

糖尿病性腎症モデルを利用した塩類感受性の非侵襲性評価系の構築 —低タンパク質食との相互作用—

矢中 規之

広島大学大学院統合生命科学研究科

概要 動物実験は生体内における医薬品や食品素材の効果を確認できることから、薬効評価や食品の機能性評価において重要な研究手法である。動物実験を用いた評価では、実験動物を屠殺して行うエンドポイントによる生化学的な解析が一般的となっているが、実験終了時点での限定的な情報しか得られない。そこで、病態の開始から改善に至るまでの時間軸に沿って複数の解析ポイントを設定するため、数多くの動物を必要とし、実験動物に関する社会的問題が生じている。また、同一個体を継時的に解析できないことから、病態の発症や効果に関する個体差によって正確な評価を行うことは困難である。一方、近年生体内の微弱な化学発光や蛍光を体外から観察するイメージング技術が確立され、生体内の細胞を非侵襲的に観察する *in vivo* イメージング法が広く利用されるようになった⁽¹⁻³⁾。*in vivo* イメージングでは同一個体を継時的に観察することが可能であるため、評価においても多くの実験動物を必要とせず、また一個体内の蛍光量や化学発光量の変化率を調べることで、機能性素材の効果を評価できると考えられる。*in vivo* イメージングを利用することを目的に、*luciferase* 遺伝子などを利用したレポーターマウスが作製され、種々の疾患モデルへの応用が試みられている。我々は *in vivo* イメージングによって白色脂肪組織の慢性炎症を体外から非侵襲的に観察することを目的に白色脂肪組織へのマクロファージの浸潤量の増加に伴って発現が上昇する *serum amyloid A3 (Saa3)* 遺伝子を単離した。そして、*Saa3* 遺伝子のプロモーターの下流に *luciferase* 遺伝子を連結させた遺伝子を全身の細胞に有する遺伝子組換えマウス (*Saa3-luc* マウス)の作出を行い、*in vivo* イメージングによって白色脂肪組織の慢性炎症を非侵襲的に観察した^(4,5)。さらに *Saa3* 遺伝子プロモーターの活性化は急性炎症反応時の肝臓や脾臓においても報告されており、白色脂肪組織以外の炎症像を化学発光によって評価を行う可能性が考えられている。

一方近年、慢性腎臓病の罹患者数は増加しており、低下した腎機能を回復させる食品素材が求められている。現行では腎機能マーカーとして尿素窒素 (BUN) や *creatinine* の血中または尿中濃度の測定が行われているが、肝機能や筋肉量によって影響を受けることに加え、初期の腎機能障害を反映しにくい欠点があることから、実験動物を用いた腎機能の評価において課題が指摘されている。正常の *Saa3-luc* マウスでは、他組織と比較して腎臓における *luciferase* 活性が最も高かったことから、腎障害において *luciferase* 活性の上昇が認められた場合には、他組織の *background* の影響が少なく、*in vivo* イメージングによる評価に適していると考えた。*Saa3-Luc* マウスを用いて、ストレプトゾトシン (STZ) 投与、および高脂肪食負荷、あるいは Na 負荷の組み合わせにより糖尿病性腎症を作製し、化学発光に基づく体外からの腎臓の観察によって、塩類摂取での生体応答、および初期の腎臓病変を簡便かつ、非侵襲的に評価する手法の確立を目指した。糖尿病性腎症モデルの作製を目的として、高脂肪食を4週間与え、低用量の STZ を5日間腹腔内投与した後、さらに8週間高脂肪食を負荷した。その結果、背部から腎臓由来の化学発光が検出されたことから、糖尿病性腎症を非侵襲的に観察可能であると考えられた。そこで、*Saa3-Luc* マウスに STZ 投与後、1% NaCl を含む高 Na 食、および 0.9% NaCl 水溶液飲水により飼育を行い、*in vivo* イメージング解析による腎臓の化学発光の観察を行った。その結果、高脂肪食負荷による腎症と同様に、背部から腎臓由来の化学発光が検出されたことから、Na 摂取誘導性の糖尿病性腎症を非侵襲的に観察可

能であると考えられた。現在、STZ 投与時より低タンパク質、あるいは高タンパク質の食餌を摂取させ、腎臓の化学発光を非侵襲的、かつ血中マーカーとの比較解析を行っている。

1. 研究目的

食品機能に関する動物評価では、実験動物の使用数や研究の実施内容において動物愛護の面から大きな社会問題となっているが、近年、生体内の微弱発光や蛍光を高感度に分析するイメージング機器が開発され、*luciferase* や蛍光タンパク質を用いた非侵襲性(動物が生きた状態)の評価手法の確立が進められている。特に従来の食品機能性に関する評価方法では、動物実験終了時に摘出組織の生化学など病態解析を行うエンドポイント的な評価が主流であるが、非侵襲性の動物評価系によって、食品素材の効果について同一個体での持続的な観察が可能となり、痛みが伴わず、使用する実験動物数も大幅に縮小できる点は動物愛護の観点からも社会的意義は大きいと考えられる。*Saa3* 遺伝子のプロモーター領域に *luciferase* 遺伝子を連結したキメラ遺伝子を導入した *Saa3-Luc* マウスを用いて、ストレプトゾトシン(STZ)投与、および高脂肪食負荷、あるいは Na 負荷の組み合わせにより糖尿病性腎症を作製した。化学発光に基づく体外からの腎臓の観察によって、塩類摂取での生体応答、および初期の腎臓病変を簡便かつ、非侵襲的に評価する手法の確立を目指した。さらに、腎炎発症に伴う腎機能低下に対して低タンパク質食による抑制効果が示されているが⁶⁾、高 Na 負荷時の腎臓病の発症に対する低タンパク質食摂取の影響についても、非侵襲的な評価を試みる。動物を生きたまま、体外からの継続的な観察、および定量化による評価系としての有用性を明らかにし、動物実験の 3R の二つである Reduction(使用動物数の削減)、および Refinement(苦痛軽減)の実現に対しての貢献を目指すものである。

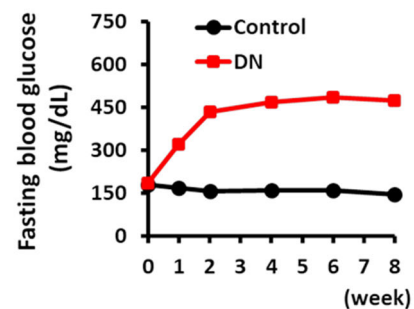
2. 実験方法, および結果

本研究内容は広島大学組換え DNA 実験委員会の承認を既に得ており(承認番号:30-5-5)、また広島大学動物実験委員会において実験の手順、および方法について承諾を得た後、関連する法令等を遵守しながら実施した(承認番号:C20-30)。

Saa3-luc マウスに高脂肪食負荷, および低用量 STZ 投与により糖尿病誘発した際の *in vivo* イメージング解析

マウスは水道水と固形試料を自由摂取させ、12 時間明暗サイクル、恒温(24±1°C)で飼育を行った。8 週齢雄性 C57BL マウスに 45%高脂肪食(オリエンタル酵母製)を与え、4 週間後 STZ を 5 日間腹腔内投与(40 mg/kg)した。さらに 8 週間高脂肪食を負荷した。血糖値は STZ 投与 1 週間後から上昇し、2 週間後には 450 mg/dl に達した(図 1A)。

A



B

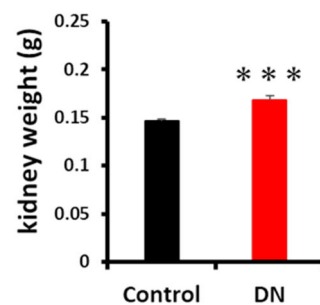


図 1. 高脂肪食, および低用量 STZ 投与による糖尿病性腎症の誘導

8 週齢雄性 C57BL マウスに糖尿病性腎症を誘導した。STZ 投与 2 週間後からの高血糖状態の持続(A)、8 週間後には腎重量の有意な増加が認められた(B)。

最終腎重量も有意に増加し(図 1B), 腎臓のパラフィン切片を作製し後, HE 染色を行った結果, 糸球体面積の有意な増加が観察された(図 2A,B)。血清自動分析装置(Beckman Coulter)を用いて, 血漿中の尿素窒素(BUN), および creatinine の濃度に変化は認められなかった(データ非掲載)。

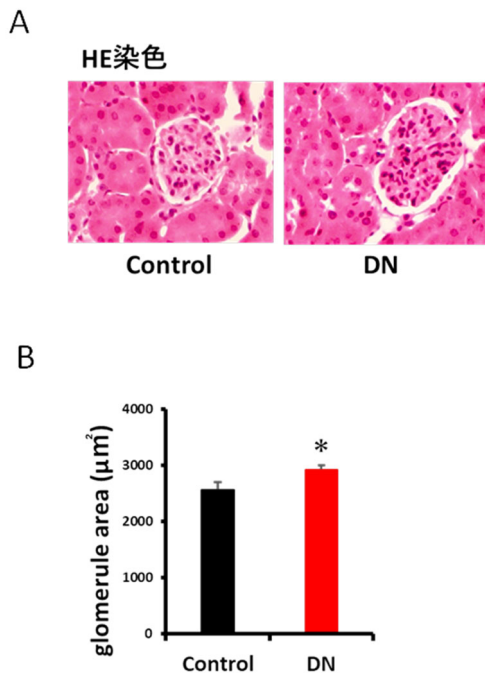


図 2. 高脂肪食, および低用量 STZ 投与による糖尿病性腎症の誘導
STZ 投与から 8 週間飼育後, 腎臓のパラフィン包埋を行い, 切片を作製した。HE 染色を行った結果, 糸球体面積の有意な増加が認められた(B)。

さらに腎臓由来の mRNA を用いて遺伝子発現解析を行った。RNeasy Mini kit(Qiagen)を用いて total RNA の調製し, RevaTra Ace RT(TOYOBO 社製)を用いて cDNA 合成を行った。THUNDERBIRDTM SYBR qPCR Mix (TOYOBO 社製), および StepOne リアルタイム PCR システム(Applied biosystems)を用いて qPCR 解析を行った。その結果, 糖尿病群では Saa3 遺伝子や TNF α 遺伝子などの発現上昇が認められた(図 3)。8 週齢雄性 Saa3-luc マウスに上記と同様に高脂肪食負荷, および 5 日間の STZ 腹腔内投与によって糖尿病を誘発させた際の *in vivo* イメージング解析を行った。*in vivo* イメージング解析は Night OWLII(Berthold 社製)を用いて行った。イメージングを行う 15 分前に D-Luciferin(富士フイルム和光純薬社製)溶液を 2 mg/head でマウスに腹腔内投与し, 麻酔下で *in vivo* イメージング解析を行った。*in vivo* イメージング解析の結果, 高脂肪食, および低用量の STZ 投与を行ったマウスの背部における luciferase 活性の上昇が認められ, 開腹することで腎臓由来の化学発光を確認した(図 4)。Saa3-luc マウスに Na 負荷, および低用量 STZ 投与により糖尿病誘発した際の *in vivo* イメージング解析

マウスは水道水と固形試料を自由摂取させた。8 週齢雄性 Saa3-luc マウスに STZ を 5 日間腹腔内投与(55 mg/kg)し, 1% NaCl を含む高 Na 食, および 0.9% NaCl 水溶液飲水により一か月間飼育を行い, 有意な血中グルコース濃度の上昇, 体重減少を確認した(図 5)。

