

## 糖尿病誘発性慢性腎疾患モデル動物 —尿管障害バイオマーカーによる検討—

保井俊英・花岡智子\*・高田義弘\*\*・竹下大輔\*  
鷺尾弘枝\*\*\*・進藤大典\*\*\*\*・中谷昭\*\*\*\*\*・坂田進\*\*\*\*\*  
(武庫川女子大学健康・スポーツ科学部健康・スポーツ科学科・\*畿央大学大学院健康科学研究科  
\*\*神戸大学大学院人間発達環境学研究科人間発達専攻からだ系講座  
\*\*\*関西国際大学保健医療学部看護学科・\*\*\*\*日本大学薬学部健康・スポーツ科学研究室  
\*\*\*\*\*関西福祉大学教育学部保健教育学科・\*\*\*\*\*奈良県立医科大学医学部第1生理学教室)

## An animal model of diabetes-induced chronic kidney disease —Study with special reference to tubule injury biomarkers—

Toshihide YASUI, Tomoko HANAOKA\*, Yoshihiro TAKADA\*\*, Daisuke TAKESHITA\*,  
Hiroe WASHIO\*\*\*, Daisuke SHINDO\*\*\*\*, Akira NAKATANI\*\*\*\*\*  
and Susumu SAKATA\*\*\*\*\*

*Mukogawa Women's University, \*Kio University, \*\*Kobe University,  
\*\*\*Kansai University of International Studies, \*\*\*\*Nihon University,  
\*\*\*\*\*Kansai University of Social Welfare, \*\*\*\*\*Nara Medical University*

### Abstract

Diabetes-induced chronic kidney disease (DCKD) is a serious health problem. Therefore, modalities for preventing/improving DCKD are required. The aim of this study was to establish an animal model of DCKD. Four five-week-old male OLETF and LETO rats were used as experimental and control animals, respectively. After both rats were raised 17 months, collections of urine, blood and bilateral kidneys were performed. Urinary biomarkers for renal proximal tubule injury, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and kidney injury molecule-1 (KIM-1), were measured by the Bio-Plex system. OLETF rats showed a significant increase in blood glucose, Hb A<sub>1c</sub>, creatinine, blood urea nitrogen (BUN), kidney/body weight ratio, glomerular area, 24 h-urine volume, urinary protein concentrations, MCP-1 and KIM-1 compared with LETO rats. There was a positive correlation not only between BUN and MCP-1 or KIM-1 but also between urinary protein concentrations and MCP-1 or KIM-1. These results indicate that the present OLETF rats have both glomerular and proximal tubular injury. Thus, the aged male OLETF rats with long-term diabetes may become a potent animal model for examining effects of exercise/dietary therapies on DCKD.

### 1 はじめに

糖尿病は、自覚症状に乏しい病気であり、一度発症すると治癒することなく、そのまま放置し続けると網膜症、腎障害、神経障害など合併症を引き起こす。中でも糖尿病性腎症は、糖尿病の中でも最大の疾患であり、医学的にも社会的にも重要な課題といえる。糖尿病性腎症による蛋白尿が続くと、慢性腎疾患になると考えられる<sup>1),2)</sup>。超高齢化社会に入り糖尿病に起因する慢性腎疾患の高齢者患者が増加している現状を鑑みると、糖尿病誘発性慢性腎疾患高齢者に対して運動療法や食事療法が改善・予防効果を有するのか、を調べるのが今後の重要課題となる。この課題に取り組むに当たり、慢性腎疾患の糖

