

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670407

研究課題名(和文)リン脂質代謝を介する腎障害の新たな分子機構の解明

研究課題名(英文)Role of phospholipid metabolism in the pathophysiology of renal injury

研究代表者

菅波 孝祥(SUGANAMI, Takayoshi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・寄附講座教授

研究者番号：50343752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：最近、開発された質量顕微鏡は、位置情報を保持したまま質量分析を行う画期的な解析手法であり、解剖学的、生理機能的に複雑な腎臓は質量顕微鏡による解析の格好の標的と言える。本研究では、虚血再灌流傷害による急性腎不全モデルにおいて質量顕微鏡解析を施行し、部位特異的なホスファチジルコリンの質的・量的変化を観察した。トランスクリプトーム解析では、ホスファチジルコリン代謝酵素群の遺伝子発現プロファイルの変化を認めた。質量顕微鏡は、腎傷害時における局所の代謝変化を明らかにする有用な解析手法と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Imaging mass microscope is a novel technique that is a combination of an optical microscope with a mass spectrometer, which enables us to know what kind of molecules are located in the region of interest. Kidney, which is complex anatomically and physiologically, may be a good target of imaging mass spectrometry. In this study, we induced renal ischemia-reperfusion injury as an acute kidney injury model and observed area-specific changes in quality and quantity of phosphatidylcholine. Consistently, transcriptome analysis revealed that mRNA expression of a series of enzymes of phosphatidylcholine metabolism was harmoniously regulated under these conditions. These observations suggest that imaging mass spectrometry is a powerful technology to investigate the role of local metabolic changes in response to pathophysiologic stresses.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：急性腎不全 質量顕微鏡 リン脂質 尿細管

1. 研究開始当初の背景

近年の解析技術の進歩により、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどの網羅的情報が爆発的に増加しているが、疾患の病態解明には必ずしも至っていない。特に腎臓は、糸球体、尿細管の各セグメント、血管系などから複雑に構成されており、それぞれに特異的な機能が絶妙に組み合わせることによって恒常性が保たれている。従来、*microdissection* 法により各機能ユニットを単離し、網羅的解析に供していたが、操作に伴うアーチファクトや機能ユニット間の連関情報の欠如が問題であった。最近、開発された質量顕微鏡は、位置情報を保持したまま質量分析を行う画期的な解析手法であり、様々な疾患の病態解明に応用が期待されるが、解剖学的、生理機能的に複雑な腎臓は質量顕微鏡による解析の格好の標的と言える。

透析医療の進歩にもかかわらず、急性腎不全は未だ死亡率が 50%を越える重篤な疾患であり、新たな治療戦略の開発が急務である。急性腎不全の病態生理に関しては、虚血再灌流障害モデルを用いた検討が数多く行われており、酸化ストレスや小胞体ストレスによる尿細管上皮細胞の障害と、それに引き続く炎症細胞の浸潤などにより形成される。この際、近位尿細管 S3 セグメントを中心に組織障害が認められるが、従来の解析手法では、障害部位に限局した代謝変化を網羅的に解析することは不可能であった。

2. 研究の目的

最近、生体膜（脂質二重膜）のリン脂質組成が変化することにより、小胞体ストレス応答が制御されることが知られている (*Mol. Cell* 48:1-12, 2012; *Nature* 473:528-531, 2011)。腎虚血再灌流障害において、小胞体ストレス応答の過剰な活性化は尿細管細胞障害を誘導するため (*Nephron Exp. Nephrol.* 112:e1-e9, 2009)、リン脂質代謝の変化による新たな腎障害の分子機構が想定される。本研究では、腎虚血再灌流による急性腎不全モデルにおいて、障害部位に限局した代謝変化を網羅的に解析することにより、病態生理の理解を深め、新しいバイオマーカーや治療戦略の開発に応用することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腎虚血再灌流障害モデル：

C57BL/6J マウスを麻酔下に右腎を摘出、左腎を 30 分間クランプした後に開放して作製し、7 日目まで観察した。

(2) Real-time PCR：

腎障害惹起後、7 日目まで経時的にサンプリングし、whole kidney より total RNA を抽出、real-time PCR 法により mRNA レベルを測定した。

(3) 組織学的解析：

腎障害惹起後、7 日目まで経時的にサンプリングし、定法に従って、ヘマトキシリン・エオジン染色、PAS 染色を施行した。

(4) 培養細胞：

尿細管上皮細胞として mProx24 マウス尿細管上皮細胞株を用いた。1%酸素濃度で mProx24 を 18 時間培養後に通常培養環境に戻し (20%酸素)、4, 8, 24 時間でサンプリングして real-time PCR 法により mRNA レベルを検出した。

(5) 質量顕微鏡解析：

対照 sham 群、腎障害 6 時間および 24 時間後の腎組織を各 3 個体ずつ用いて、質量顕微鏡解析を行った。凍結切片 (8 μ m 厚) を作製し、マトリックスは 50mg/ml DHB in 70% MeOH/0.1% TFA を用いた。

4. 研究成果

(1) 質量顕微鏡解析：

正常腎において、各ホスファチジルコリンに相当するシグナルを検出した。腎門部を中心として、腎皮質部～皮髓境界部～腎髓質にかけて、脂肪酸種類の異なるホスファチジルコリンが同心円状に観察された。セグメント特異的な尿細管機能にホスファチジルコリンの質的变化が関わっていることが示唆される。

虚血再灌流傷害を惹起して、6 時間と 24 時間後に同様の解析を施行したところ、各ホスファチジルコリン種はダイナミックに増減し、腎局所における傷害や代謝の変化を反映していると考えられた。特に、腎傷害の強い非髓境界部に着目したところ、PC (16:0/18:0)、PC (16:0/18:1)、PC (16:0/18:2)、PC (18:0/18:2) が増加する一方、PC (16:0/22:6) が減少したと考えられた。各 m/z 値に対応する候補分子が複数存在する場合があります。正確な同定には MS/MS 解析を行う必要がある。

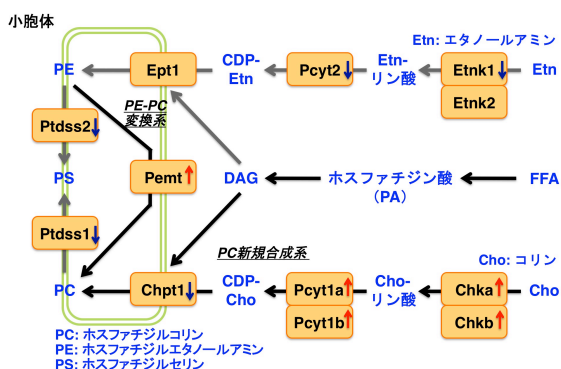
(2) 腎虚血再灌流傷害のトランスクリプトーム解析：

虚血再灌流傷害の後、経時的に腎臓をサンプリングし、遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。その結果、ホスファチジルコリンの量的制御に関わる 2 経路 (ホスファチジルコリン新規合成系とホスファチジルエタノールアミン-ホスファチジルコリン変換系) の代謝酵素群の協調的な発現上昇が認められた。即ち、新規合成系として Chka/Chkb および律速酵素である Pcyt1a/Pcyt1b、変換系として Pemt の発現がそれぞれ有意に上昇した。興味深いことに、ホスファチジルコリンをホスファチジルセリンに代謝する Ptdss の発現は有意に減少し、腎全体としては PC 量を増加させる応答が示唆された。以上のように、腎虚血再灌流傷害により、ホスファチジルコ

リンが量的、質的にダイナミックに変化することが明らかとなり、腎障害における意義が示唆された。

(3) 培養マウス尿細管上皮細胞を用いた検討：

マウス尿細管細胞株 mProx24 を低酸素 (1%) 条件で 18 時間培養後、再酸素化 (酸素 20%) して、虚血再灌流傷害を模倣する細胞系を構築した。この培養細胞系においても、腎虚血再灌流傷害とほぼ同様の遺伝子発現プロファイルの変化を確認した。今後、障害部位局所における遺伝子発現変化を同定し、リン脂質の変化や腎尿細管上皮細胞に及ぼす影響を検討する。最近、リン脂質の脂肪酸種の制御機構が明らかになってきた。虚血再灌流傷害腎や培養尿細管上皮細胞における遺伝子発現変化とリン脂質の変化を比較検討することにより、リン脂質の質的・量的変化や腎障害に及ぼす影響を検討する予定である。



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 2 件)

1. Y. Iwasaki, *T. Suganami, R. Hachiya, I. Shirakawa, M. Kim-Saijo, M. Tanaka, M. Hamaguchi, T. Takai-Igarashi, M. Nakai, Y. Miyamoto, *Y. Ogawa. Activating transcription factor 4 links metabolic stress to interleukin-6 expression in macrophages. **Diabetes** 63: 152-161, 2014.
2. M. Tanaka, K. Ikeda, *T. Suganami, C. Komiya, K. Ochi, I. Shirakawa, M. Hamaguchi, S. Nishimura, I. Manabe, T. Matsuda, K. Kimura, H. Inoue, Y. Inagaki, S. Aoe, S. Yamasaki, *Y. Ogawa. Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. **Nat. Commun.** 5: 4982, 2014.

[学会発表] (計 8 件)

1. 菅波孝祥、伊藤美智子、小川佳宏・メタボリックシンドローム・内臓脂肪蓄積に対する不飽和脂肪酸の有用性・第 36 回日本臨床栄養学会総会/第 35 回日本臨床栄養協会総会/第 12 回大連合大会、

2014.10.4-5、東京

2. 菅波孝祥、小川佳宏・メタボリックシンドロームにおける慢性炎症と異所性脂肪・第 87 回日本内分泌学会、2014.4.24-26、福岡
3. 菅波孝祥、小川佳宏・脂肪組織炎症と異所性脂肪蓄積、インスリン抵抗性・第 91 回日本生理学会、2014.3.16-18、鹿児島
4. 菅波孝祥、小川佳宏・脂肪酸代謝と炎症制御、第 42 回日本病態栄養学会年次学術集会、2014.1.11-12、大阪
5. Takayoshi Suganami, Yoshihiro Ogawa・Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation・International Symposium for the Study of Obesity、2014.10.26、宮崎
6. Takayoshi Suganami, Yoshihiro Ogawa・Adipose tissue inflammation in obesity・第 42 回日本免疫学会学術集会、2013.12.11-13、千葉
7. 菅波孝祥、小川佳宏・自然炎症の観点から捉えた慢性炎症と肥満症・第 34 回日本肥満学会、2013.10.11-12、東京
8. 菅波孝祥、田中 都、越智 梢、白川伊吹、池田賢司、小宮 力、小川佳宏・腎虚血再灌流障害における新規病原体センサー Mincle の意義・第 56 回日本腎臓学会、2013.5.10-12、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/cme/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅波 孝祥 (SUGANAMI, Takayoshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・特任教授
研究者番号：50343752

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
瀬藤 光利 (SETOU, Mitsutoshi)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：20302664

青江 誠一郎 (AOE, Seiichiro)
大妻女子大学・家政学部・教授
研究者番号：90365049

森 潔 (MORI, Kiyoshi)
京都大学・大学院医学研究科・特定准教授
研究者番号：60343232