

令和元年6月18日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08931

研究課題名(和文)新規腎疾患マーカーとしての血中・尿中アンジオポエチン様蛋白4の解析と治療薬の探索

研究課題名(英文) Analyses of angiopoietin-like protein 4 status in blood and urine as a novel marker of kidney diseases

研究代表者

鳥居 国雄 (Torii, Kunio)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・主任臨床検査技師

研究者番号：40534045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アンジオポエチン様蛋白4 (Angptl4)は筋組織由来の分泌蛋白で、糸球体に沈着して蛋白尿を減少させる可能性がある。腎でのその発現動態は病態把握に有用であるが不明であった。本研究では、腎固有細胞の飢餓・低酸素状態でAngptl4発現が誘導された。ペロキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)- $\alpha$ の活性化もAngptl4の発現を著明に増強させた。マウス実験でも飢餓がAngptl4発現を増強し、PPAR- $\alpha$ は定常状態、傷害時の発現誘導に関与した。健康者(85例)の血清Angptl4値は中性脂肪と負相関した。腎疾患群(n=78)間で血中・尿中Angptl4値は有意な差を示さなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病患者は1000万人を超え、透析患者も33万人を超えて、その医療費は2兆円に達する状態であり、慢性腎疾患の新たな病態把握と治療開発が重要課題である。Angptl4は蛋白尿を軽減し腎疾患の治療につながる候補蛋白であるが、腎臓でのAngptl4発現動態は不明であった。本研究では、腎細胞ならびに腎組織のAngptl4発現は飢餓やPPAR- $\alpha$ (脂肪酸代謝に関与する調節因子)によって著明に誘導されることが判明し、血清と尿中Angptl4は安定して測定できた。予備的解析では腎疾患群間でのAngptl4値の有意差は確認できなかったが、臨床情報を加えた詳細な解析により臨床的意義を検出できると考える。

研究成果の概要(英文)：Angiopoietin-like protein 4 (Angptl4) is a bioactive protein secreted from muscle tissues and may reduce urinary protein amounts via its deposition into glomerular membranes. Although its expression status in kidney tissues is informative for understanding renal pathologic conditions, it has so far remained to be clarified. In this study, Angptl4 expression was upregulated in renal resident cells during starvation or hypoxia. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\alpha$  activation also markedly increased Angptl4 expression. In mice experiments, starvation induced Angptl4 expression, and PPAR- $\alpha$  appeared to be positively associated with the expression at basal or injured conditions. As for clinical examinations, serum Angptl4 levels were independently and negatively related to serum triglyceride levels in apparently healthy subjects (n=85). Angptl4 levels in serum and urine appeared not to significantly differ in different kidney diseases including MCNS, FSGS and MN (N=78).

研究分野：臨床検査医学

キーワード：アンジオポエチン様蛋白4 糸球体上皮細胞 近位尿細管上皮 PPAR- $\alpha$  PPAR- $\beta$  飢餓状態 低酸素腎疾患

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 基礎実験的には、アンジオテンシン様蛋白 4 (Angpt14) は血管新生作用だけでなく、血中尿酸の抑制を介して脂肪酸毒性・炎症を抑制し、皮膚創傷治癒も促進する多機能の分泌蛋白である。Angpt14 は主として、筋組織で発現しており、シアル化が高度の陰性荷電が強い Angpt14 が産生される。この筋組織由来の Angpt14 は、腎障害マウスでは、糸球体血管壁に沈着して陰性バリア作用を増強し、蛋白尿を減少させる蛋白として注目されている (Nature Med 2011, 2014)。

(2) 腎障害マウスの糸球体上皮細胞では、低シアル化で陽性荷電に傾いた Angpt14 が産生され蛋白尿を増加させる可能性があり、アイソフォーム特異的作用が推測される。Angpt14 は低酸素で誘導され、脂肪酸で活性化するペルオキシシーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) によっても Angpt14 の発現が増強するとの報告がある。

しかし、正常と病的状態の腎固有細胞ならびに腎組織での発現動態の詳細は不明である。さらに、健常者ならびに腎疾患を含む臨床患者の血中・尿中データは極めて僅かである。Angpt14 の基準値、臨床規定因子、治療前後の腎疾患で血中・尿中 Angpt14 の変動を詳細に解析した研究報告もない。