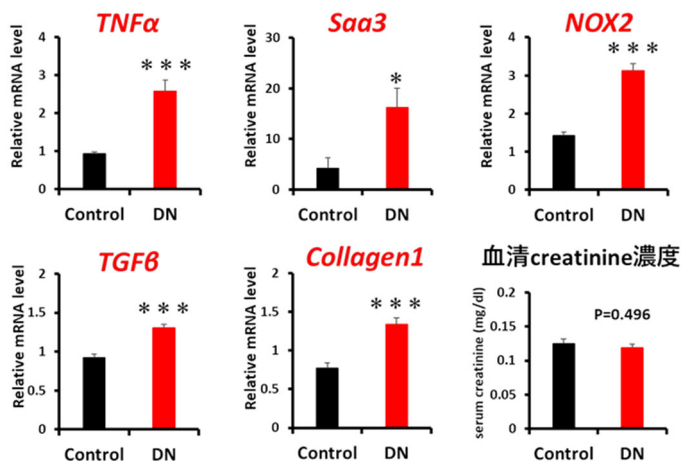


図 3. 高脂肪食, および低用量 STZ 投与による糖尿病性腎症の誘導

STZ 投与から 8 週間飼育後, 腎臓を摘出し, RNA の調製を行った。逆転写反応後, qPCR 解析を行った結果, 炎症性因子の TNF α や線維化因子の TGF β , Collagen1 の発現量の上昇が認められた。

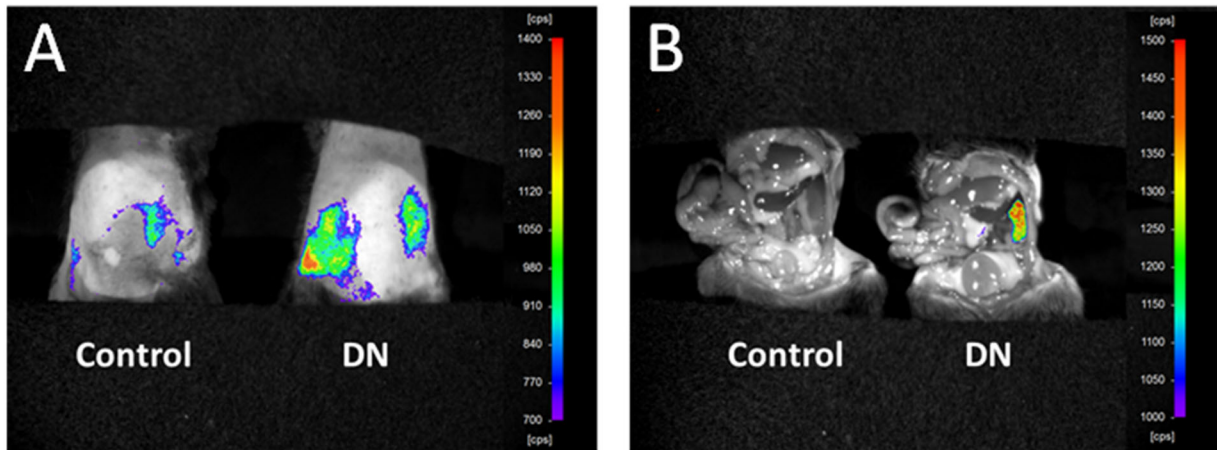


図4. 高脂肪食, および低用量 STZ 投与による糖尿病性腎症の誘導した際の *in vivo* イメージング解析
高脂肪食, および低用量 STZ 投与したマウスにおいて化学発光が観察され, 開腹において腎臓における化学発光を確認した(B)。

