

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590937
 研究課題名（和文）メタボリックシンドローム動物モデルの腎臓脂質代謝障害の
 発症メカニズムと生理的意義
 研究課題名（英文）Alteration of renal lipid metabolism and its physiological importance
 in animal model of metabolic syndrome
 研究代表者
 石坂 信和（ISHIZAKA NOBUKAZU）
 東京大学・医学部付属病院・講師
 研究者番号：20270879

研究成果の概要：2型糖尿病および高血圧を自然発症する OLETF ラットの腎臓細管において、脂肪滴の集積と O_2^- 過剰産生を認めた。アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、またはカルシウム拮抗薬の連続 8 週投与は、OLETF 腎における腎臓脂質含量を低下させ、 O_2^- 産生亢進を抑制し、また、AMP キナーゼの活性を亢進していることが明らかになった。いずれの降圧剤も糖尿病モデルにおける腎リポキシシティ改善に有効である可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：脂質、リポキシシティ、レニン・アンジオテンシン系、インスリン抵抗性、
 メタボリックシンドローム、腎機能、蛋白尿、PPAR アゴニスト

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者らは、高血圧による臓器障害発生のメカニズムを解明することを目的に、アンジオテンシン II をラットへ持続投与し、高血圧モデルを作成、標的臓器における病態生理を検討してきた。

その結果、腎、心血管、及び肝臓において鉄動態の異常が生じていること、また、鉄動態の異常が酸化ストレスレベルの亢進により組織障害を助長している可能性を見出した。

(2) 鉄は、スーパーオキシド、過酸化水素など

の、比較的毒性の弱い活性酸素種からハイドロキシルラジカルなどの、組織毒性の強い活性酸素種を生成する触媒として働く。アンジオテンシン II 投与は、標的臓器において NOX などの発現亢進から、NADH オキシダーゼを活性化し、スーパーオキシドの過剰産生に働くことから、鉄集積は、アンジオテンシン II によるスーパーオキシド産生亢進とあいまって酸化ストレスレベルを上昇している可能性がある。一方、詳細な組織学的な検討から、このスーパーオキシドの過剰産生部位は、鉄集積部とは異なること、ま

た、過剰産生部位では中性脂質が集積していることが明らかになった。

(3)脂質集積部位では、TGF- β などの線維化関連遺伝子や、PDGFファミリーなどの増殖関連遺伝子の mRNA 発現が増加していること、PCNA 陽性の細胞分裂が生じていることなどを明らかにすることができた。組織局在の一致は、脂質集積と、組織障害、増殖の間になんらかの関連があることを示唆していると考えられる。

2. 研究の目的

(1) ここまでの検討で、アンジオテンシン II 投与による高血圧誘導がラット腎における脂質動態の異常と、スーパーオキシダの過剰産生に働く、という結果が得られている。当該研究期間中は、糖尿病物モデルにおいても類似の現象が生じているか、また、そうであれば、レニン・アンジオテンシン系の活性亢進が、その現象に関与しているかどうかについて注目した。

(2) 対象として(2型)糖尿病を自然発症してくる OLETF ラットを用い、OLETF ラットの腎において、脂質集積が生じているかどうか、また、その集積部に一致してスーパーオキシダの産生亢進を認めるかどうかを検討した。

(3) また並行して、アンジオテンシン II による脂質の集積が、腎以外の組織においても認められるかどうかについて検討した。

3. 研究の方法

(1) 34 週齢の OLETF ラットに、ロサルタン 25 mg/kg/日の割合で経口投与を開始し、42 週齢の時点まで継続した。Preliminary な検討により、ロサルタン投与は若干の血圧低下をもたらすことが明らかになったため、他のクラスの降圧剤として、カルシウム拮抗薬、ベニジピンを 3 mg/kg/日の割合で、同じく経口投与をおこなった。また、糖尿病を発症しない、(あるいは程度の軽い)コントロールとして、LETO ラットを用いた。

(2) 脂質の定量は、組織から抽出後、WAKO の E テストキットを使用しておこなった。

(3) 脂質の局在、およびスーパーオキシダの局在については、非固定凍結切片に対してそれぞれ、オイルレッド O 染色、dihydroethidium (DHE)染色を行い検討した。

4. 研究成果

(1) 42 週齢の段階においては、OLETF は、対照の LETO と比較して収縮期血圧が高かった。ロサルタン、ベニジピンはいずれも降圧効果を

有しており、OLETF の血圧を LETO のレベルまで減少した。一方、これらの薬剤は、OLETF の糖・脂質データには有意な影響をあたえなかった(表 1)。OLETF は LETO に比較し、1 日尿蛋白排泄量が有意に増加していたが、ロサルタン、ベニジピンはこれを同程度に減少した。なお、クレアチニンクリアランスは、これらの薬剤により有意な影響を受けなかった。

Variables	LETO	OLETF	P value (vs. LETO)	OLETF/Ben	P value (vs. OLETF)	OLETF/Los	P value (vs. OLETF)
n	11	11		11		6	
Body weight (g)	446±8	481±13	0.014	476±11	0.394	470±15	0.311
Systolic blood pressure (mm Hg)	136±2	149±4	0.012	138±3	0.027	135±3	0.015
Total cholesterol (mg/dl)	78.7±2.6	78.6±3.0	0.487	79.2±4.5	0.461	78.5±4.3	0.495
Triglyceride (mg/dl)	172±2.3	41.0±9.1	0.005	28.5±6.1	0.461	22.8±5.0	0.098
Plasma fasting glucose (mg/dl)	159±4	203±22	0.028	184±16	0.238	187±16	0.288

表 1. 各群の血圧、体重、血清糖・脂質データ

(2) オイルレッド O 染色により脂質の局在について検討した。その結果、LETO においては明らかな脂質集積を認めなかったが、OLETF の腎では尿細管を中心に中性脂質の集積を認め、そのパターンはアンジオテンシン II 投与ラット腎と類似していた(図 1)。一方、脂質集積は、部分的にロサルタン、ベニジピンで抑制され、これらの降圧剤の効果は同程度であった。

組織脂質含量では、OLETF 腎で 6.7 ± 1.1 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{tissue}$ と増加していた中性脂肪量が、ロサルタン投与により 3.3 ± 0.4 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{tissue}$ 、ベニジピン投与により 1.9 ± 0.1 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{tissue}$ と減少しており、オイルレッド O の所見とも合致する知見であると考えられた。

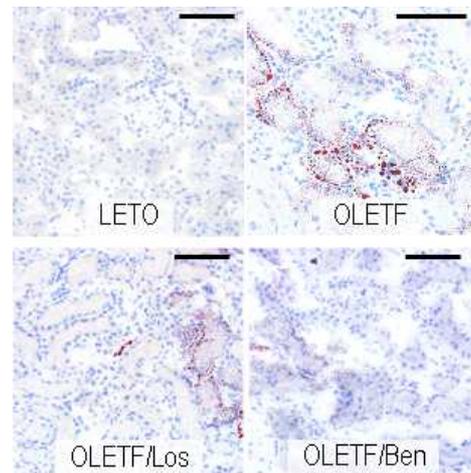


図1. オイルレッド O による脂質の局在

(3) 次に、OLETF ラット腎のスーパーオキシダ産生について検討した。LETO 腎に比較して、OLETF 腎では DHE 染色によるスーパーオキシダ染色が増加していたが、ロサルタン、ベニジ

ピンとも、染色シグナルを減少した(図 2)。また、連続切片の染色により、スーパーオキシド過剰産生部位の一部は、やはり脂質集積部位と一致していることが明らかになった(図 2、矢頭)。なお、DHE シグナルは、血管壁でも増強していたが、血管壁においては明らかな脂質集積は認めなかった(図 2、矢印)。

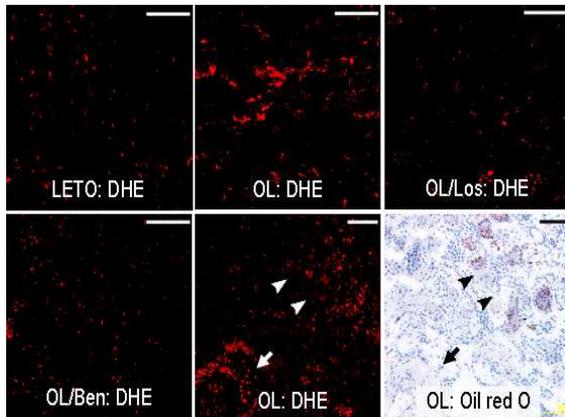


図2. スーパーオキシド産生の局在と脂質集積

(4) 以上の知見は、(2 型)糖尿病ラットにおいても、アンジオテンシン II 投与ラットと類似した尿細管への脂質集積が生じること、しかしながら、これはおそらく RAS 依存性ではなく、血圧に依存した現象である可能性が示唆された。

われわれは、以前の検討から、アンジオテンシン II 投与ラットの腎においては、SREBP-1c や脂肪酸合成酵素(FAS)の発現など脂質合成系を含めた脂質代謝関連遺伝子の発現が調節されていることを示した。他のグループからの報告でも、(1 型)糖尿病動物モデルの腎において、SREBP-1 発現が亢進していた、という報告がある。

そこで、本研究においても、いくつかの脂質代謝関連遺伝子の発現について検討した。その結果、OLETF ラット腎ではアンジオテンシン II 投与ラット腎とは異なり、SREBP-1 の発現は亢進していなかった(図 3)。また、脂質燃焼に参与すると考えられている AMP キナーゼの活性型(P-AMPK)と、ACC の活性抑制型(P-ACC)が増加していることが明らかになり、これらの現象は、脂質集積の原因、というより、むしろ過剰集積した脂質を燃焼し解消する方向の変化ではないかと考えている。

(5) これらのことから、糖尿病モデルである OLETF ラットの腎における脂質の集積は、その局在がアンジオテンシン II 投与モデルと類似するものの、いくつかの相違点が存在することも明らかになった。

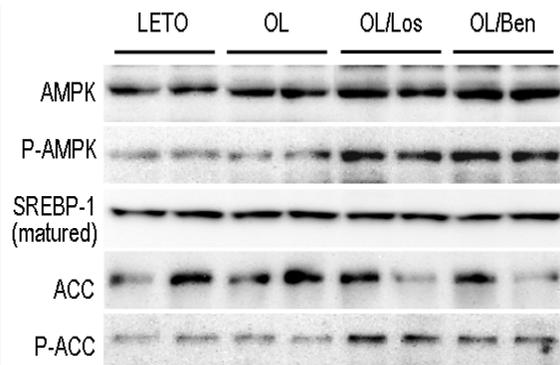


図3. 腎における脂質代謝関連遺伝子の発現調節

将来的には、両モデルの心臓における脂肪毒性の有無とその相違にアプローチしたいと考えている。そこで、今回、アンジオテンシン II による心臓における脂質の集積についても簡単に検討することにした(図 4)。

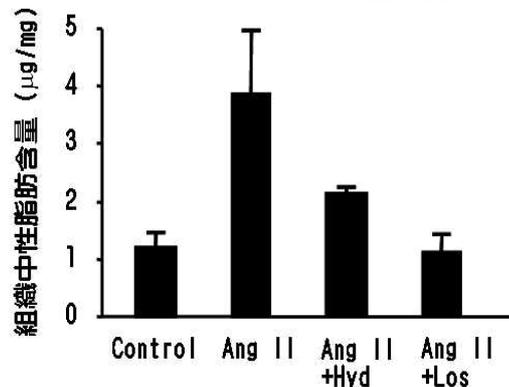
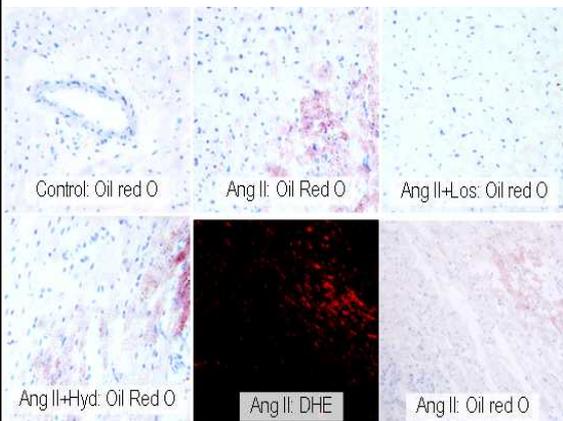


図4. 脂質集積とスーパーオキシド産生

その結果、アンジオテンシン II 投与は、ラット心においても脂質集積を誘導すること、また、やはり、脂質集積部に一致したスーパーオキシド過剰産生を認めることが明らかになった。脂質集積の抑制効果として、ロサルタンとヒドララジンに差があることから、このアンジオテンシン II による心への脂質集積の少なくとも一部は、アンジオテンシン II に特異的な現象であることが示

唆された。

(6) 今後の展開として以下の点について検討を広げてゆきたいと考えている。

1 型糖尿病モデルの腎においても脂質動態の異常が生じているかどうか。

OLETF ラットへの PPAR アゴニスト投与が、腎への脂質集積を抑制するかどうか。また、腎機能、蛋白尿に対してどのような影響を有しているか。血圧依存性はどうか。

アンジオテンシン II 投与ラットへの PPAR アゴニスト投与が、心・腎への脂質集積にどのような影響を与えるか。また、心機能、腎機能、蛋白尿に対してどのような影響を有しているか。

OLETF ラットへの PPAR アゴニストの投与が、同ラットの心臓脂質含量にどのような影響をおよぼすか、また、 $\pm dP/dt$ などの心機能に対してはどうか。

PPAR 欠損マウスにおいても、アンジオテンシン II による高血圧誘導や、ストレプトゾトシンによる糖尿病誘導は、心・腎における脂質集積を惹起するか。

これらのモデルにおいて、アディポサイトカインがどのように調節されているか。

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19件)

1. Seki G, Yamada H, Lia Y, Horita S, Ishizaka N, Koike K, Fujita T: Roles of MEK/ERK pathway in vascular and renal tubular actions of angiotensin II. *Vascular Disease Prevention* 2009 in press. 査読有.
2. Ishizaka N, Ishizaka Y, Yamakado M, Toda E, Koike K, Nagai R: Association between metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in individuals without diabetes based on the oral glucose tolerance test. *Atherosclerosis* 204(2): 619-623, 2009. 査読有.
3. Hongo M, Ishizaka N, Furuta K, Yahagi N, Saito K, Sakurai R, Matsuzaki G, Nagai R: Administration of angiotensin II, but not catecholamines, induces accumulation of lipids in the rat heart. *Eur J Pharmacol* 604(1-3):87-92, 2009. 査読有.
4. 石坂信和: 健診受診男性における CKD と頸動脈肥厚の関連. *血圧* 15(5): 380-381, 2008. 査読無.
5. 石坂信和: CKD と肥満の関連. *血圧* 15(5): 382-383, 2008. 査読無.
6. Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Koike K, Yamakado M, Nagai R: Are serum carcinoembryonic antigen levels associated with carotid atherosclerosis in Japanese men? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(1): 160-165, 2008. 査読有.
7. Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Shimomura H, Koike K, Seki G, Nagai R, Yamakado M: Association between cigarette smoking with chronic kidney disease in Japanese men. *Hypertension Res* 31(3): 485-492, 2008. 査読有.
8. Higashikuni Y, Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Nagai R, Yamakado M: Relationship between blood pressure and chronic kidney disease in the Japanese population: The lower the better even in individuals without hypertension? *Hypertension Res* 31(2): 213-219, 2008. 査読有.
9. Matsuzaki G, Ishizaka N, Furuta K, Hongo M, Saito K, Sakurai R, Koike K, Nagai R: Comparison of vasculoprotective effects of benidipine and losartan in a rat model of metabolic syndrome. *Eur J Pharmacol* 587(1-3): 237-242, 2008. 査読有.
10. Fukuda D, Sata M, Ishizaka N, Nagai R: Critical role of bone marrow angiotensin II type 1 receptor in the pathogenesis of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(1): 90-96, 2008. 査読有.
11. Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Nagai R, Koike K, Hashimoto H, Yamakado M: Relationship between smoking, white blood cell count and metabolic syndrome in Japanese women. *Diabetes Res Clin Pract* 78(1):72-76, 2007. 査読有.
12. Ishizaka N: Carotid ultrasonography in general health screening: Noninvasive assessment of early atherosclerosis. *Ningen Dock* 21(6):47-49, 2007. 査読有.

13. Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Nagai R, Yamakado M: Is metabolic syndrome a risk factor for carotid atherosclerosis in normotensive and prehypertensive individuals? *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 14(2):72-77, 2007. 査読有.
14. Ishizaka N, Ishizaka Y, Nagai R, Toda E, Hashimoto H, Yamakado M: Association between serum albumin, carotid atherosclerosis, and metabolic syndrome in Japanese individuals. *Atherosclerosis* 193(2): 373-379, 2007. 査読有.
15. Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Hashimoto H, Nagai R, Yamakado M: Higher serum uric acid is associated with increased arterial stiffness in Japanese individuals. *Atherosclerosis* 192(1): 131-137, 2007. 査読有.
16. Ishizaka N, Matsuzaki G, Saito K, Furuta K, Mori I, Nagai R: Downregulation of klotho gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Geriatrics & Gerontology International* 7(3):285-292, 2007. 査読有.
17. Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Koike K, Seki G, Nagai R, Yamakado M: Association between obesity and chronic kidney disease in Japanese: Difference in gender and hypertensive status? *Hypertension Res* 30(11): 1059-1064, 2007. 査読有.
18. Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Koike K, Seki G, Nagai R, Yamakado M: Association between chronic kidney disease and carotid intima-media thickening in individuals with hypertension and impaired glucose metabolism. *Hypertension Res* 30(11): 1035-1041, 2007. 査読有.
19. Ishizaka N, Saito K, Furuta K, Matsuzaki G, Koike K, Noiri E, Nagai R: Angiotensin II-induced regulation of the expression and localization of iron metabolism--Related genes in the rat kidney. *Hypertension Res* 30(2):195-202, 2007. 査読有.

