

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09264

研究課題名(和文)新規抗酸化分子ApolipoproteinL1の腎保護作用機序の解明

研究課題名(英文)The mechanism of anti-oxidative molecule apolipoproteinL1-mediated renoprotection

研究代表者

村上 太一 (MURAKAMI, Taichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：30403736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：日本人非糖尿病ボランティア126名で血中apoL1との相関因子を探索し、重回帰分析によりBMI、TGと正相関、HDLコレステロールとの負相関することが判明した。血中apoL1はメタボリックシンドローム(MS)群では非MS群より有意に高値でインスリン抵抗性と相関した。ゲル濾過での解析でMS群ではlarge HDL分画優位に活性型apoL1の発現増加を認めた。2型糖尿病患者でもMS群で有意に高値で、尿酸化マーカーやアルブミン尿とは負に相関した。また腎臓病患者でも尿酸化マーカーと負に相関した。以上から肥満に伴いHDLでの活性型apoL1が増加し、酸化ストレスや腎障害に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In 126 non-diabetic volunteers, multivariable linear regression analysis showed serum apoL1 positively correlated with body mass index and triglyceride, and negatively correlated with HDL cholesterol. Circulating apoL1 significantly elevates in metabolic syndrome (MS) compared with non-MS, and positively associates with HOMA-IR, thus suggesting the involvement of apoL1 in dyslipidemia in MS. Next, FPLC analysis showed the significant increase of activated apoL1 in large HDL purified from MS subjects. ApoL1/HDL cholesterol ratio is inversely associated with serum oxidative metabolites. In 36 type 2 diabetic patients, serum apoL1 significantly increases in MS, with the negative association with urine 8OHdG/Cr ratio and urine albuminuria. In 59 chronic kidney disease patients, apoL1 showed the inverse correlation with urine L-FABP. Taken together, the increased activated apoL1 on HDL may be associated with anti-oxidative activity of HDL particles, which contributes to renoprotection.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ApolipoproteinL1 HDL 抗酸化作用 インスリン抵抗性 メタボリックシンドローム 2型糖尿病 腎臓病

1. 研究開始当初の背景

APOL1 遺伝子の一塩基多型が末期腎不全の危険因子であることが報告されてきた (Science2010、NEJM2013)。APOL1 遺伝子がコードする蛋白 ApoL1 は血中高密度リポ蛋白 (HDL) のアポ蛋白として同定され (JBC1997) その血中レベルは中性脂肪や血糖との相関が報告されているが臨床的意義や病態への関与は明らかではない。HDL は抗酸化作用、コレステロール引き抜き能、抗炎症作用等の生物活性を有するが知られており、apoL1 も HDL 機能を担うものと考えられている。超遠心により分画した HDL を MS spectrometry で解析した報告では、apoL1 ペプチドの発現量と抗酸化能作用は相関することが明らかにされた (Arterioscler Thromb Vasc Biol2009)。我々は HDL 特異的 apoL1 発現トランスジェニックマウス (hAPOL1-Tg) を樹立した。予備実験として、hAPOL1-Tg で高度蛋白尿を呈する巣状系球体硬化症モデルを作成したところ、Tg で尿蛋白が減少傾向にあった (未発表)。本モデルでは酸化ストレスによる系球体上皮細胞障害が蛋白尿の増悪因子と考えられており、HDL 上に発現する apoL1 が酸化ストレスに抑制的に作用し、系球体上皮細胞障害に保護的に作用している可能性が示唆された。上記を背景として、我々は血中 apoL1 が抗酸化作用を有し腎保護に作用するものと仮説しているが、その詳細は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では血中 apoL1 の腎保護作用について抗酸化作用の観点から、ヒト検体および hAPOL1-Tg を用いて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト検体: 20~60 歳の特記治療歴や既往歴のない職域ボランティアおよび腎臓病患者 (当院腎臓内科入院患者) 2 型糖尿病患者 (当院内内分泌代謝内科入院患者) から空腹時血清および尿を採取し、同時に身長、体重、腹囲、血圧などの身体所見を測定する。血清検体で脂質、クレアチニン、アルブミン、尿酸、アルブミン、血糖、HbA1c、アディポネクチンを、尿検体でアルブミン、クレアチニン、8OHdG を測定する。血清 apoL1 は sandwich ELISA キット (proteintech 社) により測定する。健常群での解析により血中 apoL1 との相関因子を探索する。また低 apoL1 検体および高 apoL1 検体において、ゲルろ過法によりリポ蛋白を分離し、apoL1 の局在を同定することで発現動態を解析する。腎臓病患者では上記に加え、尿細管障害マーカーである尿中 2 ミクログロブリンおよび L-FABP を測定し、apoL1 の発現レベルならびにアルブミン尿、尿細管障害マーカー、腎機能との相関を解析する。また血糖と相関することが報告されており、2 型糖尿病患者での発現動態ならびに

酸化ストレスマーカー、アルブミン尿、腎機能との相関を解析する。なお、上記検体採取は当大学倫理委員会に研究計画書承認のうえ検体供与者同意のもとに行う。

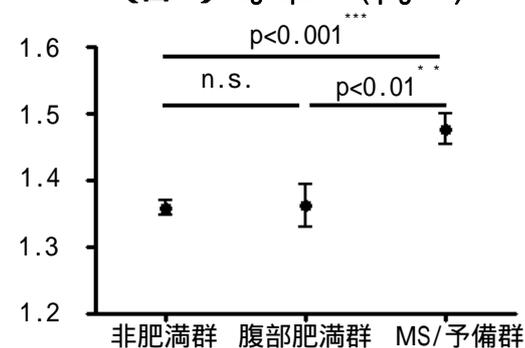
(2) HDL 特異的 apoL1 発現トランスジェニックマウス (hAPOL1-Tg): げっ歯類は APOL1 遺伝子を有しておらず野生型は apoL1 null となるため、hAPOL1-Tg は FVB/NJcl マウスにアルブミンプロモーター下に human APOL1 遺伝子を導入して樹立した。オス hAPOL1-Tg と野生型 (同腹仔) において巣状系球体硬化症モデルを作成し hAPOL1-Tg で尿蛋白が減少するか再現性を確認し、酸化ストレスマーカーや酸化ストレス制御分子の発現を解析する。巣状系球体硬化症モデルはピューロマイシンおよび FGF を投与し作成する。またストレプトゾトシン投与により 1 型糖尿病モデルを作成し表現型を解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト検体:

職域ボランティア 126 名 (男性 82 名) で測定した血清 apoL1 濃度は $24.9 \pm 7.1 \mu\text{g/mL}$ であった。単回帰分析により apoL1 は性別 (男 > 女)、腹囲、body mass index (BMI)、収縮期血圧、拡張期血圧、LDL コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪、GTP、尿酸、空腹時血糖、空腹時インスリン、HbA1c、アディポネクチンと有意に相関を認めた。さらにこれらの相関因子との重回帰分析により BMI ($0.232, p < 0.05^*$)、中性脂肪 ($0.204, p < 0.05^*$)、HDL コレステロール ($-0.203, p < 0.05^*$) が独立した規定因子と判明した。高中性脂肪および低 HDL コレステロール血症は 2 型糖尿病やメタボリックシンドローム (MS) の典型的脂質異常所見であること、apoL1 が BMI などの肥満関連因子との相関があることから、ボランティア 126 名を非肥満群 90 名、腹部肥満群 14 名、MS/予備群 22 名の 3 群に分類して比較検討した。MS の定義は International Diabetes Federation の日本人基準を採用し、腹囲基準のみを満たし代謝異常を伴わない検体を腹部肥満群、腹囲基準を満たし代謝異常を一項目以上満たす検体を MS/予備群とした。結果、MS/予備群では非

(図 1) log apoL1 ($\mu\text{g/mL}$)

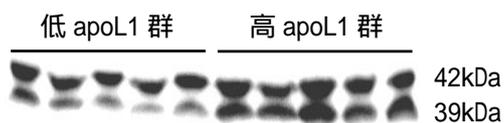


肥満群、腹部肥満群に対して有意に高値を呈した (図 1)。メタボリックシンドロームや 2

型糖尿病では内臓脂肪蓄積によるインスリン抵抗性が基本病態であることからボランティア 126 名においてインスリン抵抗性指標である HOMA-IR との相関を解析したところ、有意な正の相関を認めた ($p < 0.01^{**}$)。また今回 MS/予備群の中にエクササイズにより体重 (105.5kg → 84.2kg)、体脂肪 (35.4kg → 17.8kg) が減少し、インスリン抵抗性の改善 (6.06 → 1.86) を認めた協力者においてエクササイズ前後の apoL1 を測定した。前値 37 $\mu\text{g/mL}$ 後値 21 $\mu\text{g/mL}$ へと低下を認めた。

血中 apoL1 は HDL アポ蛋白であるが、今回の結果では HDL コレステロール値とは負の相関を認めた。そこで次に非肥満群および MS/予備群それぞれから同意の得られた 5 名の男性で追加採血を行い、低 apoL1 群、高 apoL1 群として apoL1 の発現量、局在を比較解析した。低 apoL1 群および高 apoL1 群の血中 apoL1 は $24.2 \pm 3.3 \mu\text{g/mL}$ 、 $42.6 \pm 9.9 \mu\text{g/mL}$ 、BMI は $20.6 \pm 1.1 \text{kg/m}^2$ 、 $26.2 \pm 3.3 \text{kg/m}^2$ 、中性脂肪は $58.0 \pm 24.3 \text{mg/dL}$ 、 $175.2 \pm 66.3 \text{mg/dL}$ 、HDL コレステロールは $76.0 \pm 17.9 \text{mg/dL}$ 、 $46.8 \pm 8.3 \text{mg/dL}$ であった。血清 2 μL でウエスタンブロットを行ったところ、両群とも 42kDa および 39kDa に 2 本のバンドが検出された。既報では 39kDa が活性型として報告されているが、高 apoL1 群で 39kDa 活性型 apoL1 の発現増加が確認された (図 2)。さらに血清

(図 2) 血清ウエスタンブロット



検体のゲル濾過によりリポ蛋白を分画 (VLDL、large LDL、small LDL、large HDL、small HDL、very small HDL の 6 分画) し、各リポ蛋白分画における apoL1 濃度をエライザで、分子サイズをウエスタンブロットで評価した。まず、低 apoL1 群では large HDL に 42kDa 優位のシグナルがウエスタンブロットで検出された。一方高 apoL1 群では large HDL 分画の両サイズのシグナルが増強するとともに、LDL および small HDL 分画にもシグナルが検出された (図 3)。各分画での apoL1 濃度をエライザで測定し、コレステロール濃度での補正值で比較したところ、高 apoL1 群では large HDL ($p < 0.01^{**}$)、small HDL ($p < 0.01^{**}$)、very small HDL ($p < 0.01^{**}$) 分画での apoL1 発現量が有意に増加していた。また small HDL および very

(図 3) リポ蛋白分画ウエスタンブロット



(1 : VLDL、 2 : large LDL、 3 : small LDL、 4 : large HDL、 5 : small HDL、 6 : very small

HDL)

small HDL 分画での apoL1/cholesterol 比は血中過酸化物質と負に相関した。

以上治療歴のない職域ボランティア集団において内臓脂肪蓄積により惹起されるインスリン抵抗性、脂質代謝異常に伴い、large HDL 分画優位に活性型 apoL1 の発現が増加し、HDL 粒子上での発現が血中過酸化物質と負に相関することが示された。

既報では 2 型糖尿病患者で血中 apoL1 が高値を呈するとされており、当院で入院加療を受けた 2 型糖尿病患者 36 名 (年齢 47.0 ± 9.9 歳、男性 17 名、BMI $29.6 \pm 7.9 \text{kg/m}^2$ 、腹囲 $99.8 \pm 18.2 \text{cm}$ 、空腹時血糖 $165.6 \pm 61.3 \text{mg/dL}$ 、HbA1c $9.7 \pm 2.5\%$) で apoL1 を測定した。36 名中 28 名が MS の基準を満たした。血中 apoL1 濃度は $25.0 \pm 8.6 \mu\text{g/mL}$ でボランティア非肥満群と比較し有意な上昇は認めなかったが、ボランティア群同様腹囲 ($p < 0.05^*$)、BMI ($p < 0.05^*$)、中性脂肪 ($p < 0.05^*$) とは有意な正相関、アディポネクチン ($p < 0.05^*$) とは負相関を認め、ボランティア集団同様に肥満との関連が確認された。酸化ストレスマーカーである尿中 8OHdG と血中 apoL1 の関連を解析したところ、有意な負の相関を認めた ($p < 0.05^*$)。