尿病モデル動物の確立が不可欠であると考えられる。

そこで、糖尿病誘発性慢性腎疾患のモデル動物を確立するために、多くの糖尿病モデル動物の中から、我々は Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットを用いて検討した。これまで、この OLETF ラットの糖尿病発症初期において、薬物療法と共に運動療法および食事療法による糖尿病の発症抑制効果や病態改善効果が研究された。この OLETF ラットは、24 週齢前後で糖尿病を発症する 2 型糖尿病モデルラットである<sup>3)</sup>。その特徴としては、多飲、多食、肥満、尿糖がみられる。また、糖尿病性腎症の初期発症過程において、グルコースコース刺激によりメサングウム細胞の cytosolic phospholipase A2 が活性化され、血管拡張性 prostaglandin (PG) 産生を介して糸球体過剰濾過が引き起こされることが報告された<sup>4)</sup>。実際に、14 週齢以降の OLETF ラットにおいて、thromboxane A2 (TXA2) と PG I2 の尿中排泄量が増加し、30 週齢以降で糸球体過剰濾過により尿中蛋白量が増大した<sup>5)</sup>。この OLETF ラットにおいて、糖尿病が発症する時期に当たる 22 ~ 31 週齢の 10 週間の自発的運動あるいは食事療法により糖尿病性腎症の発症・進展が抑制されることが証明された<sup>6),7)</sup>。このように、糖尿病の初期段階での腎症の発症抑制に対して、運動療法と食事療法は有効な治療法であると考えられる。しかし、これまで、糖尿病が進行した末期段階での慢性腎疾患の改善に対して、運動療法あるいは食事療法が有効であるかどうか、を検討した研究はない。

今回、慢性腎疾患の病態モデル動物を作製するにあたり、OLETF ラットを 75 週齢まで飼育した。シスプラチンにより誘発される尿細管障害に対し、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)<sup>8)</sup> と kidney injury molecule-1 (KIM-1)<sup>9)</sup> は高感度な腎障害バイオマーカーであると報告されたので<sup>10)</sup>、尿細管障害を検討するに当たり、これら 2 種の腎障害バイオマーカーを使用した。この研究の目的は、長期間飼育 OLETF 雄ラットが、糖尿病誘発性慢性腎疾患の病態モデル動物として適しているかを調べることであった。

## II 方法

本研究は、畿央大学動物実験委員会の承認後、動物実験管理規定及び NIH 動物実験ガイドラインに従って行われた。

### A 動物

5 週齢の雄 OLETF ラット 4 匹を水・餌の自由摂取で 70 週間飼育した (OLETF 群)。また、その対照群として、Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラット 5 週齢の雄 4 匹を、OLETF ラットと同様の条件で水・餌の自由摂取で飼育した (LETO 群)。なお、OLETF ラットは、LETO ラットから作製され確立されたラットである<sup>3)</sup>。70 週間の飼育期間において、両群とも運動療法及び食事療法を受けなかった。3R の原則 (reduction, replacement, refinement) に基づいて、各群の個体数を 4 匹とした。

### B 測定

飼育 68-69 週目でメタボリックケージ (テクニプラスト・ジャパン社) にて 1 日尿量を測定した。また、尿中蛋白濃度を測定した。さらに、Bio-Plex array system (バイオラッド社) にて、近位尿細管障害のバイオマーカーである MCP-1<sup>8)</sup> と KIM-1<sup>9)</sup> の尿中濃度を測定し、1 日尿中排泄量として表した。70 週間の飼育終了後、体重を測定した。5 ~ 6 時間の絶食後、麻酔をかけ、左心室より採血し、血糖値、Hb A1c、総コレステロール、トリグリセリド、クレアチニン、尿素窒素を測定した。さらに、腎の組織学的分析を行った。腎重量を測定した後、腎切片を PAM 染色し、糸球体面積を測定した。

### C 統計

OLETF 群と LETO 群の 2 群間の有意差判定には、Student test を用いた。P < 0.05 を有意差ありと判定した。

### III 結果

#### A 体重及び血液生化学成分

Table 1 に体重及び血液生化学成分を示す。体重については、OLETF 群と LETO 群の間に有意な差が認められなかった。一方、血糖値、Hb A<sub>1c</sub>、総コレステロール、トリグリセリド、クレアチニン、尿素窒素については、OLETF 群は LETO 群に比し有意に高値を示した。OLETF 群での総コレステロールとトリグリセリドの高い値は、過食によると考えられる。実際、64 週齢において、この OLETF 群は LETO 群より 1.6 倍量の餌を摂取した。

Table 1 Body weight and hematological data

	LETO	OLETF
BW (g)	581.6 ± 12.6	518.8 ± 71.5
BG (mg/dL)	72.3 ± 12.5	229.3 ± 104.5*
Hb A <sub>1c</sub> (%)	5.0 ± 0.1	7.4 ± 0.1*
T-CHO (mg/dL)	123.0 ± 5.5	258.3 ± 10.7*
TG (mg/dL)	68.0 ± 25.5	252.5 ± 40.5*
CRE (mg/dL)	0.55 ± 0.02	2.44 ± 1.3*
BUN (mg/dL)	30.3 ± 1.1	100.0 ± 57.4*

Values are expressed as mean ± SD. \*P<0.05 vs LETO rats. BW, body weight; BG, blood glucose; Hb A<sub>1c</sub>, hemoglobin A<sub>1c</sub>; T-CHO, total cholesterol; TG, triglyceride; CRE, creatinine; BUN, blood urea nitrogen.

#### B 1 日尿量及び尿中蛋白濃度

Fig. 1 は、1 日尿量と尿中蛋白濃度を示す。1 日尿量及び尿中蛋白濃度ともに、OLETF 群は LETO 群に比し有意に高値を示した。

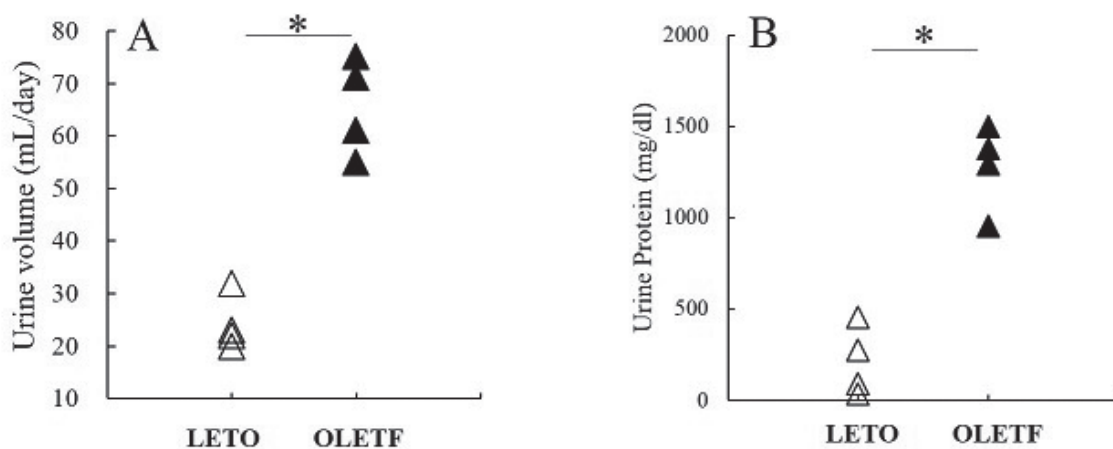


Fig. 1 Urine volume (A) and urinary protein concentration (B) in LETO ( $\Delta$ ) and OLETF ( $\blacktriangle$ ) rats. Each symbol represents individual value. \*P<0.05.

### C MCP-1 及び KIM-1

近位尿細管障害バイオマーカーである MCP-1 及び KIM-1 の 1 日尿中排泄量について、OLETF 群は LETO 群に比し有意に高値を示した(Fig. 2)。OLETF 群の MCP-1 と KIM-1 に見られる大きな個体差は、血糖値の大きな個体差(Table 1)を反映していると考えられ、近位尿細管障害に大きな個体差があることを示す。

