

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11598

研究課題名(和文)慢性腎臓病における エーテル型リン脂質に着目した新規疾病マーカーの開発

研究課題名(英文)Development of novel disease markers focusing on ether-type phospholipids in chronic kidney disease

研究代表者

西向 めぐみ(Nishimukai, Megumi)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：40374730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓病モデルとして、アデニン摂取による誘導モデルを用いた。アデニン食摂取により、腎臓中ではコリン型のアルキルリン脂質(Alk)が減少し、プラスマローゲン(PIs)が増加した。さらに、アデニン食摂取による慢性腎臓病マウス腎臓を用いたex vivo実験を行ったところ、アデニン誘導による損傷を受けた腎臓では、物理的刺激により炎症関連遺伝子発現量が増加、エーテル型リン脂質生合成律速酵素AGPS遺伝子発現量が増加し、一方でコリン型Alkの減少とエタノールアミン型PIsの増加が見られ、AlkからPIsへの変換が促進されており、ストレスに対するエーテル型リン脂質の反応の一部が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓病におけるストレスに対応するエーテル型リン脂質の関与を示唆する結果を得た。この結果は、エーテル型リン脂質の新たな生理機能を提案するとともに、ヒトの健康に大きく寄与しているものである。

研究成果の概要(英文)：A model of kidney disease induced by adenine ingestion was used. Adenine diet intake decreased choline-type alkyl phospholipids (Alk) and increased plasmalogens (PIs) in the kidneys. Furthermore, ex vivo experiments using chronic renal surface mouse kidneys on an adenine diet revealed that in kidneys damaged by adenine-induced injury, physical stimulation increased inflammation-related gene expression and ether-type phospholipid biosynthesis rate-limiting enzyme AGPS gene expression, while choline-type Alk was decreased and an increase in ethanolamine-type PIs, indicating an accelerated conversion of Alk to PIs, and revealing part of the response of ether-type phospholipids to stress.

研究分野：脂質生理学

キーワード：エーテル型リン脂質 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

プラスマローゲン (PIs) は、脳や心筋など酸素消費量の多い組織に多く含まれる。PIs の sn-1 位のビニルエーテル基はラジカル感受性が高く、組織局在性と合わせると、酸化傷害から細胞を守る役割を持つことが考えられ、動脈硬化症など酸化ストレスが関係する病態の防御因子としての機能が示唆されてきた。

我々はこれまで、以下のような結果を示してきた。

- ・健常成年者や冠動脈疾患患者において、血漿コリン型プラスマローゲンレベルが動脈硬化発症リスクと逆相関を示す。
- ・閉経モデルラット (加齢および閉経による動脈硬化症のモデル) において、血中コレステロールの増加に伴い、血漿中プラスマローゲンは減少した。
- ・慢性腎臓病患者において、重症化に伴い血漿プラスマローゲンが減少した。

これらの知見より、プラスマローゲンの動脈硬化症と関連する疾病におけるバイオマーカーとしての役割や体内量増加による疾病予防効果が強く示唆される。しかし、動脈硬化症は上述の慢性腎臓病や糖尿病のような他の疾病から誘発・併発されることも多く、病因によっても関与は異なるのか、また、その影響は結合している官能基や脂肪酸によって異なるのか、さらに、疾病に伴うプラスマローゲンの変化を制御する食事成分は何か、は未だ謎であり、探索も急務である。

2. 研究の目的

動脈硬化症につながることで知られている慢性腎臓病 (CKD) に着目して、血中エーテル型リン脂質との関係を解明し、新規疾病マーカーの提案、さらに病態予防・改善につながる食品成分を開発することを目的とし、本研究では以下の検討をおこなった。

- (1) 慢性腎臓病モデル動物を用いた体内エーテル型リン脂質の解析
- (2) 腎臓病患者の血漿のエーテル型リン脂質プロファイルの解析
- (3) 初代培養細胞を用いた *in vitro* メカニズム解析

3. 研究の方法

- (1) 慢性腎臓病モデル動物を用いた体内エーテル型リン脂質の解析

アデニン食摂取による慢性腎臓病モデル

8 週齢の ICR 系雄マウスに基本食に 0.15% のアデニンを添加した食餌で 4 週間飼育した。解剖時に腎臓、血液を採取して脂質を抽出し、LC-MS/MS を用いてエーテル型リン脂質の分子種の測定を行った。また、腎臓におけるエーテル型リン脂質生合成関連遺伝子発現の測定も行った。CKD の病態評価は、血漿および尿中のクレアチニン (Cr) 濃度の測定、腎臓の組織観察、腎臓における線維化および炎症関連遺伝子発現量の測定により行った。

腎臓 5/6 切除 (片腎切除+2/3 腎結紮) 慢性腎臓病モデル

ラットでの腎臓 5/6 切除モデルを検討した。8 週齢の Wistar/ST 雄ラットを AIN-93G に準拠した基本食で 6 日間予備飼育した後、擬似手術を行う Sham 群と 5/6 腎摘出術を行う Ope 群の 2 群に分けた。片腎切除の 1 週間後に残った腎臓の 2/3 切除を行った。2 度目の手術時を 0 週とし、14 週間後に解剖を行い、腹部大静脈血、腎臓を採取した。分析項目は上記(1)- と同様である。

- (2) 腎臓病患者の血漿のエーテル型リン脂質プロファイルの解析

帝京大学医学部付属病院腎臓内科で集められた腎臓病患者の血液を用い、LC-MS/MS を用いて血漿エーテル型リン脂質を解析した。最終的に 300 検体の分析を行った。

- (3) 初代培養細胞を用いた *in vitro* メカニズム解析

ICR 雄マウスを使用した。AIN-93G に準拠した基本食を給餌した Normal マウスと、基本食のコーンスターチをアデニンで 0.15% 置換した餌を 4 週間給餌し慢性腎臓病誘導を行う Adenine マウスの 2 群に分けた。腎臓を摘出し、組織を傷つけないよう注意しながら各サンプルの腎臓組織割合が等しくなるように腹側と側面をそれぞれ等分にし、1/4 ずつに切り分けた。重量測定後、緩衝液が入ったチューブに入れ、37 のウォーターバス中で 100 rpm・1 時間振盪を行った。緩衝液から取り出し水分を除いたものを腎臓サンプルとした。また、緩衝液振盪を行わないものを Control 群とした。分析項目は上記(1)- と同様である。

4. 研究成果

- (1) 慢性腎臓病モデル動物を用いた体内エーテル型リン脂質の解析

アデニン食摂取による慢性腎臓病モデル

アデニン添加食の摂取により、血漿中 Cr 濃度の増加および尿中 Cr 濃度の低下、腎臓におけるアデニン代謝物の蓄積、線維化および炎症関連遺伝子の発現量が増加したことから、CKD の誘導が確認された。またアデニン添加食の摂取により、血漿中ではコリン型アルキルリン脂質が増加したが、腎臓中ではコリン型アルキルリン脂質が減少し、PIs が増加した。このように、血漿と腎臓では、エーテル型リン脂質の変化は異なっていた。この時、腎臓中では特にアラキ

ドン酸またはドコサヘキサエン酸が結合した分子種の変化が顕著に見られ、これらの分子種の変化が腎臓特異的なエーテル型リン脂質の動態の要因であると考えられる。

腎臓 5/6 切除 (片腎切除+2/3 腎結紮) 慢性腎臓病モデル

5/6 腎摘出術により、尿細管管腔および間質の拡張が見られ、腎髄質における膠原線維陽性染色領域が増加した。また腎機能評価の指標となるクレアチニン濃度が手術後 4 週以降で増加し、腎臓中炎症および線維化関連遺伝子の発現量が増加した。これらのことから、ラットへの 5/6 腎摘出術により腎線維化を伴った慢性腎臓病誘導が可能であることが示唆された。採取した腎臓、血液の脂質を抽出し、LC-MS/MS を用いてエーテル型リン脂質の分子種の測定を行った。その結果、アデニンでの検討と同様、血漿中ではコリン型アルキルリン脂質が増加したが、一方で腎臓中ではエーテル型リン脂質動態への影響は見られなかった。またエーテル型リン脂質生合成系関連遺伝子である *Far1* の腎臓中遺伝子発現量が有意に減少した。

一連の動物試験より、病態モデルの違い、つまり、腎機能低下の機序の違いにより体内エーテル型リン脂質および脂肪酸動態への影響は異なることが示唆された。

(2) 腎臓病患者の血漿のエーテル型リン脂質プロファイルの解析

腎臓病の進行に伴い、血漿中の総プラスマローゲン濃度はコリン型、エタノールアミン型ともに有意差は見られなかった。しかし、sn-2 位にリノール酸が結合したコリン型プラスマローゲンの全リン脂質中の割合が、腎臓病の進行に伴い減少した。これは、冠動脈疾患患者において、血漿コリン型プラスマローゲンレベルが減少した結果と同様であった。

(3) 初代培養細胞を用いた *in vitro* メカニズム解析

正常マウス腎臓を用いた *ex vivo* モデルとは異なり、アデニン誘導による損傷を受けた腎臓では、緩衝液振盪により腎臓中炎症関連遺伝子発現量が増加、エーテル型リン脂質生合成酵素である AGPS 遺伝子発現量が増加した。また腎臓中コリン型アルキル型リン脂質濃度とエタノールアミン型プラスマローゲン濃度の間に負の相関が見られ、アルキル型リン脂質からプラスマローゲンへの変換が促進されていることが示唆された。損傷を受けた腎臓に対する緩衝液振盪は、組織へのストレスとなっていた可能性があり、損傷腎へのストレスによりエーテル型リン脂質生合成上流のペルオキシソーム内での反応は抑制されるが、最下流のアルキル型リン脂質からプラスマローゲンへの変換が促進されていると考えられる。この変動は *in vivo* 実験における腎損傷ストレスによるエーテル型リン脂質動態の変化と一致しており、*ex vivo* モデルにおける結果は、生体内における腎臓中プラスマローゲンのストレス応答に関する見解を裏付けるものとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamaguchi Riko, Akter Shamoli, Kanehama Aki, Iwamoto Takahiro, Hasegawa Meme, Ito Akeno, Nishimukai Megumi, Yamada Miwa, Kashiwagi Akiko	4. 巻 76
2. 論文標題 Improvement of solubility of phospholipase D from Streptomyces antibioticus in recombinant Escherichia coli and its application for the enzymatic synthesis of a non-natural plasmalogen	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Letters in Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/lambio/ovad049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hashiguchi Kiwa, Kikuchi Takuma, Mizokami Takuya, Sato Masao, Nishimukai Megumi	4. 巻 86
2. 論文標題 The levels of plasma plasmalogen in retired female rats decrease by ovariectomy and intake of cholesterol-diet	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1543 ~ 1551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato Nana, Kanehama Aki, Kashiwagi Akiko, Yamada Miwa, Nishimukai Megumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Lymphatic Absorption of Microbial Plasmalogens in Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.836186	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawanabe-Matsuda Hiroataka, Takeda Kazuyoshi, Nakamura Marie, Makino Seiya, Karasaki Takahiro, Kakimi Kazuhiro, Nishimukai Megumi, Ohno Tatsukuni, Omi Jumpei, Kano Kuniyuki, Uwamizu Akiharu, Yagita Hideo, Boneca Ivo Gomperts, Eberl G?rard, Aoki Junken, Smyth Mark J., Okumura Ko	4. 巻 -
2. 論文標題 Dietary Lactobacillus-Derived Exopolysaccharide Enhances Immune-Checkpoint Blockade Therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 0F1 ~ 0F20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2159-8290.CD-21-0929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hosoyamada Makoto, Tomioka Naoko H., Watanabe Tamaki, Yasuno Nobuhiro, Uchida Shunya, Shibata Shigeru	4. 巻 -
2. 論文標題 SLC23A3 is a renal hypoxanthine transporter	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 1279-1286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2022.2028826	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hosoya Takuji, Uchida Shunya, Shibata Shigeru, Tomioka Naoko H., Matsumoto Koji, Hosoyamada Makoto	4. 巻 33
2. 論文標題 Xanthine Oxidoreductase Inhibitors Suppress the Onset of Exercise-Induced AKI in High HPRT Activity Urat1- Uox Double Knockout Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 326 ~ 341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2021050616	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibata Shigeru, Uchida Shunya	4. 巻 26
2. 論文標題 Hyperkalemia in patients undergoing hemodialysis: Its pathophysiology and management	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Therapeutic Apheresis and Dialysis	6. 最初と最後の頁 3 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1744-9987.13721	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Muso Eri, Sakai Soichi, Ogura Yousuke, Yukawa Susumu, Sato Hiroshi, Uchida Shunya, Wada Takashi, Shoji Tetsuo, Oda Hiroaki, Mori Kiyoshi, Kimura Hideki, Ito Osamu, Nishiyama Akira, Maruyama Shoichi, Inagi Reiko, Fujimoto Shoichi, Tsukamoto Tatsuo, Suzuki Yusuke, Tsuruya Kazuhiko, Yuzawa Yukio	4. 巻 26
2. 論文標題 Favorable therapeutic efficacy of low density lipoprotein apheresis for nephrotic syndrome with impaired renal function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Therapeutic Apheresis and Dialysis	6. 最初と最後の頁 220 ~ 228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1744-9987.13694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishiwaki Hiroki, Nihata Kakuya, Shimizu Sayaka, Shibagaki Yugo, Yamamoto Ryohei, Nitta Kosaku, Tsukamoto Tatsuo, Uchida Shunya, Takeda Asami, Kashihara Naoki, Matsuo Seiichi, Japan Nephrotic Syndrome Cohort Study group	4. 巻 23
2. 論文標題 Incidence and factors associated with prescribing renin angiotensin system inhibitors in adult idiopathic nephrotic syndrome: A nationwide cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Hypertension	6. 最初と最後の頁 999 ~ 1007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jch.14224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大家 功之、橋口 季和、西向 めぐみ
2. 発表標題 性差および加齢がラットの骨格筋エーテル型リン脂質に及ぼす影響
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川 七瀬、庄司 智彦、西向 めぐみ
2. 発表標題 UVB の複数回照射が皮膚構成脂質および表皮バリア機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋口 季和、西向 めぐみ
2. 発表標題 雌雄の加齢ラットにおける高コレステロール食摂取が脂質代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川 芽女、柏木 明子、西向 めぐみ、山田 美和
2. 発表標題 Serenomonas ruminantium 由来pIsAR 遺伝子を導入した組換え大腸菌におけるプラスマローゲンの生合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 二本木紗耶、岩波梨花、西向めぐみ
2. 発表標題 ex vivo 法を用いた腎臓中エーテル型リン脂 質のストレス応答の検討
3. 学会等名 第7回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋口季和、杉山梢、原 博、西向めぐみ
2. 発表標題 細胞株を用いた脂質代謝関連組織間での アルキル型リン脂質の 吸収および代謝の比較
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 奈々、柏木 明子、山田 美和、西向 めぐみ
2. 発表標題 奇数鎖脂肪酸が結合している微生物由来プラスマローゲンのラット小腸におけるリンパ吸収動態
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩波梨花, 西向めぐみ
2. 発表標題 アデニン誘導による慢性腎臓病モデルマウスでは血漿と腎臓のエーテル型リン脂質組成 の変化は異なる
3. 学会等名 公益社団法人 日本栄養・食糧学会 東北支部 第53回支部大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 機能油脂懇話会 監修 城内文吾 三浦進司 青木淳賢 西向めぐみ 共著	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社 建帛社	5. 総ページ数 152
3. 書名 生体における リン脂質の性状と機能性	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	内田 俊也 (Uchida Shunya) (50151882)	帝京大学・医学部・教授 (32643)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------