

令和元年6月5日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01844

研究課題名(和文)新規ミトコンドリア蛋白質Apopと加齢による腎機能障害に関する基礎的・疫学的研究

研究課題名(英文)Basic and epidemiological studies to clarify a role of Apop-1 in aging

研究代表者

福尾 恵介 (FUKUO, keisuke)

武庫川女子大学・生活環境学部・教授

研究者番号：40156758

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)：本研究はミトコンドリア機能に関わるApoptogenic protein-1(Apop-1)が加齢による老化関連ストレスや腎機能低下に与える影響を明らかにすることを目的とした。老化の原因となる慢性炎症を惹起させるため、Apop-1欠損マウス(Apop-1KO)に高脂肪食を6か月間与えた結果、予想に反して腎機能に有意な変化は認められなかった一方、野生型マウスと比較して肝臓への脂肪蓄積が顕著に低下した。この機序として、Apop-1KOではエネルギー代謝関連遺伝子PGC1 α の肝臓における発現を制御し、エネルギー過剰産生を抑制することにより、脂肪肝を防いだ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪肝は肝硬変や肝がんの原因となるが、その発症機序は明らかでない。最近、肥満や糖尿病の増加とともに脂肪肝の患者数が急増し、大きな社会問題となっている。本研究は、脂肪肝の発症メカニズムにミトコンドリア蛋白質であるApop-1が関わる可能性を示したものである。今後、Apop-1を標的とした脂肪肝の予防、治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored a role of apoptogenic protein-1 (Apop-1), which is a protein localized in mitochondria, in the mechanism of aging and age-related renal dysfunction. Apop-1 knockout mice (Apop-1KO) were fed a high-fat diet for 6 months. In the results, renal function was not changed between wild-type mice and Apop-1KO. Unexpectedly, high-fat diet induced-lipid accumulation in the liver was significantly prevented in Apop-1KO compared to wild-type. This result suggests that Apop-1 protein may contribute to the fatty liver diseases.

研究分野：老年内科

キーワード：Apoptogenic protein-1 ミトコンドリア エネルギー代謝 脂肪肝

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

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、脂質代謝異常と動脈硬化病変を発症する Apolipoprotein E 欠損マウスより動脈硬化病巣に発現する新規遺伝子 Apoptogenic protein-1 (Apop-1)を同定し、Apop-1 遺伝子は、ほとんど全ての臓器に発現し、コードする蛋白質はミトコンドリアに局在すること、ヒト血管内皮細胞において Akt シグナル依存性にアポトーシス制御に関与することを明らかとしてきた。また、ヒト血管内皮細胞において Apop-1 は高グルコース負荷によるミトコンドリア ROS 産生に関与すること、若年女性対象の解析より Apop-1 遺伝子の一塩基多型 (SNP) はインスリン抵抗性と関連することを示した。さらに、最近の研究ではミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV であるシトクロム c 酸化酵素 (cytochrome c oxidase, COX) 異常を呈するミトコンドリア病患者の責任遺伝子の一つとして Apop-1 の欠損変異が同定された。このプロジェクトでは 5 家系 6 名に Apop-1 変異が見つかり、彼らの骨格筋 COX 活性は 3~20%にまで低下していたことから、Apop-1 は COX 発現及び活性の制御に重要な役割を担うことが示唆された。これらより、ミトコンドリア機能障害が一因となる様々な病態の発症に Apop-1 が関与する可能性が示された。

興味深いことに、加齢に伴う進行性腎障害の一因にミトコンドリア機能異常が関与することが報告されている。特に、ミトコンドリアが豊富な尿細管上皮細胞での機能異常は、血管新生因子の発現抑制、慢性虚血、腎線維化を介して腎障害発症に関与することなどが報告されている。これらの知見から、Apop-1 は、ミトコンドリア機能制御を介して加齢による慢性炎症及び腎不全の発症に関与することが推察される。

2. 研究の目的

我々は毎年、地域在住高齢者を対象とした身体計測会を実施している。しかし、同じ年齢であっても若々しく健康な人もいれば、弱々しく虚弱 (フレイル) の人も存在する。このような加齢性の病的変化には個人差があり、遺伝的要因や環境要因が関わっている。例えば、我々の先行研究において、血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の G894T 多型 (rs1799983) は地域在住女性高齢者における CKD 罹患率や腎機能と HDL コレステロール、炎症指標である TNF- α との関連、さらに日常的な清涼飲料水の飲用習慣が HDL-コレステロール値に与える影響に差異を生じさせた。

遺伝的要因や環境要因に対して個別に対応し、より効果的に加齢に伴う病的変化にブレーキをかけることができれば、寝たきり・要介護予防、健康寿命の延伸に大きく寄与すると考えられる。そこで本研究は新たなテーラーメイド健康維持、増進戦略の創出を目指し、Apop-1 欠損 (Apop-K0) マウスを用いて Apop-1 と老化関連ストレスや腎不全発症機序との関連を明らかにすること、地域在住高齢者における Apop-1 ジェノタイプの違いが環境因子と慢性炎症、腎機能の関連に与える影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Apop-K0 マウスを用いた高脂肪食負荷試験

老化の原因となる慢性炎症を惹起させる目的で、8 週令の雄性 Apop-K0 マウスと C57BL/6 (WT) マウスに通常飼料 (脂質エネルギー比率; 12.8%) または高脂肪飼料 (脂質エネルギー比率; 30.2%、QuickFat、日本クレア) を 24 週間自由摂食させた。実験期間中は食餌摂取量及び体重を経時的に測定し、各摂食期間終了後は畜尿、X 線 CT による体組成解析後、一晚絶食後麻酔下で解剖し採血を行った。

X線 CT による体組成、肝臓脂肪評価

マウスの体組成、肝臓脂肪評価を実験動物用 X 線 CT 装置 Latheta LCT-200 (日立アロカメディカル株式会社) を用い、イソフルラン (和光純薬工業株式会社) によるガス麻酔下で CT 撮影を行った。

オイルレッド O 染色

4%PFA で固定後の肝臓サンプルを用いて、7 μ m の薄層切片を作製した。切片標本を流水で洗浄後、60%イソプロピルアルコールに 1 分浸け、オイルレッド O 染色液 (武藤化学株式会社) に 25 分浸水させた。その後 60%イソプロピルアルコールに 1 分浸け、純水で洗浄、ヘマトキシリン液 (NEW ヘマトキシリン (Type M) : 武藤化学株式会社) に 10 分浸した。その後、流水で 20 分洗い、封入した。

地域在住高齢者を対象とした Apop-1 ジェノタイプ解析

地域在住高齢者を対象とした身体計測会の参加者のうち、研究同意の得られた者から採取した血液を用いて DNA 抽出し、Taqman PCR 法による Apop-1 ジェノタイプ (rs12889403) 解析を行った。

統計解析

統計解析は Mann-Whitney の U 検定および繰り返しのない 2 元配置の分散分析を行った。すべての解析は SPSS statistics 22.0 を用いた。なお統計学的有意水準は、5%未満とした。

4 . 研究成果

24 週目の体重や除脂肪率、体脂肪率、食餌摂取量は普通食群、高脂肪食群ともに WT と Apop-KO の違いはなかった。腎機能を評価するため BUN、クレアチニン、尿中アルブミンを測定した結果、仮説に反して WT と Apop-1KO との間に腎機能の違いは認められなかった。しかしながら、興味深いことに肝臓脂肪量は普通食群、高脂肪食群ともに WT と比較し、Apop-KO で有意に低値であるという所見が得られた (図 1)。

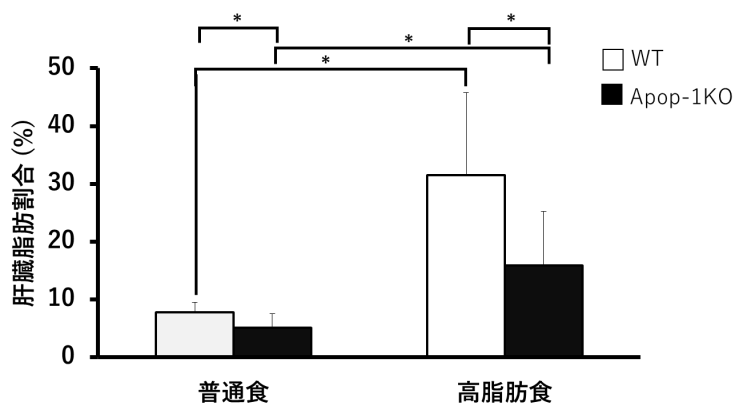


図 1 . X 線 CT によって測定した肝臓脂肪含有率

(普通食群 ; WT : n=11, Apop-KO : n=8, 高脂肪食群 ; WT : n=12, Apop-KO : n=9)

* $p < 0.05$ 、棒グラフは平均 \pm 標準偏差を示す。

解剖時の体重、内臓脂肪量は、各群ともに Apop-K0 は WT と比べ違いは見られなかったが、肝重量は高脂肪食群で有意に低値を示した。また、肝細胞傷害の指標である血中 ALT 値は WT において、高脂肪食負荷による有意な上昇を示したが、Apop-K0 では高脂肪食負荷による上昇は認められなかった。さらに、肝組織のオイルレッド O 染色の結果、WT は高脂肪食負荷による脂肪蓄積量の有意な増加や大滴性の脂肪滴形成を認めたが、Apop-K0 は高脂肪食負荷による脂肪蓄積は有意に抑制されていた（図 2）。

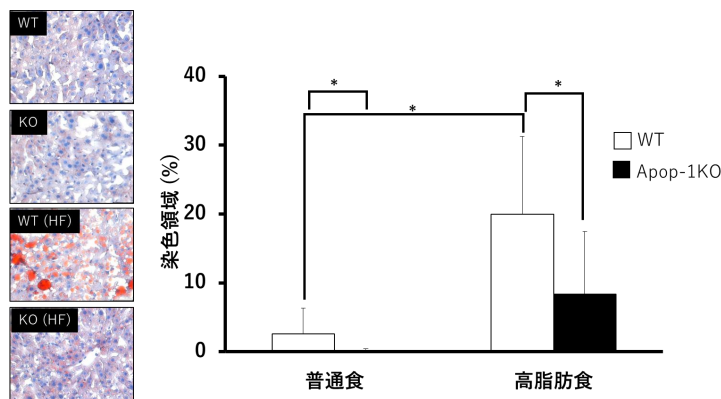


図 2 . 肝臓組織のオイルレッド O 染色

(普通食群 ; WT : n=11, Apop-K0 : n=8, 高脂肪食群 ; WT : n=12, Apop-K0 : n=8)

*p<0.05、棒グラフは平均 ± 標準偏差を示す。

肝臓におけるミトコンドリア呼吸鎖活性測定の結果、Apop-K0 は WT に比し、各群で COX 活性の低値が見られたが、ATP 量は普通食群には違いが見られず、高脂肪食群では低値傾向となった。肝組織中エネルギー代謝関連遺伝子の発現量を評価した結果、ミトコンドリア新生や呼吸鎖活性、酸化などエネルギー代謝の制御因子である PGC1 発現量が、高脂肪食群において WT に比し Apop-K0 で有意に低値を示した。

そのほか、IPGTT、ITT の結果、高脂肪食群の Apop-K0 は WT と比較してインスリン抵抗性は同程度であったが、インスリン分泌低下による耐糖能異常が見られた。次に熱産生能を評価するため、直腸温を測定したところ、Apop-K0 は、普通食群では WT との違いは見られなかったが、高脂肪食群で WT に比し熱産生能の低下が認められた。

以上より、本研究の当初の目的である Apop-1 と加齢に伴う腎機能低下との関連性は見いだせなかったが、Apop-1 欠損マウスは高脂肪食負荷による肝臓への脂肪蓄積が抑制されることを明らかにした。Apop-K0 における COX 活性の低下によって、エネルギー代謝が抑制されることが肝臓の脂肪蓄積に影響したのではないかと考えられる（図 3）。

また、Apop-1 は高脂肪食負荷による耐糖能異常の発症や熱産生調節にも役割を担う可能性が示唆された。今後は、肝臓組織のミトコンドリア形態の変化を観察し、Apop-1 とミトコンドリア機能及び肝脂肪化の関連をより詳細に検討する予定である。

また、2017 年度及び 2018 年度の地域身体計測会に参加した高齢者 177 名の Apop-1 ジェノタイプ (rs12889403) 解析を行ったが、腎機能との関連については動物実験の結果を受けてペンディングした。今後、肝機能や炎症に焦点を当て解析を進めていく予定である。

本成果は、脂肪肝の発症メカニズムにミトコンドリア蛋白質である Apop-1 が関わる可能性を示したものである。今後、Apop-1 を標的とした脂肪肝の予防、治療法の開発が期待される。

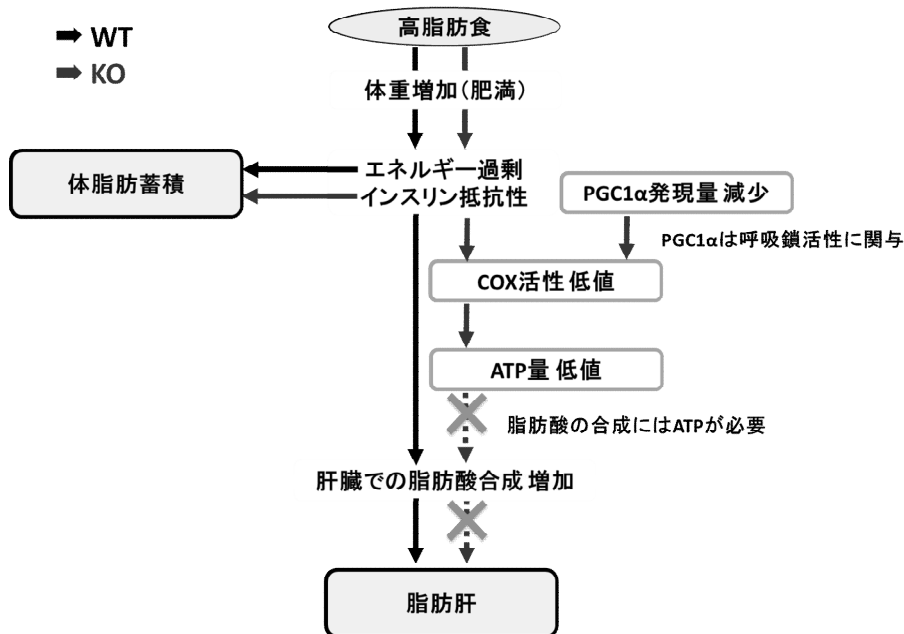


図3 . 脂肪肝抑制のメカニズム

< 引用文献 >

- J Biol Chem.* 2006;281:23899-23907
Biochem Biophys Res Commun. 2008;377:1097-1101
 日本臨床養学会雑誌 2011;32:159-166
 日本臨床栄養学会雑誌 2013;35:199-206
Am J Hum Genet. 2014;4;95(3):315-325.
Lab Invest. 2011;91(2):190-202.
 栄養科学研究雑誌 2016;5:11-18

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

岡田 董、横路 三有紀、福尾 恵介「エネルギー代謝におけるミトコンドリア蛋白質 Apop の役割の検討」第 39 回日本臨床栄養学会総会 (2017 年)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：安田 修

ローマ字氏名：YASUDA osamu

所属研究機関名：鹿屋体育大学

部局名：スポーツ生命科学系

職名：教授

研究者番号(8桁): 00372615

研究分担者氏名：横路 三有紀

ローマ字氏名：YOKORO miyuki

所属研究機関名：武庫川女子大学

部局名：生活環境学部 食物栄養学科

職名：助教

研究者番号(8桁): 80757188

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。