

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：37502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650509

研究課題名(和文)食品成分による腎臓AMPK活性化はIgA腎症を抑制するか

研究課題名(英文)Does activation of AMPK in the kidney by food components ameliorate IgA nephropathy?

研究代表者

木村 靖浩(Kimura, Yasuhiro)

別府大学・食物栄養科学部・教授

研究者番号：90549792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では食品成分のアデノシン一リン酸(AMP)及びレスベラトロール(RSV)の投与がIgA腎症マウスにおいて腎臓AMP-activated protein kinase(AMPK)を活性化するか、IgA腎症の病態改善に有効かを検討した。AMP及びRSVは腎機能指標の血漿クレアチニン濃度及び尿中アルブミン排泄を減少させ、糸球体メサンギウム基質の増加を抑制した。さらにAMPはTNF- α 濃度を低下させた。またAMP及びRSVは腎臓のAMPK発現の低下を抑制することがわかった。以上の結果からAMP及びRSVは腎臓AMPK活性化を介してIgA腎症において腎保護的に作用することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aims of the present study were to determine whether adenosine-5'-monophosphate (AMP) and resveratrol (RSV) activate AMP-activated protein kinase (AMPK) in the renal tissues and improve progression in IgA nephropathy of mice. AMP and RSV treatments declined levels of plasma creatinine, amounts of urinary albumin excretion, and accumulation of glomerular mesangial matrix in IgA nephropathy mice, while attenuated reduction of total and phosphorylated AMPK expressions in the kidneys. In addition, AMP treatment decreased levels of proinflammatory cytokine, TNF- α in the renal tissues. Taken together, these results suggest that AMP and RSV might have the renoprotective effects through the activation of AMPK in the renal tissues of IgA nephropathy mice.

研究分野：食品機能学、栄養生理学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：栄養学 食品成分 IgA腎症 AMPK

1. 研究開始当初の背景

糖代謝及び脂質代謝に密接に関連し、エネルギー代謝の恒常性に重要な役割を担う AMP-activated protein kinase (AMPK) が糖尿病や免疫異常を基礎とした腎炎の発症に関与することが報告されている。

糖尿病モデル動物において抗酸化物質及び AMPK 賦活剤 5-amino-4-imidazole carboxamide riboside (AICAR) の投与により腎の肥大や炎症の軽減が認められた (Am J Physiol, 298, F1067, 2010)。またループス腎炎を呈した全身性エリスマトーゼスマウスから採取したメサングウムを培養し AICAR で処理して AMPK を活性化すると、炎症反応に関与する nitric oxide synthase、cyclooxygenase-2 及び interleukin-6 産生が抑制された (Clin Exp Immunol, 156, 542, 2009)。また細胞内 AMPK の活性化は nuclear factor- κ B (NF- κ B) シグナル伝達系が引き金となる炎症反応を抑制する (J Mol Med, 89, 667, 2011)。このように AMPK が炎症性腎臓病の病態生理にも深く関わっている可能性が示唆されている。

IgA 腎症は原発性糸球体腎炎の約 50% を占め、従来、予後が良好な腎臓病と考えられてきた。しかし、長い年月を経ておよそ 40% の患者が末期腎不全に至ると言われている。現在、IgA 腎症は日本における人工透析への移行率が糖尿病腎症に続いて 2 番目に位置する疾患である。IgA 腎症は糸球体メサングウム領域に免疫グロブリン IgA が沈着し、糸球体に炎症を引き起こす。メサングウム領域に異常が起こり腎炎を起こす点では糖尿病腎症とループス腎炎などと類似している。しかしながら、IgA 腎症において AMPK の活性化が腎症を抑制するかについては検討されていない。したがって、報告者は AMPK の活性化が IgA 腎症の軽減においても有効ではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

最近、糖尿病や免疫異常が原因となり惹起される腎炎に細胞内エネルギーセンサーとしてエネルギー代謝に重要な役割を担う AMPK の関与が注目されている。特にメサングウム増殖と糸球体炎症を特徴とする糖尿病腎症や全身性エリスマトーゼスのループス腎炎においてレスベラトロールによる AMPK 活性化や AMPK 賦活剤により腎の肥大や炎症が軽減されることが報告されている。しかし、本邦で罹患率が高い糸球体メサングウム領域への IgA 沈着により惹起される慢性糸球体腎炎の IgA 腎症の病態改善に AMPK が関与するのか明らかにされていない。一方、ラットにアデノシンリン酸を経口投与すると肝臓 AMPK 活性が上昇することが報告されている (J Agric Food Chem, 59, 13238, 2011)。

そこで、本研究は、IgA 腎症においても核酸関連物質のアデノシンリン酸 (AMP) 及びレスベラトロール (RSV) の投与により腎臓 AMPK を活性化することが病態の改善に有効か IgA 腎症マウスを使って調べることを目的とした。