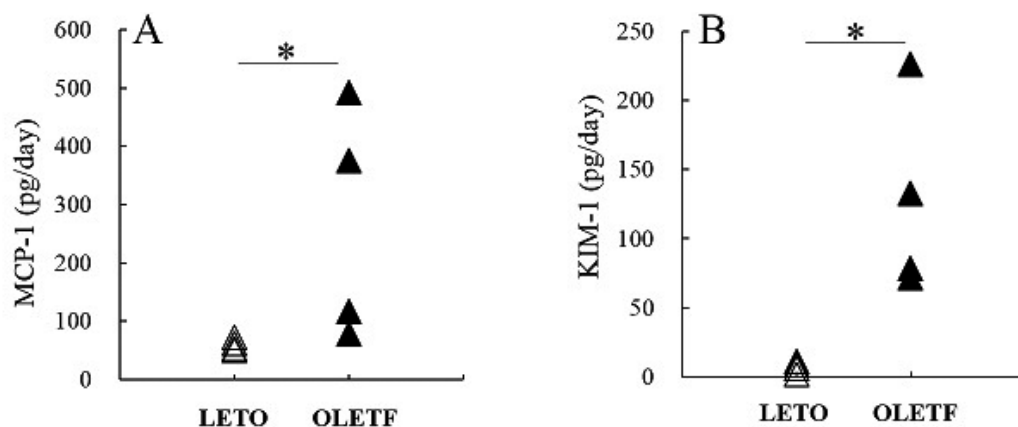


Fig. 2 Urinary MCP-1 (A) and KIM-1 (B) excretion in LETO ( $\Delta$ ) and OLETF ( $\blacktriangle$ ) rats. Each symbol represents individual value. MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; KIM-1, kidney injury molecule-1. \* $P < 0.05$ .

### D 尿素窒素と MCP-1 あるいは KIM-1 の相関及び尿中蛋白濃度と MCP-1 あるいは KIM-1 の相関

Fig. 3 は、尿素窒素と MCP-1 あるいは KIM-1 の相関を示す。いずれも高い正相関が見られた。同様に、尿中蛋白濃度と MCP-1 あるいは KIM-1 の間にも高い正相関があった(Fig. 4)。

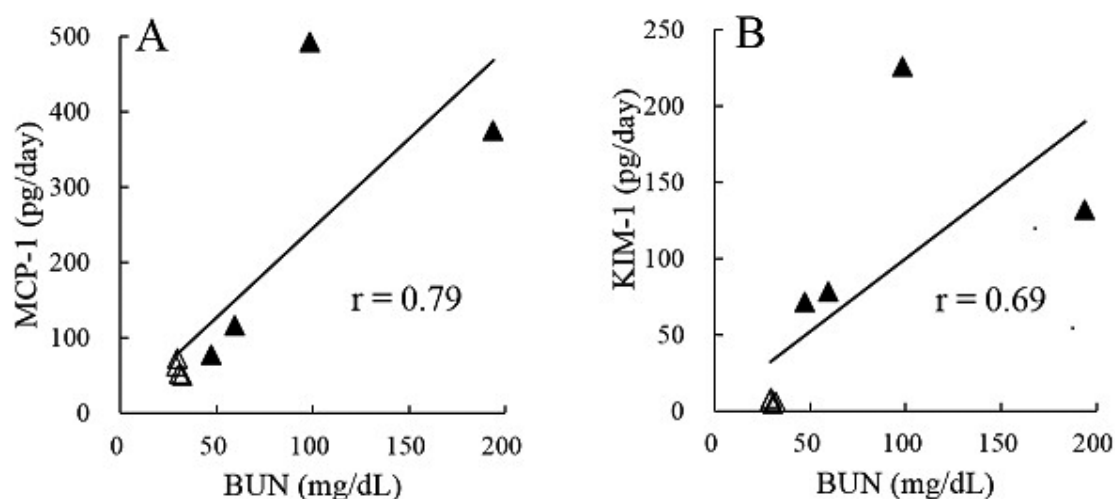


Fig. 3 Correlation between BUN and urinary MCP-1 (A) or KIM-1 (B) excretion.  $\Delta$ , LETO;  $\blacktriangle$ , OLETF rats. Each symbol represents individual value. BUN, blood urea nitrogen; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; KIM-1, kidney injury molecule-1.

