

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（腎疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

グレリンの糖尿病性腎症に対する保護効果  
慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 脇野 修

研究要旨 成長ホルモン放出促進受容体の内因性リガンドとして発見されたグレリン (Ghr)は、摂食増進作用に加え、ミトコンドリア由来の活性酸素 (ROS) を減少させることにより酸化ストレスを減少させるなどの作用があることがわかっている。これまで急性腎障害や老化のモデルマウスにおいて Ghr 投与により腎保護の作用があることが報告されてきた。今回我々は Ghr の慢性腎疾患への効果について、主にミトコンドリアを介した作用に注目し検討した。＜方法＞in vitro では腎近位尿細管細胞 HK-2 細胞へ Ghr を投与し、同時投与の効果を検討した。また in vivo では、2 型糖尿病のモデルマウスである db/db マウスに Ghr(100 $\mu$ g/kg/day)を 8 週間連日投与し、Ghr の腎保護効果を検討した。＜結果＞HK-2 細胞への Ghr 投与では、ミトコンドリアダイナミクスに関する代表的な因子である DRP1 および Mfn2 において、realtimePCR でも western blotting でも、有意差を認めなかった。db/db マウスでの Ghr 投与の検討では、Ghr 投与群において長期的な摂食量が変わらないが体重増加を認めたと、血清 BUN、Cr、尿タンパク、アルブミンなどの腎評価項目において有意差を認めなかった。腎組織での realtime PCR でもミトコンドリアダイナミクスの因子に有意差は認めなかった。[結論]今回の研究において Ghr 投与は腎臓において、2 型糖尿病のモデルマウスへの影響は認めなかったが、体重増加は認め、代謝への影響は示唆された。

A. 研究目的

グレリンとは、ラットとヒトの胃で発見されたペプチドホルモンで、GH 分泌促進受容体を介して GH 分泌を誘起させるホルモンである。グレリンは摂食行動の生理的信号物質であり、成長ホルモンの分泌と摂食を増進して成長を制御する。従ってその分泌は栄養状態やエネルギーバランスの変化に依存して生じる。グレリンは胃及び脳内の視床下部弓状核のニューロンで産生され、またグレリン受容体は脳細胞の他、様々な

部位で発現している。

グレリン受容体は腎臓にも発現が認められている。グレリンの腎での作用についてはマウスの虚血再還流傷害などの急性腎障害モデルマウスにおいて腎機能悪化を予防することが報告されている。また、我々はグレリン受容体ノックアウトマウスにおいて、腎近位尿細管細胞においてミトコンドリアが形状変化し、伸展していることを報告した。

一方、慢性腎障害を含めた慢性消耗性疾患

の患者が、体重減少および筋量減少を伴い、身体が衰弱化していく protein energy wasting(PEW)の状態となると、生命予後が悪いことが報告されている。PEW 患者への介入として摂食増進作用のあるグレリン期待されている。

我々は、グレリンの腎障害に対する効果について *in vitro* および *in vivo* で検討した

## B. 研究方法

*in vivo*(マウス)での検討では、レプチン受容体異常により 2 型糖尿病様の状態となる db/db マウスと、コントロールとしての BKS.Cg-m<sup>+/+</sup>マウス(m/m マウス)を、7 週齢から 15 週齢にわたり、Ghr 群には Ghr を 100 $\mu$ g/kg/day を、生理食塩水群には同量の生理食塩水を連日腹腔注射し、4 群で糖尿病性腎症における Ghr の効果を検討した。さらに *in vitro*(ヒト尿細管細胞株)では、Ghr のミトコンドリアへの作用を Ghr 受容体の発現が証明されている尿細管の細胞株である Human kidney-2 細胞(HK-2 細胞)でも検討した。

## C. 研究結果

*In vivo*(マウス)のデータ

摂食量に関して、m/m マウスに比して、db/db マウスにおいて摂食量を増加させたが、Ghr 投与による長期的な摂食量増加は見られなかった。(図 1)

体重に関して、m/m マウスに比して、db/db マウスでは体重は増加した。m/m マウスにおいてはグレリン投与による体重変化は認めなかったが、db/db マウスではグレリン投与により体重増加を認めた。(図 2)

慢性腎障害抑制効果に関して、投与 8 週後

の尿タンパクは db/db マウスにおいて Ghr 投与による変化は認めなかった。尿アルブミンは m/m マウスに比して db/db マウスで増加したが、Ghr 投与による変化は認めなかった。また、血清 BUN、Cr には 4 群で差を認めなかった。(図 3)

腎組織での realtimePCR では、ミトコンドリアダイナミクスの因子である DRP1、Mfn2 の発現に有意差は認めなかった。(図 4)

*in vitro*(ヒト尿細管細胞株)のデータ

ミトコンドリアダイナミクスに関する代表的な因子である DRP1 および Mfn2 において、realtimePCR でも western blotting でも、有意差を認めなかった。(図 5)

