

表 1. 研究開始時の血漿中総脂質脂肪酸組成 (mol%)

脂肪酸	化学式	Group	
		対照群 (n=20)	EPA服用群 (n=20)
ラウリン酸	C 12 : 0	0.25 ± 0.18	0.36 ± 0.42
ミリスチン酸	C 14 : 0	1.01 ± 0.35	1.05 ± 0.68
ミリストレイン酸	C 14 : 1 n-5	感度未満	感度未満
パルミチン酸	C 16 : 0	24.10 ± 1.53	24.19 ± 2.29
パルミトレイン酸	C 16 : 1 n-7	2.06 ± 0.57	2.04 ± 0.57
ステアリン酸	C 18 : 0	6.61 ± 0.41	6.44 ± 0.54
オレイン酸	C 18 : 1 n-9	19.49 ± 3.03	20.36 ± 3.45
リノール酸	C 18 : 2 n-6	30.95 ± 3.07	30.65 ± 4.56
γ-リノレン酸	C 18 : 3 n-6	0.28 ± 0.13	0.26 ± 0.13
α-リノレン酸	C 18 : 3 n-3	0.78 ± 0.28	0.83 ± 0.20
アラキジン酸	C 20 : 0	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.04
11-エイコセン酸	C 20 : 1 n-9	0.18 ± 0.04	0.21 ± 0.11
エイコサジエン酸	C 20 : 2 n-6	0.30 ± 0.05	0.30 ± 0.05
5,8,11-エイコサトリエン酸	C 20 : 3 n-9	0.19 ± 0.03	0.19 ± 0.04
ジホモ-γ-リノレン酸	C 20 : 3 n-6	0.84 ± 0.22	0.78 ± 0.20
アラキドン酸	C 20 : 4 n-6	4.74 ± 0.89	4.62 ± 1.38
エイコサペンタエン酸	C 20 : 5 n-3	1.86 ± 1.31	1.83 ± 1.42
ベヘン酸	C 22 : 0	0.48 ± 0.07	0.46 ± 0.12
エルシン酸	C 22 : 1 n-9	感度未満	感度未満
ドコサテトラエン酸	C 22 : 4 n-6	0.15 ± 0.03	0.14 ± 0.05
ドコサペンタエン酸	C 22 : 5 n-3	0.59 ± 0.17	0.59 ± 0.17
リグノセリン酸	C 24 : 0	0.40 ± 0.06	0.38 ± 0.10
ドコサヘキサエン酸	C 22 : 6 n-3	3.63 ± 1.11	3.56 ± 1.24
ネルボン酸	C 24 : 1	0.92 ± 0.20	0.88 ± 0.29

表 2. 研究開始時の赤血球膜中リン脂質脂肪酸組成 (Area%)

