

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19447

研究課題名(和文) 新しい心腎連関機序：メガリンの発現抑制による腎保護を介した動脈硬化軽減作用の検証

研究課題名(英文) New mechanism of cardio-renal association: Evaluation of the effect of megalin inhibition to the atherosclerosis through the renal protection

研究代表者

忒田 亮平 (Kaseda, Ryohei)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：20737697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：メガリン・アポEダブル KOマウスの樹立に成功した。21週齢メガリン・アポEダブル KOマウスでは、アポE KOマウスと比較して、大動脈の動脈硬化病変が軽減している傾向を認めた。また、腎障害における動脈硬化の検討の中で、食事摂取の影響も検討した。10週齢のアポE KOマウスに片腎摘出術を行い、2群に分けて、7週間カゼイン食ないし米タンパク質食を投与した。米タンパク質(植物性タンパク質)の摂取は、カゼイン(動物性タンパク質)と比較して、片腎摘出にて腎の容積減少によって増強された動脈硬化病変を軽減していた。

研究成果の概要(英文)：Megalín·ApoE double KO mice have been successfully established. 21-week-old Megalín·ApoE double KO mice have a tendency to have decreased atherosclerotic lesion of the aortas compared with ApoE KO mice. In our studies to evaluate the mechanisms of atherosclerosis in kidney injury, we have investigated the impact of nutrition intake. After 10-week-old Apo E KO mice underwent uninephrectomy, these mice were pair-fed with a usual casein (animal protein)-based diet or rice protein-based diet for 7 weeks. Compared with the animal protein-based diet, the plant protein-based diet significantly reduced atherosclerosis accelerated by renal mass reduction.

研究分野：腎臓学

キーワード：アポEノックアウトマウス メガリンノックアウトマウス 心腎連関 メガリン・アポEダブルノックアウトマウス

### 1. 研究開始当初の背景

腎障害が心血管疾患の発症・進展に関わり、逆に、心血管系疾患が腎障害を引き起こすことは以前より指摘されており、その密接な関係は「**心腎連関**」と呼ばれている。

私たちは、腎の中でも特に**近位尿細管上皮細胞 (PTEC) の傷害が心腎連関に関係するとの仮説**を提唱してきた。慢性腎臓病患者において、**血管内皮細胞傷害因子であるインドキシル硫酸 (IS) の増加が心血管疾患の発症と死亡率に関連している**とされるが、IS は PTEC の血管側膜に存在する organic anion transporter (OAT) 1 および OAT3 から PTEC に取込まれ、管腔側膜の OAT4 を介して尿中に排出される。したがって PTEC 傷害では、IS などの因子の PTEC での取込みや尿中への排出が妨げられ、それらの体内蓄積が増加することで血管内皮細胞傷害を引き起こされる可能性がある。

**メガリン**は LDL 受容体ファミリーに属する巨大分子であり、PTEC の管腔側に高発現する **エンドサイトーシス受容体**として、多種の糸球体濾過タンパク質の再吸収・代謝に関わるとともに、細胞内シグナル伝達にも関与している。PTEC は糸球体とともに糖尿病性腎症において早期より障害され、そのことがアルブミン尿出現の一因にもなる。糖尿病やメタボリックシンドローム (MetS) などにおいて、糸球体でのタンパク質濾過が増加したり、あるいは質的異常を伴うタンパク質の濾過が起こると、PTEC のエンドサイトーシス経路に異常を来し、PTEC 傷害につながる可能性が考えられる。メガリンは、その傷害のトリガーのひとつとしての重要な役割を担っている。糖尿病では、タンパク質の非酵素的糖化反応による advanced glycation endproducts (AGEs) が産生され、それが様々な細胞の傷害に関係する。メガリンは糸球体を濾過した AGEs のエンドサイトーシスに関わり、PTEC 傷害をきたす原因となると考えられる。さらに

MetS や脂質異常症では、多くの遊離脂肪酸がアルブミンや liver-type fatty acid binding protein などの結合タンパク質とともにメガリンを介して PTEC に運ばれ、過度な代謝を強いられる。したがって、このような病的条件下においては、メガリンの機能を適度に抑制することが、腎保護につながる可能性がある。

私たちは実際、高脂肪食負荷モデル (2 型糖尿病あるいは MetS モデル) において、腎特異的モザイク型メガリン KO マウス (メガリン KO 効率が約 60%) では、メガリン発現が残存している PTEC のみに空胞変性所見 (オートリソソーム異常) が起こることを見いだしている (図 1)。さらにそのような PTEC 傷害に伴って間質の線維化や傍尿細管血管傷害が進行することを明らかにした。

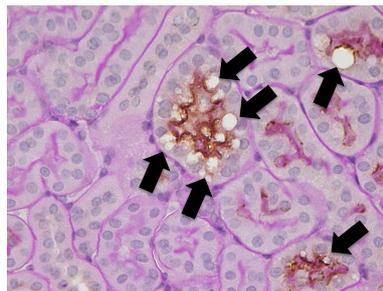


図1 高脂肪食負荷モザイク型メガリンKOマウスのメガリン発現残存近位尿細管細胞 (免疫) のみに認められる空胞 (オートリソソーム異常) 所見 (矢印)

そこで本研究は、「**2 型糖尿病あるいは MetS などの病態において、メガリンを介する PTEC および間質傷害が、IS などの血管内皮細胞傷害因子の PTEC での取込み・代謝および尿中への排出を妨げ、それによって動脈硬化を促進する**」という仮説 (図 2) を検証することを目的とする。

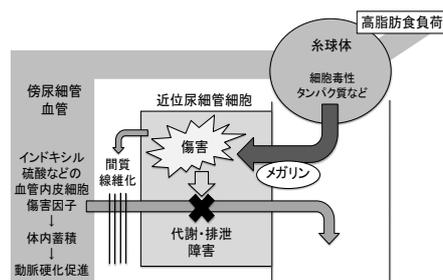


図2 メガリンを介する近位尿細管細胞傷害による動脈硬化促進仮説

そのため、動脈硬化モデルとして確立されているアポ E KO マウスと腎特異的メガリン KO マウスを交配したダブル KO マウスを作製し、高脂肪食負荷を行うことにより、メガリンを介した腎障害と動脈硬化の関連性を検討する。

さらに私たちの研究グループは、メガリンを介する毒性物質の PTEC 取り込みを抑制するための、メガリン阻害薬 X を同定し、特許出願中である。また、転写因子 Nrf2 作動薬であるバルドキシロンメチルは、糖尿病性腎症患者の腎機能改善効果が期待されているが、サルにおける実験で PTEC のメガリン発現を抑制することが報告されている。本研究においては、これらの薬剤によってメガリン機能を阻害/抑制することによる動脈硬化軽減効果についての基礎検討も行う。

## 2. 研究の目的

腎障害は心血管疾患を惹起する重大な要因であるが、そのような「心腎連関」の機序は未だ不明である。私たちは高脂肪食負荷マウスにおける腎障害において、エンドサイトーシス受容体メガリンを介する近位尿管上皮細胞 (PTEC) および間質傷害が一次的に重要であることを明らかにした。PTEC はインドキシル硫酸 (IS) などの血管内皮細胞傷害因子の代謝・排泄に関わることから、PTEC および間質傷害はそれらの因子の体内蓄積を招く可能性がある。そこで本研究では、動脈硬化モデルであるアポ E KO マウスを腎特異的メガリン KO マウスと交配させ、高脂肪食負荷を行って、動脈硬化の発症にメガリンを介する腎障害がどのように関与するか、IS やその他の因子の動態と併せて解析する。さらに腎メガリンの発現抑制あるいは阻害作用を有する薬剤による動脈硬化軽減効果を検討する。

## 3. 研究の方法

### 1) メガリン・アポ E ダブル KO マウスの作成

既に私たちは、すでに腎特異的モザイク型メガリン KO マウス (apoE Cre, megalin lox, メ

ガリン KO 効率が約 60%) を実験に用いている。さらに、PTEC 発現性プロモーター NDRG1 下流にタモキシフェン誘導型 Cre ERT2 を連結した遺伝子構造を持つ NDRG1-Cre ERT2 マウスを megalin lox マウスと交配することにより、新規の腎特異的・高効率・薬剤誘導型メガリン KO マウスを作成している。そこで、これらのマウスを市販のアポ E KO マウス (apoE -/-) と交配し (バックグラウンドはともに C57BL/6J)、ダブル KO マウスを作成する。

### 2) メガリン・アポ E ダブル KO マウスにおける腎傷害と動脈硬化病変の関係の検討

メガリン・アポ E ダブル KO マウス (Cre+, megalin lox/lox, apoE -/-) と対照アポ E KO マウス (Cre-, megalin lox/lox, apoE -/-) について、動脈硬化病変の違いを検討する。

### 3) メガリンの機能抑制が IS の血中・尿中濃度、大動脈の動脈硬化病変への蓄積に及ぼす影響の検討

メガリン・アポ E ダブル KO マウスと対照アポ E KO マウスにおいて、IS の血中・尿中濃度と大動脈硬化病変内の IS 沈着状態を評価する。既報に基づいて、IS の血中・尿中濃度は HPLC を用いて測定し、動脈硬化病変の IS は抗 IS 抗体を用いた免疫染色によって評価する。メガリン・アポ E ダブル KO マウスでは、対照アポ E KO マウスに比較して、IS の尿排泄が保たれ、血中濃度が上昇しないことが予想される。さらに、動脈硬化病変内の IS の沈着も軽度であると予想される。

### 4-a) メガリン・アポ E ダブル KO マウスの血清が血管内皮細胞に与える影響の検討

TNF- $\alpha$  により傷害を引き起こしたヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて、血清なし群、メガリン・アポ E KO マウスより得た血清を添加した群、対照アポ E KO マウスより得た血清を添加した群などに分け、以下の項目について比較検討する。

- i) 血管内皮細胞の炎症性サイトカインの産生
- ii) 接着分子の発現

iii)一酸化窒素の産生

#### 4-b) メガリン・アポEダブルKOマウスの血清がマクロファージに与える影響の検討

リポポリサッカライドにて刺激されたヒトマクロファージである THP-1 細胞、マウス腹腔内マクロファージを用いて、血清なし群、メガリン・アポE KO マウスより得た血清を添加した群、対照アポE KO マウスより得た血清を添加した群に分け、以下の項目について比較検討する。

i)マクロファージの M1, M2 の極性

ii)マクロファージの炎症性サイトカインの産生

#### 5) メガリン阻害薬 X あるいはバルドキシロンメチルの動脈硬化抑制作用の検討

上記 1)-4)において、腎におけるメガリン発現抑制が動脈硬化に対し保護的作用を有することが明らかになった場合、アポE KO マウスに対して、通常食もしくは高脂肪食の条件のもと、メガリン阻害薬 X あるいはバルドキシロンメチルを投与し、それらの薬剤による腎保護作用を評価するとともに、動脈硬化病変について、2)と同様に、大動脈の *En face* Sudan IV 染色、大動脈基部の Oil-red-O 染色等で評価を行い、どの程度抑制されるか検討する。

#### 4. 研究成果

C57BL/6 のバックグラウンドを有するアポE KO マウスの凍結受精卵を日本チャールス・リバー株式会社を通じて Jackson laboratory より購入し、体外受精による繁殖を開始したが、産仔が本来の毛色と異なる灰色ないし白色であった。アポE KO であることは確認できたが、系統が異なるものであったため、再度凍結胚受精卵を送付してもらった。出生後は、本来の黒色の毛色だった。さらに、大学動物実験施設内での動物の移動もあり、計画より遅れたが、メガリン・アポEダブルKOマウスの樹立に成功した。頭数が少ないものの、検討した結果、15週齢のメガリン・アポEダブルKO

マウスでは、コントロールであるアポE KO と比較し変化がなかった。しかし、21週齢メガリン・アポEダブルKOマウスでは、アポE KO マウスと比較して、動脈硬化病変が軽減している傾向を認めた(図3)。今後さらに詳細を検討していく。

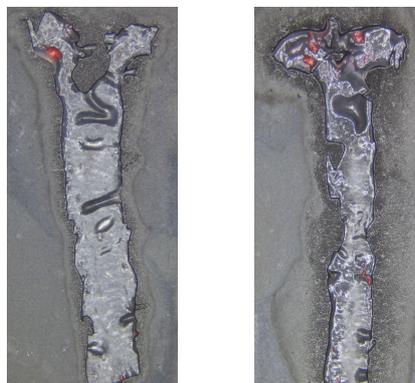


図3. *En-face* Sudan IV 染色 左: 21w ダブル KO マウス 右: 21w アポE KO マウス

また、動脈硬化の検討の中で、食事摂取の影響も同時に検討した。片腎摘出後の状態において、動物性タンパク質と植物性タンパク質が動脈硬化病変に対しどのような違いをもたらすか検討した。10週齢の C57BL/6 のバックグラウンドをもつアポE KO マウスに片腎摘出術を行い、2群に分けて、11週齢より7週間カゼイン食ないし米タンパク質食を投与した。アポE KO マウスに、片腎摘出して腎の容積が減少すると動脈硬化がより増強することがすでに報告されている。カゼイン食は、AIG-93G の飼料より L-cystein を除き、カロリー比粗蛋白を 20%、粗脂質を 16%と調整し、米タンパク質食は、そのカゼインを米胚乳に置き換えることで調整した。米の胚乳はアルカリ抽出法にて精製した。両群間のカロリー摂取量は、同一となるように調整した。

*En-face* Sudan IV 染色により大動脈の動脈硬化病変を比較した。米タンパク質食群は、カゼイン食群と比較して、動脈硬化病変が有意に抑制されていた(図4)。米タンパク質食群  $0.28 \pm 0.13$ , カゼイン食群  $0.67 \pm 0.33 \text{ mm}^2$ ,  $p=0.038$   $N=5, 5$

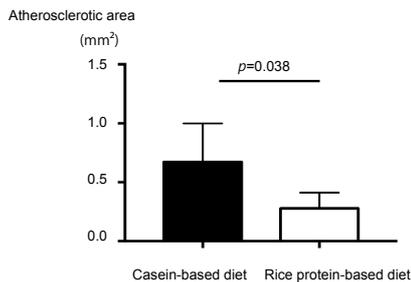
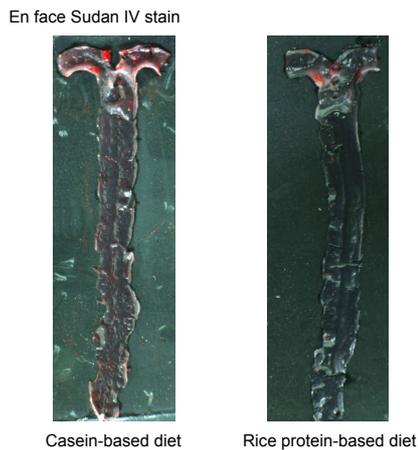


図4. En-face Sudan IV 染色 左: カゼイン食マウス 右: 米タンパク質食マウス

総コレステロール、トリグリセリド、VLDL、LDL、HDLは、ゲル浸透高速液体クロマトグラフィーにより測定した。腎障害の程度は、血清クレアチニン値、血清シスタチンC値、尿kidney injury molecule-1 (KIM-1)値、血清インドキシル硫酸値、尿アルブミン/クレアチニン比、腎組織の組織学的な検討により評価した。米タンパク質食群とカゼイン食群では、体重、コレステロール、腎機能、腎組織に変化を認めなかった(図5, 表1)。インドキシル硫酸値は、大動脈の動脈硬化が軽減している米タンパク質食群で、むしろ高値だったが、インドキシル硫酸の生成に関わるトリプトファンの含有が米タンパク質の餌において、カゼインの餌と比較して、高値だったためと考えられた。7週間の餌摂取の比較であり、長期的な慢性状態での検討は今後の課題と考えられた。

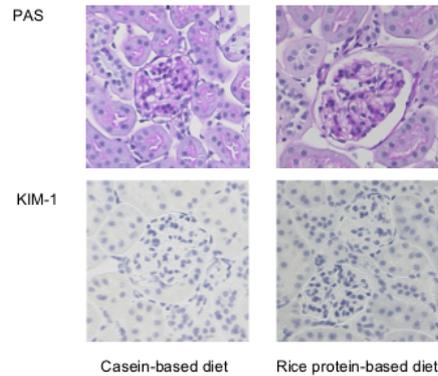


図5. PAS, KIM-1 染色 左: カゼイン食マウス 右: 米タンパク質食マウス

	Casein-based diet	Rice protein-based diet	
Body Weight (g)	25.03 ± 2.23	25.23 ± 1.28	n.s
Serum Creatinine (mg/dl)	0.46 ± 0.19	0.59 ± 0.12	n.s
Serum Cystatin C (ng/ml)	1.21 ± 0.36	1.00 ± 0.10	n.s
Urinary albumin /urinary creatinine (mg/gcre)	12.61 ± 25.48	10.91 ± 15.33	n.s
Urinary KIM-1 (ng/ml)	1.86 ± 0.75	1.30 ± 0.88	n.s
Total Cholesterol (mg/dl)	389.69 ± 54.39	373.82 ± 60.29	n.s
Triglyceride (mg/dl)	43.17 ± 11.06	50.25 ± 21.80	n.s
VLDL-Cholesterol (mg/dl)	230.92 ± 38.84	230.64 ± 40.95	n.s
LDL-Cholesterol (mg/dl)	93.04 ± 16.17	80.60 ± 15.23	n.s
HDL-Cholesterol (mg/dl)	25.72 ± 3.55	23.45 ± 3.96	n.s
Indoxyl sulfate (mg/dl)	0.16 ± 0.05	0.36 ± 0.15	P=0.005

表1. N=6, 6

HDLは、血管内皮細胞の維持、抗動脈硬化作用を有するとされる。研究代表者である俣田は慢性腎臓病患者において、その機能が失われ血管内皮細胞の炎症を抑えるよりむしろ惹起することを報告している。そこで、両群間でのHDLの抗炎症作用について検討した。HDL分画はPEG沈殿法にアポB分画を除去して精製した。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)にtumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )とHDL分画を加えて6時間培養し、Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$ をreal-time reverse transcription PCRにて評価した。炎症サイトカインであるMCP-1, IL-6, IL-1 $\beta$ の産生が米タンパク食群で有意に抑制されていた。HDLの抗炎症作用の機能が米タンパク質摂取で、より保たれていることが示唆された(図6)。米タンパク質食群とカゼイン食群において、腎の傷害の程度に違いを認めなかったが、このような動脈硬化の程度の差を来した原因について、HDLの機能の違いが関与していることが示唆された。

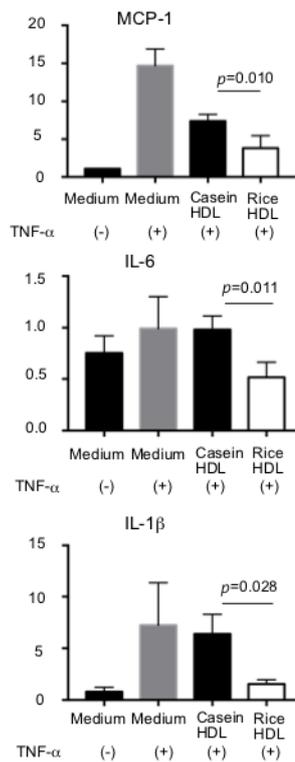


図 6. N=5, 5

<考察・まとめ>

米タンパク質（植物性タンパク質）の摂取は、通常食であるカゼイン（動物性タンパク質）と比較して、片腎摘出にともなう動脈硬化病変を軽減した。片腎摘出はされているが、腎機能マーカー、腎組織所見に異常を認めず、両群間の腎機能障害の差によって動脈硬化病変の違いがもたらされたものではないと考えられた。HDLは、血管内皮細胞の維持、抗動脈硬化作用を有するとされる。研究代表者 俣田は慢性腎臓病患者において、その機能が失われ、血管内皮細胞の炎症を抑えるよりむしろ惹起することを報告している。米タンパク質摂取マウスから得た HDL は、カゼイン摂取マウスから得た HDL と比較して炎症性サイトカインの産生が抑制されていた。米タンパク質における腎障害に伴う動脈硬化の軽減に HDL の抗炎症作用が保持されていることが関与していると考えられた。また、両群間において、コレステロール分画、また特に HDL 値に違いを認めていない。これらの結果から、植物性タンパク質摂取は、動物性タンパク質摂取と

比べて、HDL の抗炎症作用をより保つことにより、片腎摘出して腎の容積減少によって増強された動脈硬化病変を軽減していることが示唆された。

現在論文投稿に向けて、準備中である。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

俣田亮平 (Ryohei Kaseda)

研究者番号 : 20737697