

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860414

研究課題名(和文) 2型糖尿病におけるアポリポ蛋白 A I の近位尿細管再吸収障害進展機構の解明

研究課題名(英文) Dysfunction of apolipoprotein A-I reabsorption in diabetic proximal tubule

研究代表者

黒崎 祥史 (Kurosaki, Yoshifumi)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：20602030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病が腎尿細管キュビリンを介したアポリポ蛋白(Apo) A-I再吸収機構に及ぼす影響について検討した。キュビリンペプチドを固相化したELISA法にてApo A-Iは糖化修飾によりキュビリンとの結合能が低下することを明らかにした。ヒト近位尿細管上皮細胞HK-2を用いた検討においても糖化Apo A-Iは細胞への結合および細胞内取り込みが減少した。以上より、Apo A-Iは糖化によってキュビリンとの結合能が低下し腎における再吸収量が低下することが示唆された。高脂肪食負荷ラットを用いた検討においては、尿アルブミンの検出されないステージで実験したが、尿中にApo A-Iが検出されなかった。

研究成果の概要(英文)：Effects of nonenzymatic glycation on apo A-I reabsorption via cubilin in proximal tubule were evaluated. It was clarified by using cubilin peptide-coated ELISA that glycation impaired the binding properties of apo A-I to cubilin. Additionally the binding capacity and the uptake of glycated apo A-I to human proximal tubular cell diminished. Our results suggested that nonenzymatic glycation diminished the binding capacity of apo A-I to cubilin, may result in the decrease of apo A-I reabsorption by proximal tubule. In the type 2 diabetes model rat with normoalbuminuria (by feeding high fat-diet within 4 weeks), apo A-I were not detected in urine.

研究分野：糖尿病性腎症

キーワード：糖尿病性腎症 キュビリン Apo A-I

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は、糸球体の毛細血管が動脈硬化を起こすことで腎不全を起こし、尿中に蛋白質を漏出させる。糖尿病性腎症のマーカーとして、微量アルブミンが広く利用されている。しかしながら、糸球体過剰機能が低下するステージでは腎機能低下は不可逆的であり、対応は薬物等にて進行を遅延させるに限られるため、糸球体過剰機能が正常な状態で近位尿細管異常を発見することは、透析患者を減少させるために最も重要である。

アポリポ蛋白 A-I (Apo A-I) は、血管壁のコレステール回収のみならず、抗酸化作用、抗血小板凝集作用、抗アポトーシス作用などの抗動脈硬化作用を有していることが明らかとされている。糖尿病における高血糖、高酸化ストレス状態において、Apo A-I はカルボニル化合物による修飾を受けて Apo A-I 機能が低下することが知られている。それらによると、カルボニル化合物による Apo A-I の糖化は LCAT 活性化能低下、抗酸化能低下、異化亢進による血中半減期の短縮、などの影響をおよぼす。糖尿病における Apo A-I の糖化修飾亢進や血中濃度低下は動脈硬化症の合併に大きく寄与している。

このように Apo A-I の血中での代謝および糖尿病など疾患と機能との関係は十分に検討されてきたが、一方で腎における Apo A-I の再吸収機構についてはあまり検討されていない。糖尿病においては、以下の2つのメカニズムで尿中 Apo A-I が上昇する可能性が想定される。1) 糖尿病における Apo A-I の糖化修飾によるキュビリンとの結合障害により Apo A-I 再吸収が低下する、2) 糖尿病におけるキュビリン発現量の低下により Apo A-I 再吸収が低下する。糖尿病がキュビリンによる Apo A-I 再吸収に及ぼす影響を明確にすることで、Apo A-I が近位尿細管機能もしくは生体内の糖化ストレスを反映するマーカーとして活用できる可能性を検討する。

2. 研究の目的

糖尿病がキュビリンを介した Apo A-I 再吸収機構に及ぼす影響を明確にする。Apo A-I を糖化修飾したときキュビリンとの結合能および細胞への取り込みが低下するか、またそのとき尿中 Apo A-I 濃度が上昇するか、を検討する。それにより尿中 Apo A-I の糖尿病性腎症の早期発見マーカーとしての可能性を見出す。

3. 研究の方法

(1) 糖化 Apo A-I (Methylglyoxal 修飾 Apo A-I) の作製

糖化 Apo A-I は、カルボニル化合物の一つであるメチルグリオキサールを Apo A-I に添加して作製した (*Diabetologia*, 50, 643-53,

2007)。0.3mmol/L および 3.0 mol/l MG を Apo A-I を添加して、37 °C で 24 時間反応後、MG 修飾 Apo A-I (それぞれ MG-A-I(0.3)、MG-A-I(3.0)) を作製した。MG-A-I は限外ろ過カラムにてバッファー交換し、以降の実験に用いた。

(2) ELISA 法による Apo A-I および MG-A-I とキュビリンの結合能解析

ELISA 用プレートにヒトキュビリンペプチド (abcam) を一晩 4 °C で固相し、ブロッキング後にヒト Apo A-I および MG-A-I を 4 °C で 45 分反応させ、4%パラホルムアルデヒドで固定した。抗ヒト Apo A-I 抗体および Horse radish peroxidase (HRP) 標識抗体でキュビリンに結合した Apo A-I 量を検出した。

(3) 近位尿細管上皮細胞におけるキュビリンと糖化 Apo A-I の結合能解析

ヒト近位尿細管上皮細胞 (HK-2) に 0-30 µg/mL Apo A-I および MG-A-I (3.0) を添加して 4 °C, 1 h 反応させた。0.5 µg/mL Alexa 標識 Apo A-I を添加して 4 °C, 1 h 反応させ、最初に反応させた Apo A-I および MG-A-I (3.0) と競合させた。4%パラホルムアルデヒドにて固定後、PBS にて洗浄した。Hoechst33342 にて核染色を行い、蛍光顕微鏡で検出した。また、Apo A-I 添加後のインキュベーションを 37 °C で行うことで、細胞内取り込みを観察した。

(4) 高脂肪食負荷糖尿病ラットの作製

糖尿病ラットは高脂肪食負荷 (脂質含有量 32%) により作製した。オス 8 週齢の Sprague-Dawley (SD) ラットを 4 群に分けた。1 群に市販固形飼料 (ND 群)、2 群に High fat diet 32 (日本クレア) を与え (HFD 群)、3 群として市販固形飼料 + 10 mg/kg/day テルミサルタン (腎保護薬 TLM) (ND+TLM 群)、4 群として High fat diet 32 (日本クレア) + 10 mg/kg/day テルミサルタンを用意し (HFD+TLM 群) それぞれ 4 週間飼育し、検体採取、解剖を行った。

(5) 経口グルコース負荷試験 (OGTT)

血糖測定は、血糖簡易測定器グルテストエース (三和化学) を用いて尾静脈より行った。血糖値を測定した後 (0 分値)、2 g/kg body weight のグルコースを経口ゾンデで負荷し、血糖値 30 分値、60 分値、90 分値、120 分値、180 分値を測定した。グラフに血糖値をプロットし、AUC (area under the curve) を算出した。

(6) 各種生化学測定

血糖測定は、血糖簡易測定器グルテストエース (三和化学) を用いて尾静脈より行った。解剖時、ヘパリン採血して得られた血清にて、総コレステロール、HDL-コレステロール、

中性脂肪を各種酵素試薬にて測定した（和光純薬）、各種、ELISA キットを用いて、空腹時血中インスリン濃度、血清高分子アディポネクチン濃度（シバヤギ社）、尿中アルブミン濃度（exocell 社）、尿中 Apo A-I 濃度（My Biosource 社）を測定した。

4. 研究成果

(1) in vitro における糖化 Apo A-I とキュビリンの結合能解析

キュビリン合成ペプチドを固相化した ELISA 系を構築し、キュビリンと Apo A-I および糖化 Apo A-I との結合能を解析した。Apo A-I を MG によって糖化したとき、MG 濃度に依存してキュビリンとの結合能が低下することが明らかになった（図 1）。

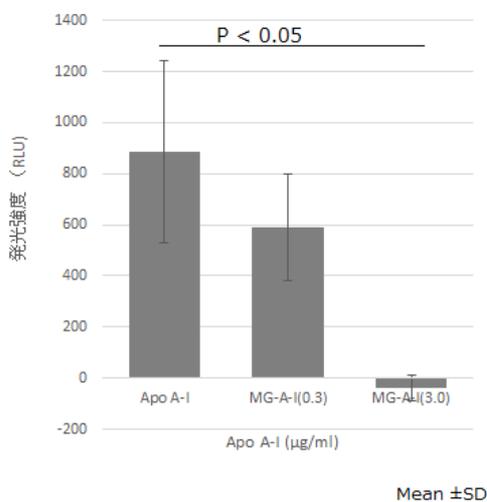


図 1 ELISA 法による糖化 Apo A-I と Cubilin の結合能解析

(2) ヒト近位尿細管上皮細胞 HK-2 による蛍光標識 Apo A-I と糖化 Apo A-I の競合実験によるキュビリンと糖化 Apo A-I の結合能解析

キュビリンを発現する HK-2 細胞を用いて蛍光標識 Apo A-I と糖化 Apo A-I を競合させることで、キュビリンと糖化 Apo A-I の結合能を解析した。Apo A-I 添加後の反応温度を 4 とすることで、細胞との結合能のみを評価した。3 μg/mL Apo A-I を添加した際は、蛍光標識 Apo A-I と競合して HK-2 細胞に蛍光標識 Apo A-I は結合しなかった。一方で、3 μg/mL 糖化 Apo A-I を添加した際には、蛍光標識 Apo A-I が HK-2 細胞に結合することが確認された（図 2）。このことは、Apo A-I の糖化修飾によりキュビリンとの結合能が低下したことを意味する。Apo A-I との反応温度を 37 で行うことで細胞内取り込みを

確認したところ、同様に糖化 Apo A-I の取り込みが低下する可能性が示唆された（図 3）。

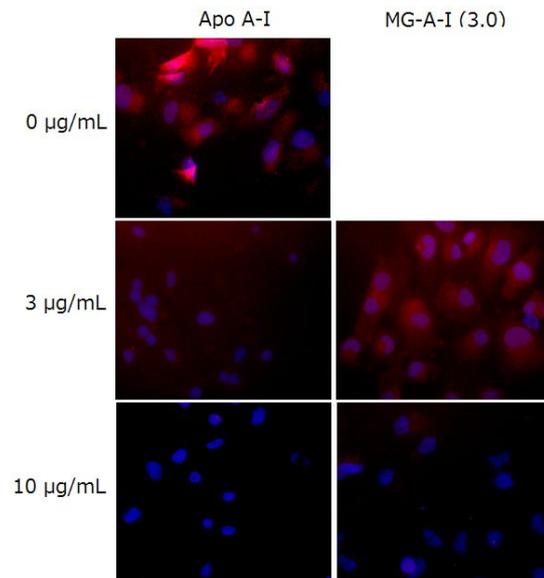


図 2 ヒト近位尿細管上皮細胞 HK-2 によるキュビリンと糖化 Apo A-I の結合能解析

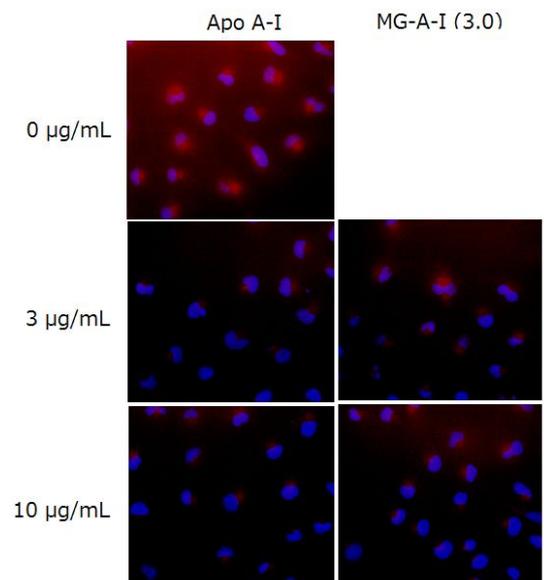


図 3 ヒト近位尿細管上皮細胞 HK-2 による糖化 Apo A-I の細胞内取り込み

(3) 高脂肪食負荷糖尿病モデルラットにおける尿中 Apo A-I 濃度と腎キュビリン発現量の解析

高脂肪食を負荷することで、2 型糖尿病ラットを作製し、尿中に Apo A-I が検出されるか確認した。ここで Apo A-I の早期診断マーカーとしての可能性を評価するため、尿中 A

ルブミンが検出される前のステージで検証した（高脂肪食負荷後 4 週間）。高脂肪食負荷 4 週間により、HFD 群では総コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪の上昇が確認された（それぞれ $P < 0.05$ ）。一方で空腹時血糖値に変化はなかった。OGTT を施行したところ、HFD 群は AUC が有意に上昇し、また空腹時インスリン濃度も高値を示す傾向にあったことより、HFD 群はインスリン抵抗性を示した（図 4）。

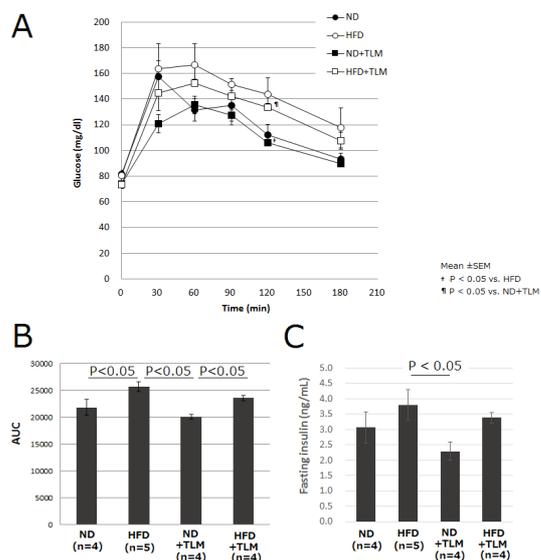


図 4 高脂肪食負荷ラットにおけるインスリン抵抗性の指標 A:OGTT B:AUC (area under the curve) C:空腹時インスリン濃度

高脂肪食負荷ラットの精巣上体脂肪において脂肪細胞の肥大化が HE 染色で確認された (data not shown)。加えて血中高分子アディポネクチン濃度の低下が確認された (図 5-A)。このことより、本実験に用いた高脂肪食負荷糖尿病ラットはインスリン抵抗性とアディポサイトカイン異常が起きているが、尿中アルブミン排泄の亢進していないステージであることが明らかになった。そこで、尿中 Apo A-I 排泄を ELISA キットにて測定したところ、4 群間で有意な差は見られなかった (図 5-B)。

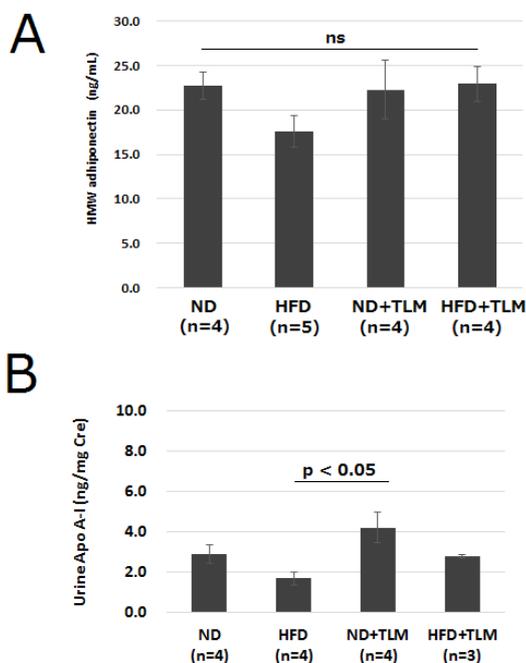


図 5 高脂肪食負荷ラットにおける血中高分子アディポネクチン濃度 (A) および尿中 Apo A-I 排泄濃度 (B)

以上より、Apo A-I が糖化修飾を受けてキュビリンとの結合能が低下する可能性が示唆された。このことより、生体内で糖化反応が促進した状態で、Apo A-I は糖化修飾を受けて尿中排泄が亢進する可能性が考えられた。一方で、高脂肪食負荷による初期糖尿病ラットでは尿中 Apo A-I 排泄の亢進が見られなかった。

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 2 件)

(1) Kurosaki Y, Tsukushi T, Munekata S, Kanoh Y, Moriya T, Nishinari M, Aoyama N, Ogawa Z. Is there a relation between triglyceride concentrations in very low-density lipoprotein and the index of insulin resistance in non-diabetic subjects? J Clin Lab Anal, 269-74, 2014. (査読有)

(2) Kurosaki Y, Tsukushi T, Munekata S, Akahoshi T, Moriya T, Ogawa Z. Semiquantitative analysis of apolipoprotein A-I modified by advanced glycation end products in diabetes mellitus. J Clin Lab Anal, 27:231-236, 2013. (査読有)

〔学会発表〕(計15件)

(1) 石井直仁、山田優也、黒崎祥史、井本明美、土筆智晶、小幡進、十良澤勝雄、鈴木英明、市川毅、横場正典、池永秀樹、市川尊文、竹中恒夫、片桐真人：酸化ストレスが亢進している腎症発症前の糖尿病の腎皮質におけるオートファジーと低酸素応答について(第14回日本ミトコンドリア学会年会、九州大学(福岡県福岡市)2014.12.3 5)

(2) 井本明美、山田優也、黒崎祥史、土筆智晶、小幡進、十良澤勝雄、市川毅、横場正典、池永秀樹、青木芳和、市川尊文、竹中恒夫、片桐真人、石井直仁：腎症発症前の糖尿病の腎皮質における低酸素応答とアポトーシスについて(第61回日本臨床検査医学会学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)2014.11.22 25)

(3) 黒崎祥史、山田優也、井本明美、土筆智晶、小幡進、十良澤勝雄、鈴木英明、市川毅、横場正典、池永秀樹、青木芳和、市川尊文、竹中恒夫、片桐真人、石井直仁：尿アルブミン正常糖尿病ラットにおけるアンジオテンシン 依存酸化ストレスが腎メガリン発現に及ぼす影響(第61回日本臨床検査医学会学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)2014.11.22 25)

(4) 山田優也、黒崎祥史、井本明美、土筆智晶、小幡進、十良澤勝雄、市川毅、横場正典、池永秀樹、青木芳和、市川尊文、竹中恒夫、片桐真人、石井直仁：腎症発症前の糖尿病の腎皮質における低酸素応答とオートファジーについて(第61回日本臨床検査医学会学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)2014.11.22 25)

(5) 山田優也、黒崎祥史、井本明美、土筆智晶、市川毅、横場正典、鈴木英明、十良澤勝雄、小幡進、池永秀樹、青木芳和、竹中恒夫、市川尊文、片桐真人、石井直仁：腎症前期糖尿病ラットの腎皮質におけるアンジオテンシン II 依存的酸化ストレスとHIF-1 α 発現の関連について(第54回日本臨床化学会年次学術集会、東京大学(東京都文京区)2014.9.5 7)

(6) 井本明美、山田優也、黒崎祥史、土筆智晶、小幡進、十良澤勝雄、鈴木英明、市川毅、横場正典、市川尊文、片桐真人、石井直仁：腎症発症前糖尿病の腎皮質における酸化ストレスとカスパーゼ3の関係について(第27回北里大学バイオサイエンスフォーラム、北里大学(神奈川県相模原市)2014.8.21 22)

(7) 黒崎祥史、山田優也、井本明美、土筆智晶、小幡進、十良澤勝雄、鈴木英明、市川毅、横場正典、市川尊文、片桐真人、石井直仁：尿アルブミン正常糖尿病ラットにおけるア