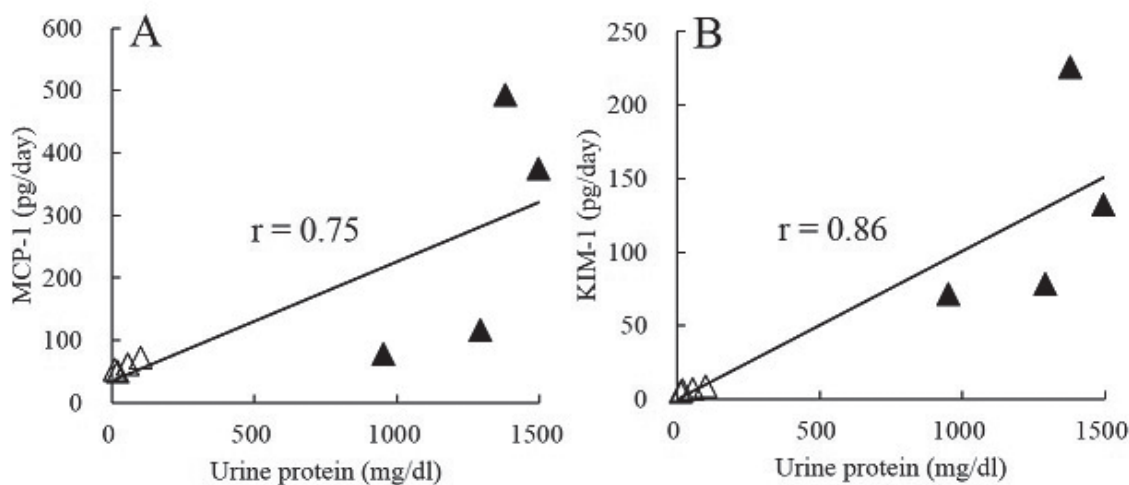


Fig. 4 Correlation between urinary protein concentration and urinary MCP-1 (A) or KIM-1 (B) excretion.  $\Delta$ , LETO;  $\blacktriangle$ , OLETF rats. Each symbol represents individual value. MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; KIM-1, kidney injury molecule-1.

E 組織学的分析

Fig.5 は、腎重量/体重比と糸球体面積を示す。腎重量/体重比及び糸球体面積ともに、OLETF 群は LETO 群に比し有意に高値を示した。

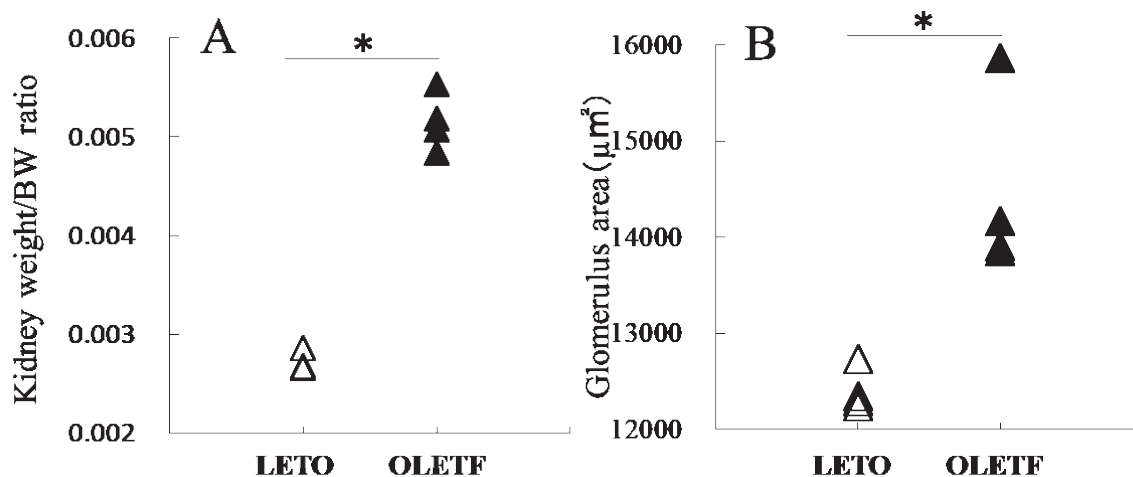


Fig. 5 Kidney weight/body weight (BW) ratio (A) and glomerular area (B) in LETO ( $\Delta$ ) and OLETF ( $\blacktriangle$ ) rats. Each symbol represents individual value. \* $P < 0.05$ .

