

論文の内容の要旨

論文題目 **The effect of activating hypoxia signaling in kidneys of
high fat diet-fed mice**
(低酸素シグナルの活性化が高脂肪食摂取マウスの腎臓に及ぼす影響)

氏名 齊藤 久さこ

1. 背景

1-1. 腎臓と低酸素

腎臓は心拍出量の 20%以上を受け取る血流豊富な臓器であるが、実際に腎臓で消費される酸素はそのうち 10%程度に過ぎない。腎臓は動静脈酸素シャントのため酸素の取り込み効率が悪く、また尿細管での再吸収という仕事のため酸素消費量が多く、生理的に低酸素状態となっており、低酸素は慢性腎臓病(chronic kidney disease; CKD)への進行の主要な原因のひとつと考えられている。

低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factor; HIF)は低酸素適応を制御する上で中心的な役割を果たす転写因子である。HIF は α 、 β のふたつのサブユニットからなり、通常酸素濃度下ではプロリン水酸化酵素(prolyl hydroxylase; PHD)によって HIF- α のプロリン残基が水酸化され、速やかにユビキチン分解される。高等哺乳類では PHD-1、2、3 が報告されており、HIF- α の分解には主に PHD-2 が関与する。PHD は酸素濃度依存性に作用するため、低酸素状態では HIF- α のプロリン残基は水酸化されず、核内へ移動し HIF- β とサブユニットを形成し、低酸素応答配列に結合することでエリスロポエチン(EPO)、血管内皮増殖因子(VEGF)、解糖系酵素など様々な低酸素応答を司る遺伝子の発現を促進する。

1-2. PHD 阻害による貧血改善効果と貧血以外に対する効果

PHD の阻害により HIF の分解が抑制され、HIF 活性が上昇することが想定される。これまでに虚血再灌流による急性腎障害を中心とした様々な動物モデルで PHD 阻害による腎障害の軽減が報告されているが、CKD における長期投与の是非は依然として解明されていない。近年では貧血改善薬として透析患者や非透析 CKD 患者に対し、様々な PHD 阻害薬の臨床試験が行われており、一部では貧血改善のみならず脂質代謝の改善も報告されている。脂質代謝の改善は臨床試験だけでなく動物実験でも認められており、PHD 阻害による肥満改善、コレステロール低下等が報告されている。

1-3. 肥満による腎臓病(肥満関連腎症)

肥満や脂質異常は様々な要因によって引き起こされるが、現代の高脂肪食はその原因の

一つと考えられる。高脂肪食摂取は血中コレステロールの上昇や肥満を引き起こし、肥満の持続は蛋白尿の出現や腎臓の糸球体に肥大、硬化等の形態学的変化を引き起こし、肥満関連腎症(*obesity related glomerulopathy*; ORG)と呼ばれる。肥満は世界的に増加しており、それに伴い肥満関連腎症も増加することが想定される。

上述のように PHD 阻害薬による肥満、脂質パラメータの改善が報告されており、今回我々は 2 系統のマウスに PHD 阻害薬である PHD 阻害薬を添加した高脂肪食(HFD)を長期間摂取させ、肥満、コレステロールの変化や腎組織の変化を調査した。

2. 実験の要旨

2-1. 自然発症高脂血症(*spontaneously hyperlipidemic*; SHL)マウスに対する PHD 阻害薬の効果

LDL 受容体欠損マウスに HFD を摂取させ、PHD 阻害薬の投与で肥満改善やコレステロール改善の報告があることから、LDL 受容体欠損マウスと同様に高脂血症を示す ApoE ノックアウトマウスとして、本邦で発見された BALB/c 背景の自然発症高脂血症(*spontaneously hyperlipidemic*; SHL)マウスを用いて実験を行った。BALB/c マウスは脂質代謝の感受性が比較的弱いとされるが 2016 年の段階では BALB/c のコンジュニックマウスのみ購入可能であったため、BALB/c 背景の SHL マウス(BALB/c.KOR/Stm Slc-Apo^{eshl})を用いた。

6 週齢の雄の SHL マウスを 1) 高脂肪食(HFD ; 脂肪分 60%)群(n=9)、2) HFD に PHD 阻害薬を添加した群(n=9)、3) 通常脂肪食(ND)群(n=2)と野生型の(*wild type*; WT) BALB/c マウス 4) HFD 群(n=3)、5) ND 群(n=4)の 5 群に分け 12 週間摂取させた。投与開始前、4 週間後(早期)、12 週間後(晩期)に 24 時間蓄尿を行いアルブミン尿を測定した。体重(BW)測定は実験開始前、4 週間毎に行った。12 週目の蓄尿施行後、6 時間絶食後に採血、採材(腎臓、肝臓、精巣上体脂肪組織(WAT))を行った。

SHL マウスの体重、WAT 重量は HFD、HFD+PHD 阻害薬群では ND 群に比べ増加傾向にあったが、n 数が少なく有意差は認めず、HFD 群と HFD+PHD 阻害薬群では既報と異なり PHD 阻害薬による肥満や WAT 重量の改善は認められなかった。血液検査では、WT に比べ SHL マウスでは総コレステロール値、nHDL コレステロール値は有意に上昇したが、ND 群と HFD 群で変わらず、PHD 阻害薬投与による改善も認められなかった。腎機能に関しては尿素窒素、クレアチニンともにすべての群で違いは認められなかった。腎障害の指標としてアルブミン尿を測定したところ、SHL マウスでは実験開始時より 200-500 μ g/gCr のアルブミン尿を認めた。ND 群と HFD 群のアルブミン尿は実験終了時にほぼ同等となり、HFD+PHD 阻害薬群ではやや低下傾向にあるものの統計学的有意差は認められなかった。

アルブミン尿では有意差は認められなかったものの、HFD+PHD 阻害薬群では HFD 群に比べ改善傾向にあったため糸球体障害の有無や PHD 阻害薬投与による改善の有無を組

組織学的に評価した。ORG の腎組織では糸球体肥大が認められるが、SHL マウスでは HFD 群と ND 群の糸球体面積は変わらず、HFD 群で ORG が生じていないことが示唆された。また、HFD+PHD 阻害薬群の糸球体面積も HFD 群、ND 群と変わらなかった。メサンギウム増殖を IV 型コラーゲン染色で、ポドサイド消失を WT-1 染色で、糸球体へのマクロファージ浸潤を F4/80 染色で行ったが、いずれも HFD 群、HFD+PHD 阻害薬群、ND 群で変わらなかった。

尿細管間質障害に関しては、picosirius red 染色、I 型コラーゲン染色、 α SMA 染色を行ったが α SMA 染色では血管平滑筋に染色を認めるのみで評価できず、picosirius red 染色と I 型コラーゲン染色では HFD 群、HFD+PHD 阻害薬群、ND 群で変わらなかった。

尿細管障害マーカーとして NGAL、KIM-1 を炎症マーカーとして TNF- α 、IL-6、MCP-1、CCR-2、RANTES、CCR-5 の RT-PCR を行った。KIM-1 では HFD+PHD 阻害薬群では HFD 群に比べ有意に発現が低下したが ND 群の発現が最も多く、尿中 KIM-1 は HFD 群と HFD+PHD 阻害薬群で変わらず、病理所見でも違いが認められなかったことから本モデルにおいては有用でないと判断した。NGAL と炎症マーカーの mRNA の発現は HFD 群と HFD+PHD 阻害薬群で変わりなかった。

以上より、SHL マウスでは LDL 受容体欠損マウスでの既報と異なり PHD 阻害薬である PHD 阻害薬によるコレステロール値や肥満の改善は認められず、腎組織においても ORG の所見は認められず PHD 阻害薬投与での改善は認められなかった。

2-2. C57BL/6J マウスに対する PHD 阻害薬の効果

SHL マウスでの結果を受けて、肥満や高脂血症に対して感受性が強く、HFD による糸球体肥大やメサンギウム増殖の報告がある C57BL/6J マウスで実験を行うこととした。

8 週齢の雄の C57BL/6J マウスを 1)HFD 群(n=7)、2) HFD に PHD 阻害薬を添加した群(n=7)、3)ND 群(n=3)、4)ND に PHD 阻害薬を添加した群(n=4)の 4 群に分け 12 週間摂取させた。投与開始前、4、12 週間後に 24 時間蓄尿を行いアルブミン尿を測定した。体重測定は実験開始前、4 週間毎に行った。12 週目の蓄尿施行後、6 時間絶食後に採血、採材(腎臓、肝臓、精巣上体脂肪組織(WAT))を行った。

