

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月7日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659418

研究課題名（和文） 腎による脂質代謝調節とリポタンパク質産生

研究課題名（英文） Lipid Metabolism and Lipoprotein Production in Kidney

研究代表者

名取 泰博 (NATORI YASUHIRO)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：10164485

研究成果の概要（和文）：正常の腎臓に脂質が蓄積することはないが、進行性の腎臓病になるとしばしば脂質が尿細管上皮細胞に蓄積する。我々はこれまでに腎疾患動物モデルを用いた研究から、肝臓での脂質代謝を活性化する薬物が、病的状態で腎に蓄積した脂質を減少させ、さらに症状を軽減させることを明らかにしている。本研究では、この機序の一つとして、脂質輸送に関与すると考えられているアポリポタンパク質Mの腎における発現が、この薬物により増加することが関与する可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In normal condition, lipid accumulation is not observed in the kidney. In progressive kidney diseases, however, lipid is commonly accumulated in tubular epithelial cells of the kidney. We previously showed that LXR agonist, a drug known to activate lipid metabolism in the liver, reduced accumulated lipid in diseased kidney, and also urinary protein level in an animal model. In the present study, we have proposed that the induction of apolipoprotein M in the kidney by the drug is a part of its therapeutic effect for the kidney disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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

(1) 生理的状态における腎の脂質代謝

正常な腎糸球体による血液ろ過では微量の血清アルブミンが原尿中に漏れることが知られており、そのほとんどは近位尿細管上皮細胞に再吸収される。アルブミンに結合した脂肪酸も同細胞に取り込まれ、何らかの形で血中に戻ると想像されるが、その経路はほとんど不明である。

(2) 腎障害時における脂質の再吸収、蓄積及び排出

種々の腎症において、タンパク尿が出現

すると原尿中の脂質も増加し、そのため尿細管上皮細胞への脂質の蓄積が起きることが、臨床例や動物モデルで観察されている。選択性の良い微小変化型ネフローゼでは増加する尿タンパクはアルブミン主体であるため脂質の中身の大部分は脂肪酸だが、選択性の悪いタンパク尿では血漿リポタンパク質も原尿中に漏れることから、同細胞に蓄積する脂質には大量のコレステロールエステルも含まれると考えられる。実際、我々がネフローゼ動物モデルで調べたところ、オイルレッドO陽性の細胞は、エステラー

ぜ処理後のフィリピン染色も陽性であり、この細胞の脂肪滴にはコレステロールエステルが含まれることがわかっている。さらに我々は、高度のタンパク尿が出現した初期に顕著に見られた脂肪滴は、その後タンパク尿が持続しているにも関わらず次第に減少すること、このとき細胞内コレステロール排出に重要な ABCA1 の発現が増加していることも見いだしている。これらの結果は、細胞内の脂質蓄積による脂質排出機構の活性化を示唆するが、その機序はわかっていない。

(3) 腎障害時における脂質産生の増加

腎に脂質が蓄積すると、腎による脂質合成が亢進することも報告されているが (J Biol Chem 280:32317, 2005; J Am Soc Nephrol 18:2715, 2007)、その意義や脂質蓄積への寄与は不明である。

(4) 腎におけるアポリポタンパク質産生

以前から腎によるアポリポタンパク質 E (アポ E、以下同様) 産生が知られており、また我々は上記動物モデルにおいてアポ E 産生が亢進することを見いだしている。さらに HDL に存在するアポリポタンパク質として同定されたアポ M は、腎において肝と同程度の量が産生され (J Biol Chem 274:31286, 1999)、その産生細胞が尿細管上皮細胞である (Acta Histochem 105:67, 2003) ことが知られている。最近、マウス腎によるアポ B 産生も報告された (J Biol Chem 285:10583, 2010)。しかし、腎が産生するこれらのタンパク質の役割は不明であり、腎の病態時における挙動の報告はない。

2. 研究の目的

生体における脂質代謝の主役は肝臓であり、生体内の脂質輸送の中心的役割を担うリポタンパク質の産生は主に肝臓で行われる。加えて小腸及び脳も各々の機能と関連して脂質代謝への関与やリポタンパク質産生能が知られている。しかし全身の脂質代謝における腎臓の関与についてはほとんど注目されていない。本研究は、腎における脂質代謝の分子機構を明らかにすること、その機構の中に進行性腎疾患の治療標的を探すことを最終目標として、腎がリポタンパク質の産生臓器であることの証明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腎尿細管上皮細胞の初代培養

ラットから採取した腎を無菌条件下で薄切し、既報に従って牛血清アルブミン存在下でインキュベーション後に密度勾配遠心

により近位尿細管画分を得る。それを 5%炭酸ガス存在下で培養し、数日後に尿細管からはえてきた (outgrowth) 細胞を実験に用いた。

(2) アポ M 遺伝子を発現するラット腎尿細管由来培養細胞 NRK52E 細胞の樹立

培養 NRK52E 細胞にアポ M 発現遺伝子 (pSwitch-ApoM) を遺伝子導入し、選択培地により薬剤耐性コロニーをクローニングした。クローニングした細胞株の中からミフェプリストンで発現が誘導されるアポ M 発現株を樹立した。

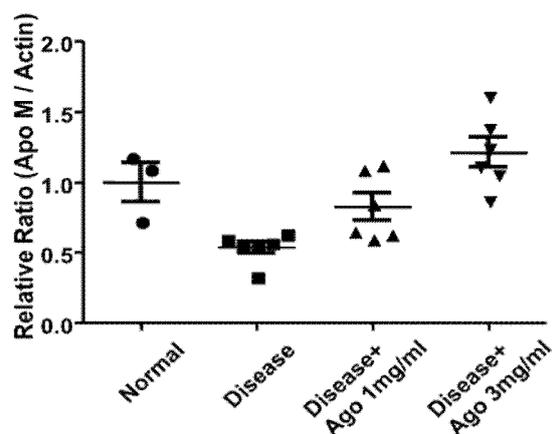
(3) ラットネフローゼモデルの作製及び LXR アゴニストの投与

ウィスター系ラットにピューロマイシンアミノヌクレオシドを投与することにより作製した。同モデルでは投与後 5 日目頃から尿タンパク量が増加し、10 日目頃には典型的なネフローゼ症候群を呈する。このモデルの 7 日目からアゴニストを 7 日間連続投与し、14 日目に屠殺して腎の解析を行った。

4. 研究成果

これまで腎での発現が報告されているが、その機能が不明なアポ M について、ラットネフローゼモデルにおける発現を調べたところ、タンパク尿が顕著になる時期に一致してアポ M の mRNA 発現が低下していることがわかった。我々は既に同モデルにおいて、脂質代謝調節に重要な核内受容体 LXR のアゴニストが尿タンパクを減少させ、さらに腎に蓄積している脂質を顕著に減少させることを明らかにしている。そこで、この時期のアポ M の mRNA 発現を調べたところ、アゴニストの用量依存的に増加していることがわかった

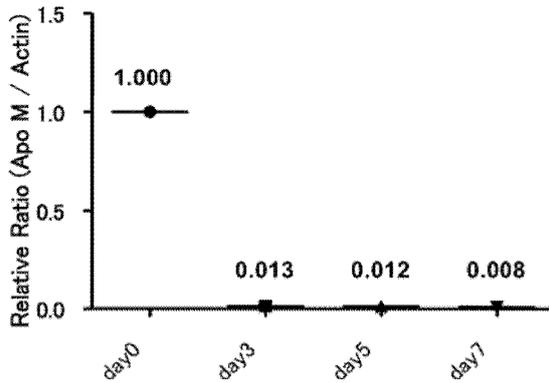
図1 ラットネフローゼモデルにおけるアポM mRNAの発現



(図 1)。

次に腎における脂質代謝調節を詳細に調べるために、腎尿細管上皮細胞の培養系を用いた実験を行った。同細胞の培養系として確立されている NRK52E (ラット) 及び HK-2 (ヒト) 細胞ではアポ M の mRNA の発現は非常に低く、また LXR アゴニストの添加でも発現増加は見られなかった (図略)。また単離したラット腎近位尿細管では肝に匹敵するくらいの高発現が見られるのに対して、同上皮細胞の初代培養系では、培養 3 日目で既に尿細管分離時の 1% 程度にまで低下していた (図 2)。我々はこれまで同じ方法を用いて近位

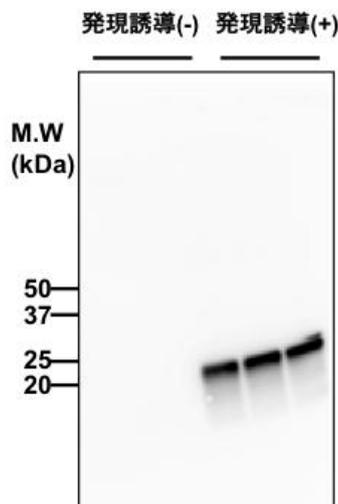
図2 腎近位尿細管上皮細胞の初代培養系におけるアポM mRNAの発現



尿細管に高発現するメガリン、HNF4 などの mRNA 発現も見したが、いずれも培養直後から急激に低下することが見られたことから、アポ M もこれら近位尿細管の分化と非常に密接な発現制御を受けていることが示唆された。

当初の計画では、培養によって多少発現が下がっても、それを用いて実験を行う予定であったが、生体内の 1% 前後の発現では、腎疾患における脂質代謝の出来事を反映すると

図3 アポM安定発現株培養上清のWesternBlot



は考えにくいいため、次善の策として、アポ M の強制発現系を用いることにした。腎尿細管

上皮由来の NRK52E 細胞にアポ M 遺伝子を導入し、その発現をミフェプリストンの有無によって制御できる系を用いた (図 3)。

この細胞を牛胎児血清存在下で培養すると、細胞内にオイルレッド O で染色される脂質の蓄積が観察されるが (図 4 上)、アポ M を発現誘導するとその染色が顕著に減少した (図 4 下)。これを画像解析処理により定量したところ、アポ M の発現誘導により細胞内脂質が有意に減少することが示された (図 5)。以上、人工の系ではあるがアポ M の発

図4 アポM安定発現株のOilRedO染色

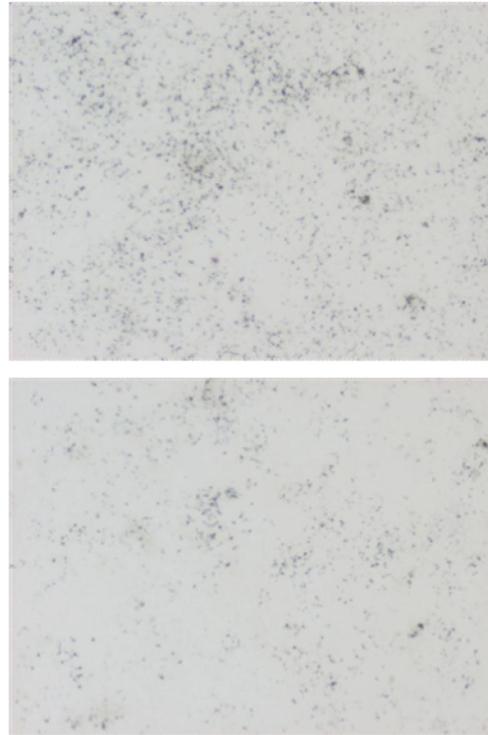
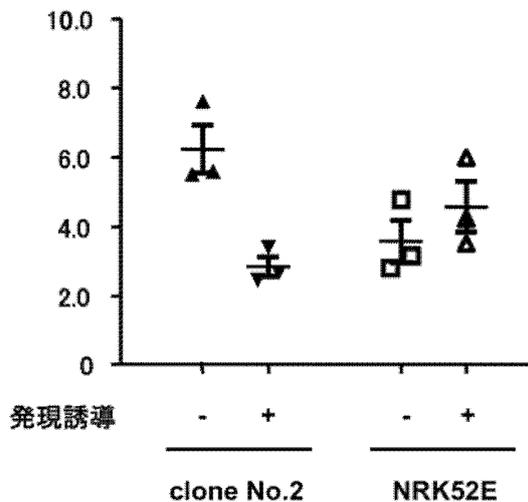


図5 アポM安定発現株の脂質蓄積



現上昇が腎尿細管上皮細胞内の脂質を減少させたことから、腎疾患動物モデル腎における脂質の排出に関与する可能性が示唆された。

これまで培養細胞を用いたアポMの研究は主に肝細胞を用いており、当研究室でもヒト由来として有名な培養細胞である HepG2 細胞を対照として用いたが高い発現が見られた。そのことから腎由来の細胞でも、ある程度のアポMの発現を予測し、特に初代培養ならば生体内に近いことを期待して本研究の計画を立てたが、残念ながら近位尿細管上皮細胞の初代培養でも培養開始3日目で、特に注目していたアポMの発現が顕著に低下していたことから、当初に考えていた実験を行うことはできなかった。本研究の期間は終了したが、今後、単離した近位尿細管を増殖させずにそのままの形でインキュベートしたものを用いて、リポタンパク質の産生や脂質蓄積の状況を調べたいと考えている。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

名取 泰博 (NATORI YASUHIRO)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：10164485