

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月20日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591049

研究課題名（和文）リポ蛋白糸球体症の発症・進展に関するアポE異常とFc受容体異常との相互作用の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the interaction between abnormalities of apolipoprotein E and Fc receptors on the development of lipoprotein glomerulopathy.

研究代表者

斉藤 喬雄（SAITO TAKAO）

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：10125552

研究成果の概要（和文）：アポEおよびFc受容体 γ 鎖(FcR γ)二重欠損マウスにヒトの野生型であるapoE3を組み込んだアデノウイルスベクターを注入すると、高トリグリセリド血症とともに、もっとも効率的にリポ蛋白糸球体症を惹起できた。この結果は、FcR γ 欠損がもたらすマクロファージの機能不全と密接に関係していると考えられる。マクロファージが、さまざまな面で脂質異常症に関与することが知られる今日、これまでとは異なるマクロファージの関わりを示唆できたことは大変意義深い。

研究成果の概要（英文）：In FcR γ /apoE-KO mice, human apoE3-injection showed the most drastic changes mimicking lipoprotein glomerulopathy as well as prominent hypertriglyceridemia. These results suggest that the impairment of macrophage function resulting from FcR γ deficiency plays a principal role in the development of LPG in the presence of apoE abnormalities. This may be another aspect of macrophage-induced dyscondition in dyslipidemia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、腎臓内科学

キーワード：腎臓学

1. 研究開始当初の背景

リポ蛋白糸球体症(lipoprotein glomerulopathy, LPG)は、腎糸球体に特異的なリポ蛋白の沈着を認める疾患であり、1988年に本研究の代表者である斉藤らにより発見された(Saito T et al. Am J Kidney Dis 13:148-153,

1989)。LPG患者においてApoE-Sendai (Arg145Pro) (Oikawa T et al. J Am Soc Nephrol 8:820-823, 1997)をはじめとした多形性を有するアポ蛋白E (apoE) 変異が発見され、さらに、これらの変異を組み込んだアデノウイルスベクターを注入した

apoE 欠損マウスに LPG の発症がみられた事実から、apoE 変異が LPG の発症因子であることが明らかとなった (Ishigaki Y et al. J Biol Chem 27:31269-31273, 2000)。しかし、これらの変異を有しても LPG を発症しない保因者がいること、上記実験でも LPG を発症するマウスに限られることなどから、その発症には腎糸球体側の要因も重要であることが示唆された。その後、ループス腎炎のモデルである GVH 反応を惹起させた C57BL/6 マウスにおいて Fc 受容体 γ 鎖 (FcR γ) を欠損させた場合、LPG 類似の変化が生じることが報告され、炎症の促進的な役割を有する FcR γ の欠損が、LPG 発症の腎糸球体要因である可能性が示唆された (Kanamaru Y et al. J Am Soc Nephrol 13:1527-1533, 2002)。以上の点から、我々は、特異的な apoE 変異のみならず、FcR γ 欠損に代表されるような炎症機序の異常が LPG 発症にかかわると考え、それらの点を総説としてまとめ、発表した (Saito T et al. Am J Kidney Dis 47:199-211, 2006)。

2. 研究の目的

この研究では、斉藤らが総説で述べた問題点のうち、以下の2点の解明を目的とした。

(1) apoE・FcR γ の二重欠損マウス (以下二重欠損マウス) を作製し、それに各種 apoE を注入し、マウスの病態を病理学的側面や脂質生化学的側面から観察・解析し、LPG 発症における apoE 異常と FcR 欠損の組み合わせの意義を明らかにする。

(2) Kanamaru らの研究から、FcR γ 欠損マウスでは LPG 発症にマクロファージの機能不全が関わっている可能性が示唆されているので、さまざまな角度から、マクロファージの作用を検証し、LPG 発症に関わるマクロファージの機能異常を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子欠損マウスの飼育・繁殖・交配
福岡大学アニマルセンターにおいて繁殖を行ってきた apoE および FcR γ 各単独欠損を交配して二重欠損マウスを作製し、安定して供給できる状態とした。

(2) 各種の ApoE を発現する組換えアデノウイルスの作製

ヒト ApoE-Sendai、ヒト apoE3 (野生型)、LacZ (対照) それぞれの cDNA を組み込んだアデノウイルスベクターを 293 細胞にトランスフェクションして培養した。大量培養後、密度勾配遠心法にてアデノウイルスを精製・回収し、 -80°C の冷凍庫で保管した。

(3) ApoE 組み込みアデノウイルスの感染

20 週齢の各欠損マウスのオスを用いて実

験を行った。前述の各種 apoE (対照には LacZ) をそれぞれ組み込んだアデノウイルスをマウスの尾静脈から注入して感染させた。

(4) 実験モデルの生化学的分析

マウスから経時的に採血・採尿し、酵素測定法キットを用いて尿蛋白、血漿 BUN・TG・TC を測定した。さらに、スカイライト・バイオテック社に依頼して、リポ蛋白質解析受託サービス: LipoSEARCH を使い、HPLC 法によるリポ蛋白質プロファイルを解析した。

(5) 腎病理組織所見の検討

① 光学顕微鏡観察

アデノウイルス感染後 21 日目にマウスを屠殺して腎臓を摘出し、組織所見の観察を行った。カルノア液または 95% アルコールにて固定した標本を $2\mu\text{m}$ で薄切片し、Periodic acid-Schiff (PAS)、Azan-Mallory (AM) の各染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

② 脂肪染色

Mochizuki らの方法 (Clin Exp Nephrol 5:240-245, 2001) により、ホルマリン前固定・四酸化オスミウム後固定にて、標本の脂肪保持性を上げ、オイルレッド O 染色で観察した。

③ 電子顕微鏡による観察

グルタールアセトアルデヒド前固定・四酸化オスミウム後固定の標本をエポン樹脂に包埋した後、超薄切片を作製して電子顕微鏡で観察した。

(6) マクロファージ機能の検討

アポ E を組み込んだマウスについて、FcR の有無によるマクロファージ機能の違いを、以下の方法で検討した。

① 組織マクロファージの計測

95% アルコール固定標本について、抗マウス CD68 抗体を用いて酵素抗体法染色を行い、糸球体における CD68 陽性マクロファージ数を計測した。

② 腹水マクロファージ機能の検討

マウス屠殺時の腹水からマクロファージを抽出し、培養に供した。マクロファージは酸化 LDL とともに 24 時間培養し、オイルレッド O 染色を行い、脂肪を貪食した、泡沫細胞数を計測した。

腹水上清について、MCP-1 や RANTES などマクロファージ活性を表すサイトカインの測定を ELISA 法により行った。

③リアルタイム PCR 法による検討

腎組織から総 RNA を抽出し、LDL 受容体やスカベンジャー受容体をはじめ、マクロファージ機能に関連する各種メッセンジャー RNA (mRNA) の転写レベルを、リアルタイム PCR 法で検討した。

なお、本研究は、福岡大学動物実験委員会に計画書を提出して承認を受け、福岡大学動物実験ガイドラインに従って実施された。

4. 研究成果

(1) 血清アポEおよび脂質の変化。

二重欠損マウスにおける血清 apoE 濃度は、ApoE-Sendai およびヒト apoE3 注入群で4日目まで最高値に達し、以後漸減した (図 1A)。一方、総コレステロール(TC)は、ベクター注入前 apoE 欠損マウスで高値であったが、ヒト apoE3 注入群では、直ちに正常化し、ApoE-Sendai 注入群では、いったん低下したものの正常化せず、再び上昇する傾向を示した (図 1B)。これに対してトリグリセリド(TG)は apoE と同様、ヒト apoE3 注入群で4日目をピークに上昇した。(図 1C)。

アポEが最高値を示した実験4日目のHPLC法によるリポ蛋白プロフィールでは、アポE注入により、コレステロールの各分画がほぼ正常化した (図 1D)。しかし、TGに関しては、とくにヒト apoE3 注入群で、small VLDL-TG から Large VLDL-TG にかけて、著しい増加がみられた (図 1E)。

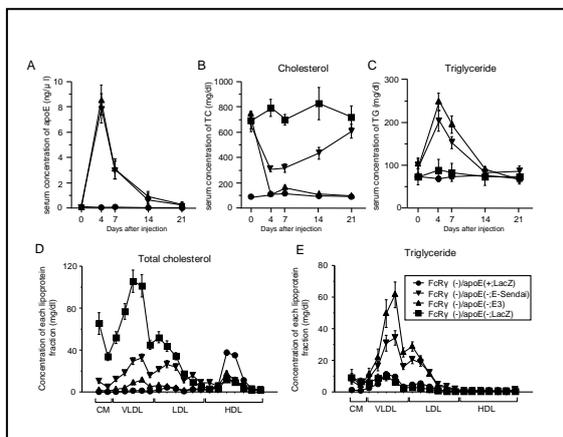


図1 ヒト apoE 注入二重欠損マウスと対照の FcR γ 欠損マウスにおける、血清 apoE (A)、TC (B)、TG (C) の変化と、注入4日後におけるコレステロール (D) と TG (E) のリポ蛋白分画。