ンジオテンシン 依存酸化ストレス亢進と腎メガリン発現の関連について(第27回北里大学バイオサイエンスフォーラム、(神奈川県相模原市)2014.8.21 22)

(8) 山田優也、黒崎祥史、井本明美、土筆智晶、小幡進、十良澤勝雄、鈴木英明、市川毅、横場正典、市川尊文、片桐真人、石井直仁：腎症発症前糖尿病の腎皮質において低酸素応答とオートファジーは亢進する(第27回北里大学バイオサイエンスフォーラム、(神奈川県相模原市)2014.8.21 22)

(9) Yoshifumi Kurosaki, Yuya Yamada, Pamela K. Carmines, Tomoaki Tsukushi, Akemi Imoto, Tsuyoshi Ichikawa, Masanori Yokoba, Susumu Obata, Hideki Ikenaga, Yoshikazu Aoki, Tsuneo Takenaka, Takafumi Ichikawa, Masato Katagiri, Naohito Ishii. The contribution of angiotensin II-dependent oxidative stress to megalin expression in the renal cortex during the normoalbuminuric stage of diabetes mellitus in the rat. AACC 2014 Annual Meeting and Clinical Lab Exposition, McCormick Place (Chicago, USA), July 29, 2014

(10) Y. Yamada, Y. Kurosaki, P. K. Carmines, T. Tsukushi, A. Imoto, T. Ichikawa, M. Yokoba, H. Ikenaga, Y. Aoki, T. Takenaka, T. Ichikawa, M. Katagiri, N. Ishii: Angiotensin II-dependent oxidative stress and increased hypoxia-inducible factor-1 α expression in the renal cortex during the normoalbuminuric stage of diabetic mellitus in the rat. AACC 2014 Annual Meeting and Clinical Lab Exposition, McCormick Place (Chicago, USA), July 29, 2014

(11) N. Ishii, Y. Kurosaki, P. K. Carmines, Y. Yamada, T. Tsukushi, A. Imoto, T. Ichikawa, M. Yokoba, H. Suzuki, H. Ikenaga, Y. Aoki, T. Takenaka, T. Ichikawa, M. Katagiri: Impact of angiotensin II receptor blockade on the renal cortical tissue renin-angiotensin system during the normoalbuminuric stage of diabetic mellitus in the rat. AACC 2014 Annual Meeting and Clinical Lab Exposition, McCormick Place (Chicago, USA), July 29, 2014

(12) 山田優也、横場正典、黒崎祥史、市川毅、土筆智晶、宇治橋善勝、市川尊文、石井直仁、片桐真人、健常者における経鼻的持続気道陽圧呼吸による横隔膜の動きの変化に対する体位の影響について、第60回日本臨床検査医学会学術集会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)、2013.11.3

(13) 黒崎祥史、山田優也、土筆智晶、横場正典、市川毅、宇治橋善勝、池永秀樹、青木芳和、市川尊文、竹中恒夫、片桐真人、石井直仁、腎症前期糖尿病ラットの腎皮質における Hypoxia inducible factor α 発現について、第 60 回日本臨床検査医学会学術集会，神戸国際会議場（兵庫県神戸市），2013.11.3

(14) 石井直仁、黒崎祥史、山田優也、横場正典、市川毅、土筆智晶、池永秀樹、青木芳和、市川尊文、竹中恒夫、片桐真人、腎症前期糖尿病ラットの腎皮質における酸化ストレス抑制と組織レニン・アンジオテンシン系の関連について、第 53 回日本臨床化学会年次学術集会，あわぎんホール（徳島県徳島市），2013. 9. 1

(15) 山田優也、黒崎祥史、土筆智晶、市川毅、横場正典、市川尊文、片桐真人、石井直仁、腎症前期糖尿病ラットの腎皮質において Hypoxia inducible factor α 発現は増加する、第 26 回 北里バイオサイエンスフォーラム，北里大学（神奈川県相模原市），2013. 8. 9

6 . 研究組織

(1)研究代表者

黒崎 祥史（KUROSAKI, YOSHIFUMI）
北里大学・医療衛生学部・助教
研究者番号：20602030