

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700701

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームに合併するCKDにおける肥満遺伝子Azgp-1の機能解析

研究課題名(英文)The role of Azgp-1, candidate gene for obesity, in CKD with metabolic syndrome

研究代表者

萩原晋二 (HAGIWARA SHINJI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70445568

研究成果の概要(和文)：本研究では、2型糖尿病肥満モデル KK/Ta マウスの腎臓における Azgp-1 の発現部位を特定し、Azgp-1 の腎臓組織における発現部位や腎臓での Azgp-1 の機能を解析することにより、肥満症・糖尿病(メタボリックシンドローム)に合併する慢性腎臓病(CKD)における Azgp-1 の役割を検討した。

KK/Ta の腎臓組織では、BALBc マウスと比較して尿細管上皮細胞において Azgp-1 蛋白の発現が有意に亢進していることを確認した。ストレプトゾトシンを投与した BALBc マウスでは、Azgp-1 蛋白の発現増加は認めなかった。C57BL/6 マウスの高脂肪食群では、腎臓での Azgp-1 の mRNA の発現は低下していた。KK/Ta マウスにピオグリタゾン投与群の腎臓組織では、Azgp-1 の発現が上昇していた。2型糖尿病患者群において、尿中 Azgp-1 蛋白濃度は有意に上昇しており、推定糸球体濾過量、尿中アルブミン/クレアチニン比、尿中 NAG/クレアチニン比との相関関係を認めた。

Azgp-1 は、糖尿病腎症において近位尿細管上皮細胞に発現の上昇が認められ、腎臓の脂質代謝に関与し、転写因子 PPAR γ は腎臓における Azgp-1 の調節因子である可能性が示唆された。また、尿中 Azgp-1 濃度は 2型糖尿病腎症患者における新規の尿中バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified the localization of Azgp-1 expression in the kidney of spontaneous type 2 diabetic obesity KK/Ta mouse, analyzed the function of Azgp-1 in the kidney and examined the role of Azgp-1 on CKD with metabolic syndrome.

The expressions of Azgp-1 protein were increased at tubular epithelial cells of KK/Ta mice compared to BALBc mice. There are no expressions of Azgp-1 protein in the kidney of STZ induced diabetic BALBc mice. The Azgp-1 mRNA expressions were decreased in the kidney of high fat diet C57BL/6 mice. The Azgp-1 mRNA expressions were increased in the kidney of KK/Ta mice treated by Pioglitazone. The concentrations of urinary Azgp-1 protein were significantly increased in patients with type 2 diabetes and positively correlated with glomerular filtration rate (GFR), urinary albumin creatinine ratio and urinary NAG creatinine ratio.

Azgp-1 protein expressions were increased in proximal tubular epithelial cells of diabetic nephropathy, probably related to lipid metabolism and transcript factor PPAR γ is a modulator of Azgp-1 in the kidney. Moreover, it is suggested that the concentrations of urinary Azgp-1 is useful as a new urinary biomarker in type 2 diabetic nephropathy patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000

年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：メタボリックシンドローム、慢性腎臓病、Azgp-1

1. 研究開始当初の背景

現在日本では、メタボリックシンドロームの患者・予備群は増加し、医療費の増大に歯止めがかかっていない状態である。メタボリックシンドロームは、心筋梗塞や脳梗塞のリスクが大きくなるのでその改善が重要になる。また、メタボリックシンドロームは慢性腎臓病（CKD）の発症と深く関係し、メタボリックシンドローム患者では、CKDの累積発症率や相対危険度が高まることが報告されている（Ninomiya T, et al. *Am J Kidney Dis* 48:383-391, 2006）。肥満による腎障害には、インスリン抵抗性が関与しており、また、腎機能低下がインスリン抵抗性を悪化させるなど、悪循環が生じる。さらにCKDは、高血圧や脂質代謝異常などの危険因子を悪化させ、この両者間にも悪循環が生じている。

