

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：田邊 淳

専攻分野：内科学（腎臓・高血圧内科）

指導教授：柴垣 有吾

主論文の題目：

The Possibility of Urinary L-type Fatty Acid Binding Protein as a Biomarker of Renal Hypoxia in Spontaneously Diabetic Torii Fatty Rats.

（腎低酸素バイオマーカーとしての尿中 L 型脂肪酸結合タンパクの可能性—自然発症肥満 2 型糖尿病モデルラットにおける検討）

共著者：

Yuji Ogura, Mikie Nakabayashi, Yoshio Nagai, Shiika Watanabe, Takeshi Sugaya, Keiichi Ohata, Daisuke Ichikawa, Kazuho Inoue, Seiko Hoshino, Kenjiro Kimura, Yugo Shibagaki, Yumie Ono, Atsuko Kamiyo-Ikemori

緒言

糖尿病に対する血糖降下薬は数多く開発されているものの、糖尿病合併症である糖尿病性腎臓病（Diabetic Kidney Disease: DKD）の根治療法はなく、未だ世界的に末期腎不全の主要な原因疾患である。末期腎不全への進行抑制は、DKD 患者の福祉の向上に加え、医療経済的観点から喫緊の課題であり、DKD 進行の危険性が高い症例に、遅滞なく多角的治療を行うことが求められる。このため、DKD 進行の可能性を早期に判別できるモニタリングマーカーが大変重要である。

尿細管間質障害は DKD の腎予後と強く関連しており、腎臓の低酸素が尿細管間質障害の進行因子であることは広く知られている。したがっ

て、腎臓の低酸素を反映する尿細管バイオマーカーは、DKD のモニタリングに有用である可能性がある。

尿中 L 型脂肪酸結合蛋白 (L-type fatty acid-binding protein: L-FABP) は、急性腎障害に加え DKD を含む慢性腎疾患における尿細管間質障害の重症度を正確に反映しうる尿細管マーカーである。我々は、尿中 L-FABP の増加が、DKD 進行の独立した危険因子である事を見出した。さらに尿中 L-FABP は、腎移植時の腎内微小循環と関連することが報告されている。よって、尿中 L-FABP は、DKD においても腎低酸素を反映する可能性があるが、このような検討はされていない。このため、ヒトの病態に近い自然発症 2 型糖尿病モデルラット (Spontaneously Diabetic Torii fatty rats: SDT fatty rats) を使用し、尿中 L-FABP と腎低酸素との関係性を評価した。

対象・方法

動物実験委員会の承認を得て (承認番号: 第 1712008 号)、肥満、高脂血症、高血圧を伴うヒト 2 型糖尿病の病態を模倣する動物モデルである SDT fatty rats (雄、n = 6) を使用した。また年齢と性別を一致させた Sprague-Dawley (SD) rats (n = 8) を対照群として使用した。体重、血糖値、および収縮期血圧を 8 週齢から 24 週齢まで 4 週ごとに測定した。採尿、腎内血流量測定は、24 週齢で行い、その後採血および腎臓を摘出した。

尿検体では、L-FABP、アルブミン、クレアチンを測定した。血液検体は、採血後に血清を分離し、クレアチニン、シスタチン C、尿素窒素、総コレステロールを測定した。さらに摘出した腎臓は、腎障害の評価、遺伝子・蛋白発現の評価に使用した。

腎組織の間質障害評価 {マクロファージ浸潤 (CD68)、間質線維化 (α SMA、コラーゲン type I および type III)} は、それぞれの一次抗体を使用した間接酵素抗体法による免疫組織染色標本を作製し行った。糸球体

硬化の程度は、Periodic acid-Schiff stain 染色標本およびコラーゲン type IV に対する一次抗体を使用した間接酵素抗体法による免疫組織化学染色標本で行った。

腎低酸素の程度は、低酸素誘導因子-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 α : HIF-1 α) の遺伝子・蛋白発現を定量的 real time PCR・Western blot 法で評価した。さらに、近赤外光を用いた拡散相関分光法 (Diffuse Correlation Spectroscopy: DCS) を使用し算出された微小血管血流指数 (Blood Flow Index: BFI) を用いて、腎臓内の微小血管血流量を評価した。

統計・解析は、統計解析ソフト {JMP® software v13.0.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA)} を使用し、2 群間比較は、Mann-Whitney U 検定、2 種類のパラメーター比較は、Spearman の順位相関係数で行った。統計学的有意差は $P < 0.05$ とした。

結果

SDT fatty rats では、肥満、高血糖、高血圧を認めた。また、SDT fatty rats では、SD rats と比較して、クレアチニン補正した尿中 L-FABP、尿中アルブミンが有意に高値であり、腎機能の軽度低下を認め、腎組織では、有意な糸球体硬化、腎間質の炎症および線維化を認めた。SDT fatty rats の腎 HIF-1 α 遺伝子・蛋白発現は、SD rats と比較して、有意に高値であり、BFI は有意に低値であった。尿中 L-FABP は、腎 HIF-1 α 蛋白発現と有意な正の相関を示し ($\rho = 0.683$, $p < 0.05$)、腎 BFI と有意な負の相関を示した ($\rho = -0.550$, $p < 0.05$)。さらに、腎 HIF-1 α 蛋白発現は腎間質組織障害と有意な正の相関を認め、BFI は腎間質組織障害と有意な負の相関を認めた。

考察

ヒトの病態に極めて近い 2 型糖尿病動物モデルである SDT fatty rats

では、SD rats と比較して、有意な腎組織障害が認められるとともに、腎 HIF-1 α 発現が有意に高値であり、腎 BFI が有意に低値であったことから、SDT fatty rats の腎臓は低酸素の状態であることが示された。さらに、SDT fatty rats では、SD rats と比較し、有意に尿中 L-FABP は高値であり、また、尿 L-FABP が腎 HIF-1 α 発現および腎 BFI と有意な相関を認めたことから、尿中 L-FABP は、DKD の腎低酸素を反映していると考えられた。本研究は、2 型糖尿病の DKD において、尿中 L-FABP が、腎低酸素を反映するマーカーになりうる事を示した。

結論

DKD 発症を認める 2 型糖尿病動物モデルにおいて、尿中 L-FABP は、腎低酸素の程度を反映したことから、腎低酸素マーカーとして DKD のモニタリングに有用である可能性が示された。