## 2. 研究の目的

- (1) 培養各種腎固有細胞で Angpt14 の発現動態を解析し、その発現誘導因子を探索する。
- (2) 飢餓、腎障害マウスで Angpt14 の発現動態を解析し、発現誘導因子を探索する。
- (3) 健常者における血中、尿中 Angpt14 の基準値を設定し、その臨床規定因子を明らかにする。
- (4) 各種腎疾患の蛋白尿患者で血中・尿中 Angpt14 値と eGFR、蛋白尿の関連性を腎疾患別、治療経過別に解析することで腎疾患での血中・尿中 Angpt14 値の臨床的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) マウス糸球体上皮 (mPod)・尿細管細胞 (mProx)、ヒト近位尿細管上皮細胞 (HPTEC, 米国製品) を用いた培養細胞：
  - ・薬刺激実験：PPAR- 活性化薬 (フェノフィブラート; 5-10  $\mu$ M)、活性化薬 (GW0742; 1-10  $\mu$ M)、活性化薬 (ヒポクリチン; 1-3  $\mu$ M)、スタチン (ヒトシタスタチン 1-10  $\mu$ M) で 24 時間刺激し、Angpt14 mRNA と蛋白 (ELISA) の発現を解析する。
  - ・病態類似刺激実験：各細胞に飢餓 (HBSS, アミノ酸非含有培地)、低酸素 (1%O<sub>2</sub>)、高血糖 (25mM)、TNF- $\alpha$  (1-10ng/ml) 刺激を 6-24 時間加えて Angpt14 発現を解析する。
- (2) S129 マウスと PPAR- 欠損マウスを用いた動物実験：
  - ・24 時間の飽食状態、飢餓状態での Angpt14 発現を解析する。
  - ・糸球体障害を誘導するドキシソルピシンの投与 9 日後での Angpt14 発現を解析する。
- (3) 健常者での Angpt14 測定：

健常者 (約 200 例) における血中・尿中 Angpt14 の基準値を設定し、臨床規定因子を明らかにする。まず、健常者で年齢、性別、腎機能、脂質値を含む生化学検査値との相関性の有無を検討する。Angpt14 測定は ELISA キット (Human ANGPTL4 Assay ELISA Kit) を用いた。
- (4) 各種腎疾患での Angpt14 測定：

各種腎疾患で血中・尿中 Angpt14 値と eGFR、蛋白尿、脂質の関連性を腎疾患別、治療経過別に解析することにより、蛋白尿患者での Angpt14 値の臨床的意義を明らかにする。また、腎不全患者 (約 200 例) の血中 Angpt14 値でも同様に臨床規定因子を解析する。

## 4. 研究成果

- (1) 各種培養細胞での Angpt14 発現解析：

各種腎固有細胞での Angpt14 発現の動態を解析するために、上記で述べたようにマウス糸球体上皮 (mPod)・尿細管細胞 (mProx)、ヒト近位尿細管上皮細胞 (HPTEC) を用いた。

### mPod の培養実験

PPAR- の活性化薬 (GW516) と飢餓状態で Angpt14 発現が増強した。Angpt14 発現は、24 時間の GW516 (1  $\mu$ M) 刺激で 10-11 倍に増加し、HBSS 培地での 6 時間培養後、4.7 倍に増加した。PPAR- 活性化薬 (フェノフィブラート; FF) での 6 時間刺激では Angpt14 発現は軽度増加 (1.8 倍) し、24 時間後には逆に 0.6 倍に低下した。飢餓 (HBSS 培地での培養; 6 時間) と FF の併用ではその発現は 6 時間で 0.4 倍へ低下した。糸球体障害モデルのドキシソルピシン (1  $\mu$ g/mL) 障害では、Angpt14 発現は 0.1 倍に低下し、FF の併用でさらに 0.05 倍に低下した。

### mProx の培養実験

PPAR- の活性化薬である GW0742 (0.01-10  $\mu$ M) と GW516 (0.1-5  $\mu$ M) は Angpt14 発現を著明に増強 (35-75 倍) し、GW0742 (0.01  $\mu$ M) の 35 倍増強は GSK0660 (1  $\mu$ M) で 90% 抑制された。また、siRNA による PPAR- の 80% 抑制でも Angpt14 発現が 80% 抑制された。これらより、

Angpt14 発現は PPAR- 依存性であることが判明した。FF の 6 時間刺激と飢餓培養 6 時間では、Angpt14 発現は 2 倍程度増加したが、両者同時の刺激では発現が 50%減少した。24 時間のシスプラチン(25 μM)刺激では、Angpt14 発現が 4-6 倍増加し、GW0742(1 μM)はこれを約 4 倍に増強し、FF は 1/20 に減弱した。また、ヒト肝型脂肪酸結合蛋白発現の mProx では mProx に比して、GW516(1 μM)による Angpt14 発現増加が約 10 倍高度であった。

#### ヒト近位尿管上皮細

GW516(PPAR- 活性化薬, 1 μM)の 24 時間刺激で Angpt14 発現は 16 倍増強し、この発現増強は PPAR- 特異的阻害薬 GSK0660(1 μM)で 30%抑制され、PPAR- 依存性と考えられた。弱い PPAR- 活性化薬と考えられるテルミサルタン(10 μM)では Angpt14 発現は 1.6 倍増加した。また、24 時間の低酸素(1%O<sub>2</sub>)状態で Angpt14 発現が 9 倍増加し、24 時間の TNF-(10ng/mL)刺激では、発現が 40%減少した。

#### (2) マウス組織での Angpt14 発現解析実験 :

S129 マウスと PPAR- 欠損マウスを用いた 24 時間の飽食状態、飢餓状態での Angpt14 発現を解析した。飽食状態では S129 マウスに比して PPAR- 欠損マウスで、腎組織と肝組織において Angpt14 発現が 80%減少していた。しかし、飢餓状態では飽食状態に比して両マウスで腎組織では 9 倍に、肝組織では 5 倍に Angpt14 発現が増強していた。また、糸球体障害を誘導するドキシソルピシン(DOX)の投与 9 日後での腎組織における Angpt14 発現は、S129 の無処置を対照とすると S129 の DOX 単独で 3.6 倍、PPAR- 欠損マウスの DOX 単独で 0.8 倍であった。

以上の結果から、in-vivo では PPAR- は飽食状態(基底状態)と傷害誘導性の Angpt14 発現に有意に関与し、飢餓状態での発現増強は非 PPAR- 経路が関与していると推察した。

#### (3) 健常者での Angpt14 測定

健常者(85 例)では、血清 Angpt14 値の中央値が 95.0 pg/mL で、95%信頼区間は 13.3-1279.8 pg/mL であった。血清 Angpt14 値は性差なく、年齢と負相関の傾向、アルブミンと直接ビリルビンとは正相関の傾向を示し、中性脂肪とは有意な負相関を示した。重回帰分析では中性脂肪が Angpt14 の負の独立規定因子であった。既報では Angpt14 は中性脂肪とは正相関することが示されており、追加の解析が必要と考えられた。

#### (4) 各種腎疾患での Angpt14 測定

陰性バリア障害の微小変化型「*no-se'* 症候群 10 例、血管壁障害が存在する増殖性腎炎 37 例、膜性腎症 12 例、巣状糸球体硬化症 6 例、糖尿病性腎症 13 例で、治療前の血清、尿で Angpt14 を測定した。血清値、尿値ともに疾患群間で有意差を認めず、尿値は尿蛋白と正相関の傾向を認めしたが、さらなる詳細な検討が必要であった。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

(1) Hideki Kimura (16 人中 11 番目) , 岩野正之 (16 人中 16 番目) : Elevated Levels of Urinary Extracellular Vesicle Fibroblast-Specific Protein 1 in Patients with Active Crescentic Glomerulonephritis. *Nephron*. 2019; 12:1-11. doi: 10.1159/000495217. 査読有

(2) Hideki Kimura (8 人中 6 番目) , 岩野正之 (8 人中 8 番目) : Short-chain fatty acid, propionate, enhances the cytotoxic effect of cisplatin by modulating GPR41 signaling pathways in HepG2 cells. *Oncotarget* 2018; 9(59):31342-31354.

DOI:10.18632/oncotarget.25809 査読有

(3) 木村 秀樹 : 慢性腎不全 検査と技術 2018 年、46 巻 11 号、p1261-1268. 査読無

(4) 木村 秀樹 (3 人中 1 番目) : クレアチニンの eGFR とシスタチン C の eGFR 臨床病理 2018 年、66 巻 10 号、1096-1101. 査読有

(5) 木村 秀樹 (8 人中 8 番目) : 高感度トロポニン 測定の基礎的検討と維持血液透析患者血清における臨床的意義の解析 臨床病理 2018 年、66 巻 7 号、p721-726. 査読有

(6) 木村 秀樹、鳥居 国雄 : 総説 ペルオキシゾーム増殖薬活性化受容体と腎疾患 日本臨床検査自動化学会雑誌 2018 年 43 巻 2 号、p131-137. 査読有

(7) Hideki Kimura (29 人中 20 番目) , Iwano Masayuki (29 人中 29 番目) : Tubulointerstitial Nephritis with IgM-Positive Plasma Cells. *J Am Soc Nephrol*. 2017, 28(12):3688-3698. DOI:10.1681. 査読有

(8) Kimura Hideki (10 人中 3 番目) , Iwano Masayuki (10 人中 10 番目) : Short-chain fatty acids, GPR41 and GPR43 ligands, inhibit TNF- $\alpha$ -induced MCP-1 expression by modulating p38 and JNK signaling pathways in human renal cortical epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017, 486(2) 499-505. DOI:10.1016 査読有

(9) 鳥居 国雄、木村 秀樹 (10 人中 10 番目) : 自動血球分析装置セルダインサファイアを用いた好中球 CD 6 4 分子発現量の測定 日本検査血液学会雑誌 2017 年 18 巻 2 号 p233-239.

査読有

(10) 木村 秀樹 : 臨床検査の最新知見 内科的腎疾患におけるバイオマーカーの最近の知見

臨床病理 2017年6巻10号 p1098-1106. 査読無

(11) 木村 秀樹: CKDの臨床 臨床検査 2016年60巻6号 p628-632. 査読無

[学会発表](計6件)

(1)鳥居 国男(9人中6番目)、木村 秀樹(9人中9番目):ジクロロ酢酸はミトコンドリア保護とCaspase8経路を介してシスプラチン腎障害を軽減する. 第58回日本臨床検査医学会 東海北陸支部総会 2019年03月

(2)鳥居 国雄(7人中2番目)、岩野 正之、木村 秀樹:尿中NGAL測定試薬「アーキテクト・U-NGAL」の基礎的検討. 日本臨床検査自動化学会第50回大会 2018年10月

(3)鳥居 国雄(10人中6番目)、岩野 正之、木村 秀樹:血液培養陽性患者を対象としたブレセプシンの測定について. 第43回北陸臨床病理集談会 2018年09月

(4)旭 ななえ、鳥居 国雄、岩野 正之、宮崎 良一、木村 秀樹:血液透析患者における高感度トロポニン の臨床的意義の解析. 第61回日本腎臓学会学術総会 2018年6月

(5)鳥居 国雄、岩野 正之(8人中7番目)、木村 秀樹(8人中8番目):ラテックス免疫比濁法を測定原理としたsIL-2R測定試薬ナノピア IL-2Rの検討. 日本臨床検査自動化学会第49回大会 2017年09月

(6)旭 ななえ、鳥居 国雄、敦賀 佳奈子、新免 望、杉本 英弘、岩野 正之、木村 秀樹:改良PIVKA- 測定試薬「ルミパルス PIVKA -N エーザイ」の基礎性能評価. 日本臨床検査自動化学会第49回大会 2017年09月

[その他]

ホームページ等

福井大学研究者総覧 (検査部 研究分担者 木村 秀樹)

<http://t-profile.ad.u-fukui.ac.jp/profile/ja.d2606a67da0659a5520e17560c007669.html>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 木村 秀樹

ローマ字氏名: **(KIMURA, hideki)**

所属研究機関名: 福井大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 准教授

研究者番号(8桁): **20283187**

(2)研究分担者

研究分担者氏名: 岩野 正之

ローマ字氏名: **(IWANO, masayuki)**

所属研究機関名: 福井大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): **20275324**

(3)研究分担者

研究分担者氏名: 菅谷 健

ローマ字氏名: **(SUGAYA, takeshi)**

所属研究機関名: 聖マリアンナ医科大学

部局名: 医学部

職名: 客員教授

研究者番号(8桁): **40381561**

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。