

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16175

研究課題名（和文）腎移植患者における血清アディポネクチンおよびエクソソームと血管石灰化との関連

研究課題名（英文）Association between serum adiponectin and exosomes and vascular calcification in patients with kidney transplantation

研究代表者

野村 佳苗（NOMURA, Kanae）

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：60835875

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：アディポネクチンは、抗糖尿病や抗動脈硬化作用を有するアディポサイトカインであり、これまで糖尿病、脂質異常症、心血管合併症の進行抑制に深く関与しているとされてきた。本課題では、アディポネクチンの血管保護作用の機序をエクソソームの視点から明らかにした。移植症例においては、総アディポネクチンと同様高分子および中分子アディポネクチンは女性に高いことが確認された。また、CTの3次元解析により、総アディポネクチンおよび高、中分子アディポネクチンが高い女性は、動脈硬化の進展が小さいことが示された。また培養細胞実験では、アディポネクチン刺激が炎症抑制系のmiRNA発現を増強することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の目的は、腎不全および腎移植症例における血清アディポネクチンが血管石灰化を引き起こす機序を解明する事であった。これまでアディポネクチンと動脈硬化およびmiRNAを関連付けた報告は少なく、重要な結果と考える。今回の結果は、高分子および中分子アディポネクチンが動脈硬化の進展に関与している可能性を示し、アディポネクチンが動脈硬化局所の炎症抑制にmiRNAを介して関与している可能性をしめした。今回得られた結果は、動脈硬化のアディポネクチンおよびmiRNAを介した治療戦略やバイオマーカー開発に重要な知見であり、腎不全症例の動脈硬化研究の礎となる重要な進歩と考える。

研究成果の概要（英文）：Adiponectin is an adipocytokine that has antidiabetic and antiarteriosclerotic effects, and has been thought to be deeply involved in suppressing the progression of diabetes, dyslipidemia, and cardiovascular complications. In this project, we clarified the mechanism of vasoprotective effect of adiponectin from the perspective of exosomes. In kidney transplanted cases, it was confirmed that total adiponectin as well as high-molecular and middle-molecular adiponectin were higher in women. In addition, three-dimensional CT analysis showed that women with high levels of total adiponectin and high and medium-molecular adiponectin had less progression of arteriosclerosis. In addition, cultured cell experiments showed that adiponectin stimulation enhanced the expression of miRNAs in the anti-inflammatory system.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：アディポネクチン 動脈硬化 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

アディポネクチンは、抗糖尿病や抗動脈硬化作用を有するアディポサイトカインであり、これまで糖尿病、脂質異常症、心血管合併症の進行抑制に深く関与しているとされてきた。しかし、腎不全症例では、アディポネクチンが高いにもかかわらず動脈硬化が進行する“アディポネクチンパラドックス”など未解明の部分も多かった。申請者らのこれまでの検討により、このような現象の一部は、病態により分子量の異なるアディポネクチンが関与する可能性を明らかにした。アディポネクチンは多量体構造をとり、高分子量、中分子量、低分子量に分類される。

我々は、これまでに腎移植症例において、高分子量アディポネクチンの増加は、HDL-コレステロールと関連し、動脈石灰化の進行を抑制することを報告してきた。しかし、アディポネクチンの血管保護作用の詳細な機序は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腎不全および腎移植症例における血清アディポネクチンが血管石灰化を引き起こす機序を解明する事である。本研究は、近年解明され始めたアディポネクチン刺激によるエクソソーム発現という視点を加える事により、その作用機序を明らかにしようとする創造性の高い研究である。大動脈石灰化の3次元的定量評価およびアディポネクチン受容体であるAdipoR1とAdipoR2に対するアゴニストである、AdipoRonを用いた細胞実験にて、エクソソーム(miRNA)の発現を検討した。

3. 研究の方法

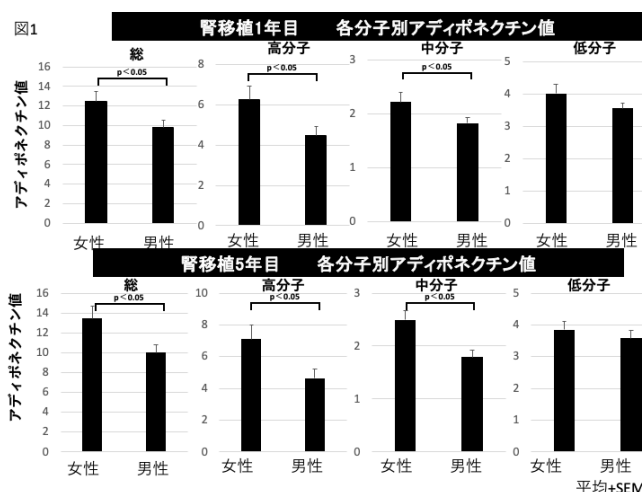
腎不全患者および腎移植患者 51 例におけるアディポネクチンおよびエクソソームが動脈硬化形成に果たす役割に関して検討を進めた。血清アディポネクチン 分画(高・中・低分子アディポネクチン)について、ELISA キットを用いて測定した。

また、腎不全症例 28 例(女性 61%)を対象に、腹部単純 CT より動脈硬化の動脈硬化病変と大動脈の体積を 3 次元的に解析した。腹部 CT の画像から、大動脈および大動脈の石灰化部位を 3 次元的に再構築し、大動脈体積に対する動脈硬化部位の体積の割合で検討した。対象部位は、横隔膜上縁のスライスから総腸骨動脈分岐部までのスライスとした。対象期間内の動脈硬化の変化を年率の割合として評価した。

くわえて、細胞実験では、血管内皮細胞、脂肪細胞、尿管上皮細胞を用いて、アディポネクチンによるエクソソーム発現を検証した。細胞を、 8×10^4 cells/6cm dish で播き、翌日、exosome depleted FBS medium で 1 回リンスした。その後、exosome depleted FBS medium にて AdipoRon を 0 あるいは 50 nM で 48hr で培養し、細胞培養上清を Minisart NML Hydrophilic 16592-K フィルターに通し細胞成分を除去した。フィルター後の上清を exoRNeasy mini kit (QIAGEN 77144) を使用し、exosome の回収と miRNA 抽出した。その際 spike in control (内部コントロール) として cel-mir-39-3p 50pM を 10ul を用いた。TaqManTM Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit(thermofisher A28007)を使用し cDNA 合成した。cDNA を 10 倍希釈し、リアルタイム PCR を行った。primer and probe は、has-mir-21-5p、has-mir-124-3p、has-mir-126-5p、has-mir-150-5p、has-mir-223-3p、has-mir-133a-3p、has-mir-185-5p、has-mir-200c-3p、has-mir-875-5p、cel-mir-39-3p (コントロール) を用いた。

4. 研究成果

移植症例におけるアディポネクチンの測定を、移植 1 年後および 5 年後の検体を用いて行った。移植時の年齢、ドナー年齢、性別などで群間比較を行ったところ、性別が最も大きくアディポネクチン値に影響を与える因子であった。そこで、以下の検討を、性別を中心に解析を進めた。腎移植 1 年目のアディポネクチン平均値は、総アディポネクチンは女性 9.8、男性 12.5 $\mu\text{g/mL}$ であり、女性が高値であった(図1)。内訳では、高分子アディポネクチン、中分子アディポネクチンは、総アディポネクチンと同様女性が高値であった(高分子; 女性 6.3、男性 4.5 $\mu\text{g/mL}$ 、中分子; 女性 2.2、男性 1.8 $\mu\text{g/mL}$)。一方、低分子アディポネクチンは、女性 4.0、男性 3.6 $\mu\text{g/mL}$ であり、両者に差はなかった。この傾向は、腎移植 5 年目でも同様であった(総; 女性 13.5、男



性 10.0 $\mu\text{g/mL}$, 高分子 ; 女性 7.2 , 男性 4.7 $\mu\text{g/mL}$, 中分子 ; 女性 2.5 , 男性 1.8 $\mu\text{g/mL}$, 小分子 ; 女性 3.9 , 男性 3.6 $\mu\text{g/mL}$, 図 1)。

移植 1 年目と 5 年目で同様の傾向があったため、それぞれのアディポネクチンの移植 1 年目と 5 年目の相関を検討した。総アディポネクチンおよび各分画のアディポネクチンともに正相関を示した (相関係数、総 0.737、高分子 0.775、中分子 0.380、低分子 0.604) (図 2)。一方性別ごとのアディポネクチンの変化を確認したところ、高分子と低分子アディポネクチンは、男性で増加していた。これら結果から、基本的には総アディポネクチンと同様高分子および中分子アディポネクチンは女性に高いことが確認された (図 2)。

そこで、次に腎不全症例における動脈硬化の進展を、CT 画像の 3 次元解析により行った。

対象者の初回 CT 撮像時の年齢は、中央値 76 歳 (四分位 71, 86 歳) であり、観察期間は、中央値 858 日 (四分位 406, 1213 日) であった。観察初めの大動脈石灰化体 積の中央値は 7.4 cm^2 (四分位 4.4, 13.5) であり、大動脈の体積は、中央値は 76.0 cm^2 (四分位 71.5, 86.0) であった。一方、最終観察時の大動脈石灰化体 積の中央値は 10.0 cm^2 (四分位 6.1, 17.5 観察初めの大動脈の体積の中央値は 86.7 cm^2 (四分位 72.0, 127.9) であった。大動脈体積に占める動脈硬化病変の体積の割合は観察開始時で中央値は 7.0% (四分位 4.7, 13.5) であった。また、観察期間内での脈硬化の進行は、1 年当たり中央値で 0.7% (四分位 0.4, 1.3) で あった。

アディポネクチン値が性別で差を認めること、また、それが分子サイズで異なる傾向にあることから、動脈硬化の程度及び進展を性別で比較検討したところ、観察開始時の動脈硬化は、男性に高度であったが有意差はなかった (女性 8.5%、男性 11.0%)。また、観察期間内の年率の動脈硬化の進展は、女性 0.92% / 年、男性 1.33% / 年で男性のほうが、進展が大きかった (図 3)。総アディポネクチンおよび高、中分子アディポネクチンは女性に高く、動脈硬化の進展に影響している可能性が推測された。

最後に、アディポネクチンが動脈硬化に与える影響を、エクソゾームの視点から解析した。動脈硬化への影響を明らかにするため、特に血管内皮細胞の検討に注力した。研究期間内にも、いくつかの先駆的な報告がされたため、それらを参考に特定の miRNA を対象に検討を進めた。エクソゾームの発現は、細胞の培養条件や刺激、時間経過で大きく変化することが明らかとなった。多数の繰り返し実験の中から、再現性が得られた 48 時間の発現変化を解析した。対象とした 9 の miRNA のうち、発現増強が見られたのは、has-mir-21-5p、has-mir-126-5p、has-mir-150-5p、has-mir-200c-3p の 4 種類であった (図 4)。本条件では、極端な発現低下を認めた miRNA はなかった。(細胞種や AdipoRon の濃度、刺激時間によっては、発現低下を認めることもあったが、再現性が十分ではなかったことも含めてその意義は明らかにはできなかった。) これら miRNA は、腫瘍細胞の解析が多く、種々の腫瘍細胞の増殖抑制に関与していることが示されている。また、抗炎症硬化を示す miRNA との報告もある。動脈硬化は、局所の炎症と捉える考え方もあり、アディポネクチンが局所の炎症抑制に関与しているというストーリーは興味深いものとも考える。これまでアディポネクチンと動脈硬化および miRNA を関連付けた報告は少なく、重要な結果と考える。

今回得られた結果は、動脈硬化のディポネクチンおよび miRNA を介した治療戦略やバイオマーカー開発に重要な知見と考えられるとともに、我々もさらなる検討を重ねる予定である。

図2 1年目(縦軸)5年目(横軸)の相関 各分子別アディポネクチン

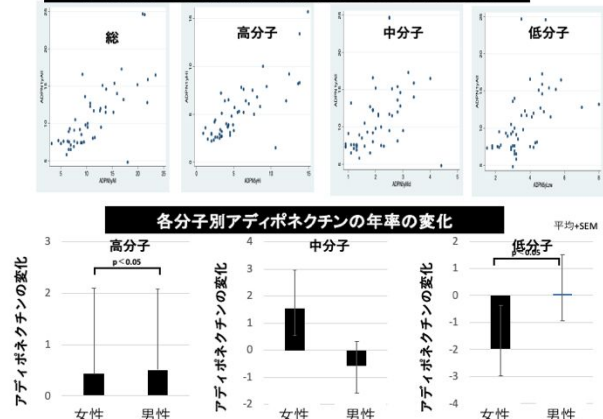


図3

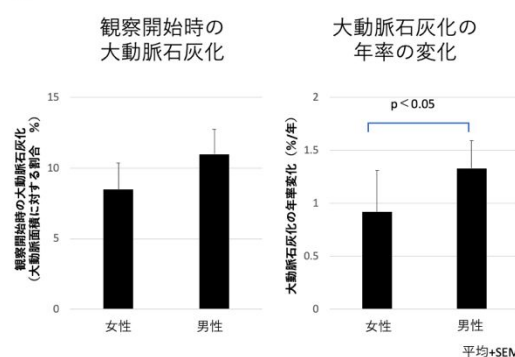
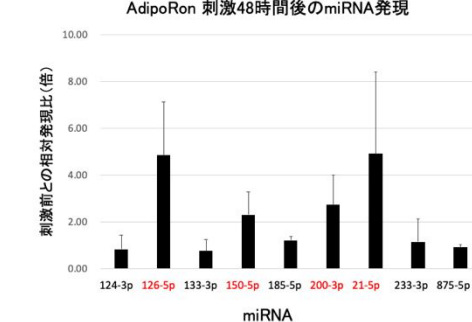


図4



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------