

メタボリックシンドローム関連腎症における近位尿細管細胞の形質変化の解析

蒲澤秀門

新潟大学大学院医歯学総合研究科 生体機能調節医学専攻腎・膠原病内科学分野
(指導：成田一衛教授)

Analysis of phenotypic changes of proximal tubule cells in metabolic syndrome-related nephropathy

Hideyuki Kabasawa

Division of Clinical Nephrology and Rheumatology Niigata university Graduate School
of Medical and Dental Science
(Director: Professor Ichiei Narita)

別刷請求先 〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757 新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学
専攻 腎・膠原病内科学分野 蒲澤秀門

Reprint requests to : Hideyuki Kabasawa, Division of Clinical Nephrology and Rheumatology Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences 1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku, Niigata 951-8510 Japan

要旨

メタボリックシンドローム(metabolic syndrome, MetS)は、内臓脂肪型肥満を基盤として高血糖、脂質異常、高血圧が引き起こされる病態であるが、慢性腎臓病とも密接に関連することが示されている。しかし、MetSの腎、特に近位尿細管機能に関わる因子とその異常に関してはまだ十分に明らかにされてはいない。そこで、6週齢時に、MetSモデルであるOLETF(Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty)ラットを食餌自由摂取群(OLETF)と、食餌制限群(pair-fed OLETF)にわけ、対照ラットとともに12週齢で評価を行った。OLETF群では対照に比較して体重、糸球体径、腎重量が増加した。さらに近位尿細管エンドサイトーシス受容体メガリンのリガンドであるアルブミン、 β_2 -ミクログロブリン、ビタミンD結合蛋白(DBP)などの尿中排泄量も増加したが、食餌制限群ではどれも増加を認めなかった。また、腎内中性脂肪もOLETF群で増加したが、食餌制限群においては増加を認めなかった。腎皮質ではmonocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)のmRNAがOLETF群で発現が亢進したが、食餌制限では亢進を認めなかった。また、MCP-1の受容体であるケモカイン受容体2(chemokine receptor type 2, CCR2)の免疫染色では、CCR2がOLETF群の近位尿細管(S1領域)で発現が増加したが、食餌制限では増加しなかった。これらの結果から、MetS腎症ではメガリンの機能異常に代表される近位尿細管細胞の形質変化が起こり、そこには脂肪毒性やMCP-1-CCR2系が関与することが示唆された。

キーワード メタボリックシンドローム関連腎症、近位尿細管、メガリン、MCP-1、CCR2

はじめに

メタボリックシンドローム(metabolic syndrome, MetS)は、内臓脂肪型肥満を背景として高血糖、脂質異常、高血圧が引き起こされる病態で、心血管イベントのリスクを上昇させることが明らかにされている^{1)~3)}。一方、肥満は血圧や糖尿病とは独立して尿蛋白出現のリスクになることや⁴⁾、肥満に加え、高血糖、脂質異常、高血圧といったMetSの構成因子数が増えるほど慢性腎臓病(CKD)発症患者数が増加することが報告されており⁵⁾⁶⁾、肥満・MetS対策は、CKDおよび末期腎不全患者数を減少させる意味においても重要な課題といえる。

肥満・MetSにおける腎障害の成因については、脂肪酸やコレステロール合成経路を制御する転写因子の腎局所での発現亢進が、細胞内脂質の蓄積を誘導し腎障害につながるという報告や⁷⁾⁸⁾、糸球体で濾過されて近位尿細管で再吸収された遊離脂肪酸が腎障害に関与するという報告⁹⁾¹⁰⁾がある。1型糖尿病モデルラットでは、高血糖負荷による近位尿細管細胞の肥大が糸球体過剰濾過に先行することが報告されており¹¹⁾、糖尿病では初期から近位尿細管の機能異常が示唆されている。しかし、肥満・MetSにおいて、近位尿細管の機能異常に関してはまだ十分には明らかではない。また、高血糖状態での腎ではmonocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)の発現上昇を認め、腎での炎症や繊維化の進行を介した腎不全の進行に深く関わっていることが知られている¹²⁾が、MCP-1やその受容体であるケモカイン受容体2(chemokine receptor type 2, CCR2)に関しての、特にMetS腎症の近位尿細管での役割に関してはまだ明らかではない。

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF)ラットは、食欲を調節するコレストキニンの受容体であるコレストキニンA受容体の異常から過食、肥満となり、18週齢以降になると明らかな糖尿病を呈し、最終的には糖尿病性腎不全に陥るモデルである¹³⁾。12週齢までの初期OLETFラットは、肥満、耐糖能異常、軽度高血圧を呈し¹⁴⁾、過食、肥満のない対照のLong-Evans Tokushima Otsuka (LETO)ラットと同量の食餌をOLETFラットにpair feedingすると、体重が増加せず、血清インスリン値が改善することから¹⁵⁾、初期OLETFラットはいわゆるMetSモデルと考えられる。

本研究では、pair feeding した MetS モデルである初期 OLETF ラットの解析を通して、MetS の腎、特に近位尿細管に関わる因子を検討し、その機能異常を解析した。

方法

動物実験

本研究における動物実験は、新潟大学動物実験倫理委員会の指針に従って計画し、同委員会の承認のもとに行った。5週齢のOLETFラット雄18匹、およびその対照であるLETOラット9匹を大塚製薬株式会社より提供を受けた。ラットは1ゲージあたり1匹とし、12時間ごとに電灯の点灯と消灯を繰り返し、水分は自由摂取とした。6週齢時にOLETFラットを食餌自由摂取群(OLETF)9匹と、食餌制限群(pair-fed OLETF, PF-OLETF)9匹にわけ、OLETF群は食餌を自由摂取とした。PF-OLETF群には毎日13時に、LETO群9匹の前日の平均食餌量の餌を与えた。体重は週1回測定した。12週終了時、平均血圧を、ラット非観血自動血圧測定装置(BP-98A; ソフトロン)にて測定した後、代謝ケージに入れて24時間蓄尿を行った。その後断頭にて屠殺し、血液を採取後、すみやかに両腎を摘出した。左腎は重量測定後、腎皮質のみを切り分けし、半分を-80℃で保存し、もう半分をRNA laterTM(Ambion)に入れ4℃で保存した。右腎の半分は組織検討のために速やかに4%パラホルムアルデヒドに浸漬し、もう半分は中性脂肪測定のため-80℃で保存した。血糖値、血清中性脂肪、遊離脂肪酸、コレステロール、インスリン、尿クレアチニン(Cre)はSRL社に測定を依頼した。尿アルブミン(Alb)はラットアルブミンELISAキット(シバヤギ)にて測定し、尿β₂-ミクログロブリンは、ラットβ₂ミクログロブリン測定キット(三菱化学安全科学研究所)を用いて測定した。腎皮質内中性脂肪は、まず腎皮質100mg内の脂質を既報の方法で抽出し¹⁶⁾、その後中性脂肪測定キット(BioVision)にて測定した。

ウエスタンブロッティング

腎皮質を、タンパク分解酵素阻害剤(Complete, Roche)を加えた細胞溶解液(1% Triton-X, 100mM Tris(pH 7.6), 150mM NaCl)に入れ、ポジットロンホモジナイザー(IKA)にて2分間ホモジナイズ後、冷却遠心機にて10000g, 4℃で15分間遠心し、上清(ライセート)を回収した。回収したライセートのタンパク質10μg相当量を、等量のサンプルバッファー(125mM Tris-HCl(pH6.8), 10%2-メルカプトエタノール, 10%SDS, 0.5%BPB, 20%グリセロール)と共に98℃, 5分間加熱処理後、SDS-PAGEで分離した。一方尿検体はCre 500 mg相当量の尿検体を、同量の上記サンプルバッファーとともに同条件で加熱後SDS-PAGEで分離した。その後PVDFメンブレン(Millipore)上に転写し、転写したメンブレンをブロッキングバッファー(5%FBS, 0.05%Tween20含有 tris- buffered saline)で室温, 1時間処理し、その後一次抗体を室温で2時間反応させた。メガリンはウサギ抗ラットメガリン抗体¹⁷⁾を用いて、ビタミンD結合蛋白(Vitamin D binding protein, DBP)はウサギ抗ヒトDBP抗体(Dako)を用いて、コントロール用のβアクチンはマウスモノクローナル抗体(Abcam)を用いて検討した。反応後ブロッキングバッファーで洗浄し、二次抗体として抗ウサギIgG抗体(Dako), あるいは抗マウスIgG(BIORAD)を用い、室温で1時間反応させた。反応後ブロッキングバッファーで洗浄し、SuperSignal(Thermo SCIENTIFIC)とLumiVisionPRO(アイシン)を用いて検出した。

RNA抽出とリアルタイムRT-PCR

ラットRNAはISOGEN(ニッポンジーン)を用いて抽出し、高圧蒸気滅菌したジエチルピロカーボネート処理水に溶解した。溶解したRNAはGeneQuant(Biochrom)で吸光度を測定し、濃度を100ng/μlに調整した。RNAの逆転写とPCR反応はOne Step SYBR® PrimeScript® PLUS RT-PCR Kit(TAKARA Bio)とThermal Cycler Dice® Real Time Systemを用い、PCR反応には表1