## D. 考案

2 型糖尿病モデルマウスに Ghr を長期投与し、体重は増加したが、腎機能に差は見られなかった。また、ミトコンドリアダイナミクスに関わる因子にも有意差は認めなかった。体重増加に関しては、db/db マウスのみで認められており、Ghr の作用に拮抗するレプチンの作用が阻害されたモデルであるため、表現型として顕在化したと考えられる。しかし、Ghr 投与により摂食量増加は認めておらず、Ghr の投与によりエネルギー消費減少による体重増加が示唆された。Ghr は飢餓時に分泌亢進するホルモンであり、エネルギー貯蓄の方向へ働くのは現象として矛盾しないと考える。また、腎機能に差は認められなかったが、Ghr 投与により体重増加を認めた分、腎保護効果が相殺された可能性もある。今後は体重減少を伴うような慢性腎障害のモデル動物で Ghr 投与の効果があるか検討する必要があると考える。

また、2型糖尿病モデルマウスでも HK-2 細胞でも、ミトコンドリアダイナミクスに関する因子に変化は見られなかった。in vitro においては、平常時には Ghr 作用は弱く、何らかの侵襲的な刺激への暴露があった際に、Ghr の作用が顕在化してくる可能性がある。また、心筋細胞や肝細胞、腎足突起細胞では、高血糖時にミトコンドリアが分裂、断片化する傾向にあるのに対し、老化した細胞や腎尿細管細胞ではミトコンドリアが拡大する傾向があることが報告されている。In vitro において、realtimePCR や western blotting による解析では腎組織全体での傾向しか捉えられないため、組織切片の観察など直接的な評価が必要であると考ええる。

#### E. 結論

今回の研究において Ghr 投与は腎臓において、2型糖尿病のモデルマウスへの影響は認めなかったが、体重増加は認め、代謝へ

の影響は示唆された。慢性腎障害患者に対する Ghr 投与の効果を確認なものにするため、体重減少を伴う腎疾患モデルへの Ghr 投与での検討を今後進めていく予定である。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 食事摂取量