3. 研究の方法

4 週齢雌 HIGA/NscSlc (IgA 腎症モデルマウス) を飼育環境に 1 週間馴化させたのち、マウスには被検物である AMP あるいは RSV のいずれかを蒸留水に添加して飲料水として与えた。被験物は、AMP の投与量が 10 mg/日、RSV の投与量が 100 mg/kg 体重・日となるよう飲料水中の被検物濃度を調節して与えた。飼料は AIN93G 精製固形飼料を用いた。飼料と飲料水は自由摂取とし 20 週間飼育した。対照 IgA 腎症マウスには蒸留水と AIN93G 精製固形飼料を与えた。

飼育 20 週目にマウスをイソフルラン吸入麻酔下に開腹し、下大静脈より採血して脱血死させ、両腎を摘出した。片腎は組織切片作製に供し、炎症の有無 (H.E 染色)、IgA の沈着 (免疫組織化学染色) 及びメサングウム基質の増加 (PAS 染色) を観察した。もう一方の腎臓は AMPK 発現の検出及び炎症性サイトカイン濃度 (IL-1、TNF- α 、IL-6) の測定に供した。採取した血液は遠心分離により血漿を得た後、クレアチニン濃度を測定した。実験期末に 24 時間採尿して尿潜血及びアルブミン排泄量を調べた。腎臓 AMPK 発現はイムノブロットング法、腎臓炎症性サイトカイン濃度及び尿中アルブミン濃度は ELISA 法、尿潜血は尿試験紙法により測定した。血漿クレアチニン濃度はクレアチニン測定キット (和光純薬工業株) により測定した。

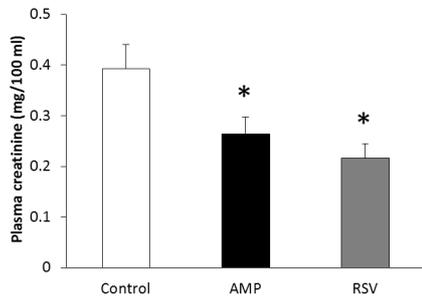
血漿クレアチニン濃度、尿中アルブミン排泄量及び腎臓炎症性サイトカイン濃度における対照群に対する AMP 群及び RSV 群の平均値の差の検定は、一元配置分散分析後、Dunnett 検定により行った。

4. 研究成果

本研究は、IgA 腎症モデルの HIGA/NscSlc マウスを用い、AMP 及び RSV の投与が IgA 腎症の病態に影響するか否かを調べた。

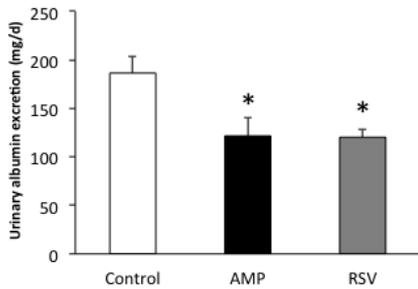
AMP 及び RSV の投与により、IgA 腎症マウスの体重、摂餌量、飲水量及び腎臓重量に変化はなかった。

AMP 及び RSV 投与は、腎機能パラメーターの血漿クレアチニン濃度を有意に低下させた (Fig. 1)。さらに実験期末に 24 時間尿を回収し、尿潜血及び腎機能パラメーターの尿中アルブミン排泄量を調べたところ、AMP 及び RSV 投与は、尿中アルブミン排泄量を有意に減少させた (Fig. 2)。尿潜血は全マウスにおいて陰性であった。



*: P<0.05 vs. Control

Figure 1. The effects of AMP and RSV on plasma creatinine levels.



*: P<0.05 vs. Control

Figure 2. The effects of AMP and RSV on urinary albumin excretion.

腎臓組織学的検査では、3群全てにおいて糸球体メサンギウム領域にIgAの沈着が認められた。また明らかな活動性の炎症は全群において認められなかった。しかし、AMP及びRSV投与は対照IgAマウスに比べ、糸球体メサンギウム基質の増加を抑制することがわかった (Fig 3)。

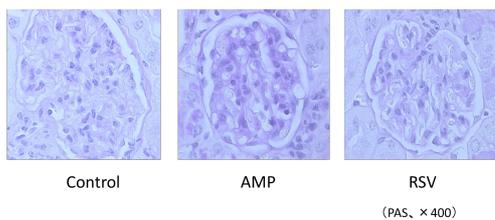
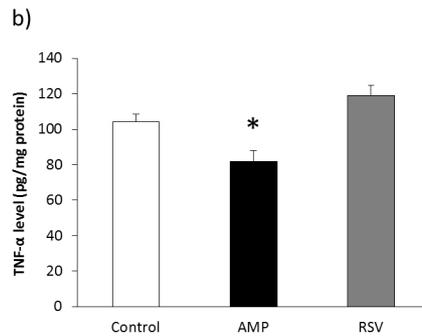
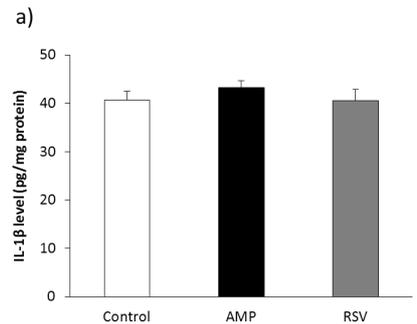


Figure 3. The effects of AMP and RSV on mesangial matrix expansion in IgA nephropathy.