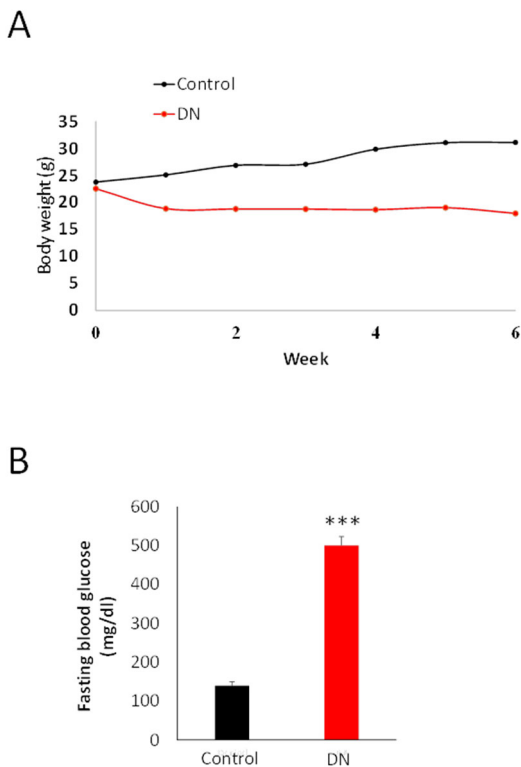


図5. Na 負荷, および低用量 STZ 投与による糖尿病性腎症の誘導

Na 負荷, および低用量 STZ 投与により体重減少, および絶食時の高血糖状態を確認した。

そこで *in vivo* イメージング解析による腎臓の化学発光の観察を行った。その結果, 高脂肪食負荷による腎症と同様に, 背部から腎臓由来の化学発光が検出され

(図 6A), またシグナル強度を photon counts/sec(cps)で定量化したところ, 有意な発現上昇として確認された(図 6C)。さらに, 腎臓由来の化学発光を確認するために, 解剖後腎臓を摘出し, lysis buffer(1% Triton-X 100, 2mM DTT, 10% glycerol, and 25mM Tris-HCl pH 7.5)内でホモジナイズし, 12,000rpm で遠心後, 上清の luciferase 活性をピッカジーキット(東洋インキ製), およびルミノメーター(Turner Model TD-20)によって測定したところ, 有意な発現上昇が認められた(図 6B)。その活性上昇は Na 摂取誘導性の糖尿病性腎症を非侵襲的に観察可能であると考えられた。

Na 摂取誘導性の糖尿病性腎症に対する低タンパク質食の影響

8 週齢雄性 Saa3-luc マウスに STZ を 5 日間腹腔内投与(55 mg/kg)し, STZ 投与後, 1% NaCl を含む高 Na 食, および 0.9% NaCl 水溶液飲水により一か月間飼育を行うことで, 高 Na 負荷時の腎臓病の発症を誘導した。その際には食餌由来タンパク質の摂取量の低下の影響を検討するため, ストレプトゾトシン(STZ)投与後, 標準食(23.84% protein), および低タンパク質食(5.77% protein)により飼育を行い, Na 負荷による糖尿病性腎症を発症させ, 腎臓の化学発光を誘導する。その際, STZ 投与 2 カ月後の血中尿素窒素, およびクレアチニン値の測定との比較解析を行う予定である。