のプライマーセットを使用した。RNAは61°C, 20分で逆転写を行い、合成されたcDNAは95°C, 15秒で熱変性させ、その後PCRを95°C, 15秒の熱変性と58°C, 15秒のアニーリングを40サイクル行った。反応の特異性は、融解曲線分析で確認し、目的遺伝子とハウスキーピング遺伝子glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)遺伝子のそれぞれの検量線を作成し、GAPDHに対する相対定量を行った。

糸球体径測定、腎の免疫染色

4%パラホルムアルデヒドで固定した腎はパラフィンに包埋し、その後4μmに薄切した。糸球体径測定のために、periodic acid Schiff(PAS)染色を施行し、顕微鏡はBZ-9000 オールインワン蛍光顕微鏡BIOREVO(keyence)を使用し、表層近くの糸球体をランダムに10個選択し、解析ソフトImage-Pro Plus(MediaCybernetics)を使用して測定し、平均値をその個体の糸球体径とした。免疫染色の一次抗体は、CCR2はウサギ抗ヒトCCR2抗体(Abcam)、有機アニオントランスポーター1(organic anion transporter 1, OAT-1)はウサギ抗ヒトOAT-1抗体(TransGenic)、メガリンは前述のウサギ抗ラットメガリン抗体を用いた。4μmのパラフィン切片よりパラフィンを除去後、0.01M クエン酸pH 6.0下に600W, 4分電子レンジにて抗原賦活処理し、3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼを失活させた。phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄後、5%ヤギ血清にて20分ブロッキングを行い、上記一次抗体を4°Cで一晩反応させた後にPBSで洗浄し、ビオチン標識ヤギ抗ウサギ抗体と室温で1時間反応させた。その後PBSで洗浄し、ストレプトアビジン-ビオチン標識ペルオキシダーゼと室温で1時間反応させてPBSで洗浄し、ジアミノベンジジンで発色させ、マイヤーのヘマトキシリンで核染した。

統計

データは平均±標準誤差で表示した。多重比較は Bonferroni/Dunn 検定を用いた一元配置分散分析で解析し、 $p<0.05$ にて有意差ありとした。

結果

12 週齢での検査データ

12 週齢での検査データを表 2 に示す。肥満・MetS モデルを反映して、体重、平均血圧、腎重量とも OLETF 群では LETO 群と比較して有意に増加し、OLETF 群と比較して PF-OLETF 群では有意に減少した。採血データでは血糖値、血清中性脂肪、血清遊離脂肪酸、血清インスリン、腎内中性脂肪は OLETF 群では LETO 群と比較して有意に上昇し、OLETF 群と比較して PF-OLETF 群では有意に低下していた。しかし血清コレステロールは 3 群で有意差はなかった。

OLETF ラットにおける食餌制限の臨床効果

実験期間中体重は、LETO 群と PF-OLETF 群では差を認めず、OLETF 群のみ有意に増加した。糸球体過剰濾過、糸球体肥大を反映してクレアチニンクリアランス(Ccr)と糸球体径は、LETO 群と比較して OLETF 群で有意に増加し、PF-OLETF 群では OLETF 群より低下する傾向であった。しかし光学顕微鏡による検討では、その他に 3 群とも有意な変化は認めなかった。尿中アルブミンは、OLETF 群で LETO 群に比較して有意に増加し、PF-OLETF 群では OLETF 群に比較して低下していた。さらに近位尿細管機能障害を反映して、尿中β₂-ミクログロブリンと尿中 DBP は、OLETF 群で増加し PF-OLETF 群で低下していた。しかし、腎でのメガリンの蛋白発現、mRNA 発現は 3 群間に有意差は認めなかった(図 1)。

腎皮質における mRNA 発現

腎皮質における MCP-1 の mRNA 発現は、OLETF 群では LETO 群と比較して有意に増加し、PF-OLETF 群では OLETF 群と比較して低下していた。PAI-1 の mRNA 発現は、OLETF 群では LETO 群と比較して有意に増加していたが、PF-OLETF 群で発現低下は認められなかった。このほか TNF α , TGF β , アンジオテンシノーゲン, Sirt1 は 3 群で有意差が認められなかった(表 3)。

CCR2 の腎における免疫染色

近位尿細管にて CCR2 の免疫染色は、LETO ラット(図 2, A)と比較して、OLETF ラット(図 2, B)で発現が亢進し、PF-OLETF ラット(図 2, C)では改善傾向となった。連続切片の検討では、OLETF ラットでの CCR2 の免疫染色は(図 2, D), 近位尿細管 S2 基底膜側に特異的に発現している OAT-1 と局在が異なることが確認され(図 2, E), メガリンと CCR2 の二重染色で、メガリンが染色される尿細管でのみ CCR2 が発現していることが確認された(図 2, F)。つまり、OLETF ラットで CCR2 は近位尿細管 S1 領域で強く発現していると考えられた。

考察

MetS は内臓脂肪型肥満を基盤とし、高血圧、脂質異常、耐糖能異常が誘導される病態であるが、MetS 患者では尿中アルブミンが増加傾向となることが報告されている¹⁸⁾。本研究では、MetS 腎症モデルである初期 OLETF ラットにおいて、腎重量が増加するほか、尿中アルブミン、尿中 β_2 -ミクログロブリン、尿中 DBP が増加し、食餌制限をした OLETF ラットではそれらが増加しないことが示された。1 型糖尿病患者では腎重量の増加は尿細管の肥大を反映し、腎尿細管の肥大は糸球体過剰濾過に先行することや¹⁹⁾、動物実験でも、近位尿細管での形質変化が糸球体肥大に先行することが報告されている²⁰⁾。本研究の MetS 腎症では、糸球体肥大はあるが、光学顕微鏡による検討ではその他に明らかな病変の違いはなく、腎重量増加、つまり尿細管の肥大が出現し、食餌制限を行うことで改善していた。このことは、初期 1 型糖尿病と同様の尿細管の肥大が、MetS 腎症でも起きたことを示唆する所見と考えられた。メガリンは近位尿細管の管腔側に発現する膜蛋白質で、低分子蛋白質の再吸収にかかわっている²¹⁾。 β_2 -ミクログロブリンや DBP はメガリンのリガンドで、近位尿細管でメガリンを介して再吸収されるため²¹⁾、 β_2 -ミクログロブリン、DBP の尿中での増加は近位尿細管のメガリンの機能異常が存在することを示している。1 型糖尿病モデルではメガリンの近位尿細管での発現低下が初期から出現し、近位尿細管でのメガリンを介したアルブミン再吸収低下が起きると報告されている²²⁾。今回用いたモデルでは、メガリンの蛋白、mRNA 発現とも明らかな低下は認めなかったが、近位尿細管への代謝負荷があると、メガリンの発現低下が無くとも、近位尿細管でのエンドサイトーシスの障害が起き、メガリンのリガンドが尿中で上昇することが報告されている²³⁾²⁴⁾。したがって、近位尿細管への代謝負荷が近位尿細管エンドサイトーシスの障害を引き起こしたものと推測された。

初期 OLETF ラットの腎皮質では、腎内中性脂肪の増加が認められ、食餌制限で改善した。Bobulescu らは、糸球体で濾過されて尿細管で再吸収されたアルブミンに結合した脂肪酸が、近位尿細管で再吸収されることで腎内中性脂肪が増加し、その脂肪毒性の影響で、近位尿細管での Na⁺/H⁺交換輸送体 3(NHE3)の発現低下や、尿中へのアンモニウムイオン産生能の低下を介した尿中 pH の上昇が認められることを報告している⁹⁾。したがって、本研究の MetS モデルの腎内中性脂肪の増加は、脂肪毒性を介して、直接尿細管機能障害を起こしている可能性を示唆する所見と考えられた。

また、初期 OLETF ラットの腎皮質での TNF α , TGF β , アンジオテンシノーゲンの mRNA 発現には明らかな変化を認めなかったが、MCP-1 は OLETF ラットで著明に上昇し、食餌制限にて改善を認めた。MCP-1 は単球や T 細胞の遊走活性、サイトカイン産生誘導接着分子の発現誘導などの機能を担っているサイトカインで、単球やマクロファージなどの骨髄由来細胞や脂肪細胞で産生される²⁵⁾ほか、腎でも高血糖刺激にて糸球体メサンギウム細胞、糸球体上皮細胞のほか、尿細管細胞でも産生され、腎内の炎症や繊維化の進行を介した腎不全の進行に深く関わっていることが報告されている¹²⁾。また、MCP-1 の受容体である CCR2 は、2 型糖尿病モデルマウスの腎や、糖尿病顕性腎症患者の糸球体で発現が亢進し²⁶⁾²⁷⁾、CCR2 アンタゴニストにて糖尿病性腎症モデルの腎組織障害が改善されることから²⁶⁾、MCP-1-CCR2 系は、腎障害の進行に重要な役割と果たしていると考えられている。本研究では、OLETF ラットの腎皮質での MCP-1 の mRNA の上昇を認めるとともに、CCR2 の発現はメガリンの染色される尿細管でのみ観察され、OLETF ラットで発現が亢進し、食餌制限した OLETF ラットでそれが抑制されることが確認された。CCR2 は近位尿細管 S1 領域で発現亢進が認められたが、近位尿細管の S1 領域は原尿がほぼ直接流れ込む部位で、糸球体を濾過した低分子蛋白や脂肪酸といった物質の大部分が流入し、メガリンを介して近位尿細管へ再吸収が行われている部位であり、S1 領域の尿細管は強い代謝負荷にさらされていると予想される。したがって、MCP-1-CCR2 系は MetS 腎症において代謝負荷を介して近位尿細管の形質変化を促す可能性が考えられた。ただ、本モデルの性質上メガリンと CCR2 の直接作用の証明は難しく、今後更なる検討が必要である。

結語

MetS 腎症では、メガリンの機能異常に代表される近位尿細管細胞の形質変化が起こり、そこには脂肪毒性や MCP-1-CCR2 系が関与することが示唆された。

謝辞

最後に、本研究において御指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科腎・膠原病内科学分野 成田一衛教授、機能分子医学講座 斎藤亮彦特任教授、腎・膠原病内科学分野 細島康宏先生に深謝いたします。

文献

1. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissén M, Taskinen MR, Groop L: Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24: 683-689, 2001.
2. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT: The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 288: 2709-2716, 2002.
3. Ninomiya T, Kubo M, Doi Y, Yonemoto K, Tanizaki Y, Rahman M, Arima H, Tsuruyuya K, Iida M, Kiyohara Y: Impact of metabolic syndrome on the development of cardiovascular disease in a general Japanese population: the Hisayama study. *Stroke* 38: 2063-2069, 2007.
4. Tozawa M, Iseki K, Iseki C, Oshiro S, Ikemiya Y, Takishita S: Influence of smoking and obesity on the development of proteinuria. *Kidney Int.* 62: 956-962, 2002.
5. Ninomiya T, Kiyohara Y, Kubo M, Yonemoto K, Tanizaki Y, Doi Y, Hirakata H, Iida M: Metabolic syndrome and CKD in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Am J Kidney Dis* 48: 383-391, 2006.

6. Tozawa M, Iseki C, Tokashiki K, Chinen S, Kohagura K, Kinjo K, Takishita S, Iseki K: Metabolic syndrome and risk of developing chronic kidney disease in Japanese adults. *Hypertens Res* 30: 937-943, 2007.
7. Jiang T, Wang Z, Proctor G, Moskowitz S, Liebman SE, Rogers T, Lucia MS, Li J, Levi M: Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. *J Biol Chem* 280: 32317-32325, 2005.
8. Hao J, Liu SX, Zhao S, Liu QJ, Liu W, Duan HJ: High-fat diet causes increased serum insulin and glucose which synergistically lead to renal tubular lipid deposition and extracellular matrix accumulation. *Br J Nutr* 107: 74-85, 2012.
9. Bobulescu IA, Dubree M, Zhang J, McLeroy P, Moe OW: Effect of renal lipid accumulation on proximal tubule Na⁺/H⁺ exchange and ammonium secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F1315-1322, 2008.
10. Tanaka Y, Kume S, Araki S, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sakaguchi M, Sugimoto T, Koya D, Haneda M, Kashiwagi A, Maegawa H, Uzu T: Fenofibrate, a PPAR α agonist, has renoprotective effects in mice by enhancing renal lipolysis. *Kidney Int.* 79:871-882, 2011.
11. Bak M, Thomsen K, Christiansen T, Flyvbjerg A: Renal enlargement precedes renal hyperfiltration in early experimental diabetes in rats. *J Am Soc Nephrol* 11:1287-1292, 2000.
12. Tesch GH: MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F697-701, 2008.
13. Takiguchi S, Takata Y, Funakoshi A, Miyasaka K, Kataoka K, Fujimura Y, Goto T, Kono A: Disrupted cholecystokinin type-A receptor (CCKAR) gene in OLETF rats. *Gene* 197: 169-175, 1997.
14. Nagai Y, Yao L, Kobori H, Miyata K, Ozawa Y, Miyatake A, Yukimura T, Shokoji T, Kimura S, Kiyomoto H, Kohno M, Abe Y, Nishiyama A: Temporary angiotensin II blockade at the prediabetic stage attenuates the development of renal injury in type 2 diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* 16: 703-711, 2005.
15. Bi S, Ladenheim EE, Schwartz GJ, Moran TH: A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R254-260, 2001.
16. Bligh E, Dyer WA: Rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917, 1959.
17. Hosaka K, Takeda T, Iino N, Hosojima M, Sato H, Kaseda R, Yamamoto K, Kobayashi A, Gejyo F, Saito A: Megalin and nonmuscle myosin heavy chain IIA interact with the adaptor protein Disabled-2 in proximal tubule cells. *Kidney Int* 75: 1380-1315, 2009.
18. Urinary cystatin C as a potential risk marker for cardiovascular disease and chronic kidney disease in patients with obesity and metabolic syndrome: Satoh-Asahara N, Suganami T, Majima T, Kotani K, Kato Y, Araki R, Koyama K, Okajima T, Tanabe M, Oishi M, Himeno A, Kono S, Sugawara A, Hattori M, Ogawa Y, Shimatsu A; Japan Obesity and Metabolic Syndrome Study (JOMS) Group. *Clin J Am Soc Nephrol* 6: 265-273, 2011.
19. Zerbini G, Bonfanti R, Meschi F, Bognetti E, Paesano PL, Gianolli L, Querques M, Maestroni A, Calori G, Del Maschio A, Fazio F, Luzi L, Chiumello G: Persistent renal hypertrophy and faster decline of glomerular filtration rate precede the development of microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 55: 1620-2625, 2006.
20. Fujisawa G, Okada K, Muto S, Fujita N, Itabashi N, Kusano E, Ishibashi S:

Spirolactone prevents early renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int* 66: 1493-1502, 2004

21. Saito A, Sato H, Iino N, Takeda T: Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium. *J Biomed Biotechnol* 2010:403272, 2010.
22. Tojo A, Onozato ML, Ha H, Kurihara H, Sakai T, Goto A, Fujita T, Endou H: Reduced albumin reabsorption in the proximal tubule of early-stage diabetic rats. *Histochem Cell Biol* 116: 269-176, 2001.
23. Thelle K, Christensen EI, Vorum H, Ørskov H, Birn H: Characterization of proteinuria and tubular protein uptake in a new model of oral L-lysine administration in rats. *Kidney Int* 69: 1333-1340, 2006.
24. Nielsen R, Mollet G, Esquivel EL, Weyer K, Nielsen PK, Antignac C, Christensen EI: Increased lysosomal proteolysis counteracts protein accumulation in the proximal tubule during focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 84:902-910, 2013.
25. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808, 2003.
26. Sayyed SG, Ryu M, Kulkarni OP, Schmid H, Lichtnekert J, Grüner S, Green L, Mattei P, Hartmann G, Anders HJ: An orally active chemokine receptor CCR2 antagonist prevents glomerulosclerosis and renal failure in type 2 diabetes. *Kidney Int* 80:68-78, 2011.
27. Tarabra E, Giunti S, Barutta F, Salvidio G, Burt D, Deferrari G, Gambino R, Vergola D, Pinach S, Perin PC, Camussi G, Gruden G: Effect of the monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine receptor 2 system on nephrin expression in streptozotocin-treated mice and human cultured podocytes. *Diabetes* 58:2109-2118, 2009.

遺伝子	プライマー
ATG	F 5'-TGGAAGCAGCAGCCAGACAC-3' R 5'-GGCAGCAAGAACTGGGTCAG-3'
GAPDH	F 5'-GTATTGGGCGCCTGGTCACC-3' R 5'-CGCTCCTGGAAGATGGTGATGG-3'
MCP-1	F 5'-CAGAAACCAGCCAACCTCTCA-3' R 5'-AGACAGCACGTGGATGCTAC-3'
PAI-1	F 5'-TGGTGAACGCCCTCTATTTTC-3' R 5'-GAGGGGCACATCTTTTTCAA-3'
Sirt1	F 5'-CCAGATCCTCAAGCCATGTT-3' R 5'-CCAAAATTGCTTTCCTTCCA-3'
TGFβ	F 5'-TACTACGCCAAAGAAGTCACCCC-3' R 5'-CCCGAATGTTCTGACGTATTGAA-3'
TNFα	F 5'-AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC-3' R 5'-TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'
メガリン	F 5'-TAGCGATTTGGTTCTCCACC-3' R 5'-ACTTGTGGCCTGCATAACC-3'

表1 プライマー配列

ATG, angiotensinogen; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; Sirt 1, sirtuin 1; TGFβ, transforming growth factor β; TNFα, tumor necrosis factor α

	LETO	OLETF	PF-OLETF
体重(mg)	373.6±1.4	523.7±2.5 a	372.9±1.5 d
平均血圧(mmHg)	99.1±1.9	121.6±2.7 a	111.8±3.2 be
腎重量(mg)	1.08±0.08	1.61±0.13 a	1.24±0.13 ad
血糖値(mg/dl)	164.2±0.6	215.2±1.8 b	175.6±0.6 e
血清中性脂肪(mg/dl)	24.2±2.6	99.9±11.5 a	25.9±3.5 d
血清遊離脂肪酸(mg/dl)	364.0±28.5	639.0±58.1 a	469.2±38.6 e
血清総コレステロール(mg/dl)	78.9±1.4	74.5±2.5	77.8±1.5
血清インスリン(ng/ml)	0.26±0.08	0.83±0.14 b	0.32±0.14 e
腎臓内中性脂肪 (mg/g)	2.12±0.58	7.05±1.79 c	2.75±0.60 e

表 2 12 週齢での検査データ

値は平均±標準誤差. LETO, Long-Evans Tokushima Otsuka ラット; OLETF, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty ラット; PF-OLETF, Pair-fed Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty ラット.

a p<0.001 versus LETO, b p<0.01 versus LETO, c p<0.05 versus LETO, d p<0.001 versus OLETF, e p<0.05 versus OLETF

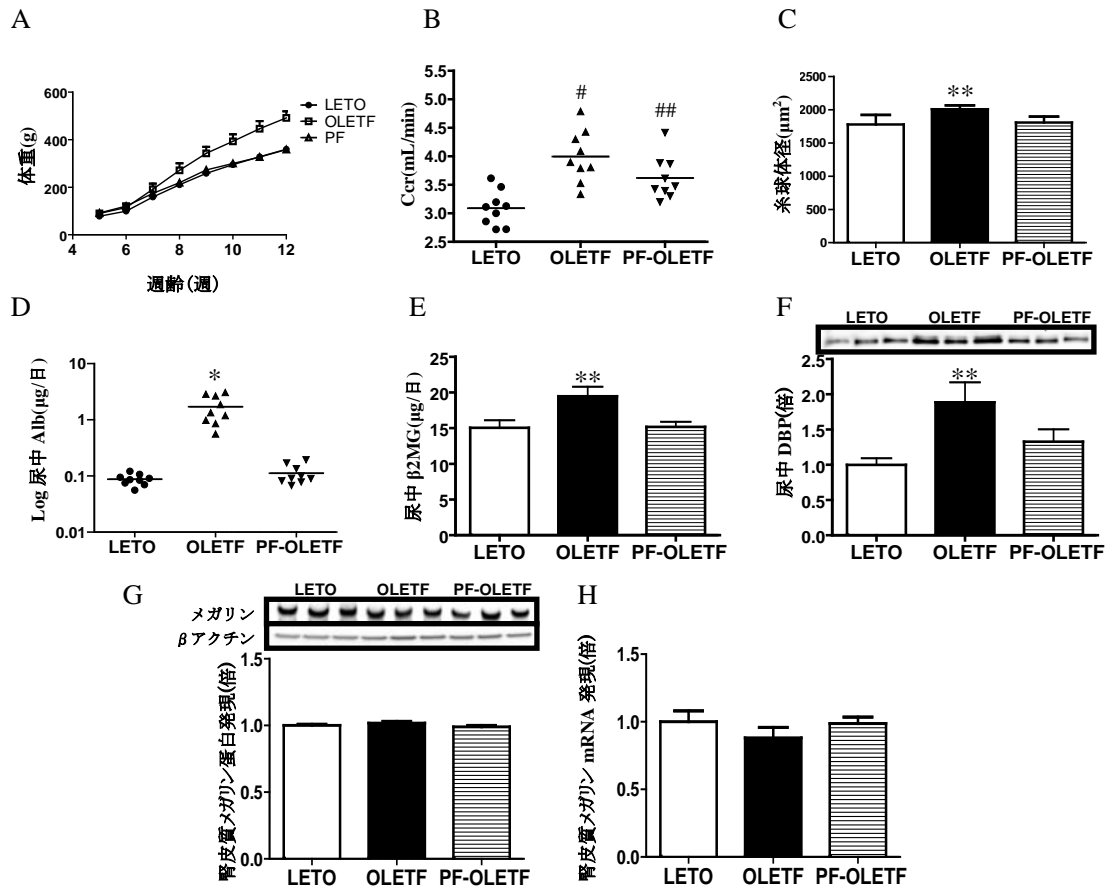


図1 OLETF ラットにおける食餌制限の臨床効果

(A)実験期間中の体重の推移, (B)12 週齢でのクレアチニンクリアランス(Ccr), (C)腎糸球体径, (D)対数化尿中アルブミン(Alb)定量, (E)尿中 β₂-ミクログロブリン(β₂MG)定量, (F)尿中ビタミン D 結合蛋白(DBP)の蛋白定量, (G)腎皮質でのメガリンの蛋白発現, (H)腎皮質でのメガリンの mRNA 発現. LETO, Long-Evans Tokushima Otsuka ラット; OLETF, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty ラット; PF-OLETF, Pair-fed Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty ラット. # p<0.01 versus LETO, ## p <0.05 versus LETO, * p<0.01 versus LETO,PF-OLETF, ** p<0.05 versus LETO,PF-OLETF

	LETO	OLETF	PF-OLETF
ATG mRNA	1.00±0.21	0.99±0.12	1.12±0.20
MCP-1 mRNA	1.00±0.11	1.97±0.29 *	1.10±0.12 **
PAI-1 mRNA	1.00±0.18	3.16±0.67 *	3.45±0.41 *
Sirt 1 mRNA	1.00±0.08	0.83±0.07	1.00±0.11
TGFβ mRNA	1.00±0.09	0.82±0.08	0.91±0.10
TNFα mRNA	1.00±0.12	1.31±0.13	0.77±0.07

表3 12週齢での腎皮質の各種パラメーターの mRNA 発現

LETO を 1 倍としたとき相対値, 値は平均±標準誤差. LETO, Long-Evans Tokushima Otsuka ラット; OLETF, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty ラット; PF-OLETF, Pair-fed Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty ラット. ATG, angiotensinogen; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; Sirt 1, sirtuin 1; TGFβ, transforming growth factor β; TNFα, tumor necrosis factor α. * p<0.01 versus LETO, ** p<0.05 versus OLETF

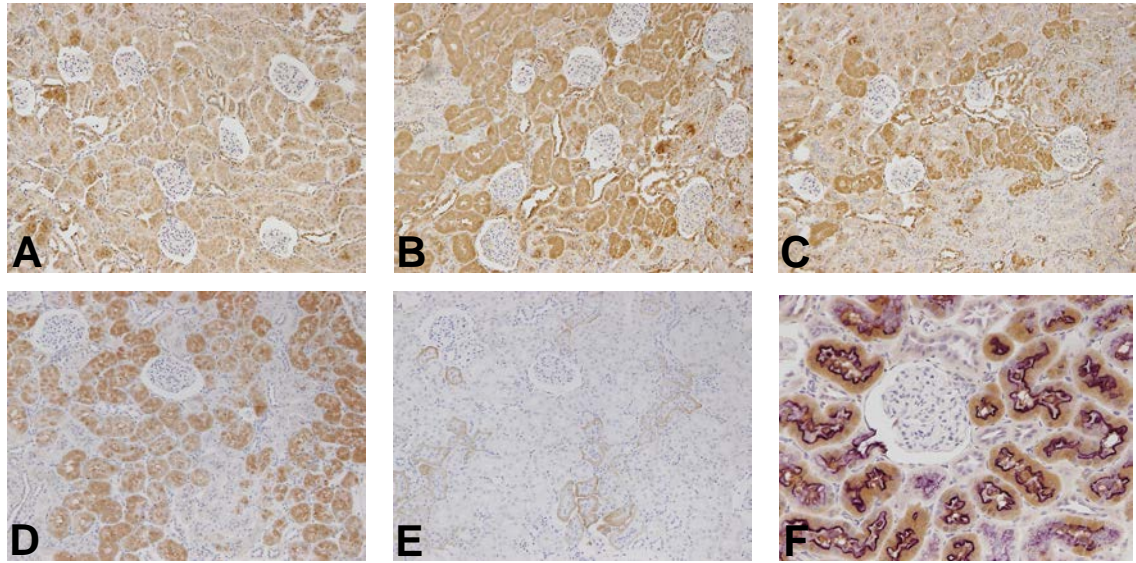


図 2

LETO ラット(A), OLETF ラット(B), PF-OLETF ラット(C)のケモカイン受容体 2(chemokine receptor type 2, CCR2)の腎臓における免疫染色(倍率 200 倍). 連続切片での OLETF ラットの CCR2 の免疫染色(D)と有機アニオントランスポーター1(organic anion transporter 1, OAT-1)の免疫染色(E)(倍率 200 倍). OLETF ラットでのメガリンと CCR2 の二重染色(F)(倍率 400 倍). OLETF ラットでの CCR2 の免疫染色は, 近位尿細管 S2 基底膜側に特異的に発現している OAT-1 と局在が異なることが確認され, メガリンと CCR2 の二重染色で, 近位尿細管 S1 領域に発現するメガリンが染色される尿細管でのみ CCR2 が発現していることが確認された.