C57BL/6J マウスでは ND 群に比べ HFD 投与による肥満、WAT 重量の増加を認めたが、体重は HFD 群と HFD+PHD 阻害薬群での違いは認められなかった。一方、WAT 重量は HFD+PHD 阻害薬群では HFD 群より低下傾向にあり、その傾向は体重補正で有意になった。

血漿データでは、総コレステロール値は ND 群、ND+PHD 阻害薬群に比較し HFD 群、HFD+PHD 阻害薬群で有意に上昇しており、HFD+PHD 阻害薬群は HFD 群に比較し有意に低下した。アルブミン尿は緩徐に上昇し HFD+PHD 阻害薬群では HFD 群に比べ低下傾向であったが、すべての群で大きな違いはなかった。

腎組織に関しては、HFD 群と HFD+PHD 阻害薬群は ND 群に比較し糸球体面積は増大

傾向にあった。メサングウム増殖、ポドサイト消失は ND 群と比べ有意差は認められず、また HFD 群と HFD+PHD 阻害薬群での違いも認められなかった。一方、F4/80 染色では HFD 群、HFD+PHD 阻害薬群では ND 群、ND+PHD 阻害薬群に比べ F4/80 陽性細胞数は増加しており、HFD+PHD 阻害薬群では HFD 群より陽性細胞数が有意に減少した。尿細管間質の線維化は picrosirius red で行ったが、すべての群で変わらなかった。全腎組織の RT-PCR では上述の NGAL、KIM-1、TNF- α 、IL-6、MCP-1、CCR-2、RANTES、CCR-5 に加えマクロファージの極性を調べるために iNOS、arginase 1 を評価した。尿細管障害マーカーでは KIM-1 が HFD 群に比べ HFD+PHD 阻害薬群で有意に上昇したが、picrosirius red 染色では両者で変わらなかったことから本モデルにおいても尿細管障害マーカーとして有用でないと判断した。炎症マーカーは全体的に HFD+PHD 阻害薬群では HFD 群に比べ発現は低下傾向にあった。iNOS の mRNA の発現は HFD 群と HFD+PHD 阻害薬群で変わらなかったものの、arginase 1 の発現は HFD+PHD 阻害薬群では HFD 群に比べ有意に上昇していた。以上より、PHD 阻害薬投与によりマクロファージの極性が M2 マクロファージ優位に変わった可能性が示唆された。

また、過酸化脂質である尿中 TBARS を測定したが、HFD 群、HFD+PHD 阻害薬群で変わらなかった。

3. 結語

本研究では ApoE ノックアウトマウスと同等の SHL マウス、C57BL/6J マウスの 2 系統のマウスで高脂肪食摂取時の PHD 阻害薬の腎臓や全身への影響への研究を行った。

SHL マウスでは PHD 阻害薬による肥満やコレステロール値の改善は認められず、腎臓では ORG を呈する所見は認められず本実験のモデルとして不適と考えられた。

一方、C57BL/6J マウスでは、PHD 阻害薬による肥満の改善は認められなかったものの、総コレステロール値の低下と WAT/BW 重量の改善を認めた。腎臓では、ND 群に比べ HFD 群では糸球体面積は増大傾向にあり、ORG に近い病態を呈していると考えられた。他に PHD 阻害薬投与により糸球体へのマクロファージ浸潤の改善や、arginase 1 の mRNA 発現上昇が認められた。

PHD 阻害薬による HIF の活性化は、HFD 投与の SHL マウスでは有意な改善を認めなかったが、C57BL/6J マウスでは脂質パラメータや WAT 重量の改善や、腎臓に対しては糸球体へのマクロファージ浸潤の改善や M2 マクロファージ優位を認めており、腎保護的に作用している可能性が示された。アルブミン尿は、有意差はないものの HFD 群に比べ HFD+PHD 阻害薬群では低下傾向にあり、実験期間を延長することで差が顕著となる可能性が示唆された。今回の実験において以上の制限があるものの、これらの結果は PHD 阻害薬の肥満関連腎症への適応の可能性を示しており、さらなる研究への根拠となると考えられる。