharmacother	6. 最初と最後の頁 111181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2020.111181	査読の有無 有
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 Yamamoto Y, Sakurai T, Chen Z, Furukawa T, Gowda SGB, Wu Y, Nouse K, Fujii Y, Yoshikawa Y, Chiba H, Hui SP	4. 巻 413
2. 論文標題 Analysis of serum lysophosphatidylethanolamine levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease by liquid chromatography-tandem mass spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anal Bioanal Chem	6. 最初と最後の頁 245-254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-020-02996-9	査読の有無 有
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 Chen Z, Liang Q, Wu Y, Gao Z, Kobayashi S, Patel J, Li C, Cai F, Zhang Y, Liang C, Chiba H, Hui SP	4. 巻 16
2. 論文標題 Comprehensive lipidomic profiling in serum and multiple tissues from a mouse model of diabetes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metabolomics	6. 最初と最後の頁 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11306-020-01732-9	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Fuda H, Miyanaga S, Furukawa T, Umetsu S, Joko S, Roan Y, Suzuki H, Hui SP, Watanabe M, Chiba H.	4. 巻 67
2. 論文標題 Flazin as a Promising Nrf2 Pathway Activator	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Agric Food Chem	6. 最初と最後の頁 12844-12853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.9b04600.	査読の有無 有
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 Zhao Y, Chen Z, Wu Y, Tsukui T, Ma X, Zhang X, Chiba H, Hui SP	4. 巻 91
2. 論文標題 Separating and Profiling Phosphatidylcholines and Triglycerides from Single Cellular Lipid Droplet by In-Tip Solvent Microextraction Mass Spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anal Chem	6. 最初と最後の頁 4466-4471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.8b05122.	査読の有無 有
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 Tsukui T, Chen Z, Fuda H, Furukawa T, Oura K, Sakurai T, Hui SP	4. 巻 67
2. 論文標題 Novel Fluorescence-Based Method to Characterize the Antioxidative Effects of Food Metabolites on Lipid Droplets in Cultured Hepatocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Agric Food Chem	6. 最初と最後の頁 9934-9941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.9b02081.	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Xun-Zhi Wu, Hsin-Jung Ho, Miki Eguchi, Zhen Chen, Hitoshi Chiba, Shu-Ping Hui
2. 発表標題 Improving effect of flazin on mitochondrial quality and function in human HK-2 cells
3. 学会等名 第63回日本臨床化学会 年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 何 欣蓉, 関根 かりん, 青木 菜摘, 櫻井 俊宏, 千葉 仁志, 渡辺 秀明, 渡辺 貢, 惠 淑萍
2. 発表標題 マガキ由来抗酸化物質DHMBAの腎臓尿細管細胞における抗酸化作用
3. 学会等名 第29回日本未病学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 惠 淑萍
2. 発表標題 臨床化学者の異分野連携研究
3. 学会等名 第62回日本臨床化学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 惠 淑萍, Wu Xunzhi, Chen Zhen, Wu Yue, Chen Yifan, 千葉 仁志
2. 発表標題 HK2細胞における異所性脂肪蓄積・酸化と、フラジンによる予防効果(Ectopic lipid accumulation and oxidation in HK2 cells and the prevention effects of flazin)
3. 学会等名 第28回 日本未病学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 祐輔, 櫻井 俊宏, 陳 震, Wu Yue, 藤井 佑樹, 能祖 一裕, 千葉 仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 健常者及び非アルコール性脂肪性肝疾患患者の血清中LysoPEプロファイル
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千葉 仁志, Siddabasavegowda B. Gowda, 布田 博敏, 津久井 隆行, 惠 淑萍
2. 発表標題 Nrf2介在抗酸化物質と考えられるn-3脂肪酸由来脂質の発見
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関島 将人, 櫻井 俊宏, 佐藤 浩志, 何 欣蓉, 千葉 仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 サケ白子抽出物の培養ヒト肝細胞におけるミトコンドリア活性化作用
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野 朱音, 櫻井 俊宏, 関島 将人, 山端 ありさ, 陳 震, 千葉 仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 酸化HDLにより誘導された肝細胞過酸化脂質プロファイルの変動
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山端 ありさ, 櫻井 俊宏, 関島 将人, 上野 朱音, 千葉 仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 酸化HDLの肝脂質代謝及びミトコンドリアへの影響
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 山本 祐輔, 櫻井 俊宏, 三浦 佑介, 陳 震, 千葉 仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 リゾホスファチジルエタノールアミンの定量系開発のための標準品および内部標準物質の合成
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 拓貴, 譚 慧, 布田 博敏, 千葉 仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 ムール貝抽出物の新たな機能性評価と機能性物質の探索
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦 佑介, 櫻井 俊宏, 陳 震, 千葉 仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 HK-2 細胞における脂肪滴とカルジオリピンの関連性についての検討
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
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

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
---------	---------