一方、腎臓炎症性サイトカインのIL-1及びIL-6濃度にAMP及びRSVは変化を与えなかった (Fig 4. a と c)。しかし、TNF-濃度はAMP摂取により有意な減少が認められた (Fig 4. b)。本IgA腎症マウスはIgAがメサンギウム領域に沈着するが、炎症を必ずしも伴うモデルではないと言われていることから炎症性サイトカインレベルに顕著な変化が現れなかったものと考えられる。

そのような状態下、腎臓AMPK及びリン酸化AMPK (サブユニット、Thr172リン酸化)の発現をイムノブロッティング法により検討した。正常マウスに比べ、対照IgAマウスにおいてAMPKの発現が減少することがわかった。それに対しAMP及びRSV投与マウスで



*: P<0.05 vs. Control

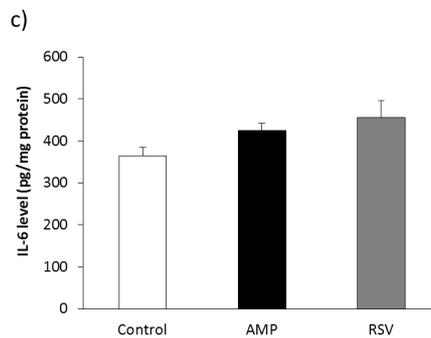


Figure 4. The effects of AMP and RSV on levels of IL-1β, TNF-α, IL-6 in renal tissues.

はAMPK

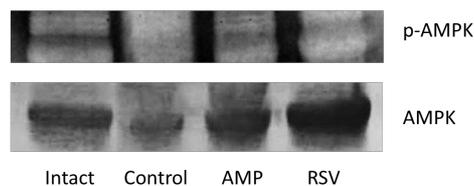


Figure 5. The effects of AMP and RSV on expressions of AMPK and phosphorylated AMPK in renal tissues.

発現が維持されていた。またAMPKが活性化されていることを示すリン酸化AMPKも正常マウスに比べ、対照IgAマウスではほとんど発現していなかった。ところが、AMP及びRSV投与において発現量は少ないもののリン酸化AMPKが検出された (Fig. 5)。

以上の結果より、1)AMP及びRSVの投与は血漿クレアチニンレベルを低下させること、尿中へのアルブミン排泄を減少させることがわかった。2)AMP及びRSV投与によって糸球体メサンギウム基質増加の抑制傾向が認められた。3)AMPの投与は腎臓TNF-レベル

ルを低下させた。4) IgA 腎症マウスにおいて AMPK 及びリン酸化 AMPK 発現が減少することが確認されたが、AMP 及び RSV 投与することによりそれらの減少が抑制されることがわかった。

このように IgA 腎症マウスにおいて AMP 及び RSV の投与は腎機能低下を抑制することがわかった。またその腎機能低下の抑制に AMP 及び RSV による腎臓 AMPK 活性化が関与する可能性が示された。AMP 及び RSV は IgA 腎症マウスにおいて腎保護的に作用することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

仙波和代、矢野義記、木村靖浩、浅田憲彦、大坪素秋、長谷真、石田和人、森大輔、大賀恭、伊達紫、西澤千恵子. 別府地獄蒸し食品のアンチエイジング効果に関する研究. 別府大学紀要、第 54 号:115-121、2013 (査読無)

Yasuhiro Kimura, Marie van der Merwe, Stine B. Bering, Himabindu Penmatsa, Veronica G. Conoley, Per T. Sangild, Anjaparavanda P. Naren, Randal K. Buddington. Glucose transport by epithelia prepared from harvested enterocytes. Cytotechnology, DOI 10.1007/s10616-013-9656-1, 2013 (査読有)

仙波和代、大賀恭、木村靖浩、浅田憲彦、中村弘幸、長谷真、大坪素秋、西澤千恵子. 老化促進マウス (SAMP8) の記憶力・活動力低下に対する地獄蒸し食品の効果. 別府大学大学院紀要、第 16 号: 29-38、2014 (査読無)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.beppu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村靖浩 (KIMURA YASUHIRO)

別府大学・食物栄養科学部・准教授

研究者番号: 90549792

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし