

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460645

研究課題名(和文) 睡眠時無呼吸症候群-糖尿病性腎症連関(ポドサイト障害と尿中microRNA解析)

研究課題名(英文) Linkage of sleep apnea syndrome and diabetic nephropathy

研究代表者

高橋 直生 (Takahashi, Naoki)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教

研究者番号：30377460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、糖尿病自然発症マウスのBTBR ob/obマウスを間欠的低酸素環境下で飼育し、尿中ポドサイト、尿microRNAの解析を通し、睡眠時無呼吸症候群(SAS)と糖尿病性腎症に介在する分子メカニズムを解析し、SASにおけるポドサイトの細胞質ちぎれ現象の機序を解明することを目標に計画を立案した。しかし、BTBR ob/obマウスの腎病変が予想より軽微で、かつ明らかな性差を認め( > )、同時に多くのマウスを獲得し実験を遂行することが必要であったが、それがもっとも困難であった。作成した少数のマウスを間欠的低酸素環境で飼育したが、予想以上に死亡率が上昇し、慢性期の十分な解析が出来なかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was elucidation of molecular mechanisms between sleep apnea syndrome (SAS) and diabetic nephropathy progression based on urinary podocytes and urinary microRNA of podocytes using BTBR ob/ob mice under intermittent hypoxia environment. However, the kidney lesion of BTBR ob/ob mice was not severer than our expectation and obviously recognized sex differences ( > ). Many male BTBR ob/ob mice were necessary to accomplish this experiment at the same time. But it was the most difficult. Although we obtained several male BTBR ob/ob mice and bred under intermittent hypoxic environment, the death rate was increased more than our expectation. Finally, it was not analyzed enough about BTBR ob/ob mice in chronic intermittent hypoxic condition.

研究分野：検査医学

キーワード：睡眠時無呼吸症候群 糖尿病性腎症 ポドサイト 低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

睡眠時無呼吸症候群 (SAS) では、生体は間欠的低酸素状態に暴露され、その間欠的低酸素刺激は、炎症を惹起する。慢性腎臓病の中でも末期腎不全への進行抑制が急務とされる糖尿病性腎症 (DN) においても、SAS が DN を進行させることが報告され、SAS は DN の増悪因子である可能性が高いが、その機序の詳細は不明である。この SAS と DN に介在する分子メカニズムが解明することで、SAS 合併により DN が悪化している症例を見いだす新たなバイオマーカーの発掘に繋がる。合わせて、低酸素刺激によって増強するポドサイト障害 (shedding) のメカニズムが解明することで、shedding の阻害によりポドサイトを温存するという新たな治療戦略も生まれる。今回、ヒト糖尿病性腎症に酷似した糸球体硬化像を呈することが確認されている BTBR ob/ob マウスを用いて SAS-DN 関連、さらには、ポドサイト障害と尿中 microRNA の意義を検討する。

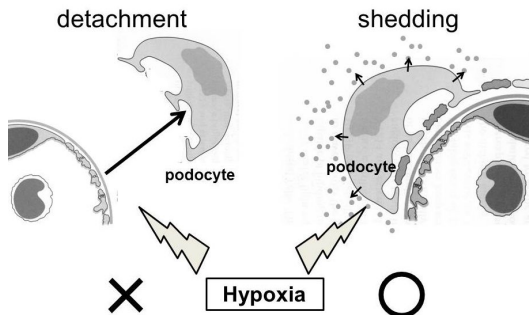


図: 低酸素刺激によるpodocyte障害の作業仮説

## 2. 研究の目的

われわれは、これまで低酸素刺激が腎疾患の重要な増悪因子であることを示す多数の報告をしてきた。近年、間欠的低酸素刺激が、NF-κB の活性化を介して炎症反応を惹起すること、睡眠時無呼吸症候群 (SAS) において、生体は間欠的低酸素状態に暴露されること、糖尿病性腎症 (DN) 患者に SAS の合併が多いことなどから、SAS が DN の増悪因子である可能性が高いが、その機序の詳細は不明である。本研究では、BTBR ob/ob マウスに間欠的低酸素刺激を行い、DN が増悪する機序の詳細を解析する。ポドサイト障害と尿中 microRNA/mRNA 解析を行い、SAS により発現が誘導される DN とは独立した新たなポドサイト関連尿中バイオマーカーを探索する。

## 3. 研究の方法

BTBR ob/ob マウスを SAS に模した間欠期低酸素環境で飼育し、腎組織学評価、尿解析、尿 microRNA/mRNA、ポドサイト障害の解析を行う。不活化ラット培養ポドサイトを用い、ポドサイト障害 (shedding 現象) の機序を各種培養で検討する。cDNA array を用いて、間欠的低酸素刺激が及ぼすマウス糸球体、ある

いは、培養ポドサイトへの影響を網羅的に解析する。得られた候補蛋白が、免疫染色・real time PCR で意義があるものと判断されれば、新たな SAS 誘導性 DN 悪化予測尿中バイオマーカーになるかを検討する。

### (1) BTBR ob/ob マウスの SAS を模した間欠期低酸素環境で飼育

BTBR ob/m ヘテロマウスを Jackson Lab から輸入し、交配する。8 週齢 BTBR ob/ob マウスを間欠的低酸素刺激環境下で飼育する。マウスは夜行性であるため、昼間に 10-30 回の間欠的低酸素刺激を行い、開始前、開始 24、72 時間、1、2、4 週飼育後屠殺する。各群 5 匹割り振る。

### (2) 腎病変評価と間欠的低酸素刺激によるポドサイト剥離に関する検討

血液・蓄尿検査、血圧測定

血糖、Ht、Cr、尿酸の採血を行う。代謝ケージで蓄尿を行い、尿 Alb、尿 Cr、尿 NAG、尿 β2m、尿 8-OHdG を測定する。クレアチニンクリアランスで腎機能を評価する。場合によっては Inulin Kit で GFR を測定する。Tail cuff 型血圧測定器で血圧を測定する。

腎組織の光学顕微鏡的評価

ホルマリン固定した腎組織を PAS、PAM、Trichrome 染色し、腎組織病変の進行を、画像解析ソフトを用いて半定量する。

電子顕微鏡による微細構造の形態評価

25%グルタルアルデヒドで固定後、標準作製し、透過・走査電子顕微鏡で観察する。

ポドサイト剥離に関する検討

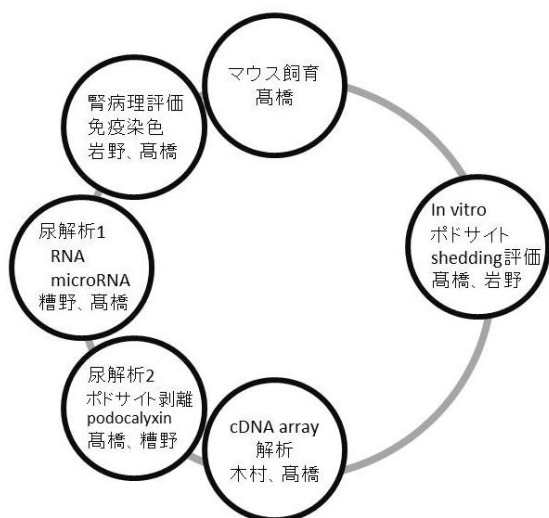
尿ポドカリキシン濃度測定を依頼する (産学連携)。また、尿中に脱落したポドサイトと糸球体ポドサイト数をカウントする。Laser microdissection 法で単離糸球体の RNA を抽出し、real time PCR にて、ポドサイト関連の遺伝子発現を定量的に評価する。

### (3) 尿中 microRNA/mRNA 解析

尿を通常遠心し、沈渣成分を除去後、上清を超遠心して得られた画分を抗ポドカリキシン抗体を用いて濃縮する。RNA 抽出 Kit を用い、microRNA/mRNA を、real time PCR で解析を行う。

### (4) ラット培養ポドサイトにおける間欠的低酸素刺激によるポドサイト shedding の検討

順天堂大学より供与いただいたラット由来培養ポドサイトを 33 でコンフルエントになるまで培養し、37 で 4 日以上分化させる。1%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、94%NO<sub>2</sub> の混合ガスと低酸素チャンバーで 1%O<sub>2</sub> 環境を作り出す。その後、再び正常酸素に戻す反復刺激を行い、上清 ELISA 解析、lyaste のウェスタンブロット、real-time PCR、共焦点レーザー顕微鏡による局在確認を行う。



#### 4. 研究成果

BTBR ob/ob マウスの腎病変は既報の報告より軽微なものにとどまり、かつ明らかな性差を認められた(♂ > ♀)。そこで、同時に多くの♂マウスを獲得し、本実験を遂行することが必要であったが、それがもっとも困難であった。何とか作成した少数のマウスを間欠的低酸素環境で飼育したが、今度は予想以上に死亡率が上昇し、慢性期(長期)の十分な解析が出来なかった。

一方、*in vitro* の不活化ポドサイトの検討では、低酸素チャンパー内は間違いなく低酸素環境になったが、液体の培地内が低酸素になるまでの時間が明確にならず、間欠的低酸素刺激をどれ位の頻度・どれ位の回数で行えば、培地内まで至適間欠的低酸素環境に出来るのかの予備実験に時間がかかり、TaqMan probe を用いた real time PCR による mRNA の検討でも再現性の乏しいデータしか得られなかった。また、同実験系の培養上清中のポドカリキシン濃度の測定を行ったが、有意な差を認めなかった。

加えて、beads を用いてマウスの糸球体を単離し上記と同様の *in vitro* 実験を行ったが、糸球体を単離してしまうと速やかにポドサイト由来の mRNA の減少が始まり(特にネフリン)、24 時間後には半分以下になったため、単離糸球体は shedding 現象の検討材料として不適切であることが分かった。

#### 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 3 件)

N Takahashi, K Kasuno, H Kimura, M Iwano. A heterozygous female with Fabry disease due to a novel  $\alpha$ -galactosidase A mutation exhibits a unique synaptopodin distribution in vacuolated podocytes. **Clin Nephrol.** 83 (2015) 301-308. (査読有)

N Takahashi (8 人中 5 番目) Clinical and biochemical investigation of male patients exhibiting membranous cytoplasmic bodies in biopsied kidney tissues; a pitfall in diagnosis of Fabry disease. **J Nephropathol** 4 (2015) 91-96. (査読有)

H Kimura, N Takahashi, M Iwano (10 人中 2, 3, 10 番目) Renal resistive index correlates with peritubular capillary loss and arteriosclerosis in biopsy tissues from patients with chronic kidney disease. **Clin Exp Nephrol.** 19 (2015) 1114-1119. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

Naoki Takahashi, Haruyoshi Yoshida, Hideki Kimura, Seiji Yokoi, Daisuke Mikami, Kenji Kasuno, Hironobu Naiki, Masanori Hara, Masayuki Iwano. Hypoxia-augmented glomerulosclerosis in spontaneously diabetic db/db mice. ERA-EDTA 54<sup>th</sup> annual meeting, June 2017, Madrid.

高橋 直生, 糟野 健司, 上山 和子, 横井 靖二, 黒澤 寛之, 横山 由就, 三上 大輔, 木村 秀樹, 吉田 治義, 原 正則, 岩野 正之. Beads 法を用いた単離マウス糸球体における低酸素高糖刺激による糸球体 mRNA の解析. 日本腎臓学会総会, 2014 年 5 月, 横浜.

[図書] (計 1 件)

高橋直生、岩野正之. Basic nephrology 免疫・病理 腎アミロイドーシス Annual Review 腎臓 2016 巻 Page31-38 (2016.01) (査読無)

[産業財産権]

出願状況 なし(計 0 件)

取得状況 なし(計 0 件)

[その他]

福井大学医学部腎臓病態内科学ホームページ <http://jinnai.med.lab.u-fukui.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 直生 (TAKAHASHI, Naoki)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教

研究者番号: 30377460

(2) 研究分担者

岩野 正之 (IWANO, Masayuki)  
福井大学・学術研究院医学系部門・教授  
研究者番号： 20275324

木村 秀樹 (KIMURA, Hideki)  
福井大学・学術研究院医学系部門 (附属病院  
部)・准教授  
研究者番号： 20283187

糟野 健司 (KASUNO, Kenji)  
福井大学・学術研究院医学系部門・准教授  
研究者番号： 60455243

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし