

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461233

研究課題名(和文) 脳腎連関における腎の抗酸化作用の役割

研究課題名(英文) Renal lipid metabolism in extrarenal vascular injury

研究代表者

鈴木 祐介 (Suzuki, Yusuke)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70372935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腎近位尿細管細胞のL-FABPは、酸化ストレスにより生じる過酸化脂質と強く結合し細胞外へ排出することにより腎保護的に働くといわれているが、今回L-FABP Tgマウスを用いて脳虚血再灌流(MCAO)モデルを作成したところ、野生型と比しMCAO後の腎臓において脂質代謝に変化が生じていた。これは、脳梗塞のような腎外血管病変時には、近位尿細管細胞L-FABPを介した抗酸化・脂肪酸処理能の増強により腎保護につながる可能性を示唆する所見であり、脳腎連関の機序の一つである可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：L-FABP has a capacity to bind long-chain fatty acid oxidation products with high affinity, and thus may play roles as an effective endogenous antioxidant in human proximal tubules. We evaluated kidneys for L-FABP Tg and its wild-type littermates (WT) mice at 24hr after middle cerebral artery occlusion and reperfusion (MCAO). There were clear differences in the renal lipid metabolism between WT and L-FABP Tg mice, suggesting that one of underlying mechanisms in brain-renal association.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：酸化ストレス L-FABP

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国において急速に進行する高齢化に伴い、脳梗塞は要介護の原因として最も割合が高く、その中でも大半を占める脳梗塞の予防や急性期における病態進行抑制は早急に解決すべき重要な課題である。また慢性腎臓病(CKD)患者において脂質異常症の改善は、動脈硬化性疾患イベントのリスクを抑制すると言われている。また、腎脂質代謝の異常や脂質腎毒性により腎機能障害が進展する liponephrotoxicity という概念が注目されており、脂質代謝は心血管病と腎機能障害において密接な関係がある。

(2) L-FABP は、肝臓、腸および腎臓の近位尿細管細胞質に存在する分子量約 14Kd の脂肪酸結合蛋白である。腎臓において L-FABP は、アルブミンと結合した遊離脂肪酸が尿細管細胞に取り込まれた際に、遊離脂肪酸と結合し細胞内小器官へ転送することで酸化を促進するだけでなく、酸化ストレスにより生じる過酸化脂質と強く結合し細胞外へ排出することにより腎保護的に働く。尿中への L-FABP 排泄量は、腎疾患進展の程度を反映する高感度の診断指標であることが報告されている。本指標は、研究分担者の菅谷らにより世界に先駆けわが国において開発され、2010 年 9 月に「尿細管機能障害を伴う腎疾患の診断」を使用目的として体外診断医薬品の承認を取得し、2011 年 8 月には保険算定項目として収載された。

ヒトとげっ歯類では L-FABP の遺伝子転写調節領域の構造が異なっており、発現臓器に違いがある。マウスでは、ヒトと違い近位尿細管には L-FABP を発現しない。そこで、L-FABP の染色体を遺伝子導入し腎尿細管における抗酸化作用を増強したマウス(L-FABP Tg) が作成された。L-FABP-Tg を用いた各種

CKD、急性腎障害(AKI)モデルなどで、近位尿細管 L-FABP による抗酸化機能を介した、腎保護作用が確認されている。

(3) 脳血管障害など脳内で酸化ストレスが発生する病態において、脳組織や血中および尿中で 8-OHdG や HNE などの酸化ストレスおよび過酸化脂質マーカーが増加することや、脂肪酸の過剰負荷が梗塞巣を悪化させることが知られている。

(4) パスウェイ解析において、遺伝子導入されたヒト L-FABP は、マウス遺伝子群として検出されない。疾患モデルの発現解析の際、疾患原因遺伝子と障害の結果誘導される遺伝子が混在し、誘導率の大きな急性期蛋白ばかりが検出されるという現象に陥りがちであるが、Tg のみで変動するマウス遺伝子群を同定することで、腎臓のヒト L-FABP を介したターゲットパスウェイが解析可能となる。

(5) 交感神経および迷走神経は、血压や各臓器への血流量を精巧に調節している。腎交感神経アブレーションは治療抵抗性高血圧の改善に有効であり、臨床応用がされ始めている。また、中枢神経中枢である延髄吻側腹外側領域(rostral ventrolateral medulla:RVLM)が腎交感神経系を介した脳内酸化ストレス調節(一酸化窒素と活性酸素のバランス)を行い、脳腎関連の一つの機序であることが知られている。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、腎外血管病変時における主として、抗酸化的な腎臓の役割を解明し腎保護のみならず、脳のような遠隔臓器に対する影響を明らかにすることである。最終目標到達のため今回の研究期間では前述の背景に基づき、「脳梗塞のような腎外血管病変時には、近位尿細管細胞 L-FABP を介した抗酸化・脂肪酸処理能の増強により腎保護

のみならず、腎外血管病変に対しても保護的に働く」という仮説を立て、L-FABP Tg マウスと野生型マウスに中大脳動脈虚血再還流(MCAO)モデルを作製し、仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

1) MCAO モデルの作成

hL-FABP-Tg マウスと野生型マウスを用い中大脳動脈閉塞・虚血再灌流モデルを作製する。吸入麻酔下でマウスの左総頸動脈より、シリコンコーティングした塞栓糸を挿入し左中大脳動脈を梗塞させ、60分後に抜去して血流を再開通させた。再開通24・72時間後にsacrificeを行う。

2) 脳組織・腎組織の免疫組織化学的評価
得られた標本より脳ではTTC染色により梗塞範囲を定量的に評価する。腎ではPAS/HE染色にて尿細管間質のほか糸球体障害も評価する。同時にpimonidazoleによる腎虚血の程度を評価する。

3) micro array およびネットワーク解析
hL-FABP-Tg と野生型マウスの腎組織を用いmicro array を行い遺伝子発現解析を行う。

4) 腎組織の蛋白・遺伝子レベルの評価
ネットワーク解析により得られた病態に関与する候補分子に関して、腎臓での経時的な発現量の評価をRT-PCR法で評価する。

5) 血清・尿生化学的検査、生理学的検査
尿蛋白・血圧・尿中電解質、尿中・血中酸化ストレスマーカー(L-FABP, HNE, 8-OHdG, GSSGなど)を測定し評価する。

6) 交感神経系の影響の評価

同モデルのマウスを麻酔下で、腎動脈・静脈周囲を露出し、腎交感神経を手動的に切断し、フェノールを塗布する。このような手技を用いて除神経を行い、各モデルマウス群を比較し交感神経系の関与を評価する。

4. 研究成果

1) MCAO 作成 24 時間後では、両群において梗塞コア部のサイズに差を認めないものの、作成後 72 時間以降の梗塞巣の 2 次的な拡がり(ペナンプラ)は野生型に比し Tg マウスにおいて抑制され、生命予後が改善される傾向にあった。

2) MCAO 作成 24 時間後より尿中 8-OHdG などの酸化ストレスマーカーが上昇するとともに、腎臓では虚血性の変化(pimonidazole 染色による)が起き、脳血管イベントによって腎臓で速やかに生体応答が起こることが示唆された(特許出願済み)。

3) パスウェイ解析では、MCAO 作成 24 時間後の腎臓の変動する遺伝子を野生型と Tg マウスにおいて比較したところ、多数の遺伝子発現の相違がみられた。その中でも特に脂質代謝に関連する遺伝子の変動が顕著であった。

4) パスウェイ解析で得られた情報をもとに MCAO モデルにおける腎臓での脂質代謝について検討を行ったところ、MCAO 作成 24 時間後の腎臓では、野生型と Tg マウスにおいて脂質の挙動が異なることを見出した。これは、脳血管障害後の腎臓における急性期反応の一つとして、例えば脂肪酸代謝を中心とする腎内脂質代謝が関与しており近位尿細管における L-FABP が脂質を介した抗酸化的な働きを担うことにより、腎臓のみならず遠隔臓器である脳にも抗酸化的に働く可能性を示唆する所見である。

5) これらモデルマウスに腎交感神経除神経を行い、交感神経の関与を検討しているが均一的なモデルの確立が困難であり、実験系の見直しを行い引き続き検討を行う。

引用文献

Weinberg JM. Lipotoxicity, *Kidney Int.* 2006;1560-6.

Kishi T, Hirooka Y. Oxidative stress in the brain causes hypertension via sympathoexcitation. *Front Physiol.* 2012 ;17;3:335

Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Sekizuka A, Hirata K, Kimura K. Amelioration of diabetic tubulointerstitial damage in liver-type fatty acid-binding protein transgenic mice, *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(3):788-800.

Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Matsui K, Yokoyama T, Kimura K. Roles of human liver type fatty acid binding protein in kidney disease clarified using hL-FABP chromosomal transgenic mice. *Nephrology (Carlton).* 2011; 16(6):539-44.

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5件)

Takeda M, Ohnuma T, Takeuchi M, Katsuta N, Maeshima H, Takebayashi Y, Higa M, Nakamura T, Nishimon S, Sannohe T, Hotta Y, Hanzawa R, Higashiyama R, Shibata N, Gohda T, Suzuki Y, Yamagishi SI, Tomino Y, Arai H. Altered serum glyceraldehyde-derived advanced glycation end product (AGE) and soluble AGE receptor levels indicate carbonyl stress in patients with schizophrenia. *Neurosci Lett*, 査読有, 23: 51-55, 2015

Suzuki Y, Suzuki H, Yasutake J, Tomino Y. Paradigm shift in activity assessment of IgA nephropathy-optimizing the next generation of diagnostic and therapeutic maneuvers via

glycan-targeting. *Expert Opinion on Biological Therap*, 査読有, 15: 583-93, 2015

Suzuki H, Suzuki Y, Novak J, Tomino Y. Development of Animal Models of Human IgA Nephropathy. *Drug Discov Today Dis Models*, 査読有, 11: 5-11, 2014

Osaki K, Suzuki Y, Sugaya T, Tanifuji C, Nishiyama A, Horikoshi S, Tomino Y. Amelioration of angiotensin II-induced salt-sensitive hypertension by liver-type fatty acid-binding protein in proximal tubules. *Hypertension*, 査読有, ;62:712-8, 2013

Horikoshi S, Okuda M, Nishimura E, Ohsawa I, Suzuki Y, Shimizu Y, Hamada C, Tomino Y. Usefulness of HPLC assay for early detection of microalbuminuria in chronic kidney disease. *J Clin Lab Anal*, 査読有, 27:333-8, 2013

[学会発表](計3件)

1. 高橋敬子、鈴木祐介、小林敬、菅谷健、睡眠時無呼吸時の慢性低酸素状況における酸化ストレス変化に関する機序の検討、第28回腎と脂質研究会、2016.03.26、大阪
2. 村越真紀、合田朋仁、高橋敬子、市川沙紀、丸山俊太郎、苑田祐二、小林敬、鈴木仁、鈴木祐介、堀越哲、高血圧患者におけるテルミサルタンが種々のバイオマーカーに与える影響、第38回日本高血圧学会総会。2015.10.10
3. Takashi Kobayashi, Yusuke Suzuki, Liu MeiZi, Takeshi Sugaya, Satoshi Horikoshi, Takao Urabe and Yasuhiko Tomino. Renal lipid metabolism in

extrarenal vascular injury, World
Congress of Nephrology 2013.22, Jan,
2013, Hong Kong

(2016年5月欧州腎臓学会(EDTA), 6月
日本腎臓学会総会にて発表予定)

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木祐介 (SUZUKI, Yusuke)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・
准教授

研究者番号: 70372935

(2) 研究分担者

菅谷 健 (SUGAYA, Takeshi)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号: 40381561

小林 敬 (KOBAYASHI, Takashi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号: 70459056