

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：11501  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22790777  
 研究課題名(和文) 腎血管障害における抗酸化酵素 Paraoxonase-1 の役割と作用機序の解明  
 研究課題名(英文) The role of Paraoxonase-1 in chronic kidney disease and renovascular injury  
 研究代表者  
 市川 一誠 (ICHIKAWA KAZUNOBU)  
 山形大学・医学部・助教  
 研究者番号：50436218

## 研究成果の概要(和文)：

進行性腎不全モデルであるラット 5/6 腎摘モデルにて、Paraoxonase-1 (PON1) 抗体の免疫染色を施行し、PON1 は腎血管障害に関連して細動脈内皮に発現する事が示された。末期腎不全患者を対象として PON1 遺伝子多型と患者背景ならび予後との関連を検討した。血清 Paraoxonase 活性と強い関連を示す SNP の遺伝子多型タイピングを行ったところ、生存率に有意差を認めなかった。進行した腎機能障害患者においては、PON1 遺伝子多型は心血管病の発症や予後に影響を与える因子とはいえない事が示された。

## 研究成果の概要(英文)：

We performed immunohistochemistry for PON1 in rat 5/6 nephrectomy model. It showed that PON1 expression in vascular endothelium was associated with renovascular injury. Then we examined the association of PON1 genotype (rs662) and prognosis among patients with end-stage renal disease. However, there was no significant difference between survival rate and PON1 genotype, suggesting that PON1 gene was not associated with the risk of cardiovascular disease and prognosis in end-stage renal disease.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：Paraoxonase-1、慢性腎臓病、遺伝子多型

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、2003 年から行っている一般住民約 3,000 人を対象とした遺伝子多型解析を含む大規模検診 (Takahata study) の結果から、

高脂血症や (Konta et al, Kidney Int 2006)、内臓脂肪によるメタボリックシンドローム (Hao et al, Intern Med 2007) が微量アルブミン尿発現や腎機能低下の危険因子であ

ることを明らかにした。さらに遺伝素因と腎障害の関連を検討したところ、一般住民において、抗酸化酵素である Paraoxonase-1 遺伝子多型が腎機能低下とアルブミン尿発現に関連していることを確認した (Ichikawa et al, Kidney Int 2009)。

Paraoxonase-1(PON1)とはエステル加水分解酵素で抗酸化酵素の一つであり、HDL (high-density lipoprotein) 粒子に結合して存在し、HDL がもっている抗酸化作用やコレステロール逆転送能を促進する。PON1 遺伝子の一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism, SNP) において、アミノ酸置換 (192 番目のアミノ酸がアルギニンからグルタミン) と関連する missense SNP (rs662) がよく研究されている。近年、同様の PON1 遺伝子多型が、血中酵素活性、血中酸化ストレス、心血管疾患のイベントや予後と強く関連することが報告された (Bhattacharyya et al, JAMA 2008)。さらに、我々は同様の遺伝子多型が一般住民において腎機能低下とアルブミン尿発現に関連している事を報告し、PON1 が慢性腎臓病と心血管疾患の発症進展に共通した因子である可能性を示した (Ichikawa et al, Kidney Int 2009)。

これらのことより、一般住民における腎障害や心血管疾患の発症進展に脂質代謝異常を介した機序が関与し、酸化脂質、抗酸化酵素の遺伝多型、活性がその共通因子の一つであることが推察された。しかし、現在まで慢性進行性腎障害への Paraoxonase-1 の関与について国内外から詳細な報告はない。この点を明らかにするため、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

腎組織における PON1 の発現を確認する。また、PON1 の慢性腎臓病への関連をより確かなものとするため、慢性腎臓病患者を対象として、PON1 遺伝子多型と生命予後との関連

を検討する。

## 3. 研究の方法

進行性腎不全モデルであるラット 5/6 腎摘モデル作成する。免疫染色法を用い Paraoxonase-1 発現細胞を同定し、腎病変形成への関与を検討する。

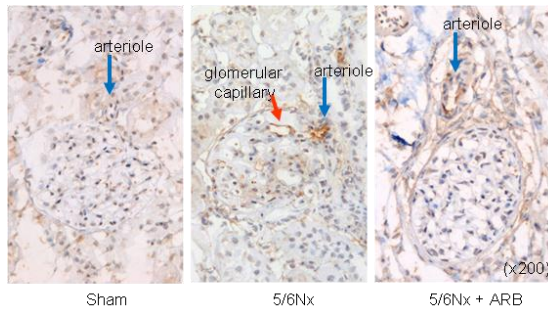
大規模検診 (Takahata study) の対象のうち基本データをマッチングさせた計 150 人を選択し、Paraoxonase 活性を測定する。自己問診票を使用した生活習慣調査との関連を解析する。Paraoxonase 活性は Paraoxon の反応産物である Para-nitrophenol を測定する。

山形県ならび宮城県の 6 施設の維持透析患者で遺伝子検査に同意が得られた 481 名のうちデータ欠損を除いた 317 名を対象とする。フォローアップ期間は 5 年間とし、エンドポイントは全死亡とする。Paraoxonase 活性と強い関連を示す、missense SNP (rs662) の遺伝子多型タイピングを行い、死亡との関連を Kaplan-Meier 法にて検討する。遺伝子多型タイピングは Invader 法、TaqMan PCR 法で施行する。

## 4. 研究成果

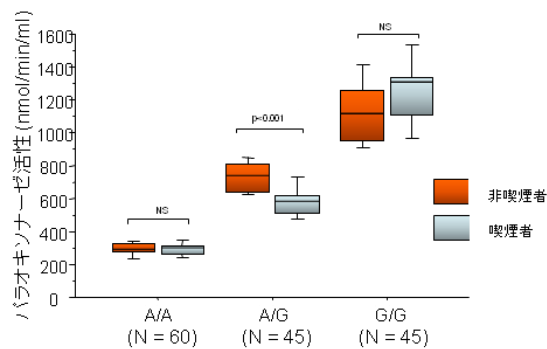
Paraoxonase-1(PON1)の腎臓内での発現部位を確認するため、進行性腎不全モデルであるラット 5/6 腎摘モデルにおいて、PON1 抗体の免疫染色を施行した。Sham において発現を認めなかったが、腎摘モデルで腎細動脈内皮に強い発現を認めた。腎摘ラットにアンジオテンシン II 受容体拮抗薬を投与した群では発現が減弱していた (図 1)。以上より、PON1 は腎血管障害に関連して細動脈内皮に発現する可能性が示唆された。

図 1: ラット 5/6 腎摘モデル (8W) PON1 免疫染色



大規模検診 (Takahata study) の結果をさらに検討し、遺伝子・環境相互作用の解析を行った。Paraoxonase 活性は missense SNP (rs662) で強く規定されており、A/A、A/G、G/G の順に活性が強かった。さらに喫煙の有無で分けたところ、ヘテロ接合体である A/G 群のみ、喫煙者において Paraoxonase 活性が有意に低下していた (図 2)。

図 2: 喫煙の有無と Paraoxonase 活性



末期腎不全患者の PON1 遺伝子多型と予後との関連を検討した。血清 Paraoxonase 活性と強い関連を示す、missense SNP(rs662)の遺伝子多型タイピングを行ったところ、rs662 A/A 群、A/G 群、G/G 群の 3 群間において、生存率に有意差を認めなかった (図 3)。心血管死と全死亡に分けて検討したが、同様の結果であった (図 4)。

図 3: PON1 遺伝子多型による生存率の比較

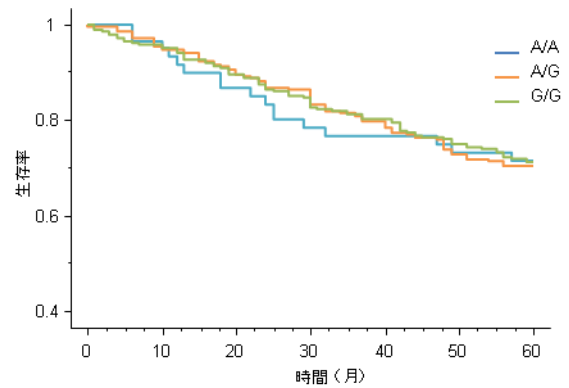
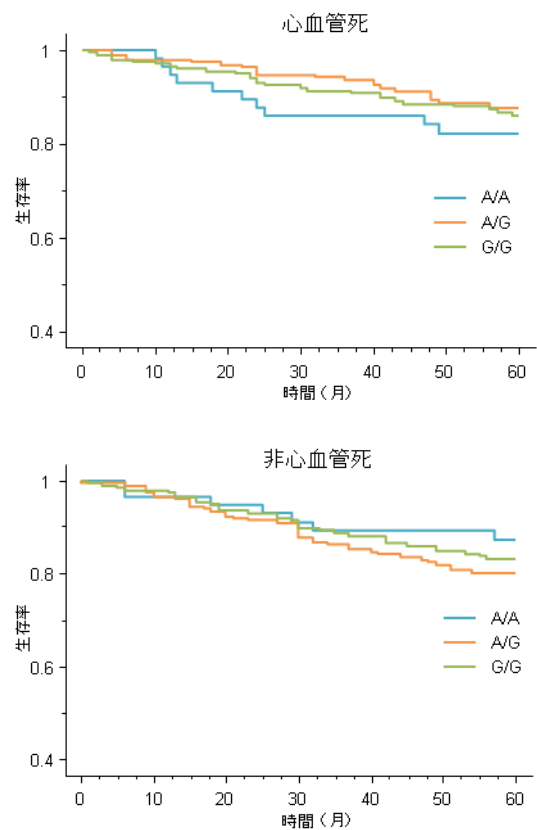