脂肪酸	化学式	Group	
		対照群 (n=20)	EPA服用群 (n=20)
ラウリン酸	C 12 : 0	0.02 ± 0.04	0.06 ± 0.06
ミリスチン酸	C 14 : 0	0.30 ± 0.07	0.33 ± 0.09
ミリストレイン酸	C 14 : 1 n-5	感度未満	感度未満
パルミチン酸	C 16 : 0	24.66 ± 1.39	24.69 ± 1.18
パルミトレイン酸	C 16 : 1 n-7	0.32 ± 0.18	0.38 ± 0.20
ステアリン酸	C 18 : 0	14.62 ± 1.36	14.35 ± 1.84
オレイン酸	C 18 : 1 n-9	14.33 ± 0.63	14.25 ± 0.63
リノール酸	C 18 : 2 n-6	10.51 ± 0.91	10.46 ± 1.00
γ-リノレン酸	C 18 : 3 n-6	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02
α-リノレン酸	C 18 : 3 n-3	0.19 ± 0.12	0.23 ± 0.27
アラキジン酸	C 20 : 0	0.40 ± 0.09	0.38 ± 0.15
11-エイコセン酸	C 20 : 1 n-9	0.19 ± 0.04	0.20 ± 0.06
エイコサジエン酸	C 20 : 2 n-6	0.28 ± 0.09	0.34 ± 0.15
5,8,11-エイコサトリエン酸	C 20 : 3 n-9	感度未満	感度未満
ジホモ-γ-リノレン酸	C 20 : 3 n-6	1.17 ± 0.30	1.22 ± 0.24
アラキドン酸	C 20 : 4 n-6	10.36 ± 1.22	10.19 ± 1.52
エイコサペンタエン酸	C 20 : 5 n-3	1.87 ± 0.81	1.85 ± 0.92
ベヘン酸	C 22 : 0	1.35 ± 0.19	1.28 ± 0.29
エルシン酸	C 22 : 1 n-9	0.05 ± 0.06	0.09 ± 0.12
ドコサテトラエン酸	C 22 : 4 n-6	1.31 ± 0.31	2.25 ± 3.92
ドコサペンタエン酸	C 22 : 5 n-3	1.88 ± 0.31	1.91 ± 0.29
リグノセリン酸	C 24 : 0	3.41 ± 0.36	3.24 ± 0.60
ドコサヘキサエン酸	C 22 : 6 n-3	7.20 ± 1.17	6.86 ± 1.20
ネルボン酸	C 24 : 1	4.02 ± 0.38	3.89 ± 0.54

2006.2.27 現在

表3. 6ヶ月後の血漿中総脂質脂肪酸組成 (mol%)

脂肪酸	化学式	Group	
		対照群 (n=20)	EPA服用群 (n=20)
ラウリン酸	C 12 : 0	0.21 ± 0.14	0.23 ± 0.18
ミリスチン酸	C 14 : 0	0.96 ± 0.29	0.86 ± 0.53
ミリストレイン酸	C 14 : 1 n-5	感度未満	0.11 ±
パルミチン酸	C 16 : 0	23.74 ± 1.29	24.66 ± 2.96
パルミトレイン酸	C 16 : 1 n-7	1.93 ± 0.49	1.82 ± 0.58
ステアリン酸	C 18 : 0	6.64 ± 0.43	6.74 ± 0.77
オレイン酸	C 18 : 1 n-9	20.10 ± 2.76	19.14 ± 2.51
リノール酸	C 18 : 2 n-6	30.67 ± 2.94	27.93 ± 3.87
γ-リノレン酸	C 18 : 3 n-6	0.29 ± 0.12	0.21 ± 0.12
α-リノレン酸	C 18 : 3 n-3	0.74 ± 0.25	0.72 ± 0.22
アラキジン酸	C 20 : 0	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.04
11-エイコセン酸	C 20 : 1 n-9	0.18 ± 0.04	0.17 ± 0.04
エイコサジエン酸	C 20 : 2 n-6	0.29 ± 0.04	0.26 ± 0.04
5,8,11-エイコサトリエン酸	C 20 : 3 n-9	0.19 ± 0.04	0.16 ± 0.04
ジホモ-γ-リノレン酸	C 20 : 3 n-6	0.86 ± 0.21	0.56 ± 0.16
アラキドン酸	C 20 : 4 n-6	4.74 ± 0.73	4.19 ± 0.97
エイコサペンタエン酸	C 20 : 5 n-3	1.99 ± 1.67	5.84 ± 2.11
ベヘン酸	C 22 : 0	0.50 ± 0.08	0.50 ± 0.14
エルシン酸	C 22 : 1 n-9	0.07 ±	感度未満
ドコサテトラエン酸	C 22 : 4 n-6	0.13 ± 0.03	0.11 ± 0.03
ドコサペンタエン酸	C 22 : 5 n-3	0.56 ± 0.15	1.26 ± 0.40
リグノセリン酸	C 24 : 0	0.42 ± 0.08	0.42 ± 0.12
ドコサヘキサエン酸	C 22 : 6 n-3	3.82 ± 1.51	3.26 ± 0.98
ネルボン酸	C 24 : 1	0.97 ± 0.22	0.97 ± 0.28

表4. 6ヶ月後の赤血球膜中リン脂質脂肪酸組成 (Area%)

脂肪酸	化学式	Group	
		対照群 (n=20)	EPA服用群 (n=20)
ラウリン酸	C 12 : 0	0.04 ± 0.04	0.04 ± 0.04
ミリスチン酸	C 14 : 0	0.28 ± 0.08	0.28 ± 0.05
ミリストレイン酸	C 14 : 1 n-5	0.03 ± 0.06	0.03 ± 0.05
パルミチン酸	C 16 : 0	24.19 ± 1.10	24.35 ± 1.21
パルミトレイン酸	C 16 : 1 n-7	0.32 ± 0.16	0.29 ± 0.12
ステアリン酸	C 18 : 0	14.99 ± 1.63	15.41 ± 1.24
オレイン酸	C 18 : 1 n-9	14.39 ± 0.80	14.11 ± 0.66
リノール酸	C 18 : 2 n-6	9.94 ± 1.23	8.45 ± 0.81
γ-リノレン酸	C 18 : 3 n-6	0.03 ± 0.05	0.01 ± 0.02
α-リノレン酸	C 18 : 3 n-3	0.20 ± 0.17	0.22 ± 0.18
アラキジン酸	C 20 : 0	0.35 ± 0.04	0.36 ± 0.06
11-エイコセン酸	C 20 : 1 n-9	0.23 ± 0.04	0.22 ± 0.05
エイコサジエン酸	C 20 : 2 n-6	0.32 ± 0.14	0.25 ± 0.14
5,8,11-エイコサトリエン酸	C 20 : 3 n-9	感度未満	感度未満
ジホモ-γ-リノレン酸	C 20 : 3 n-6	1.10 ± 0.21	0.84 ± 0.20
アラキドン酸	C 20 : 4 n-6	11.13 ± 1.29	9.13 ± 1.38
エイコサペンタエン酸	C 20 : 5 n-3	1.87 ± 0.87	5.50 ± 1.67
ベヘン酸	C 22 : 0	1.22 ± 0.28	1.15 ± 0.19
エルシン酸	C 22 : 1 n-9	0.05 ± 0.05	0.07 ± 0.06
ドコサテトラエン酸	C 22 : 4 n-6	1.40 ± 0.35	0.93 ± 0.29
ドコサペンタエン酸	C 22 : 5 n-3	2.01 ± 0.29	4.30 ± 0.89
リグノセリン酸	C 24 : 0	3.07 ± 0.85	2.89 ± 0.78
ドコサヘキサエン酸	C 22 : 6 n-3	7.61 ± 1.35	6.28 ± 1.40
ネルボン酸	C 24 : 1	3.57 ± 0.66	3.29 ± 0.75

2006.2.27 現在

表5. 24ヶ月後の血漿中総脂質脂肪酸組成 (mol%)