次に当院で入院加療を受けた慢性腎臓病患者 59 名 (年齢 42.4 ± 11.1 歳、男性 32 名、推定糸球体ろ過量 $66.9 \pm 25.4 \text{ml/min/m}^2$ 、尿蛋白 $1.4 \pm 1.8 \text{g/gCr}$) で apoL1 を測定した。原疾患は糸球体腎炎 27 名、糖尿病性腎症 8 名、ループス腎炎 5 名、常染色体優性多発性嚢胞腎 5 名、尿細管間質性腎炎 5 名、微小変化型ネフローゼ症候群 3 名、膜性腎症 3 名、診断不明 3 名であった。血中 apoL1 値は $24.6 \pm 8.1 \mu\text{g/mL}$ でボランティア非肥満群と比較し有意な上昇は認めなかった。また、ボランティアや糖尿病患者と異なり、BMI や中性脂肪、アディポネクチンなど肥満関連因子と有意な相関は認めなかった。単回帰分析で血中 apoL1 値は年齢、推定糸球体濾過量、尿中 2 ミクログロブリン、尿中 L-FABP と有意に相関を認め、重回帰分析で推定糸球体濾過量 (0.429 、 $p < 0.01^{**}$)、尿中 FABP (-0.267 、 $p < 0.05^*$) が独立した相関因子であることが判明した。尿蛋白量とは相関しなかった。腎臓病患者群には高中性脂肪や浮腫をきたすネフローゼ症候群が含まれていること、血中アディポネクチン値は腎機能に影響を受けることから、他の集団で相関を認めた脂質や肥満関連因子が相関しなかった可能性が推測された。L-FABP は腎臓の近位尿細管細胞に発現する脂肪酸結合タンパク質で、尿細管酸化ストレスや虚血のバイオマーカーである。我々の集団では血中 apoL1 は尿中 L-FABP と負の相関を認め、血中 apoL1 レベルは腎臓病患者における組織酸化ストレス制御に関する可能性が示唆された。

(2) HDL 特異的 apoL1 発現トランスジェニックマウス :

基礎データとして hAPOL1-Tg ではウエスタンブロットにより血清中でのみ apoL1 蛋白が発現し、肝臓などの臓器に発現しないこと、血清を超速心で分画し apoL1 蛋白が HDL 分画に局在することを確認している。また野生型 (FVB/NJcl 同腹仔) と APOL1-Tg との比較で、体重、血圧、血糖、総コレステロール、中性脂肪に有意な差は認めなかった。巣状糸球体硬化症モデルを作成し尿蛋白量、酸化ストレスへの効果を検討したところ、野生型との間に有意な差は認めなかった。次に別の腎障害モデルとして 1 型糖尿病モデルを作成したが尿蛋白は対照群と差を認めなかった。今回マウス実験では腎障害モデルにおいて hAPOL1-Tg での特異的表現型は確認できなかった。しかし、腎臓病患者ならびに 1 型糖尿病患者データでも apoL1 レベルと尿蛋白との相関は認めなかったことから糸球体障害を介する尿蛋白への保護効果は乏しいと推測された。一方でヒト検体を用いた結果からは血中 apoL1 は 80HdG や L-FABP など尿中酸化ストレスマーカーとの有意な負の相関、糸球体過剰との正の相関を認めており、酸化ストレス制御や腎臓機能へ影響する可能性が強く示唆された。腎糸球体障害は尿蛋白が、尿細管間質障害は 2 ミクログロブリン、L-FABP がバイオマーカーとなる。今回ヒト検体を用いた研究は改めて apoL1 と尿細管間質障害機序を介する腎機能変化に寄与する可能性を示唆する結果となり、今後の課題として hAPOL1-Tg での腎間質線維化モデルや尿細管上皮細胞を用いたメカニズム解明が挙げられた。

今回ヒト検体からの結果を中心に、血中 apoL1 とインスリン抵抗性との関連、2 型糖尿病での尿中酸化マーカーと、腎臓病患者での尿中酸化マーカー、腎機能との相関が明らかにされた。今後の課題としてヒト疾患群では検体数を増やし、尿中マーカーや腎機能の経時的変化のフォロー、また腎組織を用いた病理学的検討、マウスではマウス HDL を用いた in vitro での抗酸化作用評価、腎間質線維化モデルでの表現型解析を行うことで、apoL1 を介する新たな病態制御の解明できると考えられる。

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 0 件)

現在投稿準備中

〔学会発表〕(計 2 件)

村上太一、安部秀斉、土井俊夫、岸誠司、長井幸二郎、松浦元一、三好雅士、中尾隆之、小谷和彦、HDL アポ蛋白 ApolipoproteinL1 の血中濃度の意義についての検討、第 62 回日

本臨床検査医学会中国・四国支部総会、平成 29 年 2 月 12 日

村上太一、安部秀斉、土井俊夫、岸誠司、長井幸二郎、松浦元一、三好雅士、中尾隆之、HDL アポ蛋白 ApolipoproteinL1 の血中濃度の意義についての検討、第 57 回日本臨床化学会年次学会、平成 29 年 10 月 6 日

〔図書〕(計 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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 太一 (MURAKAMI, Taichi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究所・助教
研究者番号：30403736

(2) 研究分担者

松浦 元一 (MATSUURA, Motokazu)
徳島大学・病院・特任助教
研究者番号：10403734

(3) 連携研究者

小谷 和彦 (KOTANI, Kazuhiko)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：60335510

(4) 研究協力者

()