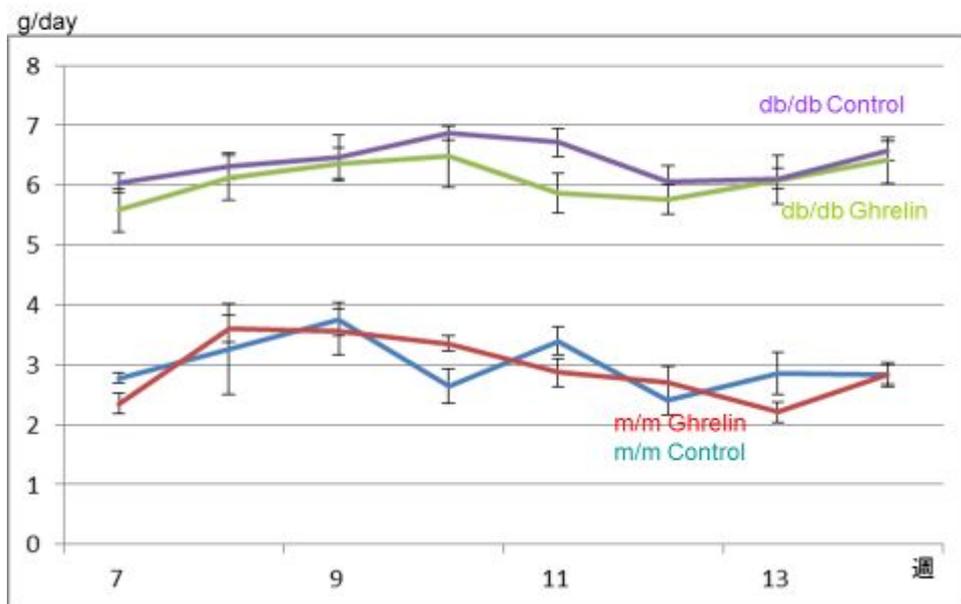


図 2

## 体重

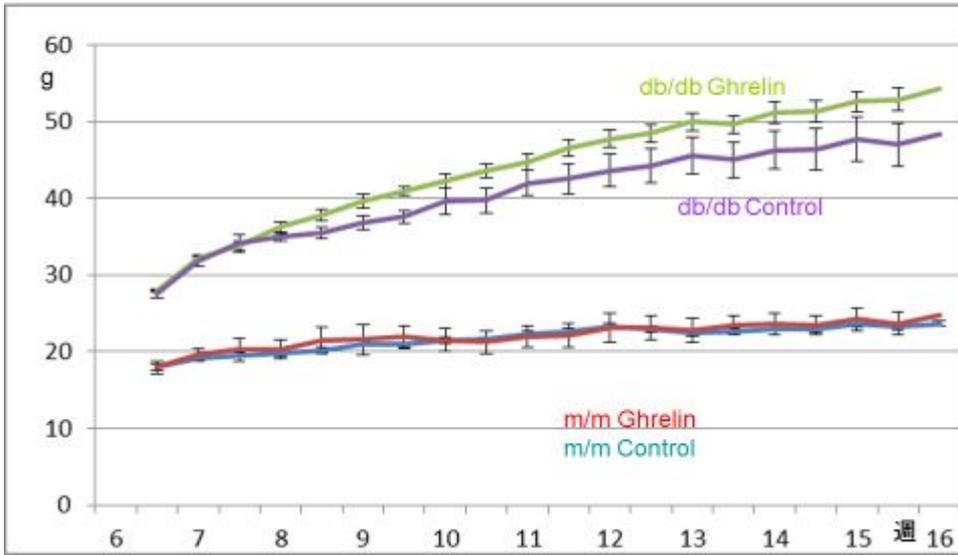
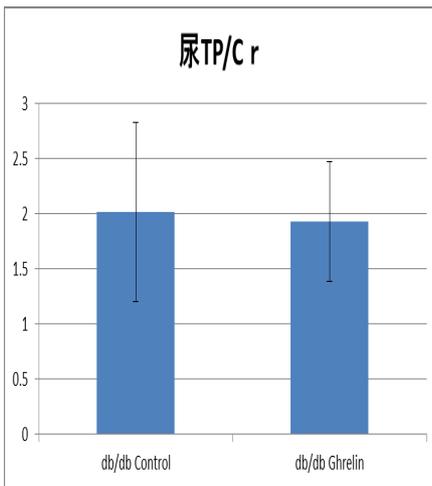
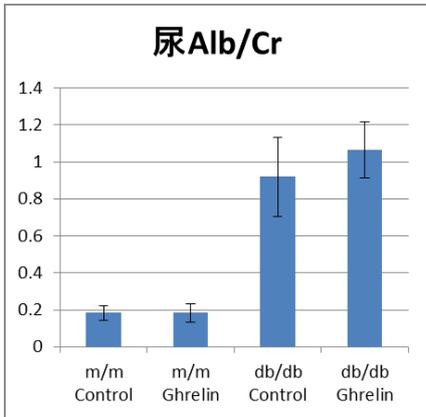


図 3





\* \* P<0.1 vs m/m Control

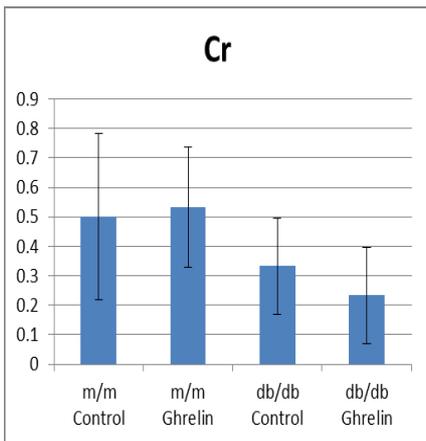
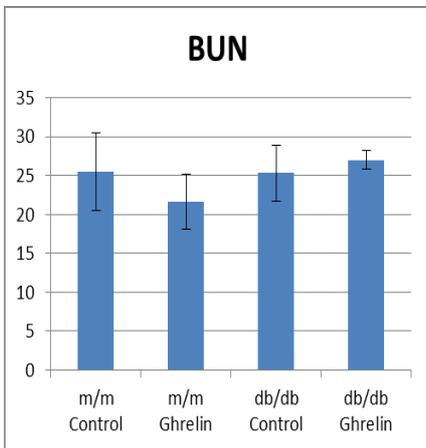


图 4

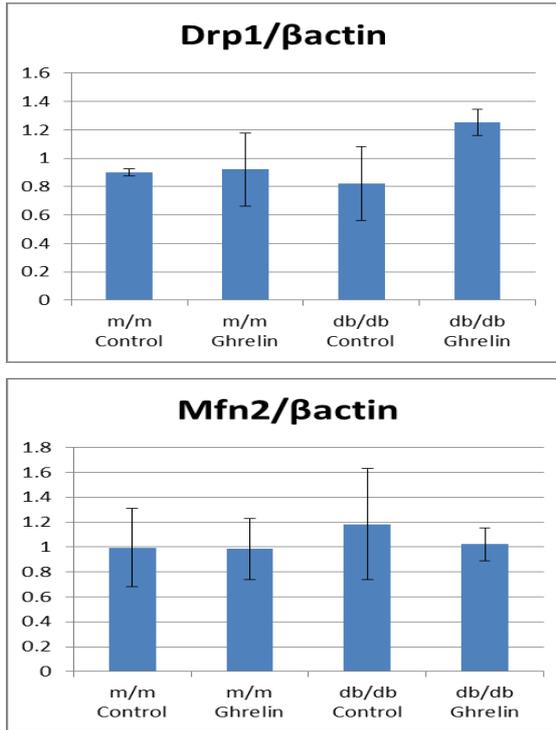


图 5

C: Control

G1 : Ghrelin 1nM 投与

G10 : Ghrelin 10nM 投与

G100 : Ghrelin 100nM 投与

D10 : Desacyl Ghrelin 10nM 投与

D100 : Desacyl Ghrelin 100nM 投与

