

令和元年5月16日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09621

研究課題名(和文)腎臓における脂肪酸結合タンパク4の役割と臨床的意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of clinical significance of fatty acid-binding protein 4 in the kidney

研究代表者

田中 希尚(Marenao, Tanaka)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60533362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腎生検組織を用いた検討で障害された糸球体にて脂肪酸結合タンパク4(FABP4)が新規発現し、その局在は糸球体内皮細胞にあることを確認した。また健康人では尿中FABP4排泄量が尿中アルブミン量および経時的な腎機能の低下度と関連し、腎生検症例では尿中FABP4排泄量が腎機能と有意な負の相関、尿タンパク量と有意な正の相関を示すことを確認した。更にマウスを用いた検討により、障害された動脈内皮細胞においてFABP4が新規発現および分泌することを確認し、腎炎モデルおよび糖尿病モデルではFABP4が糸球体内皮細胞に新規発現していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって早期糸球体障害マーカーとしての尿中FABP4排泄量の有用性が明らかにされ、今後臨床応用されることにより慢性腎臓病の発症早期からの治療介入が可能となり得る。また腎疾患では腎生検組織をFABP4で免疫染色することにより、予後の推定や治療反応性の推測が可能になり得る。今後さらにFABP4が糸球体係蹄内細胞増殖や糸球体上皮細胞の形態保持などを与える影響を分子生物学的メカニズムまで掘り下げて検討することにより、腎機能増悪や尿タンパク出現の機序の一端を解明される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We confirmed ectopic expression of fatty acid binding protein 4 (FABP4) in the impaired glomeruli by immunohistochemistry examination using renal biopsy specimen, and that its localization is in glomerular endothelial cells. In healthy subjects, urinary FABP4 excretion is related to urinary albumin and decline of renal function, and in renal biopsy cases, urinary FABP4 excretion is significantly negatively correlated with renal function and urinary protein. In addition, we confirmed the novel expression and secretion of FABP4 in injured arterial endothelial cells by in vivo studies using mice. In nephritis and diabetes model, we confirmed FABP4 is newly expressed in glomerular endothelial cells.

研究分野：腎臓

キーワード：脂肪酸結合タンパク4 糸球体障害 糸球体内皮細胞 マクロファージ 尿バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂質代謝異常と慢性腎臓病(CKD)の関連が注目されてきており、これまでデータの蓄積から脂質異常症は CKD の発症・進行の危険因子であることや脂質異常症の治療により蛋白尿の減少と腎機能低下抑制が期待されることが明らかになってきている。一方、脂肪酸結合タンパク(FABP)は長鎖脂肪酸などの疎水性リガンドと結合し、細胞内輸送を担う 14-15 kDa のタンパク質で、これまでに FABP1~9 までのアイソフォームが報告されており (右表: Furuhashi M, et al. Nat Rev Drug Discov 2008)、一部の FABP は細胞障害時に放出される組織障害マーカーとしての可能性が報告され、尿中 FABP1 (L-FABP) 濃度や血中 FABP3 (H-FABP) 濃度が、それぞれ尿細管間質障害や心筋傷害のバイオマーカーとしてすでに臨床応用されている。

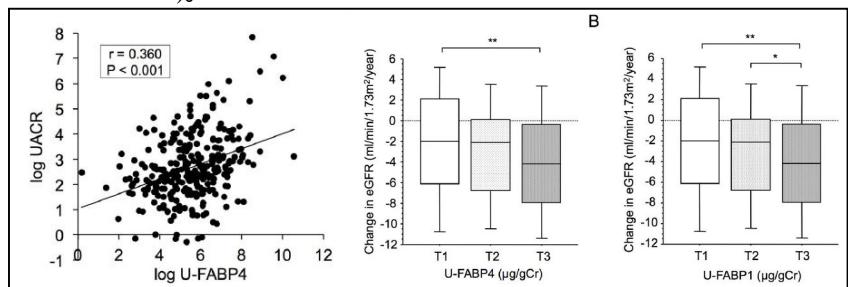
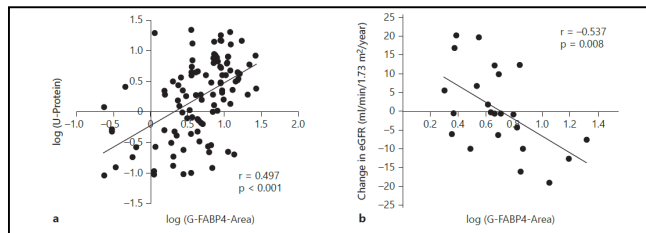
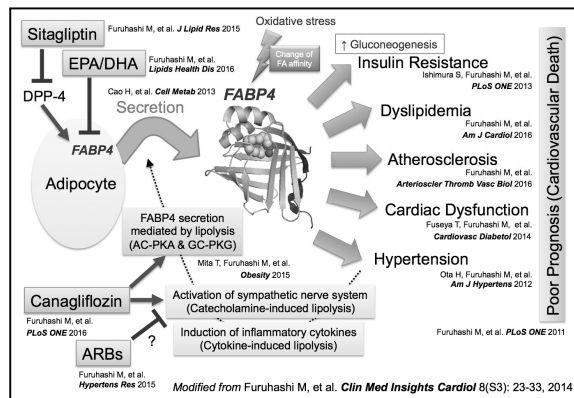
FABP ファミリーのうち、FABP4 (A-FABP/aP2) は脂肪細胞に高発現し、脂肪組織における全可溶性タンパク質の 1-数% を占めて、脂肪細胞の分化とともに発現が増加する。また、マクロファージにも FABP4 が発現する事が示されている。FABP4 欠損マウスを用いた検討から、FABP4 は脂肪細胞とマクロファージのそれぞれにおいて代謝・炎症反応を統合してインスリン抵抗性および動脈硬化形成に重要な役割を果たすことが示されている (Hotamisligil GS, et al. Science 1996; Makowski L, et al. Nat Med 2001; Furuhashi M, et al. J Clin Invest 2008, Furuhashi M, et al. Nature 2007)。

FABP4 はアミノ酸配列上明らかなシグナルペプチドを持たないため、これまで非分泌タンパク質と考えられていたが、我々は FABP4 が脂肪細胞から脂肪分解と共に分泌されることを明らかにし (Mita T, Furuhashi M, et al. Obesity 2014)、これまで右の図に示す血中 FABP4 濃度と動脈硬化性疾患や薬剤との関連を報告してきた。

一方、腎臓での FABP4 の発現はマウス正常形態のみで検討されており、間質毛細血管及び静脈血管内皮細胞に認められるものの、糸球体内皮細胞には認められないと報告されていた (Elmasri H, et al. FASEB J 2010)。しかしながら我々は当院で腎生検を行った連続 112 例を対象に、免疫染色法と in situ hybridization 法にて腎組織での FABP4 の発現を検討したところ、FABP4 タンパク及び mRNA は間質毛細血管のみならず、糸球体毛細血管にも認められ、その局在が糸球体内皮細胞及び糸球体内のマクロファージにあることを確認した。また半定量法にて計測した糸球体 FABP4 発現面積が蛋白尿や腎予後に関与し、IgA 腎症においては急性炎症の所見である管内増殖性病変の有無に関与していることを確認した (Tanaka M, et al. Nephron Clin Pract 2014)。

更に尿中の FABP4 に関してはこれまで全く報告がなかったが、最近我々は当教室で 35 年以上継続している疫学調査 (端野・壮警町研究) における健診の尿サンプルを用いた検討から、尿中 FABP4 排泄量が尿中アルブミン量や経時的な腎機能 (eGFR) の低下度と関連することを報告した (Okazaki Y, et al. PLoS One 2014)。

