

平成 21 年 4 月 21 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790298

研究課題名（和文） 近位尿細管における脂肪酸結合蛋白の機能解析

研究課題名（英文） Role of fatty acid binding protein in the proximal tubules

研究代表者

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

研究成果の概要：肝臓型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)の腎保護作用を、マウス近位尿細管細胞株(24mProx)を用いて検討した。野生型の24mProxには、L-FABPが発現していないことから、ヒトL-FABP遺伝子をトランスフェクションした細胞を用いた。遺伝子が組み込まれた細胞では、尿細管線維化刺激および酸化ストレス刺激による尿細管細胞上皮細胞の上皮間葉形質転換が、無処置の細胞に比べ有意に抑制されていた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	600,000	0	600,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,100,000	150,000	1,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腎臓、近位尿細管、脂肪酸結合蛋白、腎保護作用、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎疾患は、その病因が明らかになっていないことから、疾患の進行抑制ならびに透析導入時期の遅延を目的として治療が行われているのが現状である。その結果、末期腎不全患者・透析導入患者が増加の一途をたどり、患者個人の肉体的・精神的負担のみならず医療支出の増大等、社会的・経済的負担増加の一因ともなっている。このため、腎疾患の寛解・根治を目指した治療法開発のため、

腎保護作用を有するもしくは腎疾患の進行を抑制する分子を探索し、臨床応用可能なレベルにまで基礎研究を積み重ねる事が強く求められている。

(2) 腎疾患の予後は、糸球体障害そのものより間質尿細管障害の程度と相関することが、注目されている。間質尿細管障害の進行因子として、傍尿細管毛細血管障害による虚血ストレスが最近明らかにされた。虚血ストレスは、ホスホリパーゼA2の活性化を生じ、

細胞膜内のリン脂質から脂肪酸が切り出されるため、細胞内に過剰に脂肪酸が負荷されることになり、その結果 細胞障害に進展することが知られている。間質尿細管障害を進行させるストレスは、最終的に脂肪酸ストレスとなり、近位尿細管障害を進行させると考えられる。

(3) そこで、ヒトの近位尿細管上皮細胞に限局して発現し、細胞内の脂肪酸代謝に関与する肝臓型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)に注目した。L-FABP は細胞内の脂肪酸と結合し、脂肪酸をミトコンドリアやペルオキシソームへ輸送して脂肪酸の β 酸化を促進し、また脂肪酸をリガンドとする核内転写因子(peroxisome proliferators-activated receptor; PPAR)に脂肪酸を輸送し、脂肪酸代謝を促進する遺伝子の発現を調節している。さらにL-FABP は、過酸化脂質と強く結合することから、抗酸化作用を有する事が報告されている。

(4) げっ歯類の近位尿細管には、L-FABP が発現していないことから、私たちは、L-FABP 染色体遺伝子導入マウスを使用した間質尿細管障害モデルを作成し、腎疾患におけるL-FABP の役割を検討した。その結果、L-FABP は、抗酸化作用を介して間質尿細管の炎症・線維化を緩和し、間質尿細管障害の進行を抑制する事を示した。これらの結果より、L-FABP は、腎疾患治療のターゲット蛋白として期待される。

(5) L-FABP は、抗酸化作用以外に細胞増殖に関与することが報告されている。近位尿細管上皮細胞は、障害を受けると増殖し、再生することから、L-FABP は、尿細管再生を促進する可能性がある。さらにこの可能性を裏付ける研究結果として、最近、L-FABP からリガンドを受け取ったPPARが、Hepatocyte growth factor (HGF)の発現を亢進する事が示された。

HGF は、間質線維化病変を抑制するだけでなく、障害をうけた尿細管上皮の再生を促進する事が知られている。L-FABP は、HGF を介して間質尿細管線維化の抑制、尿細管上皮再生に関与する可能性がある。

(6) 私たちは、近位尿細管上皮細胞の細胞質に発現しているL-FABP が、間質線維化モデルである一側尿細管結紮モデルにおいて近位尿細管の核にも発現が認められる事を確認した。尿細管線維化刺激 {尿細管上皮細胞の形質転換: epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)を惹起する刺激} によりL-FABP は、細胞質から核内へ移動し何らかの遺伝子発現調節に関与している可能性が示された。

(7) しかし、腎疾患におけるL-FABP の腎保護作用は、詳細に検討されていない。

2. 研究の目的

野生型のマウス近位尿細管細胞株(24mProx)には、L-FABP が発現していない。そのため、すでに樹立されている 24mProx に、ヒトL-FABPcDNA プラスミドをトランスフェクションし、尿細管線維化刺激(TGF- β)および酸化ストレス刺激(アンジオテンシンII)による尿細管細胞上皮細胞のEMT が抑制されることを野生型24mProxと比較し、検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス近位尿細管細胞株(24mProx)での一過性ヒトL-FABP 発現の確認
濃度の異なるL-FABP cDNA プラスミドをそれぞれトランスフェクションし、24時間培養した結果、細胞内でL-FABP 発現をreal time PCR およびELISAにて検討する。トランスフェクションには、ノンリポソーム形試薬であるFuGENEを用いた。

(2) TGF- β 刺激およびアンジオテンシンII

刺激を行った際の L-FABP による近位尿管障害抑制作用を培養上清の炎症性サイトカイン (monocyte chemotactic and activating factor; MCP-1), 血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor、VEGF) を ELISA で測定した。Well 間の細胞数の違いを補正するため、細胞に溶解バッファーを添加、細胞をセルスクレーパーで回収し、蛋白を抽出して、総蛋白濃度を測定した。MCP-1、VEGF 蛋白の発現は、総蛋白との比で評価した。

4. 研究成果

(1) FuGENE に、L-FABP cDNA プラスミド濃度を 1, 2, 3ug/2ml/well と変えて混和し (FuGENE は、それぞれ 3ul, 6ul, 9ul)、トランスフェクションを行った。24 時間後に細胞の蛋白を抽出し、L-FABP の蛋白発現を見たところ、プラスミドの濃度依存性に L-FABP 蛋白の発現が増加した (143.4 ng/mg. TP, 214.4 ng/mg. TP, 675.6 ng/mg. TP)。また、L-FABP 遺伝子は、実験期間中、発現していた。

(2) 24mProx に L-FABP プラスミド 2ng/2ml/well をトランスフェクションした 24 時間後、TGF- β 1ng/ml, 10ng/ml を添加した。これらの添加によって、L-FABP 遺伝子発現がさらに増加することはなかった (1.2 vs 1.8, NS)。TGF- β 1ng/ml を添加し、6 時間後の MCP-1 は、L-FABP プラスミドトランスフェクション群 (FABP 群) と野生型細胞群 (Wild 群) で同程度であった (982 pg/mg. TP vs 1102 pg/mg. TP, NS)。6 時間後の VEGF は、FABP 群で、Wild 群に比べ有意に発現が低下していた (1.0 pg/mg. TP vs 1.3 pg/mg. TP, $p < 0.05$)。TGF- β 10ng/ml を添加し、6 時間後の MCP-1 は、FABP 群で、Wild 群に比べ有意に発現が低下していた (1112 pg/mg. TP vs 1554 pg/mg. TP, $p < 0.05$)。6 時間後の VEGF は、両群で同程度であった (1.9 pg/mg. TP vs 1.9 pg/mg. TP, NS)。

TGF- β 1ng/ml, 10ng/ml 添加後の 24 時間の培養では、MCP-1, VEGF の発現に有意な差は、認められなかった。

L-FABP は、TGF- β による早期の尿管線維化刺激に対し、細胞保護的に作用すると考えられる。

(3) 24mProx に L-FABP プラスミド 2ng/2ml/well をトランスフェクションし、24 時間後にアンジオテンシン II で刺激した。添加 6 時間、24 時間後に培地上清を回収した。L-FABP 群では、wild 群に比べ、有意に MCP-1 の発現が抑制された (6 時間後, 362 vs 523, 24 時間後, 596 vs 749, $p < 0.05$)。VEGF については、有意差はなかった (6 時間後, 14.8 vs 12.4, 24 時間後, 23.6 vs 20.6, NS)。

L-FABP は、酸化ストレス刺激に対しても、細胞保護的に作用すると考えられる。

(4) 最近、L-FABP と腎疾患の関係が、世界的に注目されている。今回は、in vitro の系での L-FABP の意義について、世界に先駆けて検討された。

尿管障害は、上皮間葉の形質転換が生じることから始まる。今回の研究により L-FABP は、尿管上皮細胞の形質転換を抑制する可能性があることが示された。今後、最近樹立されたヒトの近位尿管細胞を使用し、再度この点を明らかにしていく。さらに、L-FABP 発現増作用のある薬剤のスクリーニングを行い、新しい観点からの腎疾患治療薬の開発につなげていく。

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

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし