

平成 21 年 4 月 21 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590966

研究課題名（和文） 間欠的虚血ストレスをターゲットとした腎疾患治療薬の開発
—脂肪酸結合蛋白に注目して

研究課題名（英文） Role of renal liver-type fatty acid binding protein in intermittent hypoxia

研究代表者

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

研究成果の概要：間欠的低酸素は、微小循環障害を進行させることにより腎疾患の悪化因子となることを明らかにする事を目的に本研究を行った。進行性腎疾患モデルである水腎症モデルをマウスで作成し、検討を行った。モデル作成6時間後に間欠的低酸素装置に入れ、5日後に腎臓の障害を検討した。間欠的低酸素装置に入れたマウスのほうが、入れられなかったマウスに比べ、有意ではないが、腎障害が進行している傾向にあった。この結果から、間欠的低酸素は、腎疾患の悪化因子となる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：間欠的低酸素、腎臓、脂肪酸結合蛋白、循環器・高血圧、睡眠時無呼吸、腎不全

1. 研究開始当初の背景

(1) 喫緊の課題である腎疾患の進行抑制

近年、糖尿病やメタボリックシンドロームなどの生活習慣病の患者が増加し、それらに伴って生じる腎疾患や末期腎不全となる患

者が増加しており、医療経済に多大な負担を強いている。そのため、腎疾患の進行因子を同定し、その治療法を開発する事は喫緊の課題である。

(2) 睡眠時無呼吸症候群 (sleep apnea)

syndrome, SAS) と心血管疾患および腎疾患
SAS は心血管疾患発症の危険因子であるとともに、夜間に間欠的な著しい低酸素血症を生じることから、腎の微小循環障害を発症または増悪させると考えられており、腎疾患の進行に SAS が深く関与している可能性がある。しかし、未だ十分な検討はなされていない。末期腎不全では SAS の頻度が高いこと、SAS が腎疾患進展の危険因子になっている可能性は既にいくつかの研究により示唆されている。

(3) 肝臓型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)と腎疾患

・脂肪酸結合蛋白 (FABP) の細胞内の脂肪酸代謝における重要性および細胞保護作用が明らかにされている。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。

・げっ歯類の腎臓には、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。この Tg マウスを使用し、腎疾患における L-FABP の役割を検討してきた。その結果、慢性腎疾患において、L-FABP は、虚血や低酸素など微小循環障害を惹起するストレスにより腎臓での発現が亢進することを示した。また L-FABP Tg マウスでは、野生型マウスに較べて腎障害が緩和された事から、L-FABP は虚血や低酸素刺激による腎障害の進展を緩和する可能性も示した。

・私たちは、腎臓に発現している L-FABP の

尿中排泄量を測定するキットを世界に先駆けて開発した (J Lab Clin Medicine, 143: 23, 2004)。慢性糸球体疾患患者を対象にした多施設臨床性能試験により、尿中 L-FABP は、従来のマーカーと異なり、腎疾患の進行する患者を高い感度で識別でき、腎疾患をモニタリングする上で重要な臨床指標になりうる事を示した (J Lab Clin Medicine, 145: 125, 2005)。造影剤使用における尿中 L-FABP の意義を検討した臨床研究では、造影剤投与により尿蛋白や尿中 NAG は変化しなかったが、尿中 L-FABP のみ排泄量の増加を示した。造影剤は、腎の一時的虚血を生じ、腎臓の微小循環障害を惹起することから、尿中 L-FABP は、他のマーカーでは捕捉し得ない腎の微小循環障害をモニターするのに有用なマーカーである可能性がある

2. 研究の目的

(1) 間欠的低酸素は、微小循環障害を進行させることにより腎疾患の悪化因子となる事を明らかにする。また、その際の腎近位尿細管の L-FABP の動態を明らかにする。