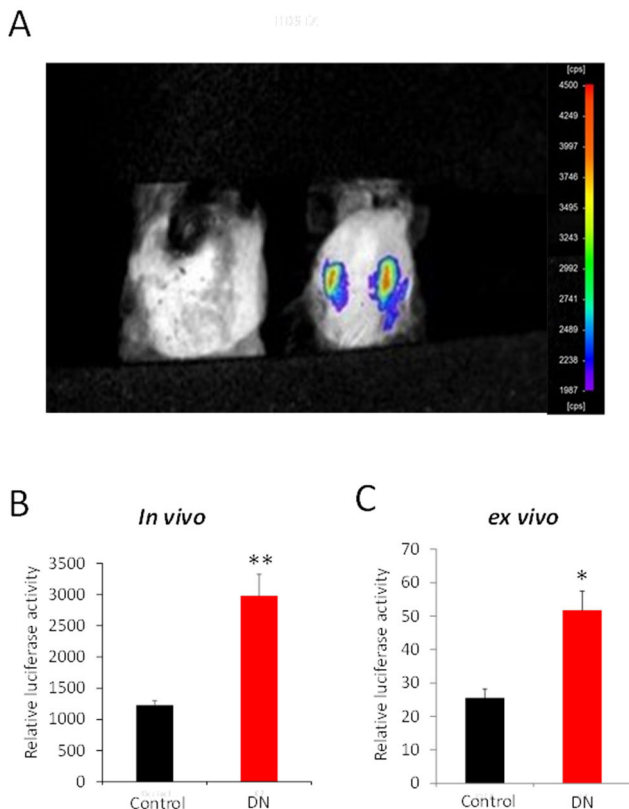


図 6. Na 負荷, および低用量 STZ 投与による糖尿病性腎症を誘導した際の *in vivo* イメージング解析
Na 負荷, および低用量 STZ 投与したマウスにおいて腎臓由来の化学発光が観察された (A)。腎臓を摘出した後, 組織をホモジナイズし, luciferase 活性の有意な上昇が認められた (B)。*in vivo* イメージング解析画像のシグナル強度を photon counts/sec (cps) で定量化したところ, 有意な発現上昇が確認された (C)。

4. 考察

近年, 糖尿病患者数の増加を背景として, 慢性腎臓病の罹患者数は増加が社会的問題となっている。特に糖尿病性腎症においては人工透析への移行率の高さから, 低下した腎機能を回復させる薬剤の開発や食品素材の探索は社会的な関心事である。一方, 動物モデルにおいて腎障害は容易には引き起こされず, 現行での腎機能を評価する診断マーカーとして尿素窒素 (BUN) や creatinine の血中濃度に関しても病態進行による変化は認めづらい。一般に腎臓は大きな予備能力を持っており, 糖尿病でない正常の動物でも 5/6 腎摘の処置においても腎機能は低下せず, 計算上 80% 以上の糸球体の機能の損失で腎機能の低下が認められるとされる。そこで, 高脂肪食負荷な

どの腎傷害を加速化させる必要があり, 多くの研究者が腎臓への負荷を増加させるために片腎を摘出した動物を使用しているのが現状である。

本研究において, 高脂肪食負荷による腎症と同様に Na 摂取誘導性の糖尿病性誘導時に背部から腎臓由来の化学発光が観察され, 特に Na 誘導性の際には有意なシグナル強度の上昇が確認され, 高脂肪食負荷と比較して高血糖状態は大きな差異はないものの, luciferase 活性の上昇は Na 摂取時の方が明瞭であり, Na 摂取に応答する可能性を示唆するとともに, 糖尿病性腎症を非侵襲的に観察可能であると考えられた。以前の研究では, アデニン食を負荷した尿細管障害による腎症においても Saa3-luc マウスの背後からの化学発光の観察によって腎臓における炎症反応, および線維化が可視化される可能性が見出されており, さらに Saa3-luc マウスに片側尿管結紮を実施した際の *in vivo* イメージング解析によっても luciferase 活性の上昇が認められていることから, 尿細管上皮障害が Saa3 遺伝子のプロモーター活性を誘導した可能性が強く示唆されている。本研究においては, Na 負荷による化学発光量の上昇には一部に尿細管上皮障害の関与が考えられた。一方, 腎臓における Saa3 遺伝子のプロモーター活性の上昇は尿細管上皮細胞の障害に基づく転写因子 C/EBP β の関与が示唆⁵⁾されており, 今後は Na 誘導性の糖尿病性腎症の発症時の C/EBP β の発現量の解析が興味深いと考えられた。さらに, 腎炎発症に伴う腎機能改善において低タンパク質食の役割が示されているが, 高 Na 負荷時の腎臓病の発症に対する低タンパク質食摂取の影響についても現在検討を行っており, 非侵襲的な評価を試みる予定である。体外からの継続的な観察, および定量化による Na 感受性の組織障害の評価系としての有用性を明らかにすることは, 動物実験の 3R の実現に対しても大きく貢献するものであり, Saa3 遺伝子プロモーターの活性化を指標とした新規の機能性成分や食環境の探索などに応用されることを将来期待したい。

4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり, 研究助成金を賜りましたソルト・サイエンス研究財団の関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

5. 文献

1. Jenkins, D.E., Hornig, Y.S., Oei, Y., Dusich, J., Purchio, T. (2005) Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *Breast Cancer Res.* 7, R444-R454.
2. Luker, K.E., Luker, G.D. (2010) Bioluminescence imaging of reporter mice for studies of infection and inflammation. *Antiviral Res.* 86, 93-100.
3. Ho, T.Y., Chen, Y.S., Hsiang, C.Y. (2007) Noninvasive nuclear factor-kappaB bioluminescence imaging for the assessment of host-biomaterial interaction in transgenic mice. *Biomaterials* 28, 4370-4377.
4. 真田洋平, 矢中規之.(2017) 肥満の慢性炎症を体外から観察する. *バイオサイエンスとインダストリー*, 75, 235-237.
5. Sanada, Y., Yamamoto, T., Satake, R., Yamashita, A., Kanai, S., Kato, N., van de Loo, F.A., Nishimura, F., Scherer, P.E., Yanaka, N. (2016) Serum amyloid A3 gene expression in adipocytes is an indicator of the interaction with macrophages. *Sci Rep.* 6, 38697
6. Kitada M., Ogura Y., Suzuki T., Monno I., Kanasaki K., Watanabe A., Koya D. (2018) A low-protein diet exerts a beneficial effect on diabetic status and prevents diabetic nephropathy in Wistar fatty rats, an animal model of type 2 diabetes and obesity. *Nutr Metab (Lond).* 15, 203)

Non-Invasive Method for Evaluating Sensitivity to Sodium by Using Mouse Diabetic Kidney Model - Interaction with a Low-Protein Diet

Noriyuki Yanaka

Hiroshima University

Summary

Animal experiments are an essential research method for the evaluation of drug efficacy and food functionality in order to examine the effects *in vivo*. In animal experiments, researchers usually performed biochemical analysis, however, this method can only provide limited information at the end of the experiment. In addition, since the same individual animals cannot be analyzed at a tissue level repeatedly, there will be problems with individual differences in pathology and functionality. *In vivo* imaging, which is a non-invasive observation *in vivo*, has become widely used due to the recent development of imaging technology to observe chemiluminescence and fluorescence *in vivo* from outside the body. By *In vivo* imaging, the effects of drugs and functional foods can be evaluated without a large number of experimental animals. We have previously isolated the serum amyloid A3 (Saa3) gene, whose expression is up-regulated upon macrophage infiltration into white adipose tissue, in order to observe chronic inflammation in white adipose tissue non-invasively by *in vivo* imaging. We then generated a transgenic mouse (Saa3-luc mouse), which have a chimeric gene (luciferase gene) linked to the downstream of the promoter of the Saa3 gene and successfully observed chronic inflammation in white adipose tissue non-invasively by *in vivo* imaging.

On the other hand, the number of patients with chronic kidney disease has been increasing in recent years, and functional foods are needed to restore the decreased kidney functions. The aim of this study is to establish a non-invasive method to evaluate the biological response to early diabetic nephropathy and salt intake by observations of the kidney from outside the body based on luciferase activity. To create a diabetic nephropathy model, Saa3-Luc mice were given a high-fat diet and administered with streptozotocin (STZ), followed by a high-fat diet. As another diabetic nephropathy model, after STZ administration, Saa3-Luc mice were given a high-NaCl diet. In both cases, bioluminescence based on Saa3 promoter activity in Saa3-luc mice were promoted in kidney, showing that Saa3 promoter activity is most likely related to diabetic nephropathy. We are currently analyzing kidney bioluminescence of Saa3-luc mice non-invasively and compared with blood markers, and are testing the effect of a feeding of low-protein or high-protein diet with STZ administration.