Azgp-1の生理学的な作用は、いまだ明らかにされていないが、アデノカルチノーマから分泌される蛋白質や癌性悪液質を伴った患者の血漿中や尿中で上昇する蛋白質と同一であることが確認され、脂質代謝の重要な因子と考えられている（Todorov et al: *Cancer Res* 58: 2353-2358, 1998）。我々は、これまでに、2型糖尿病肥満モデルマウスであるKK/TaマウスとコントロールマウスであるBALB/cAマウスを用いてDifferential display PCRを施行し、Zinc-alpha2-glycoprotein (Azgp-1)遺伝子が肥満の候補遺伝子であることを報告した（Gohda et al: *Diabetes* 52: 2175-2181, 2003）。予備実験ではKK/Taマウスの腎臓尿細管において、Azgp1の発現が亢進しており、最近、尿中Azgp-1が早期の糖尿病腎症で上昇しているとの報告もあるが、糖尿病腎症におけるAzgp-1の役割は、今のところ明らかではない（*J Assoc Physicians India* 53:513-520, 2005）。

2型糖尿病モデルであるdb/dbマウスの腎尿細管では、そのコントロールであるdb/mマウスと比較して脂肪の蓄積が増加

しており、尿細管細胞や糖尿病腎症の障害を促進していると考えられている（Mishra et al: *Am J Physiol* 286: F913-F921, 2004）。我々は、KK/Taマウスにおいても、脂肪蓄積が腎症の障害を促進していると考えられ、脂肪代謝を調節するAzgp-1が腎症の進展または保護に関与している可能性を示した。

ピオグリタゾン（PGZ）はPPAR γ のリガンドであり、EPAは主にPPAR α のリガンドであるが、脂肪細胞においてAzgp1のmRNA発現を上昇または低下すると報告されている。腎臓においてもAzgp1遺伝子は、PPARsを介して発現が調節されていると思われる。我々は、KK/TaマウスにPGZを投与したところ、血糖に依存せずにアルブミン尿と糸球体肥大の改善を認めることを報告した（Tanimoto et al: *Metabolism* 53: 1473-1479, 2004）。また、KK/Taマウスに肥満遺伝子（Ay）を導入したKKAy/TaマウスにPPAR γ ・ α のリガンドであるEPAを投与したところ、尿中アルブミン・腎組織障害の改善、炎症細胞の浸潤の抑制、ERK1/2の活性抑制を認めたことを報告した（Hagiwara et al: *Nephrol Dial Transplant* 22: 1361-1368, 2005）。これらの腎症改善効果には、Azgp1も何らかの役割を果たしている可能性も考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、2型糖尿病肥満モデルであるKKAy/Taマウスの腎臓において、肥満の候補遺伝子であるAzgp-1のmRNA・蛋白発現およびAzgp-1の発現部位を特定し、Azgp-1発現に影響する因子を特定することにより、メタボリックシンドロームに合併するCKDにおけるAzgp-1の機能を検討する。また、2型糖尿病患者における尿中Azgp-1濃度を測定し、腎機能や尿細管障害マーカーとの関連について検討する。

3. 研究の方法

1) 実験デザイン

KK/Ta および BALB/c マウス 7 週齢を個々にプラスチックゲージに入れ実験期間中は全てのマウスは同じ環境下で飼育する。糖尿病による Azgp-1 の発現に対する影響を確認するため、8 週齢の BALB/cA マウスにストレプトゾトシン(STZ)を投与し 1 型糖尿病を惹起する。8 週齢の KK/Ta を低脂肪食を与える群と高脂肪食を与える群に分ける。さらに、脂肪代謝に関係する PPAR のリガンドであるピオグリタゾン投与群と非投与群の 4 グループに分ける。

2) 表現型の測定

尿アルブミン/クレアチニン比、体重、空腹時血糖、インスリン抵抗性、血清中性脂肪・総コレステロール、血圧などを経時的に測定し、各群間で差があるか否かを統計学的 (students t-test, ANOVA) に評価する。必要に応じて屠殺する。