Gene	Common name	Alternative names	Expression
Fabp1	Liver FABP	L-FABP	Liver, intestine, pancreas, kidney, lung, stomach
Fabp2	Intestinal FABP	I-FABP	Intestine, liver
Fabp3	Heart FABP	H-FABP, MDGI	Heart, skeletal muscle, brain, kidney, lung, stomach, testis, aorta, adrenal gland, mammary gland, placenta, ovary, brown adipose tissue
Fabp4	Adipocyte FABP	A-FABP, aP2	Adipocyte, macrophage, dendritic cell
Fabp5	Epidermal FABP	E-FABP, PA-FABP, mal1	Skin, tongue, adipocyte, macrophage, dendritic cell, mammary gland, brain, intestine, kidney, liver, lung, heart, skeletal muscle, testis, retina, lens, spleen
Fabp6	Ileal FABP	IL-FABP, I-BABP, gastrotrypin	Ileum, ovary, adrenal gland, stomach
Fabp7	Brain FABP	B-FABP, MRG	Brain, glia cell, retina, mammary gland
Fabp8	Myelin FABP	M-FABP, PMP2	Peripheral nervous system, Schwann cell
Fabp9	Testis FABP	T-FABP	Testis, salivary gland, mammary gland



尿中 FABP4 排泄量が尿中アルブミン量や経時的な腎機能 (eGFR) の低下度と関連することを報告した (Okazaki Y, et al. PLoS One 2014)。

2. 研究の目的

ヒト腎組織では障害された糸球体内皮細胞に FABP4 が異所性に発現することから、主に尿中に増加する FABP4 は糸球体内皮細胞由来と推測される。この研究の目的は糸球体障害マーカーとして尿中 FABP4 排泄量の臨床的有用性を検証し、更に障害された内皮細胞で異所性に発現する FABP4 の可能性や分泌のメカニズムを *in vivo*、*in vitro* によって検証することである。

3. 研究の方法

(1)ヒト腎組織に発現する FABP4 と尿中 FABP4 排泄量の臨床的意義の検証として、腎生検症例を対象にした多施設共同臨床研究を行い、腎疾患症例での尿中 FABP4 を測定し、腎機能や尿タンパク量などの臨床的指標との関連を検討する。(2) 血管内皮細胞障害における異所性 FABP4 発現を確認するため、マウスの物理的な血管傷害モデルを作成(wire-induced vascular injury)し、障害された内皮細胞での FABP4 の発現を検証する。(3) 腎炎および糖尿病における糸球体障害と FABP4 との関連を検討するため、gddY マウス、KK-TA/Akita マウスを用いて糸球体 FABP4 の発現および尿中 FABP4 排泄量を検討する。(4) *In vitro* にて FABP4 の分子制御機構を明らかにするため、ヒト由来腎糸球体内皮細胞を用いて FABP4 発現誘導や分泌の有無を検討する。更に外因性の FABP4 負荷や FABP4 特異的阻害薬の投与による炎症マーカーなどの発現誘導を検証し、更に糸球体内皮細胞と糸球体上皮細胞との共培養により糸球体細胞間での FABP4 を介するクロストークを検討する。

4. 研究成果

(1)腎生検が行われた症例の血中 FABP4 濃度及び尿中 FABP4 排泄量を測定したところ、血中 FABP4 濃度及び尿中 FABP4 排泄量は腎機能とはそれぞれ負の相関、尿タンパク量とはそれぞれ正の相関を示した。更に対象を IgA 腎症に絞り、年齢、性別、BMI、血圧、eGFR、中性脂肪、血中 FABP4 濃度の背景因子で補正して解析したところ、それぞれ尿中 FABP4 排泄量は尿タンパク量、尿タンパク量は尿中 FABP4 排泄量の独立した説明因子であった。

(2)マウスの物理的な血管傷害モデル(wire-induced vascular injury)では、動脈の血管内皮細胞に FABP4 が異所性に新規発現誘導され、それが局所で分泌されて内皮機能障害や炎症等を惹起することを明らかにした。