図 4: 死亡原因別の生存率の比較



末期腎不全患者の死亡に関連する因子は多因子であり、PON1 単独での生命予後に対する関連を今回の検討で見出す事は出来なかった。よって、今後はより早期の慢性腎臓病患者を対象として、PON1 と慢性腎臓病の進行との関連を検討する必要があると考えられた。それにより、慢性腎臓病の各ステー

ジにおける、PON1 の関わりを明らかにできる可能性がある。一般住民における検討では、PON1 遺伝子多型が腎機能低下とアルブミン尿発現に関連している事を示せた。軽度から中等度の腎機能低下患者における PON1 と腎障害進行との関連を検討するため、腎臓病入院患者ならびに通院患者を対象とし、Paraoxonase 活性ならび酸化脂質マーカーの測定し、患者背景や臨床データとの関連を検討した。現在までのところ、有意な結果は得られていないが、さらなるデータの集積と縦断的研究を進め、PON1 の腎障害進行・心血管病発症との関連について解析を行っていく必要がある。

#### 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 4 件)

① Ichikawa K, Konta T, Ikeda A, Fujimoto S, Iseki K, Moriyama T, Yamagata K, Tsuruya K, Yoshida H, Asahi K, Kurahashi I, Ohashi Y, Watanabe T. Significance of past history of renal failure for the detection of high-risk individuals for cardiovascular and end-stage renal disease: analysis of data from a nationwide health checkup. Clin Exp Nephrol. 2011 Dec;15(6):841-7. 査読有 DOI: 10.1007/s10157-011-0509-y

② Mashima Y, Konta T, Kudo K, Takasaki S, Ichikawa K, Suzuki K, Shibata Y, Watanabe T, Kato T, Kawata S, Kubota I. Increases in urinary albumin and beta2-microglobulin are independently associated with blood pressure in the Japanese general population: the Takahata Study. Hypertens Res. 2011

Jul;34(7):831-5. 査読有

DOI:10.1038/hr.2011.42

③ Mashima Y, Konta T, Kudo K, Suzuki K, Ikeda A, Ichikawa K, Shibata Y, Watanabe T, Tamiya G, Kato T, Kawata S, Kubota I. Polymorphism of proinflammatory cytokine genes and albuminuria in the Japanese general population: the Takahata study. Nephrol Dial Transplant. 2011 Dec;26(12):3902-7. 査読有 DOI: 10.1093/ndt/gfr105

④ Kudo K, Konta T, Mashima Y, Ichikawa K, Takasaki S, Ikeda A, Hoshikawa M, Suzuki K, Shibata Y, Watanabe T, Kato T, Kawata S, Kubota I. The association between renal tubular damage and rapid renal deterioration in the Japanese population: the Takahata study. Clin Exp Nephrol. 2011 Apr;15(2):235-41. 査読有 DOI: 10.1007/s10157-010-0392-y

[学会発表] (計 1 件)

透析患者における Paraoxonase-1 遺伝子多型と生命予後に関する検討

市川一誠、今田恒夫、久保田功 他

第 56 回日本透析医学会学術集会・総会

2012 年 6 月 7 日 横浜市 パシフィコ横浜

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川 一誠 (ICHIKAWA KAZUNOBU)

山形大学 医学部 助教

研究者番号: 50436218