

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25年4月23日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590901

研究課題名（和文） 高血圧性腎障害に特化した脂肪酸結合蛋白の機能解析

研究課題名（英文） Functional Analysis of fatty acid binding protein in hypertensive renal injury

研究代表者

池森 敦子（上條）（IKEMORI ATSUKO）

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80350635

研究成果の概要（和文）：

野生型(WT)マウスと L-FABP 染色体遺伝子導入(Tg)マウスに Ang II を 4 週間投与し、高血圧性腎障害モデルを作成した。WT マウスと Tg マウスでは、同程度の高血圧を発症したが、腎臓の炎症性サイトカイン、コラーゲン type I, III 発現は、Tg マウスで有意に抑制された。Tg マウスにおける L-FABP 発現は、Ang II 投与で有意に増加した。また、腎臓における過酸化脂質の蓄積は、Tg マウスで有意に抑制された。これらの結果から、高血圧性腎障害において、腎臓の L-FABP は、血圧非依存的に腎臓を保護することが示された。

研究成果の概要（英文）：

Angiotensin II was infused systemically into human liver type fatty acid binding protein (L-FABP) chromosomal transgenic (Tg) and wild type (WT) mice for 4 weeks. Although blood pressure levels in both groups increased to a similar extent, expressions of inflammatory cytokines and collagen type I or III were significantly attenuated in the Tg mice compared to the WT mice. The expression of L-FABP increased in the Tg mice by Ang II infusion and the accumulation of peroxidative products was significantly inhibited in the Tg mice than in the WT mice. From these results, renal L-FABP attenuated the hypertensive renal injury independent on blood pressure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：腎臓内科

科研費の分科・細目：7205

キーワード：L-FABP, 腎疾患、高血圧、治療、高血圧性腎障害、アンジオテンシン II、尿細管間質障害

1. 研究開始当初の背景

高血圧性腎障害（腎硬化症）は、血液透析導入原因疾患の第3位であり(日本透析

学会編, 2011)、増加の一途をたどっており、慢性透析患者数の増加の原因となっている。

この背景には、国民の高齢化に加え、メタボリックシンドロームを背景とした動脈硬化症の増加があると考えられる。

腎機能障害を伴う高血圧性腎障害の進行を抑制するためには、降圧剤による血圧コントロールが必須であるが、この治療だけでは腎障害の進行抑制は、不十分であり、新規の腎疾患治療薬の開発が必要である。

2. 研究の目的

FABP は細胞内の脂肪酸をミトコンドリアやペルオキシソームに輸送し、脂肪酸代謝を促進する事により、また自らが転写因子となり脂肪酸代謝を促進する遺伝子群の発現を調節する事により、細胞内の脂肪酸による酸化ストレスを緩和している脂肪酸メディエーターである。ヒト腎臓の近位尿細管には、肝臓型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) が発現しているが、マウスの腎臓には、L-FABP が発現していないことから、われわれはヒト L-FABP 染色体遺伝子導入(Tg)マウスを作成した。このマウスには転写調節領域を含めたヒト L-FABP 遺伝子を導入しているため、マウスでのヒト L-FABP 発現はヒトと同様の転写調節を受けている。

今回、腎臓における L-FABP の発現が、高血圧性腎障害の進行を抑制することを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、高血圧性腎障害モデルとしてアンジオテンシン II (Ang II) 投与マウスを用いる。高血圧性腎障害の程度を高血圧発症 L-FABP 遺伝子導入(Tg)マウスと高血圧発症野生型(WT)マウスとで比較する。

(1) 高血圧モデル作成

・ヒト Ang II を浸透圧ポンプに注入し、野生型マウスおよびL-FABP Tg マウスの皮下に植

え込む。

(2) 腎障害の評価

①血圧測定：1, 2, 3, 4 週後に測定。

②尿中パラメーターの測定：2, 4 週後に代謝ケージで採尿し、尿中アルブミン・NAG・クレアチニン・L-FABP を ELISA で測定。

③血中パラメーターの測定：4 週後に採血し、血清クレアチニン・尿素窒素を測定。

④2, 4 週後に腎臓を摘出し、形態学的検討 (PAS 染色、AZAN 染色)、間質マクロファージ浸潤の程度の検討(F4/80 抗原に対する抗体を使用した免疫染色)、間質線維化 (コラーゲン type I および type III の免疫染色) の検討。

⑤摘出された腎臓から遺伝子を抽出し、L-FABP ・ 間質線維化を誘導する遺伝子 (MCP-1、コラーゲン type I および type III) の発現を real-time PCR で検討。

⑥摘出された腎臓から蛋白を抽出し、L-FABP・MCP-1 の蛋白発現を ELISA で検討。

(3) L-FABP の抗酸化作用の検討

高血圧発症 Tg マウスと高血圧発症 WT マウスの腎臓に蓄積された過酸化脂質量(HEL) を ELISA で検討。

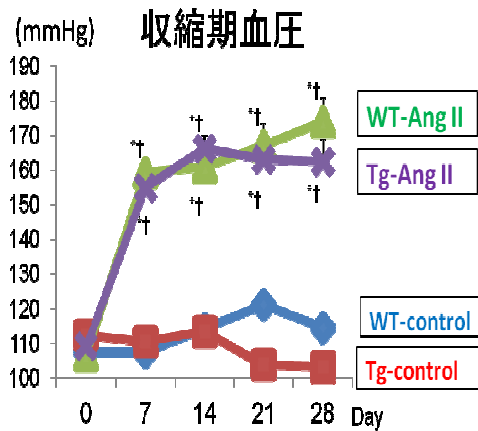
(4) 腎組織における Ang II 受容体と L-FABP の相互作用

① Ang II 受容体には、AT1a, AT1b, AT2 のアイソタイプがあるが、腎障害と強く関係しているタイプは、AT1a である。そのため、AT1a 欠損ホモマウスと Tg マウスを掛け合わせ、Tg- AT1a 欠損ヘテロ(Tg-Ko)マウスを作成する。AT1a 欠損マウスは、AT1a の欠損部位に Lac Z カセットを導入しているため(knock-in)、Lac Z 染色をすることにより、組織における AT1a 部位を同定できる。

② Tg-Ko マウスに上記同様の Ang II を皮下に移植し、4 週間後に腎臓を摘出。Lac Z 染色と L-FABP 染色の 2 重染色を行い、Ang II 活性化部位と L-FABP 発現部位を同定する。

4. 研究成果

(1) Tg マウスおよび WT マウスともに Ang II 投与で有意な血圧上昇を認めたが、その程度は、同程度であった。



(2) 尿中マウスアルブミン排泄は、Tg マウスおよび WT マウスともに Ang II 投与で有意に上昇したが、その程度は、同程度であった。

(3) 尿細管障害のマーカーである尿中 NAG は、Tg マウスおよび WT マウスともに Ang II 投与で有意に上昇したが、Tg マウスでは、WT マウスにくらべ、有意に低値であった。

(4) 腎臓の MCP-1 遺伝子・蛋白発現は、Tg マウスおよび WT マウスともに Ang II 投与で有意に上昇したが、Tg マウスでは、WT マウスにくらべ、有意に抑制された。

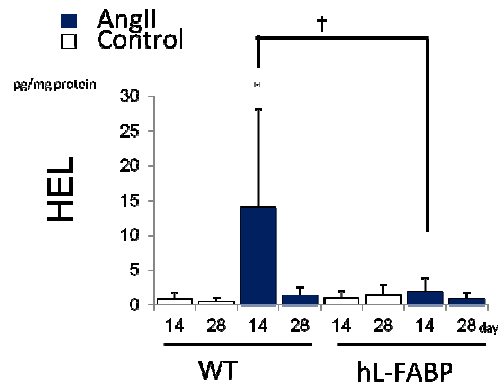
(5) 腎臓のコラーゲン Type I および Type III 遺伝子発現は、Tg マウスおよび WT マウスともに Ang II 投与で有意に上昇したが、Tg マウスでは、WT マウスにくらべ、有意に抑制された。

(6) 間質のマクロファージ浸潤および間質のコラーゲン type I および III 沈着は、Tg マウスおよび WT マウスともに Ang II 投与で有意に増加したが、Tg マウスでは、WT マウスにくらべ、有意に抑制された。また、PAS 染色で評価した尿細管障害や AZAN 染色で評価した間質線維化も、Tg マウスでは、WT マウスにくらべ、有意に抑制された。

(7) Tg マウスの L-FABP 遺伝子・蛋白発現および尿中 L-FABP 発現は、Ang II 投与によ

り有意に増加した。その部位は、Ang II 受容体 AT1aR の発現部位と一致していた。

(8) 腎臓の HEL は、Ang II 投与の WT マウスで有意に増加したが、Tg マウスでは増加を認めず、WT マウスの HEL レベルに比べ、有意に抑制されていた。



*p < 0.05 Ang II vs control, †p < 0.05 Tg vs WT

(9) これらの結果から、腎臓に発現している L-FABP は、抗酸化作用をもち、高血圧性腎障害を抑制する蛋白であることが示された。今後、L-FABP 発現増強薬の開発を目指して研究を行ってきたい。

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 1 件)

① Ichikawa D, Kami-jo-Ikemori Atsuko, et al, Renal Liver-Type Fatty Acid Binding Protein Attenuates Angiotensin II-induced Renal Injury. Hypertension, 査読有, vol 60, p973-980, 2012.

[学会発表] (計 4 件)

① 池森敦子、腎臓に発現するヒト肝臓型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) の血圧非依存性臓器保護作用—アンジオテンシン II 腎症における検討、日本解剖学会総会・全国学術集会、2013 年 3 月 29 日、サンポートホール高松

② Daisuke Ichikawa, Renal Liver-Type Fatty Acid Binding Protein Attenuates Angiotensin II-Induced Renal Injury. 日本循環器学会学術総会、2013 年 3 月 16 日、パシフィコ横浜

③ 市川大介、高血圧性腎障害における尿中

L 型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)の意義、日本腎臓学会学術総会、2012年6月3日、パシフィコ横浜

④ 池森敦子、高血圧性腎障害におけるL型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)の動態、日本解剖学会総会・全国学術集会、2012年3月26日、山梨大学甲府キャンパス

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池森 敦子 (IKEMORI ATSUKO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80350635

(2) 研究分担者

菅谷 健 (SUGAYA TAKESHI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：40381561

木村 健二郎 (KIMURA KENJIRO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：00161555

(3) 連携研究者

なし