(3) 腎炎モデルである gddY マウスを用いて検討したところ、gddY マウスではコントロールマウスでは認められなかった糸球体 FABP4 の発現を認めた。糸球体内で発現する FABP4 の局在は、糸球体内皮細胞及びマクロファージであった。半定量法で測定された糸球体 FABP4 の発現面積は、尿中アルブミン排泄量と強い相関を示した。更に糖尿病腎症モデルである KK-TA/Akita マウスにおいても同様にコントロールマウスでは認められなかった糸球体異所性 FABP4 の発現を認めた。

(4) ヒト糸球体内皮細胞 (HRGEC: Human Renal Glomerular Endothelial Cells) での FABP4 の発現を mRNA およびタンパクレベルで確認し、更にマウス糸球体上皮細胞 (MPC: Mouse Podocyte Clones)へ FABP4 負荷及び FABP4 特異的抗体の投与により炎症性サイトカインの発現パターンの変化が認められることを確認した。更に糸球体内皮細胞と糸球体上皮細胞の FABP4 を介するクロストークの検証として、FABP4 を過剰発現させた HRGEC と分化誘導した MPC の共培養では、MPC の形態変化の可能性を示唆する所見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. [Furuhashi M](#), Matsumoto M, Murase T, Nakamura T, Higashiura Y, Koyama M, [Tanaka M](#), Moniwa N, Ohnishi H, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Independent links between plasma xanthine oxidoreductase activity and levels of adipokines. *J Diabetes Investig* 2018 Dec 5; doi: 10.1111/jdi.12982.

(査読有)

2. [古橋真人](#), [東浦幸村](#), [田中希尚](#). CKD の新規治療ターゲットとしての異所性 FABP4 発現の可能性 血圧 25: 630-635, 2018 (査読無)

3. [Furuhashi M](#), Mori K, [Tanaka M](#), Maeda T, Matsumoto M, Murase T, Nakamura T, Moniwa N, Ohnishi H, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Unexpected high plasma xanthine oxidoreductase activity in female subjects with low level of uric acid. *Endocr J* 65: 1083-1092, 2018; doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0127. (査読有)