(2) L-FABP Tg マウスと野生型マウスに間欠的低酸素刺激を与え、微小循環障害の程度を比較し、L-FABP が微小循環障害の進行を抑制する蛋白であることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) SASモデルの作成
間欠的低酸素負荷をマウスに与えるため、OxyCycler model A84[®](間欠的低酸素になる装置)を購入し使用した。間欠的低酸素刺激の条件として、マウスをアクリルチャンバー内で飼育し、明期にチャンバー内の空気を 10 分ごとに窒素ガスで置換し、その間酸素濃度を 10%にすることで作成した。自然発症糖尿病の野生型マウスおよび L-FABP Tg マウスの左腎、片腎摘 1 週間後に OxyCycler 装置に入

れ、1週間にわたり間欠的低酸素負荷を与えた。コントロールは、低酸素刺激を与えないマウスとした。1週後に腎臓を摘出し、腎障害の程度を評価した。さらに、進行性腎疾患障害マウスである水腎症モデルマウスを作成し、6時間後に間欠的低酸素刺激を開始した。その5日後に腎臓を摘出し、腎障害の程度を評価した。

(2) 腎障害の評価

間欠的低酸素刺激が、腎臓の微小循環障害を進行させる事、尿中 L-FABP 排泄が微小循環障害の程度を反映する事、L-FABP Tg マウスでは野生型マウスに比べ、間質尿細管障害の程度が軽減される事を確認する。

・尿中パラメーター測定：メタボリックケージを用いて12時間蓄尿を行う。尿中クレアチニン、尿マウスアルブミンを測定する。尿中 L-FABP は、我々が開発した ELISA キットを使用し測定する。

・血中パラメーター測定：腎摘出直前に下大静脈より採血を行う。血清を用いて、クレアチニン、尿素窒素を測定する。

・血圧測定：BP-98 ソフトマックスプロを用いて、尻尾で測定する。

・蛋白発現解析：腎臓を摘出し、蛋白を抽出する。L-FABP の発現や炎症性サイトカイン (MCP-1) の発現を ELISA で測定する。

4. 研究成果

(1) 片腎を摘出した糖尿病マウスの検討

血圧：間欠的低酸素刺激後の糖尿病野生型マウスでは、負荷をされなかったマウスに比べ、平均血圧が有意に上昇した (113.6 ± 7.1 vs 97.4 ± 8.6 , $p < 0.05$, mean \pm SD)。しかし、糖尿病 L-FABP Tg マウスでは、そのような変化は認められなかった (106.0 ± 9.7 vs 103.6 ± 11.0 , NS)。

血糖：間欠的低酸素刺激後の糖尿病野生型マウスでは、負荷をされなかったマウスに比べ、有意差は認めなかったが、血糖の上昇を認めた (448 ± 139 vs 521 ± 148 , NS, mean \pm SD)。糖尿病 L-FABP Tg マウスでも、同様の变化を認めた (392 ± 82 vs 430 ± 102 , NS)。

腎障害の程度：糖尿病マウスでは、糸球体の肥大は、認められたものの、間質尿細管障害や MCP-1 の発現は認められなかった。尿中アルブミンの排泄は、間欠的低酸素刺激により、増加しなかった。

L-FABP の動態：尿中 L-FABP の増加や腎臓での L-FABP の発現増加も認められなかった。

1週間と短い間欠的低酸素刺激であったため、間質障害の進行を確認できなかった。今後は、12週間という長期の刺激を行い、検討していく。

(2) 水腎症モデルでの検討

間欠的低酸素装置に入れた野生型マウス (n=5) のほうが、L-FABP Tg マウス (n=5) に比べ、有意ではないものの、MCP-1 の発現が増加している傾向にあった (55.0 ± 5.4 vs 44.2 ± 8.5 , NS, mean \pm SD)。しかし、間欠的低酸素刺激による間質の線維化の進行は、両群で認められなかった。

実験に使用した動物の数が少なく、かつ one point でしか、観察できなかったため、間質障害の程度の評価が不十分であった可能性が高い。今後は、動物数を増やし、さらに経時的に観察していく。

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)
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

池森 (上條) 敦子 (IKEMORI (KAMIJO)
ATSUKO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号 80350635

菅谷 健(SUGAYA TAKESHI)

東京歯科大学・歯学部・客員講師
研究者番号 40381561