[学会発表] (計14件)

1. 本郷真紀子, 石坂信和, 齋藤幹, 古田恭子, 松崎弦, 桜井良太, 永井良三. アンジオテンシンIIによる腎・心への脂質集積. 第9回アンジオテンシン研究会, 2008/12/13, 東京.
2. 石坂信和, 本郷真紀子, 齋藤幹, 松崎弦, 桜井良太, 古田恭子, 永井良三. 2型糖尿病ラットにおけるカルシウム拮抗薬とアンジオテンシンII受容体拮抗薬の血管内皮保護作用の比較. 第49回日本脈管学会総会 2008/10/24, 東京.
3. 本郷真紀子, 石坂信和, 齋藤幹, 松崎弦, 桜井良太, 古田恭子, 永井良三. アンジオテンシンIIによる血管障害への鉄キレーター治療の可能性についての検討. 第49回日本脈管学会総会 2008/10/24, 東京.
4. 本郷真紀子, 石坂信和, 齋藤幹, 古田恭子, 松崎弦, 桜井良太, 永井良三. PPARアゴニスト投与がアンジオテンシンII投与ラット腎への脂質集積に与える影響の検討. 第31回日本高血圧学会 2008/10/9, 札幌.
5. 松崎弦, 石坂信和, 齋藤幹, 本郷真紀子, 桜井良太, 永井良三. 糖尿病動物モデルの血管障害におけるカルシウム拮抗薬とアンジオテンシンII受容体拮抗薬の効果の比較. 第31回日本高血圧学会 2008/10/10, 札幌.
6. 本郷真紀子, 石坂信和, 齋藤幹, 古田恭子, 松崎弦, 桜井良太, 永井良三. アンジオテンシンII投与ラットの心臓における脂質集積とその生理的意義. 第31回日本高血圧学会 2008/10/11, 札幌.
7. 石坂信和, 石坂裕子, 山門 実, 永井良三. 高血圧・糖代謝障害が存在しない, または軽度な場合のメタボリックシンドロームと頸動脈硬化病変. 第56回日本心臓病学会学術集会 2008/9/8, 東京.
8. 本郷真紀子, 石坂信和, 齋藤幹, 松崎弦, 桜井亮太, 古田恭子, 永井良三. アンジオテンシン 投与ラットの心臓におけるリポトキシティ. 第56回日本心臓病学会学術集会 2008/9/10, 東京.
9. 石坂信和. 酸化ストレスと心臓. 第18回 東京高血圧研究会 2008/9/6, 東京.
10. Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Nagai R, Yamakado M. Is metabolic syndrome a risk factor for carotid atherosclerosis in

individuals with normal fasting glucose?
第72回日本循環器学会総会・学術集会
2008/3/30、福岡。

11. Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Nagai R, Yamakado M. Cardiac lipid accumulation in the rat model of angiotensin II-infusion. 第72回日本循環器学会総会・学術集会 2008/3/28、福岡。
12. Ishizaka N, Aizawa T, Saito K, Furuta K, Matsuzaki G, Nagai R. Angiotensin II induces upregulation of heme oxygenase-1 and deposition of iron in the kidney of rat---Possible link to oxidative stress and cellular apoptosis. The Second Congress of International Biolron Society (Biolron 2007), 2007/4/ 5, Kyoto.
13. Ishizaka N, Saito K, Furuta K, Matsuzaki G, Nagai R. Regulation of iron metabolism-related genes in the kidney by angiotensin II. The Second Congress of International Biolron Society (Biolron 2007), 2007/4/5, Kyoto.
14. Ishizaka N, Saito K, Furuta K, Matsuzaki G, Nagai R. Altered iron homeostasis as an underlying mechanism of Angiotensin II-induced cardiovascular damage. The Second Congress of International Biolron Society (Biolron 2007), 2007/4/4, Kyoto.

6. 研究組織

(1)研究代表者

石坂 信和 (ISHIZAKA NOBUKAZU)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20270879

(2)研究分担者

齋藤 幹 (SAITO KAN)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 60422292
塚本 和久 (TSUKAMOTO KAZUHISA)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20251233
野入 英世 (NOIRI EISEI)
東京大学・医学部附属病院・準教授
研究者番号: 00301820