4. Furuhashi M, Matsumoto M, Tanaka M, Moniwa N, Murase T, Nakamura T, Ohnishi H, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Plasma xanthine oxidoreductase activity as a novel biomarker of metabolic disorders in a general population. *Circ J* 82: 1892-1899, 2018; doi: 10.1253/circj.CJ-18-0082. (査読有)
5. Furuhashi M, Yuda S, Muranaka A, Kawamukai M, Matsumoto M, Tanaka M, Moniwa N, Ohnishi H, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Circulating FABP4 concentration predicts the progression of carotid atherosclerosis in a general population without medication. *Circ J* 82: 1121-1129, 2018; doi: 10.1253/circj.CJ-17-1295. (査読有)
6. Tanaka M, Moniwa N, Mita T, Tobisawa T, Matsumoto T, Mochizuki A, Yamashita T, Yano T, Furuhashi M, Miura T. A Case of Crescentic Glomerulonephritis Complicated with Hypocomplementemic Urticarial Vasculitis Syndrome and ANCA-Associated Vasculitis. *Case Rep Nephrol Dial* 7:144-153, 2017; doi: 10.1159/000484476. (査読有)
7. Tanaka M, Moniwa N, Ohnishi H, Yamashita T, Koyama M, Gocho Y, Nishizawa K, Kimura Y, Sugawara H, Murakami S, Okazaki Y, Furuhashi M, Yoshida H, Miura T. Impact of the Number of Anti-Thrombosis Agents in Hemodialysis Patients: BOREAS-HD2 Study. *Kidney Blood Press Res* 42: 553-564, 2017; doi: 10.1159/000480487. (査読有)
8. Fuseya T, Furuhashi M, Matsumoto M, Watanabe Y, Hoshina K, Mita T, Ishimura S, Tanaka M, Miura T. Ectopic Fatty Acid-Binding Protein 4 Expression in the Vascular Endothelium is Involved in Neointima Formation After Vascular Injury. *J Am Heart Assoc* 6: e006377, 2017; doi: 10.1161/JAHA.117.006377. (査読有)
9. Tanaka M, Yamashita T, Koyama M, Moniwa N, Ohno K, Mitsumata K, Itoh T, Furuhashi M, Ohnishi H, Yoshida H, Tsuchihashi K, Miura T; BOREAS HD study Investigators. Impact of use of angiotensin II receptor blocker on all-cause mortality in hemodialysis patients: prospective cohort study using a propensity-score analysis. *Clin Exp Nephrol* 20: 469, 2016; doi: 10.1007/s10157-015-1182-3. (査読有)
10. Furuhashi M, Ogura M, Matsumoto M, Yuda S, Muranaka A, Kawamukai M, Omori A, Tanaka M, Moniwa N, Ohnishi H, Saitoh S, Harada-Shiba M, Shimamoto K, Miura T. Serum FABP5 concentration is a potential biomarker for residual risk of atherosclerosis in relation to cholesterol efflux from macrophages. *Sci Rep* 7: 217, 2017; doi: 10.1038/s41598-017-00177-w. (査読有)
11. Furuhashi M, Hiramitsu S, Mita T, Omori A, Fuseya T, Ishimura S, Watanabe Y, Hoshina K, Matsumoto M, Tanaka M, Moniwa N, Yoshida H, Ishii J, Miura T. Reduction of circulating FABP4 level by treatment with omega-3 fatty acid ethyl esters. *Lipids Health Dis* 15: 15, 2016; doi: 10.1186/s12944-016-0177-8. (査読有)
12. Furuhashi M, Omori A, Matsumoto M, Kataoka Y, Tanaka M, Moniwa N, Ohnishi H, Yoshida H, Saitoh S, Miura T. Independent link between levels of PCSK9 and FABP4 in a general population without medication. *Am J Cardiol* 118: 198-203, 2016; doi: 10.1016/j.amjcard.2016.04.037. (査読有)
13. Furuhashi M, Matsumoto M, Hiramitsu S, Omori A, Tanaka M, Moniwa N, Yoshida H, Ishii J, Miura T. Possible increase in serum FABP4 level despite adiposity reduction by canagliflozin, an SGLT2 inhibitor. *PLoS ONE* 11: e0154482, 2016; doi: 10.1371/journal.pone.0154482. (査読有)
14. Furuhashi M, Fuseya T, Murata M, Hoshina K, Ishimura S, Mita T, Watanabe Y, Omori A, Matsumoto M, Sugaya T, Oikawa T, Nishida J, Kokubu N, Tanaka M, Moniwa N, Yoshida H, Sawada N, Shimamoto K, Miura T. Local production of fatty acid-binding protein 4 in epicardial/perivascular fat and macrophages is linked to coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36: 825-834, 2016; doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307225. (査読有)

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 田中希尚, 古橋真人, 松本めぐみ, 山下智久, 茂庭仁人, 後町結, 前田卓人, 滝沢英毅, 三浦哲嗣. 腎疾患症例における尿 FABP4 排泄量の臨床的意義: 腎生検例を用いた検討 日本腎臓学会 2018 年
2. 古橋真人, 湯田 聡, 村中敦子, 川向美奈, 松本めぐみ, 田中希尚, 茂庭仁人, 大西浩文, 斎藤重幸, 三浦哲嗣. 脂肪酸結合タンパク 4 (FABP4) 濃度は動脈硬化進展度の予測因子である 日本糖尿病学会 2018 年
3. Furuhashi M, Fuseya T, Mita T, Ishimura S, Tanaka M, Miura T. Ectopic Expression of Fatty Acid-Binding Protein 4 in the Vascular Endothelium is Involved in Neointima Formation After Vascular Injury. 日本循環器学会 2018 年
4. 古橋真人, 田中希尚, 三浦哲嗣. 慢性腎臓病の新規治療ターゲットとしての異所性 FABP4 発現の可能性 日本高血圧学会 2017 年
5. Furuhashi M, Yuda S, Muranaka A, Kawamukai M, Matsumoto M, Tanaka M, Moniwa N, Ohnishi H, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Serum FABP4 concentration is independently associated with atherosclerosis in a general population without medication. 日本動脈硬化学会 2017 年
6. 古橋真人, 松本めぐみ, 平光伸也, 田中希尚, 茂庭仁人, 石井潤一, 三浦哲嗣. SGLT2 阻害薬カナグリフロジン投与による脂肪酸結合タンパク 4 (FABP4)濃度の経時的変化とその規定因子の検討 日本糖尿病学会 2017 年
7. Furuhashi M, Fuseya T, Matsumoto M, Mita T, Ishimura S, Tanaka M, Moniwa N, Miura T. Ectopic FABP4 expression in the vascular endothelium is involved in neointima formation after vascular injury. European Society of Cardiology Congress 2017 年
8. Furuhashi M, Yuda S, Muranaka A, Kawamukai M, Matsumoto M, Tanaka M, Moniwa N, Ohnishi H, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Circulating FABP4 Concentration Predicts the Progression of Carotid Atherosclerosis in a General Population Without Medication. American Heart Association 2017 年
9. Furuhashi M, Ogura M, Matsumoto M, Yuda S, Muranaka A, Kawamukai M, Tanaka M, Moniwa N, Ohnishi H, Saitoh S, Harada-Shiba M, Shimamoto K, Miura T. Serum FABP5 is a Potential Biomarker for Residual Risk of Atherosclerosis in Relation to Cholesterol Efflux from Macrophages. 日本循環器学会 2017 年
10. Furuhashi M, Omori A, Matsumoto M, Tanaka M, Moniwa N, Ohnishi H, Yoshida H, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Independent link between levels of PCSK9 and FABP4 in a general population without medication. European Society of Cardiology Congress 2016 年
11. Furuhashi M, Ogura M, Matsumoto M, Yuda S, Muranaka A, Tanaka M, Moniwa N, Ohnishi H, Saitoh S, Harada-Shiba M, Miura T. Serum FABP5 concentration, a Novel Determinant of Cholesterol Efflux from Macrophages, is a Potential Biomarker for Residual Risk of Atherosclerosis. American Heart Association 2016 年
12. Furuhashi M, Fuseya T, Ishimura S, Mita T, Hoshina K, Watanabe Y, Omori A, Matsumoto M, Moniwa N, Tanaka M, Yoshida H, Miura T. 日本循環器学会 2016 年
13. 古橋真人, 松本めぐみ, 平光伸也, 大森晶奈, 田中希尚, 茂庭仁人, 吉田英昭, 石井潤一, 三浦哲嗣. SGLT2 阻害薬であるカナグリフロジンによる新規アディポカイン脂肪酸結合タンパク 4 (FABP4)の血中濃度への影響 日本糖尿病学会 2016 年

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：糸球体障害の検査方法（尿中 FABP4）

発明者：古橋真人

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-120521 (2015 年 6 月 15 日 出願)

出願年：2015 年

国内外の別： 国内

取得状況（計 1 件）

名称：糸球体障害の検査方法（尿中 FABP4）

発明者：古橋真人

権利者：同上

種類：特許

番号：特開 2017-003529 (2017 年 1 月 5 日 公開)

取得年：2017 年

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/im2/achievement.php>

6 . 研究組織

研究分担者

研究分担者氏名：古橋真人

ローマ字氏名：Masato Furuhashi

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8 桁）：20563852

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。