3) 組織学的検討と免疫染色

各グループの腎組織病変を光学顕微鏡で検討し、さらに脂肪染色で腎組織での脂肪蓄積や免疫染色で Azgp-1・PPAR γ の発現の差や部位を検討する。

4) RT-PCR と Real time PCR 法

各グループの腎組織における、Azgp-1・PPAR γ の mRNA 発現の差を検討する。

5) Western blot 法

各グループの腎組織における、蛋白レベルでの Azgp-1・PPAR γ の発現の差を検討する。

4. 研究成果

KK/Ta マウスにおいて、Azgp-1 蛋白の発現上昇が近位尿細管上皮細胞に認められた。高脂肪食負荷 C57BL/6 マウスでは腎での Azgp-1 の mRNA 発現の低下傾向がみられた。一方、ピオグリタゾンを投与した KK/Ta マウスでは、腎における Azgp-1 の発現上昇が認められた。2 型糖尿病患者群において、尿中 Azgp-1 蛋白濃度は有意に上昇しており、推定糸球体濾過量、尿中アルブミン/クレアチニン比、尿中 NAG/クレアチニン比との相関関係を認めた。以上より、Azgp-1 は、糖尿病腎症において近位尿細管上皮細胞に発現の上昇が認められ、腎の脂質代謝に関与しており、転写因子 PPAR γ は腎における Azgp-1 の調節因子である可能性が示唆された。また、尿中 Azgp-1 濃度は 2 型糖尿病腎症患者における新規の尿中バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Moon JY, Tanimoto M, Gohda T, Hagiwara S, Yamazaki T, Ohara I, Murakoshi M, Aoki T, Ishikawa Y, Lee SH, Jeong KH, Lee TW, Ihm CG, Lim SJ, Tomino Y. Attenuating effect of angiotensin-(1-7) on angiotensin II-mediated NAD(P)H oxidase activation in type 2 diabetic nephropathy of KK-Ay/Ta mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011, In press.
2. Murakoshi M, Tanimoto M, Gohda T, Hagiwara S, Takagi M, Horikoshi S, Tomino Y. Mindin: a novel marker for podocyte injury in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2010, In press.
3. Ohara I, Tanimoto M, Gohda T, Yamazaki T, Hagiwara S, Murakoshi M, Aoki T, Toyoda H, Ishikawa Y, Funabiki K, Horikoshi S, Tomino Y. Effect of Combination Therapy with Angiotensin Receptor Blocker and 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) in Type 2 Diabetic Nephropathy in KK-A/Ta Mice. *Nephron Exp Nephrol* 117, 2010, 124-132.
4. Yamazaki T, Tanimoto M, Gohda T, Ohara I, Hagiwara S, Murakoshi M, Matsumoto M, Kaneko S, Aoki T, Toyoda H, Ishikawa Y, Funabiki K, Horikoshi S, Tomino Y. Combination effects of enalapril and losartan on lipid peroxidation in the kidneys of KK-Ay/Ta mice. *Nephron Exp Nephrol* 113, 2009, e66-76.
5. Hagiwara S, Gohda T, Tanimoto M, Ito T, Murakoshi M, Ohara I, Yamazaki T, Matsumoto M, Horikoshi S, Funabiki K, Tomino Y. Effects of pyridoxamine (K-163) on glucose intolerance and obesity in high-fat diet C57BL/6J mice. *Metabolism* 58, 2009, 934-945.
6. 奥村こずえ, 谷本光生, 萩原晋二, 濱田千江子, 堀越哲, 富野康日己. 炭酸ランタン(リン吸着薬)の血清中リン結合作用の検討. *Nephrology Frontier* 8, 2009, 314-317.

[学会発表] (計 2 件)

1. 発表者名: 萩原晋二、合田朋仁、村越真紀、谷本光生、古川雅子、石川祐史、青木竜弥、表敬介、山口早織、蒔田雄一郎、船曳和彦、堀越哲、富野康日己
発表標題: 高脂肪食 C57BL/6 マウスにお

ける Pyridoxamine 投与による耐糖能障害・肥満改善効果の検討

学会等名：第53回日本糖尿病学会年次学術集会

発表年月日：2010年5月28日

発表場所：岡山

2. 発表者名：萩原晋二、合田朋仁、谷本光生、古川雅子、村越真紀、石川祐史、青木竜弥、表敬介、山口早織、堀越哲、富野康日己

発表標題：2型糖尿病腎症におけるZinc-alpha2-glycoprotein (Azgp-1)の役割の検討

学会等名：第53回日本腎臓学会学術総会

発表年月日：2010年6月16日

発表場所：神戸

〔図書〕(計 1件)

著者名：富野康日己他(萩原晋二)

出版社：株式会社 医学書院

書名：腎機能低下患者への薬の使い方
2版

発行年：2011

総ページ数：294

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称：慢性腎疾患の診断方法

発明者：村越真紀、萩原晋二、谷本光生、合田朋仁、富野康日己

権利者：学校法人順天堂

種類：特願

番号：2010-001638

出願年月日：2010/1/7

国内外の別：国内

○取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原晋二 (HAGIWARA SHINJI)

研究者番号：70445568

(2) 研究分担者

谷本光生 (TANIMOTO MITUO)

研究者番号：00420836