

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

市川 大介

専攻分野：内科学

コース：腎臓・高血圧内科

指導教授：木村 健二郎

主論文の題目：

Renal Liver-Type Fatty Acid Binding Protein Attenuates Angiotensin II-Induced Renal Injury

(腎臓内の肝型脂肪酸結合蛋白はアンジオテンシンⅡによる腎障害を緩和する)

共著者：

Atsuko Kamijo-Ikemori, Takeshi Sugaya, Takashi Yasuda, Seiko Hoshino, Jyunko Igarashi-Migitaka, Kazuaki Hirata, Kenjiro Kimura

### 緒言

生活習慣病の蔓延によりレニンアンジオテンシンアルドステロン系 (RAS) が活性化し, 慢性腎臓病 (CKD) の増悪による腎不全が増加している。RAS 阻害薬は CKD 治療における代表的な治療薬であるが, その進行を十分に抑制できていない。野生型マウスの腎臓には, 肝型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) が発現していないため, 我々はヒト L-FABP (hL-FABP) 染色体遺伝子導入 (Tg) マウスを作成した。このマウスを使用し, 様々な腎疾患モデルにおいて腎 hL-FABP が腎保護的に作用する蛋白である事を明らかにしてきた。本研究ではアンジオテンシンⅡ (AngⅡ) による腎障害モデルにおける腎臓内の hL-FABP の役割を明らかにする。

### 方法・対象

研究は聖マリアンナ医科大学の定めた動物実験施設ガイドラインに基づき行った。8-10週のおス hL-FABP Tg マウスと C57/BL6 系統の野生型マウス (WT) が使用した (承認番号 TG130528-3号, TG120514-2号)。それぞれのマウスに AngⅡ を浸透圧ポンプに充填し,  $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  の速度で持続投与しながら 5% 食塩食で飼育した (AngⅡ 群)。対照として生理食塩水の浸透圧ポンプ投与を行い, 通常食で飼育した (Control 群)。14日

目, 28日目に腎臓を摘出し, 血圧はテイルカフ装置で毎週測定し, 収縮期血圧 (SBP) を3回測定してその平均値を解析に使用した。0, 14, 28日にメタボリックケージを使用し, 自由飲水のもと採尿を行った。尿パラメーターとして尿アルブミン, N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase

(NAG), hL-FABPの測定を行った。腎組織評価にPAS染色 (尿細管間質障害の評価), AZAN染色 (間質線維化の評価) を行い, ランダムに10視野選択して定量的に評価した。免疫染色はマクロファージの浸潤をF4/80染色で評価し, 線維化をコラーゲンタイプI, III染色で評価した。糸球体硬化は硬化面積をスコア化して評価した。Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) 蛋白, hL-FABP蛋白をELISAで計測し, GAPDH, hL-FABP, 炎症性サイトカインであるMCP-1, 線維化を示すコラーゲンタイプI, IIIをリアルタイムPCRで評価した。酸化ストレスの評価として脂質過酸化の初期生成物であるヘキサノイルリジン (HEL) 蛋白の評価を行った。値はmean $\pm$ SEで表し, 統計学的意義は  $P < 0.05$ とした。統計はMann-Whitney U検定を用いた。

## 結果

Ang IIの投与によりSBP上昇, 尿アルブミン排泄増加, 糸球体障害は, Tg-Ang II群とWT-Ang II群で認められ, 同程度であった。尿NAGの上昇は, WT-Ang II群にくらべ, Tg-Ang II群で有意に低値であった ( $P < 0.01$ )。MCP-1遺伝子, 蛋白発現, コラーゲンタイプI, III遺伝子発現は, Control群に比べAng II群は有意に増加したが, WT-Ang II群よりTg-Ang II群で有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。組織所見では, 尿細管間質障害が両群で観察されたが, WT-Ang II群よりTg-Ang II群で有意に抑制された (28日目, Tg-Ang II群  $4.8 \pm 1.6\%$ , WT-Ang II群  $11.2 \pm 1.2\%$ ,  $P < 0.05$ )。同様の所見がAZAN染色における間質線維化, マクロファージ浸潤を示すF4/80染色, 間質線維化を示すコラーゲンタイプI, III染色でも認められた。腎hL-FABPの動態については, Tg-Ang II群ではControl群と比べて, hL-FABPの遺伝子, 蛋白発現が有意に上昇し, 尿中hL-FABP排泄も有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。hL-FABPとアクアポリン1の二重染色では14日目より皮質と髄質のアクアポリン陽性領域にhL-FABPの染色性の増加が観察された。HEL蛋白は14日目にControl群に比べて, WT-Ang II群で有意に増加したが, Tg-Ang II群ではWT-Ang IIと比べて有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。

## 考察

高用量のAng II投与による腎障害モデルでは, 高血圧, 糸球体障害, 尿細管間質障害が観察される。尿アルブミン排泄量, 糸球体障害の程度は, WT-Ang II群とTg-Ang II群で, 同程度であったが, 炎症性サイトカイン

産生, マクロファージの浸潤, 尿細管間質障害はTg-Ang II 群で有意に抑制された。腎hL-FABPの動態に関しては, 腎hL-FABPの発現は近位尿細管曲部に加え, 近位尿細管直部でも増加していた。L-FABPは抗酸化作用を有することが知られているため, 早期の酸化ストレスマーカーであるHEL蛋白を測定した。WT-Ang II 群では, HEL蛋白が有意に増加したが, Tg-Ang II 群では増加せず, またWT-Ang II 群と比べ有意に低値であった。これらの結果より, 近位尿細管に発現しているhL-FABPは, 抗酸化作用により尿細管間質障害の進行を抑制していることが示された。

#### 結論

Ang II による腎障害モデルにおいて, 腎hL-FABPは抗酸化作用により尿細管間質障害の進行を抑制する。