(2) 腎組織所見

ヒト LPG に類似したりポ蛋白血栓を有する糸球体障害は、apoE 存在下の FcR γ 欠損マウスに見られたが、とくに二重欠損マウスにヒト apoE3 を注入した場合に著明であった (図 2Aa-c)。リポ蛋白血栓は、オイルレッドO脂

肪染色 (図 2Ae-g) と電顕所見 (図 2Ai-k) により証明された。リポ蛋白血栓を有する糸球体の割合は、ヒト apoE3 注入群で有意に増加した (図 2B)。

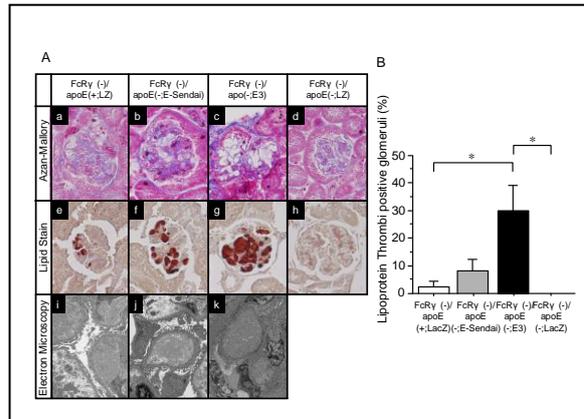


図2 ヒト apoE 注入二重欠損マウスと対照の FcR γ 欠損マウスにおける糸球体組織所見 (A) とリポ蛋白血栓の割合 (B)。

(3) アポE存在下での FcR γ 欠損の検討

ヒト apoE3 注入による LPG の発症が FcR γ 欠損の有無によりどのように影響を受けるか検討した。ヒト apoE を注入した場合、リポ蛋白血栓形成は、二重欠損マウスで有意に増加し、apoE 単独欠損マウスでは僅かであった。また、FcR γ 単独欠損マウスのように同種 apoE が存在する場合には、ヒト apoE3 を注入してもリポ蛋白血栓形成はみられなかった (図 3A)。すなわち、FcR γ 欠損により、異種アポEなどの異常アポEを処理する能力が失われ、リポ蛋白血栓を形成する可能性が示唆された。また、このような場合には、糸球体における CD68 陽性マクロファージの増加は認められなかった (図 3BC)。このことから、FcR γ がマクロファージの機能と深く関わっており、その欠損がマクロファージ機能不全を引き起こして LPG の発症因子となることが示唆された。

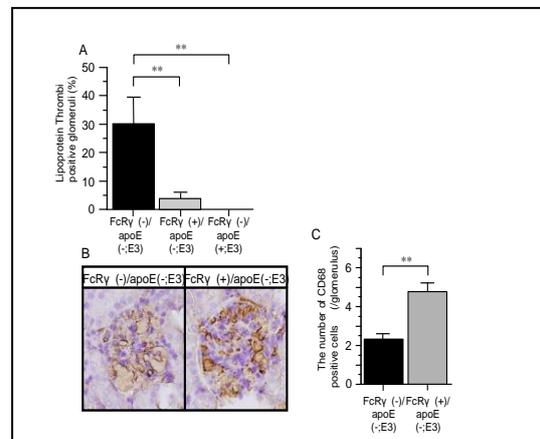


図3 ヒト apoE3 注入二重欠損マウスと対照の apoE 欠損マウスおよび FcR γ 欠損マウスにおける、糸球体リポ蛋白血栓の割合 (A) と CD68 陽性マクロファージ浸潤 (B, C)。

(4) LPG 発症に関わるマクロファージの機能低下

①腹水におけるマクロファージの機能

apoE を注入した際に、FcR γ の有無でマクロファージの機能に差があるか否かを検討した。まず、酸化 LDL で培養した腹水マクロファージにおいて、その取り込みオイルレッド O 染色で検討したところ、陽性マクロファージの割合は、FcR γ 欠損マウスで有意に低下した (28.9 \pm 1.6% vs 79.3 \pm 1.5%, 図 4AB)。また、マクロファージ活性に関わるサイトカインである MCP-1 や RANTES の産生も、FcR γ 欠損群の培養上清中で有意に低下した (図 4CD)。

②腎におけるマクロファージ関連 mRNA の転写レベル

LDL 受容体やスカベンジャー受容体遺伝子のうち、LDL 受容体に関する *ldlr* の転写レベルについて、FcR γ 欠損群で有意な低下がみられた (図 4E)。

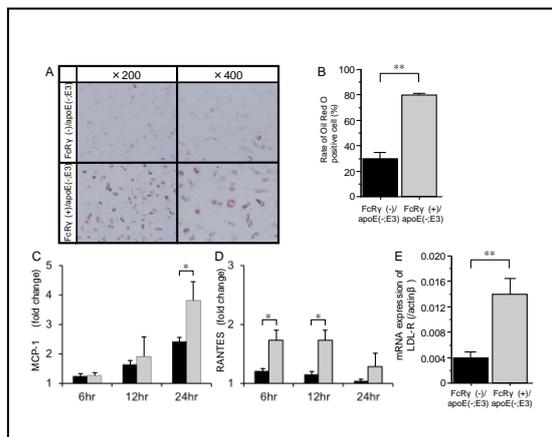


図4 ヒト apoE3 注入マウスの腹水マクロファージにおける酸化 LDL の取り込み (A, B) と、培養上清中における MCP-1 (C)、RANTES (D) の分泌能、および腎における LDL 受容体 mRNA (*ldlr*) の転写レベル (E)。

Kanamaru らの研究のほかに、本研究と並行して行われ発表された我々の研究でも、apoE 異常に伴った LPG の発症に、マクロファージ機能低下が関わっていることが示されている。石村らの研究 (Clin Exp Nephrol 13:430-437, 2009) では、ヒトアポ E に ApoE-Sendai を注入して LPG が発症する場合には、apoE 欠損マウスの加齢変化でみられる糸球体障害と異なり、CD68 陽性マクロファージの増加がみられなかった。また、宮原らの研究 (Clin Exp Nephrol 16:115-121, 2012)

では、GVH 反応で FcR γ 欠損マウスに LPG が発症する場合には、通常の GVH 反応でみられるようなスカベンジャー受容体 CD36 陽性細胞の増加がなく、マクロファージのスカベンジャー化機能が低下していることが示された。これらの研究とともに、今回の結果を考察すると、FcR γ 欠損によるマクロファージの機能低下が、異常アポ E を含むリポ蛋白の処理を抑制し、リポ蛋白血栓形成に寄与していると考えられる。

(5) 結果のまとめ

今回の研究の当初の目的は、ヒト LPG に関わる変異 apoE のなかで、最も代表的とされ、動物実験でも病因としての役割が証明されてきた ApoE-Sendai が、FcR γ 欠損下で、確実に LPG を発症することを示し、その意義を明らかにすることであった。そのために、二重欠損マウスを作成し、各種ヒト apoE 組み込みウイルスベクターを注入する実験を行った。しかし、予想に反して当初対照として考えたヒト apoE3 が、もっとも効率的に LPG を発症した。この点については、野生型とはいえ、ヒト apoE3 もマウスにとって異種蛋白であり、そのような異常 apoE を FcR γ 欠損により処理できなかったことが、LPG 発症に関わったのではないかと考えられる。とくに、このマウス群では、一過性ではあるが、ヒト apoE3 注入後 TG とくにヒトの IDL-TG に相当する small VLDL-TG から large LDL-TG 分画の増加が目立ち、ヒトの典型的な LPG と一致する所見を示した。このようなリポ蛋白を抑制するフィブラートが、ヒト LPG にも有効であるとの最近の治療報告を考慮すると、大変興味深い結果である。

さらに、FcR γ 欠損マウスにおける LPG の発症がマクロファージの機能不全と密接に関係していた点を強調したい。ヒト LPG の病因として、変異 apoE が重要であることはほぼ確定的であるが、変異 apoE を有しても発症しない保因者も少なくない。今回、マクロファージ機能不全が LPG の発症に関わる可能性を示したが、このことは、apoE 異常だけでは LPG が発症しにくい場合があることを示唆している。

一方、これまで、脂質異常症による動脈硬化や糸球体硬化の機序としては、Brown と Goldstein が示したように、マクロファージの機能亢進とくにスカベンジャー化による細胞内へのリポ蛋白の取り込みが、中心的に考えられてきた。しかし、マクロファージの機能不全がもたらす病態については、ほとんど注目されていなかった。マクロファージが、さまざまな面で脂質異常症に関与すると考えられる今日、このような病態に、これまでとは異なるマクロフ

ページの関わりを示唆できたことは大変意義深い。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Ito K, Nakashima H, Watanabe M., Ishimura A., Miyahara Y., Abe Y., Yasuno T., Ifuku M, Saito T. Macroage impairment produced by Fc receptor gamma deficiency plays a principal role in the development of lipoprotein glomerulopathy in concert with apoE abnormalities. Nephrol Dial Transplant, 査読あり、Vol. 24、2012 (印刷中)
- ② Miyahara Y, Nishimura S, Watanabe M, Ito K, Nakashima H, Saito T Scavenger receptor expressions in the kidneys of mice with lipoprotein glomerulopathy. Clin Exp Nephrol, 査読あり, Vol, 16, No, 1, 2012, :115-121
- ③ Ishimura A, Watanabe M, Nakashima H, Ito K, Miyake K, Mochizuki S, Ishigaki Y, Saito T. Lipoprotein glomerulopathy induced by ApoE-Sendai is different from glomerular lesions in aged apoE-deficient mice. Clin Exp Nephrol, 査読あり、Vol. 13, No. 5, 2009, :430-437

[学会発表] (計7件)

- ① Kenji Ito、Impairment of macrophage function resulting from Fc receptor gammachain (FcR γ) deficiency causes the development of lipoprotein glomerulopathy (LPG). The 48th ERA-EDTA Congress、2011年6月25日、Prague, Czech Republic
- ② 伊藤 建二 Fc受容体 γ 鎖欠損がリポ蛋白糸球体症発症に影響する機序の検討、第54回日本腎臓学会学術総会、2011年6月16日、横浜
- ③ Kenji Ito、Impairment of macrophage function resulting from Fc receptor gammachain (FcR γ) deficiency causes the development of lipoprotein glomerulopathy (LPG). World Congress of Nephrology 2011、2011年4月10日、Vancouver, Canada
- ④ Takao Saito、Polymorphism of apolipoprotein E (apoE) variants in lipoprotein glomerulopathy (LPG). World Congress of Nephrology 2011、2011年4月10日、Vancouver, Canada
- ⑤ Kenji Ito、Impairment of macrophage

function resulting from Fc receptor gamma chain (FcR γ) deficiency causes the development of lipoprotein glomerulopathy (LPG)、The 43rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology、2010年11月16日、Denver、USA.

- ⑥ Kenji Ito、Fc receptor gamma chain deficiency is related to the development of lipoprotein glomerulopathy. The 47th FRA-EDTA Congress、2010年6月27日、Munich, Germany
- ⑦ 伊藤建二、Fc受容体 γ 鎖欠損がリポ蛋白糸球体症に影響する機序の検討。第53回日本腎臓学会学術総会、2010年6月17日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 喬雄 (SAITO TAKAO)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：10125552

(2) 研究分担者

中島 衡 (NAKASHIMA HITOSHI)
福岡大学・医学部・准教授
研究者番号：70188960
笹富 佳江 (SASATOMI YOSHIE)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号：30369003
安部 泰弘 (ABE YASUHIRO)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号：50461512
伊藤 建二 (ITO KENJI)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号：00580234

(3) 研究協力者

渡辺 真穂 (WATANABE MAHO)
福岡大学・医学部・大学院研究生
石村 春令 (ISHIMURA ATSUNORI)
福岡大学・医学部・大学院生
宮原 義登 (MIYAHARA YOSHITO)
福岡大学・医学部・大学院生
西村 晋輔 (NISHIMURA SHINSUKE)
福岡大学・医学部・大学院研究生
安野 哲彦 (YASUNO TETSUHIKO)
福岡大学・医学部・助手
福島 隆生 (FUKUSHIMA TAKAO)
福岡大学・医学部・大学院生
井福 正和 (IFUKU MASAKAZU)
福岡大学・医学部・大学院生