

# 可視化システムを利用したカテキン類の糖尿病性腎症 予防・改善する機能性食品への応用

## 【助成対象者】

神戸大学大学院農学研究科生命機能科学科

教授 白井 康仁

## 【共同研究者】

神戸大学大学院 農学研究科 生命機能科学科

芦田 均

## 【研究の目的】

今や国民病である糖尿病患者の QOL を左右しているのが、糖尿病性合併症である。この糖尿病性血管合併症の増悪には様々な要因が関与しているが、PKC の活性化もその大きな一因であることが知られている。一方、PKC の活性化剤であるジアシルグリセロール (DG) をリン酸化する DG キナーゼ (DGK) は、間接的に PKC の活性を抑制できる。このことから、DGK の活性化剤は糖尿病性腎症などの改善薬になり得ると期待される。実際に、ビタミン E が腎糸球体の DGK を活性化することで、糖尿病性腎症を改善することが報告された。これを受け、我々は、腎糸球体に存在する DGK サブタイプのうち、DGK $\alpha$  がビタミン E (VtE) によって活性化されること、この活性化にはクロマン環構造が重要であることを見出した。しかし、その後行われた大規模試験の結果、VtE の経口投与は糖尿病性腎症を優位に改善しないことが明らかになった。そこで、本研究では、DGK $\alpha$  をターゲットとし糖尿病性腎症を改善する機能性食品の開発を目的として、申請者が確立してきた可視化システムをヒト腎糸球体培養細胞に応用し、クロマン環様構造を有するカテキン類の糖尿病性腎症を予防及び改善する機能性食品としての有用性と作用機序の解明を試みた。

## 【研究の成果】

### 1) DGK $\alpha$ の活性化に及ぼすカテキン類の効果

まず、GFP-DGK $\alpha$ を発現させた DDT 細胞に、カテキンガラート (Cg) エピカテキン (EC)、エピカテキンガラート (ECg)、エピガロカテキン(EGC)、エピガロカテキンガラート (EGCg)、ガロカテキンガラート (GCg) を作用させ、活性化の指標である細胞質膜へのトランスロケーションを共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブイメージングにより評価した。その結果、ガラート基を持つカテキンのみが、GFP-DGK $\alpha$ を細胞質膜にトランスロケーションさせた。一方、ガラート基本体である没食子酸は DGK $\alpha$ のトランスロケーションを引き起こさなかったことから、DGK $\alpha$ のトランスロケ

ーションにはクロマン環とガレート基の両方が必要であることが明らかになった。ついで、トランスロケーションを引き起こした ECg、EGCg、Cg、GCg を比較したところ、100 $\mu$ M では ECg、EGCg がほぼ同程度 DGK $\alpha$  のトランスロケーションを引き起こしたのに対し、Cg、GCg のトランスロケーション率はその半分以下であった。そこで、様々な濃度の ECg と EGCg を用いて、DGK $\alpha$  のトランスロケーションに対する濃度依存性を調べた。その結果、ともに濃度依存的に DGK $\alpha$  のトランスロケーションを有機したが、高濃度では ECg が、低濃度では EGCg がよく効いた。特に、生理的に可能性のある数 $\mu$ M の EGCg でも十分なトランスロケーションを引き起こした。

## 2) EGCgによるDGK $\alpha$ の活性化とそのメカニズム

ついで、実際に EGCg が DGK $\alpha$  を活性化するか否かを、従来どおりの活性測定法を用いて測定したところ、EGCg は直接 DGK $\alpha$  を活性化するのではないことが明らかになった。そこで、EGCg 処置した細胞内の DGK $\alpha$  の活性を測定したところ、約 2.8 倍に上昇していることを確認した。即ち、EGCg は間接的に DGK $\alpha$  を活性化していることがあきらかになった。これまでに、ガレート型カテキンの受容体として 67kd ラミニン受容体 (67LR) が知られていたため、EGCg による DGK $\alpha$  の活性化には 67LR が関与しているのではないかと予測し、以下の実験を行った。まず、DDT 細胞よりハムスター 67LR をクローニングし、FLAG タグをつけ、DDT 細胞に強発現させ、EGCg による DGK $\alpha$  のトランスロケーションを観察したところ、67LR を強発現させた細胞では EGCg による DGK $\alpha$  のトランスロケーションが有意に上昇した。一方、67LR 抗体を処置した細胞においては、EGCg による DGK $\alpha$  のトランスロケーションが有意に抑制された。さらに、67LR siRNA を用いて内在性の 67LR をノックダウンした DDT 細胞では、EGCg による DGK $\alpha$  のトランスロケーションが有意に減少した。以上のことから、EGCg による DGK $\alpha$  のトランスロケーションには 67LR が関与していることが明らかになった。

## 3) 腎糸球体における67LRの局在とEGCgの効果

腎糸球体は、血管内皮細胞、血管上皮細胞 (ポドサイト)、メサンギウム細胞から構成されている。そこで最後に、67LR と DGK $\alpha$  がどの細胞に発現しているのかを検討した。マウスの腎糸球体を抗 DGK $\alpha$  抗体及び抗 67LR 抗体で染色したところ、ともにポドサイトに発現していることが明らかになった。そこで、マウス培養ポドサイトに GFP-DGK $\alpha$  を発現させ、EGCg によるトランスロケーションが認められるか否かを検証した。その結果、GFP-DGK $\alpha$  は EGCg により細胞質膜にドット状に集積した。このドット状の集積は 67LR の局在と一致することも明らかになった。ポドサイトは足突起を介して尿の濾過作用に重要な働きをしていることから、ポドサイトに EGCg による DGK $\alpha$  の活性化はポドサイトの形態変化を介して、腎濾過機能調節の向上や糖尿病性腎症時の蛋白尿の改善などに役立つと期待される。

## 3) VtE によるDGK $\alpha$ の活性化機構について

同じくクロマン環構造を有する EGCg が 67LR を介し DGK $\alpha$  を活性化することが明らかとなった

ことから、VtE も同様に 67LR を介し DGK $\alpha$ を活性化すると考え検証を行った。その結果、2) と同様の実験を行い、VtE も 67LR を介して DGK $\alpha$ を活性化することを明らかにした。この事実は、カテキンは生体内における VtE の作用の一部を代償できることを示唆していた。

### 【今後の課題】

#### 1) ヒトポドサイトを用いた検証実験

これまでの実験はハムスターあるいはマウスの培養細胞を用いていたため、ヒトの培養細胞を用いて、EGCg が 67LR を介して DGK $\alpha$ を活性化するのかを検証する必要がある。また、これまでの実験において 67LR 及び DGK $\alpha$ はポドサイトに局在していることが判明したため、EGCg による DGK $\alpha$ の活性化がポドサイトの分化や形態変化（とくに足突起形成）に与える影響を調べていきたい。この実験に関しては、当初予定していた実験であることから、近いうちに行いたい。また、高血糖状態におけるポドサイトの形態及び PKC 活性に EGCg による DGK $\alpha$ の活性化がどのような影響を与えうるのかも検討していく必要がある。

#### 2) 糖尿病性腎症に対する EGCg の効果の検証

これまでの実験では、実際に EGCg が糖尿病性腎症に効果を発揮するか否かは明らかではない。そこで、糖尿病モデルラット及びマウスを作製し、EGCg の経口投与により、蛋白尿、尿量、腎重量、クレアチンクレアランスなどが改善するか否か調べていく必要がある。また、改善効果が見られた際には、EGCg の抗酸化作用と DGK $\alpha$ の活性化による作用が混在しているため、DGK $\alpha$ のノックアウトマウスを用いて、どの作用が消失するか、即ち EGCg による DGK $\alpha$ の活性化は糖尿病性腎症の症状のうち、どのような症状に効果を発揮するか検討していく必要がある。一方、EGCg と同様 67LR を介して DGK $\alpha$ を活性化する VtE の経口投与が大規模なヒト試験において効果を示さなかったことから、EGCg の経口投与も効果を示さない可能性がある。そこで、EGCg の腹腔内投与で同様の実験を行う。また、動物を用いた VtE の糖尿病性腎症改善実験は腹腔内投与でしか行われていなかったため、VtE の経口投与実験も行う。これにより、投与方法による問題であることを提起できると考えている。

#### 3) メカニズムの検証

EGCg あるいは VtE の腹腔内投与で糖尿病性腎症改善が改善し、その一部が DGK $\alpha$ ノックアウトマウスで消滅した際には、EGCg や VtE の糖尿病性腎症改善効果は 67LR を介した DGK $\alpha$ の活性化によるものと推察できる。しかし、DGK $\alpha$ が活性化すると糖尿病性腎症改善するのかは明らかではない。そこで、尿量や蛋白尿の解析とともに、腎糸球体のポドサイトの形態と腎濾過機能に着目し、EGCg や VtE 処置群や DGK $\alpha$ ノックアウトマウスの腎糸球体、とくにポドサイトの形態を電子顕微鏡を用いて解析していく必要がある。これら個体レベルの研究と 1) での培養細胞レベルでの実験を通して、DGK $\alpha$ を介した EGCg や VtE の糖尿病性腎症改善効果機構を明らかにしていく必要がある。

【本研究に関する主な発表論文、投稿等】

Hayashi D, Ueda S, Yamanoue M, Saito N, Ashida H and Shirai Y. (2015) Epigallocatechin-3-gallate activates diacylglycerol kinase alpha via a 67 kDa laminin receptor: a possibility of galloylated catechins as functional food to prevent and/or improve diabetic renal dysfunctions. *J. Functional Food* 15, 561-569