

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17736

研究課題名(和文) 近位尿細管特異的PPAR α 欠損マウスを用いたPPAR α の腎保護作用の検討研究課題名(英文) Investigation of the renoprotective effects of PPAR α using proximal tubule-specific PPAR α knockout mice

研究代表者

山田 洋輔 (Yamada, Yosuke)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20836035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はNDRG1-CreERT2マウスとFloxPPAR α マウスを交配させ、腎近位尿細管特異的 PPAR α KOマウス(n-PPAR α KO)を作成することができた。n-PPAR α KOマウスを用いた研究は世界的にも行われておらず、このマウスから様々な新しい知見を見出すことができると考えている。このマウスに飢餓負荷をかけて検討を行ったところ、腎臓でのPPAR α の欠損は、脂肪組織、肝臓のエネルギー貯蔵能、血糖値など全身に様々な影響を及ぼすことが分かった。また現在、腎虚血再灌流モデルやProtein overload腎症モデルといった他の腎不全モデルについての検討も並行して行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、腎臓でのPPAR α の役割を検討することができた。PPAR α は肝臓での働きが主であると考えられているが、腎臓のPPAR α も全身にとって重要な役割を果たしていることが示唆された。この研究成果は2021年日本腎臓学会を含めた複数の学会で報告した。また、今回の研究で腎臓でのPPAR α が生体で重要な作用を及ぼしていることがわかったため、正常マウスにペマフィブラートという特異的PPAR α 活性化薬を使用して腎臓のPPAR α を活性化させた状態でprotein overload腎症モデルを起こす追加検討を行ったところ、同腎症が抑制されることがわかった。この成果は国際誌に報告することができた。

研究成果の概要(英文)：We were able to generate renal proximal tubule-specific PPAR α KO mice (n-PPAR α KO) by crossing NDRG1-CreERT2 mice with FloxPPAR α mice. n-PPAR α KO mice have not been studied in the world, and we expect to find various new findings from these mice. When these mice were subjected to starvation, it was found that deficiency of PPAR α in the kidney has various effects on the whole body, including adipose tissue, liver energy storage capacity, and blood glucose levels. The team is currently investigating other models of renal failure, such as renal ischemia-reperfusion and protein overload nephropathy.

研究分野：腎臓

キーワード：PPAR α 腎臓 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

近年生活習慣病の増加、高齢化などにより、腎臓病患者数が増加している。腎臓病は進行すると肺水腫や高 K 血症から死に至ることもある危険な病態である。腎臓病が末期に至ると多くの患者は週 3 回・1 回 4 時間の血液透析を導入され、QOL が著しく低下する。さらに血液透析には患者 1 人あたり年間約 500 万円の医療費がかかるとされ、日本の医療財政を圧迫する。このように、腎臓病は患者本人のみならず社会全体にとって重大な問題であるにもかかわらず、治療法は少なく、病態解明と新たな治療法の開発が急務である。

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) は脂肪酸代謝経路に関わる酵素発現を支配し、細胞内のエネルギー産生に強く関わっている核内転写調節因子である。PPAR は腎臓組織中にも多く存在し、主に近位尿細管に局在している。信州大学腎臓内科では、全身 PPAR 遺伝子欠損マウスを用いて腎障害時における PPAR の働きを研究してきた。その結果、

(1) PPAR は腎臓における脂肪酸代謝に不可欠な物質であり、PPAR が全身欠損すると正常な尿細管機能が維持できなくなる。

(2) 全身 PPAR 欠損マウスでは、様々な腎障害モデルにおいて、腎脂肪酸代謝異常、炎症、酸化ストレス、アポトーシスがより顕著となり、腎障害が強くなる。

(3) 腎炎および尿細管障害モデルでは PPAR 機能障害が生じる。PPAR アゴニストは PPAR 機能障害を改善し、腎障害を軽減する

などを報告してきた。これらのことから我々は、腎障害時には近位尿細管の PPAR が腎保護効果を発揮しているのではないかと考えた。このことがわかれば、腎近位尿細管の PPAR が腎臓病治療における治療ターゲットの一つになる可能性がある。

しかしながら、我々が行ってきた検討は全身 PPAR 遺伝子欠損マウスを用いており、腎臓の PPAR 遺伝子欠損の影響をみているのか、筋、心臓、肝臓などの全身の PPAR 遺伝子欠損の複合的な影響をみているのかが不明である。

2. 研究の目的

腎近位尿細管特異的 PPAR 欠損マウスを作成し、PPAR が生体内で重要な役割を果たすとされる飢餓時と、各種腎障害時における特徴を観察することで、腎近位尿細管の PPAR の役割を検討すること。

また、本研究期間には近年注目されている PPAR 特異的活性化薬であるペマフィブラート (PEM) を用いた研究や、脂質 (血清スルファチド) に関する追加研究も行った。

3. 研究の方法

腎近位尿細管特異的 PPAR 欠損マウスを用いた検討

NDRG1-CreERT2 マウスと FloxPPAR マウス (いずれも B6 マウス) を交配させ、生まれたマウスにタモキシフェンを投与することで腎近位尿細管特異的 PPAR 欠損マウスを作成した。

腎近位尿細管特異的 PPAR 欠損マウスに飢餓負荷をかけ、同負荷をかけた正常マウスと比較した。

腎障害モデルとして Protein overload 腎症、虚血再灌流腎症を発症させ、同負荷をかけた正常マウスと比較した。

追加検討について

PPAR 特異的活性化薬であるペマフィブラート (PEM) を用いた検討を行った。正常マウスに Protein overload 腎症モデルを発症させ、PEM を投与した群と投与しない群を作成し、比較検討した。

4. 研究成果

NDRG1-CreERT2 遺伝子をヘテロで保有し、Flox-PPAR 遺伝子をホモで保有するマウスを作成した。遺伝子の確認は PCR 法で行った。同遺伝子を保有するマウスに対しタモキシフェンを腹腔内投与することで、近位尿細管細胞内の PPAR 遺伝子を特異的に切断した。腎組織中の PPAR の蛋白発現量、RNA 発現量を Immunoblot 法、real-time PCR 法で検討した。

その結果、同処理を行われたマウスは正常マウスと比較し、腎組織中の PPAR 蛋白、PPAR RNA 発現量が強力に低下した。腎組織を用いて PPAR の免疫染色を行ったところ、正常マウスでは腎臓の近位尿細管細胞の核内を中心に PPAR が染色されたが、同処理マウスの近位尿細管細胞には PPAR が染色されなかった。この PPAR のノックアウト状態はタモキシフェン投与終了後も長期にわたって持続することがわかった。

これらの結果から、我々は、腎近位尿細管特異的 PPAR 欠損マウスを作成することができた。

で作成した腎近位尿細管特異的 PPAR 欠損マウスと正常マウスを用いた。両方のマウス

において、体内での PPAR α への生体依存性を高めるために飢餓負荷をかけ、脂肪組織、肝臓、心臓、腎臓、血液を採取し、各種解析を行った。その結果、腎近位尿細管 PPAR α 特異的欠損マウスでは体重の低下、脂肪組織 (eWAT) の減少、肝臓への泡沫沈着、肝臓のグリコーゲンの減少、血糖値の低下などといった、全身における様々な異常が起こった。一方で、我々が最も評価したいアウトカムとして計画書内で定めた腎臓の組織学的変化に関しては現在の研究条件では違いが認められていない。今後研究条件を再評価し、追加実験を行っていく予定である。

従来 PPAR α の作用は肝臓での役割が主と考えられているため、腎臓での PPAR α も全身的に重要な役割を果たしていることは、今回の研究で初めて分かったことである。この研究成果は、日本腎臓学会学術総会などの学会で報告した。(青村 大輝, 山田 洋輔, 原田 真, 橋本 幸始, 上條 祐司 近位尿細管の PPAR α は全身の飢餓応答に関与する 第 64 回日本腎臓学会学術総会 ハイブリッド開催 2021/6/18-6/20 パシフィコ横浜)
今後さらにそのメカニズムなどの検討を追加し、学術論文として国際誌に成果を報告したいと考えている。

現在検討中である。特にマウスの腎臓動脈を手術的にクランプし、一定時間後に開放することで虚血から復帰した時の急性腎障害を評価することを目的とした虚血再灌流モデルにおいて、腎近位尿細管 PPAR α 特異的欠損マウスでは腎障害が強く出ることを示唆する結果が出ている。現在そのメカニズムを含め追加実験を進めている。結果がまとまり次第成果を学会や国際誌で報告する。

追加検討について

Protein overload 腎症を起こさせた正常マウスを用いた。PEM を投与したマウスでは投与されていないマウスを作成し、腎臓の組織学的変化を比較した。その結果、PEM を投与したマウスでは尿細管障害が有意に軽減されることがわかった。また、酸化ストレスや脂肪酸代謝経路を評価し、メカニズムを検討したところ、PEM は腎臓の脂肪酸代謝を維持・活性化し、Protein overload 腎症モデルに対して腎保護作用を発揮していることが示唆された。この研究成果は国際誌に報告した。(Aomura D, Harada M, Yamada Y, Nakajima T, Hashimoto K, Tanaka N, Kamijo Y. Pemafibrate Protects against Fatty Acid-Induced Nephropathy by Maintaining Renal Fatty Acid Metabolism. *Metabolites*. 2021 Jun 9;11(6):372. doi: 10.3390/metabo11060372. PMID: 34207854; PMCID: PMC8230306.)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Aomura Daiki, Harada Makoto, Yamada Yosuke, Nakajima Takero, Hashimoto Koji, Tanaka Naoki, Kamijo Yuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Penafibrate Protects against Fatty Acid-Induced Nephropathy by Maintaining Renal Fatty Acid Metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 372 ~ 372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo11060372	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Harada Makoto, Nakajima Takero, Yamada Yosuke, Aomura Daiki, Yamaguchi Akinori, Sonoda Kosuke, Tanaka Naoki, Hashimoto Koji, Kamijo Yuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Serum Sulfatide Levels as a Biomarker of Active Glomerular Lesion in Patients with Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis: A Single Center Pilot Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 762 ~ 762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11030762	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Yosuke, Harada Makoto, Hara Yuuta, Iwabuchi Ryohei, Hashimoto Koji, Yamamoto Shuhei, Kamijo Yuji	4. 巻 23
2. 論文標題 Efficacy of plasma exchange for antineutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis: a systematic review and meta-analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Research and Therapy	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-021-02415-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Y, Harada M, Hashimoto K, Guo R, Nakajima T, Kashihara T, Yamada M, Aoyama T, Kamijo Y.	4. 巻 36
2. 論文標題 Impact of chronic kidney dysfunction on serum Sulfatides and its metabolic pathway in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glycoconj J.	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-018-9850-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamada Y, Inui K, Hara Y, Fuji K, Sonoda K, Hashimoto K, Kamijo Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Verification of serum albumin elevating effect of cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy for ascites patients: a retrospective controlled cohort study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 10195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46774-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kishida M, Yamada Y, Inayama E, Kitamura M, Nishino T, Ota K, Shintani A, Ikenoue T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Effectiveness of Music Therapy for Alleviating Pain During Haemodialysis Access Cannulation for Patients Undergoing Haemodialysis: A Multi-Facility, Single-Blind, Randomised Controlled Trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trials.	6. 最初と最後の頁 631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13063-019-3773-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Guo R, Hu X, Yamada Y, Harada M, Nakajima T, Kashiwara T, Yamada M, Aoyama T, Kamijo Y.	4. 巻 42
2. 論文標題 Effects of Hypertension and Antihypertensive Treatments on Sulfatide Levels in Serum and Its Metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertens Res.	6. 最初と最後の頁 598-609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-018-0160-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 上條祐司, 山田洋輔, 青村大輝, 原田真, 橋本幸始, 中島岳郎, 田中直樹
2. 発表標題 多価不飽和脂肪酸欠乏が腎のautophagyに与える影響とその機序の解明
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青村 大輝, 山田 洋輔, 原田 真, 橋本 幸始, 上條 祐司
2. 発表標題 近位尿細管のPPAR は全身の飢餓応答に關与する
3. 学会等名 第64回日本腎臟学会學術總會
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田洋輔、犬井啓太、上條祐司
2. 発表標題 CART膜の特性と適正使用
3. 学会等名 第42回日本アフェレンス学会學術集會（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田 洋輔, 原田 真, 橋本 幸始, 上條 祐司
2. 発表標題 ANCA關連血管炎に対する血漿交換療法：系統的レビュー・メタアナリシス
3. 学会等名 第64回日本腎臟学会學術總會
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田 洋輔
2. 発表標題 井上學術奨励賞受賞記念講演
3. 学会等名 第40回日本アフェレンス学会、第12回國際アフェレンス学会 合同集會（招待講演）（國際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 洋輔
2. 発表標題 腹水症におけるCARTの血清アルブミン上昇効果の検討
3. 学会等名 第64回日本透析医学会学術集会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 洋輔
2. 発表標題 マウスにおける慢性腎機能障害が血清スルファチドとその代謝経路に与える影響
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 YOSUKE YAMADA
2. 発表標題 IMPACT OF CHRONIC KIDNEY DYSFUNCTION ON SERUM SULFATIDES AND ITS METABOLIC PATHWAY IN MICE
3. 学会等名 the ISN 's World Congress of Nephrology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------