## IV 考察

OETF 雄ラットの1日尿蛋白量は、30週齢で顕著に上昇し、50週齢以降に800mg/dayに達したと報告された<sup>11)</sup>。この結果は、本研究での75週齢OETF群の1日尿蛋白量の平均値が833mg/dayであることと一致した。一方、70週齢のOETF雄ラットの腎糸球体において、メサンギウムの増殖と糸球体基底膜の肥厚により糸球体が肥大し、糸球体硬化症と結節病変が認められると報告された<sup>3),11)</sup>。さらに、一部の委縮した尿細管の周囲には、マクロファージの浸潤と線維形成が認められたと報告された<sup>3)</sup>。本研究でのOETF群は、高いクレアチニン値・尿素窒素に加えて、1日尿量と尿中蛋白濃度の増加を示した。さらに、組織学的分析は、腎重量増大と糸球体面積増加を示した。これらの腎組織病変の所見を踏まえて、明らかに腎糸球体病変を呈していると考えられる。さらに、OETF群において、2種の近位尿細管障害バイオマーカー(MCP-1とKIM-1)の1日尿中排泄量が、LETO群に比し有意に増加したので、近位尿細管障害も患っていることが判明した。

本研究でも示されるように、糖尿病性腎症での糸球体病変が進行すると、多量の蛋白が尿中に排泄される。糖尿病性腎症の初期発症過程において、PGsやTXA2の増加により糸球体の過剰濾過が生じ、尿中蛋白量が増加すると考えられる<sup>4),5)</sup>。この蛋白尿が長期間に亘ると、尿細管障害と間質の線維化が起こり、慢性腎不全に至ることが知られている<sup>12)</sup>。臨床研究において、尿細管障害が尿蛋白量と関係することが報告された<sup>1),2)</sup>。一方、培養近位尿細管細胞において、アルブミンによりMCP-1遺伝子の発現が誘導され<sup>13)</sup>、さらにアルブミンにより培養近位尿細管細胞から様々な炎症性サイトカイン(MCP-1<sup>13)</sup>, RANTES<sup>14)</sup>, interleukin-8<sup>15)</sup>, tumor necrosis factor- $\alpha$ <sup>16)</sup>)が放出され、近位尿細管細胞のアポトーシスが惹起されることが報告された。また、糸球体から漏出した様々な蛋白質は、エンドサイトーシスに関わるレセプターであるmegalinを介して近位尿細管細胞に再吸収され、近位尿細管障害を引き起こすことが報告された<sup>17)</sup>。さらに、慢性的なKIM-1発現が、MCP-1発現の亢進を伴って、腎線維化を促進することが報告された<sup>12)</sup>。本研究において、多量の蛋白尿を排泄するOETF群は、高いレベルのMCP-1とKIM-1を示し、明らかに近位尿細管が障害されていると考えられる。また、これら2つの近位尿細管障害バイオマーカーは、血液尿素窒素および尿中蛋白濃度と正相関を示した。後者の正相関は、上記の報告内容と一致して、近位尿細管障害が尿中蛋白濃度に依存して引き起こされることを示唆する。

## V 結論

約1年間にわたって糖尿病を患う高齢OETF雄ラットは、糸球体病変に加えて近位尿細管障害を受けており、糖尿病誘発性慢性腎疾患の病態モデル動物として適していることが判明した。将来、このOETF雄ラットは、糖尿病誘発性慢性腎疾患患者に対する運動療法あるいは食事療法による予防・改善効果を調べる基礎研究に貢献できると期待される。

## 謝 辞

ラットからの尿採取法をご指導くださいました東京慈恵会医科大学の鈴木政登先生に深謝申し上げます。

## VI 引用文献

- 1) Abbate M, Zoja C and Remuzzi G: How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol* 17: 2974-2984 (2006) .
- 2) Ruggenenti P, Perna A and Remuzzi G: Retarding progression of chronic renal disease: The neglected issue of residual proteinuria. *Kidney Int* 63: 2254-2261 (2003) .

- 3) Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M and Natori T: Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat. *Diabetes* 41: 1422-1428 (1992) .
- 4) Furuya Y, Tagami S, Hasegawa A, Ishii J, Hirokawa J, Yoshimura H, Honda T, Sakaue S, Aoki K, Murakami M, Kudo I and Kawakami Y: Increased glomerular cytosolic phospholipase A2 activity of OLETF rats with early diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:299-305 (1999) .
- 5) Okumura M, Imanishi M, Yamashita T, Yamamura Y, Kim S, Iwao E, Tanaka S and Fujii S: Renal production of thromboxane and prostaglandins in a rat model of type 2 diabetes. *Life Sci* 66:371-377 (2000) .
- 6) Suzuki M, Hodumi N, Kimura M, Nakaya M, Shimizu T, Anai H, Takao T, Magara T, Mori Y and Machida K: Effects of exercise and dietary therapies on renal function and morphological findings in the kidney and glucose-fatty metabolism in OLETF rats. Use of OLETF rats as a model of type II diabetes mellitus. *Jpn J Phys Fitness Sports Med* 49: 403-417 (2000) .
- 7) Suzuki M, Shindo D, Suzuki R, Shirataki Y and Waki H: Combined long-term caffeine intake and exercise inhibits the development of diabetic nephropathy in OLETF rats. *J Appl Physiol* 122: 1321-1328 (2017) .
- 8) Ota T, Tamura M, Osajima A, Doi Y, Kudo H, Anai H, Miyazaki M, Nishino T and Nakashima Y: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubular epithelial cells in a rat model of progressive kidney failure. *J Lab Clin Med* 140: 43-51 (2002) .
- 9) Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R and Bonventre JV: Kidney injury molecule-1 (KIM-1) : A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 62: 237-244 (2002) .
- 10) Nishihara K, Masuda S, Shinke H, Ozawa A, Ichimura T, Yonezawa A and Nakagawa S: Urinary chemokine (C-C motif) ligand 2 (monocyte chemoattractant protein-1) as a tubular injury marker for early detection of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 85: 570-582 (2013) .
- 11) Kawano K, Hirashima T, Mori S and Natori T: OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rat: a new NIDDM rat strain. *Diabetes Res Clin Pract* 24 Suppl: S317-S320 (1994) .
- 12) Humphreys BD, Xu F, Sabbiseti V, Grgic I, Naini SM, Wang N, Chen G, Xiao S, Patel D, Henderson JM, Ichimura T, Mou S, Soeung S, McMahon AP, Kuchroo VK and Bonventre JV: Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. *J Clin Invest* 123: 4023-4035 (2013) .
- 13) Wang Y, Rangan GK, Tay Y-C, Wang Y and Harris DCH: Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by albumin is mediated by nuclear factor  $\kappa$ B in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 10: 1204-1213 (1999) .
- 14) Zoja C, Donadelli R, Colleoni S, Figliuzzi M, Bonazzola S, Morigi M and Remuzzi G: Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF- $\kappa$ B activation. *Kidney Int* 53:1608-1615 (1998) .
- 15) Tang S, Leung JCK, Abe K, Chan KW, Chan LYY, Chan TM and Lai KN.: Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 111:515-527 (2003) .
- 16) Drumm K, Bauer B, Freudinger R and Gekle M: Albumin induces NF- $\kappa$ B expression in human proximal tubule-derived cells (IHKE-1) . *Cell Physiol Biochem* 12:187-196 (2002) .
- 17) Motoyoshi Y, Matsusaka T, Saito A, Pastan I, Willnow TE, Mizutani S and Ichikawa I: Megalin contributes to the early injury of proximal tubule cells during nonselective proteinuria. *Kidney Int* 74: 1262-1269 (2008) .

受理日 2020年12月22日