脂肪酸	化学式	Group	
		対照群 (n=5)	EPA服用群 (n=7)
ラウリン酸	C 12:0	0.22 ± 0.08	0.16 ± 0.07
ミリスチン酸	C 14:0	1.04 ± 0.53	1.20 ± 0.61
ミリストレイン酸	C 14:1 n-5	0.19 ± 0.11	0.19 ± 0.02
パルミチン酸	C 16:0	23.01 ± 1.49	24.17 ± 2.17
パルミトレイン酸	C 16:1 n-7	2.23 ± 0.68	2.11 ± 0.86
ステアリン酸	C 18:0	6.66 ± 0.19	6.89 ± 0.60
オレイン酸	C 18:1 n-9	19.24 ± 3.17	19.48 ± 3.42
リノール酸	C 18:2 n-6	29.54 ± 2.82	26.16 ± 4.39
γ-リノレン酸	C 18:3 n-6	0.66 ± 0.11	0.46 ± 0.13
α-リノレン酸	C 18:3 n-3	0.81 ± 0.21	0.92 ± 0.21
アラキジン酸	C 20:0	0.20 ± 0.03	0.18 ± 0.05
11-エイコセン酸	C 20:1 n-9	0.22 ± 0.07	0.18 ± 0.04
エイコサジエン酸	C 20:2 n-6	0.27 ± 0.05	0.26 ± 0.03
5,8,11-エイコサトリエン酸	C 20:3 n-9	0.23 ± 0.04	0.21 ± 0.04
ジホモ-γ-リノレン酸	C 20:3 n-6	0.83 ± 0.17	0.61 ± 0.22
アラキドン酸	C 20:4 n-6	5.14 ± 1.00	3.63 ± 0.92
エイコサペンタエン酸	C 20:5 n-3	2.55 ± 1.25	6.88 ± 1.57
ベヘン酸	C 22:0	0.50 ± 0.09	0.47 ± 0.16
エルシン酸	C 22:1 n-9	感度未満	感度未満
ドコサテトラエン酸	C 22:4 n-6	0.17 ± 0.02	0.11 ± 0.03
ドコサペンタエン酸	C 22:5 n-3	0.63 ± 0.06	1.48 ± 0.25
リグノセリン酸	C 24:0	0.47 ± 0.11	0.48 ± 0.16
ドコサヘキサエン酸	C 22:6 n-3	4.29 ± 1.19	3.12 ± 0.75
ネルボン酸	C 24:1	1.14 ± 0.29	0.91 ± 0.35

表6. 24ヶ月後の赤血球膜中リン脂質脂肪酸組成 (Area%)

脂肪酸	化学式	Group	
		対照群 (n=13)	EPA服用群 (n=13)
ラウリン酸	C 12:0	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.04
ミリスチン酸	C 14:0	0.30 ± 0.06	0.34 ± 0.11
ミリストレイン酸	C 14:1 n-5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01
パルミチン酸	C 16:0	26.58 ± 1.11	26.80 ± 0.78
パルミトレイン酸	C 16:1 n-7	0.36 ± 0.17	0.48 ± 0.28
ステアリン酸	C 18:0	12.44 ± 0.57	12.41 ± 1.29
オレイン酸	C 18:1 n-9	14.30 ± 0.72	14.82 ± 1.02
リノール酸	C 18:2 n-6	10.29 ± 1.16	9.11 ± 0.87
γ-リノレン酸	C 18:3 n-6	0.15 ± 0.29	0.38 ± 0.39
α-リノレン酸	C 18:3 n-3	0.17 ± 0.03	0.19 ± 0.04
アラキジン酸	C 20:0	0.35 ± 0.05	0.36 ± 0.04
11-エイコセン酸	C 20:1 n-9	0.21 ± 0.03	0.17 ± 0.04
エイコサジエン酸	C 20:2 n-6	0.25 ± 0.09	0.29 ± 0.15
5,8,11-エイコサトリエン酸	C 20:3 n-9	感度未満	感度未満
ジホモ-γ-リノレン酸	C 20:3 n-6	0.87 ± 0.16	0.73 ± 0.17
アラキドン酸	C 20:4 n-6	9.31 ± 1.09	6.90 ± 1.16
エイコサペンタエン酸	C 20:5 n-3	1.99 ± 1.11	5.14 ± 1.24
ベヘン酸	C 22:0	1.50 ± 0.24	1.50 ± 0.19
エルシン酸	C 22:1 n-9	0.02 ± 0.04	0.00 ± 0.00
ドコサテトラエン酸	C 22:4 n-6	1.28 ± 0.37	0.72 ± 0.15
ドコサペンタエン酸	C 22:5 n-3	1.95 ± 0.38	4.01 ± 0.87
リグノセリン酸	C 24:0	4.36 ± 0.49	4.42 ± 0.53
ドコサヘキサエン酸	C 22:6 n-3	6.54 ± 1.14	5.02 ± 1.29
ネルボン酸	C 24:1	4.73 ± 0.58	4.24 ± 0.53

図1. 血漿総脂質中の EPA (mol%) の変化

研究を終了し(24ヶ月)、血漿総脂質脂肪酸測定を終えた12名(対照5名、EPA群7名)で検討。

分散分析表 : 血漿中のEPAの変動

群	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
対象(群)	1	77.232	77.232	26.060	.0005	26.060	.998
カテゴリー 血漿中のEPAの変動	10	29.636	2.964				
カテゴリー 血漿中のEPAの変動 * 群	2	61.056	30.528	33.634	<.0001	67.269	1.000
カテゴリー 血漿中のEPAの変動 * 対象(群)	2	46.143	23.072	25.419	<.0001	50.838	1.000
	20	18.153	.908				

基本統計量 : 血漿中のEPAの変動

効果 : カテゴリー 血漿中のEPAの変動 * 群

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
EPA, 血漿EPA 0ヶ月目	7	1.566	.539	.204
EPA, 血漿EPA 6ヶ月目	7	6.640	1.698	.642
EPA, 血漿EPA 24ヶ月目	7	6.877	1.566	.592
対照, 血漿EPA 0ヶ月目	5	1.828	1.142	.511
対照, 血漿EPA 6ヶ月目	5	1.788	.804	.360
対照, 血漿EPA 24ヶ月目	5	2.554	1.247	.558

交互作用折れ線グラフ : 血漿中のEPAの変動

効果 : カテゴリー 血漿中のEPAの変動 * 群

エラーバー : ± 1 標準偏差

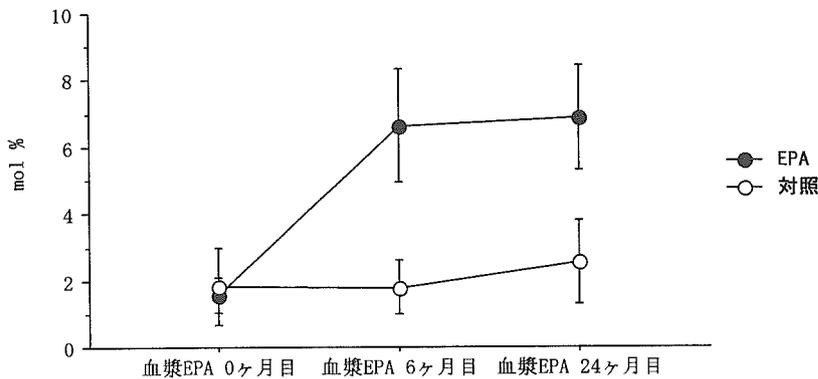


図 2. 赤血球膜リン脂質中の EPA (Area%) の変化

研究を終了し (24ヶ月)、血漿総脂質脂肪酸測定を終えた 26名 (対
照 13名、EPA群 13名) で検討。

分散分析表 : 赤血球膜中のEPAの変動

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
群	1	103.546	103.546	44.682	<.0001	44.682	1.000
対象 (群)	24	55.618	2.317				
カテゴリー 赤血球膜中のEPAの変動	2	61.040	30.520	43.577	<.0001	87.153	1.000
カテゴリー 赤血球膜中のEPAの変動 * 群	2	64.555	32.278	46.086	<.0001	92.171	1.000
カテゴリー 赤血球膜中のEPAの変動 * 対象 (群)	48	33.618	.700				

基本統計量 : 赤血球膜中のEPAの変動

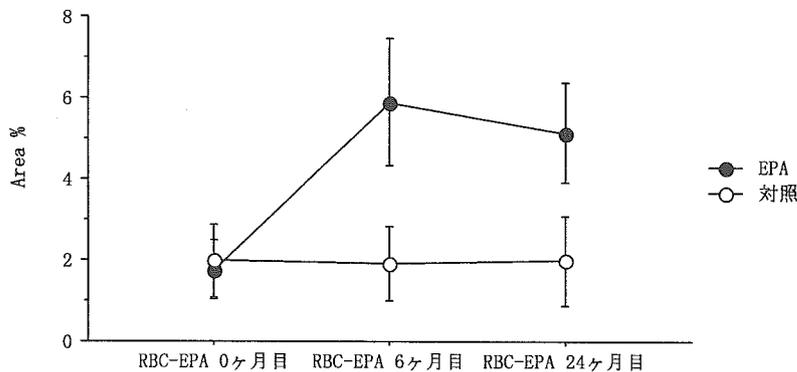
効果 : カテゴリー 赤血球膜中のEPAの変動 * 群

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
EPA, RBC-EPA 0ヶ月目	13	1.761	.736	.204
EPA, RBC-EPA 6ヶ月目	13	5.883	1.561	.433
EPA, RBC-EPA 24ヶ月目	13	5.141	1.241	.344
対照, RBC-EPA 0ヶ月目	13	1.985	.911	.253
対照, RBC-EPA 6ヶ月目	13	1.900	.921	.255
対照, RBC-EPA 24ヶ月目	13	1.987	1.113	.309

交互作用折れ線グラフ : 赤血球膜中のEPAの変動

効果 : カテゴリー 赤血球膜中のEPAの変動 * 群

エラーバー : ± 1 標準偏差



「嚢胞腎患者における高分子アディポネクチンの測定」

研究協力者 東京慈恵会医科大学腎臓・高血圧内科 花岡一成

研究要旨

常染色体優性多発性嚢胞腎（PKD）では腎障害の進行の程度に比較して高血圧や動脈硬化の進行が顕著である。今回の検討では動脈硬化の促進因子と考えられるアディポサイトカインや血管の慢性炎症がPKDの動脈促進因子となっているかを調べるため、保存期腎不全患者をPKD患者と非PKD患者に分けて評価を行った。結果は両群に違いはなく、動脈硬化促進因子として内皮機能検査等を検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

脂肪組織の分泌するアディポサイトカインは糖尿病、高脂血症、動脈硬化症の誘因および増悪因子である。慢性腎不全（CRF）では、動脈での慢性炎症が、腎機能障害の進行に伴う全身の代謝異常の原因と考えられ、アディポサイトカインの関与が示唆されている。

血管病変や高血圧の合併の多い嚢胞腎患者（PKD）において抗動脈硬化因子 adiponectin（AN）および高分子 adiponectin（HAN）を測定し、腎障害との関連を検討した。

B. 研究方法

当院受診中の Stage1～4 期腎疾患患者 38 名（男 25 名・女 13 名、平均 CCr 65.5ml/min）について血清 AN、HAN

濃度、血清 Cr 濃度、24 時間蓄尿による CCr、高感度 CRP 測定を行った。疾患別では PKD 患者 19 名（PKD 群）、非 PKD 患者 19 名（非 PKD 群：糖尿病性腎症、慢性糸球体腎炎、腎硬化症、SLE）。

（研究の倫理面への配慮）

本研究で施行している検査は、腎不全診療の中で日常検査として施行されている項目として腎機能、貧血検査を行い、同時に患者の同意を得てアディポサイトカインの採血を追加し検討した。個人のプライバシー保護については十分に留意し、検査項目については日常診療のなかで説明を行った。さらに、学会発表の際には、個人情報は削除した。

C. 結果

血清 AN 濃度 ($\mu\text{g/ml}$) は PKD 群 15.78 ± 2.09 、非 PKD 群 16.49 ± 3.16 。血清 HAN 濃度 ($\mu\text{g/ml}$) はそれぞれ 9.99 ± 1.75 、 9.98 ± 1.96 で、AN、HAN と両群間に有意差を認めなかった ($p > 0.05$)。血清 Cr 値上昇に伴い血清 AN 濃度、血清 AN 濃度の上昇傾向を認めた。血清 AN 濃度-HAN 濃度には両群とも強い正の相関を認めた。また AN に対する HAN 濃度比 (%HAN) は、今回の検討では腎障害とは関連しなかった。

PKD 群については腎障害時に AN、HAN の上昇傾向を認め、CCr と AN の間に有意な負の相関を認める。しかし今回の検討では、他疾患に比較し有意に AN、HAN が上昇してはいない事がわかった。また両群ともに CCr と CRP の間には相関関係を認めなかった。

D. 考察

ADPKD 患者の血管内皮機能検査や PKD1 ノックアウトマウスを使った実験により、PKD では血管内皮の反応が低下していることが近年報告され、早期より動脈硬化、高血圧の進行する原因と考えられている。高血圧や動脈硬化が顕性化してくる保存期慢性腎不全において動脈硬化の進行に血管の慢性炎症や血中アディポサイトカインの関与が報告されているため、これらの指標が保存期慢性腎不全において非 PKD 群との間に相違があることを予測して検討を行なった。しかし今

回測定した AN、HAN、高感度 CRP は PKD 群、非 PKD 群の間に統計学的な有意差を認めず、保存期腎不全における PKD の血管障害、動脈硬化の進展を評価するパラメーターとしては不十分であった。今後は血管反応性の機能検査などを含めた幅広い検査を施行し、PKD 患者の動脈硬化を詳しく評価した上で、腎障害への関与を検討する必要があると考えられる。

E. 結論

PKD 群では腎障害時に AN、HAN の上昇を認めるが、他疾患に比較し有意ではなく、今回の検討からは、AN、HAN 依存性に動脈硬化促進、血管病変の進行が起こっているとは言えない。また %HAN と腎障害時の血管病変の関連については更なる検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 知的所有権の出現登録状況

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

花岡一成、川口良人、小坂直之、岡田秀雄、丹野有道、柳沼樹宏、清水昭博、岡田和久、細谷龍男。 嚢胞腎患者における高分子アディポネクチンの測

定. 第 48 回日本腎臓学会学術総会.
2005 年

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
各個研究報告書

「ADPKDにおけるイコサペント酸の脈波伝播速度に対する影響」

研究協力者

帝京大学医学部泌尿器科教授 堀江重郎
帝京大学医学部泌尿器科講師 武藤 智
帝京大学医学部泌尿器科助教授 岡田 弘

研究要旨

【方法】ADPKD患者11例をEPA投与群（2400mg）とし投与前後で、足関節／上腕血圧比（ankle brachial index：ABI）、脈波伝播速度（pulse wave velocity：PWV）、腎容積を比較した。また非投与群との比較も行った。【結果】投与群は男性5例、女性6例、平均年齢50.2歳、平均投与期間は12.0ヶ月、非投与群は43例（男性18例、女性25例、平均年齢50.0歳）であった。両群の腎機能に有意な差は認めなかった（Ccr：投与群 89.0 ± 49.8 ml/min、非投与群 88.2 ± 41.6 ml/min、 $P=0.8791$ ）。ABIは投与前後で有意に低下したが（ 1.20 ± 0.07 ml vs 1.14 ± 0.07 ml/min、 $P<0.05$ ）、PWVは有意な変化を認めなかった（ 1607.05 ± 485.58 ml vs 1594.71 ± 420.177 ml/min、 $P=0.9529$ ）。腎容積はEPA投与前後で差を認めなかった（前 2891.2 ± 1793.5 ml vs 後 2615.4 ± 986.4 ml/min、 $P=0.2162$ ）。【結語】ADPKD患者に対するEPA投与はABIを改善することから、その有用性が示された。

A. 研究目的

大豆蛋白投与がADPKDの動物モデルにおいて嚢胞形成を抑制することが知られ、 $\omega 3$ 不飽和脂肪酸によると考えられている。われわれは $\omega 3$ 不飽和脂肪酸であるイコサペント酸（エパデールTM：EPA）がADPKD患者の血管内皮機能に対する影響を検討するために、EPA投与における脈波伝播速度に与える影響を検討した。

B. 研究方法

ADPKD患者11例（男性5例、女性6例、平均年齢50.2歳）を投与群、43例（男性18例、女性25例、平均年齢50.0歳）を非投与群とした。投与群に対してはEPA2400mgを 12.0 ± 5.7 ヶ月投与した。form PWV/ABI（日本コーリン社製）を用いて、投与前後での四肢血圧、足関節／上腕血圧比（ankle brachial index：ABI）、空気容積脈波法により脈波伝播速度（pulse wave velocity：

PWV=脈波伝播距離／脈波伝播時間)の測定を行った。クレアチニンクリアランス (Ccr)、MRIを用いて腎容積も投与前後で測定した。

C. 結果

投与群と非投与群の腎機能 (Ccr) に有意な差を認めなかった ($89.0 \pm 49.8 \text{ ml/min}$ vs $88.2 \pm 41.6 \text{ ml/min}$ 、 $P=0.8791$)。ABI、PWV とともに投与群と非投与群との間に有意差は認めなかった (ABI: 1.20 ± 0.07 vs 1.16 ± 0.06 、 $p=0.0767$ 、PWV: 1607.1 ± 485.6 vs $1412.9 \pm 313.4 \text{ cm/s}$ 、 $p=0.2200$) (Fig.1,2)。投与前後の比較ではPWVは有意差を示さなかったが (1607.1 ± 485.6 vs $1594.7 \pm 420.2 \text{ cm/s}$ 、 $p=0.9529$) (Fig.1)、ABIは有意な減少を認めた (1.20 ± 0.07 vs 1.14 ± 0.07 、 $p=0.0475$) (Fig.2)。投与前後で腎容積の有意な差を認めなかった (2891.2 ± 1793.5 vs $2754.5 \pm 2095.3 \text{ cm}^3$ 、 $p=0.8753$) (Fig.3)。

D. 考察

35歳以前に高血圧を指摘されたADPKD患者は、正常血圧あるいは35歳以後に高血圧と診断された患者よりも腎機能の予後が悪い (J Am Soc Nephrol. 1997;8:1560-7)。またADPKDの患者の血管造影から、腎において異常血管新生がおこることも知られている (Fig.4)。そしてADPKD患者ではeNOSの多型により、末期腎不全にいたる予後が有意に異なることも報告

されている (Fig.5)。

われわれは昨年度の本報告で、ADPKD患者におけるPWVとCcr、腎容積に相関が示されたことから、血管内皮機能と腎不全の進行との関連が示唆されことを報告した。大豆蛋白投与がADPKDの動物モデルにおいて嚢胞形成を抑制することが知られ、 $\omega 3$ 不飽和脂肪酸によると考えられている。今回の結果から $\omega 3$ 不飽和脂肪酸の嚢胞抑制作用と血管内皮機能の関連が示唆された。

E. 結論

EPA投与によりADPKD患者のABIが有意に改善したことから、ADPKD患者の血管内皮機能に対する $\omega 3$ 不飽和脂肪酸の関与が示唆された。

F. 健康危険情報：特に無し

G. 知的所有権の出現登録状況：特に無し

H. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

武藤 智、西尾浩二郎、斉藤恵介、吉井 隆、芦沢好夫、栗原浩司、磯谷周二、上山 裕、狩野宗英、丸山 修、岡田 弘、堀江重郎：ADPKDにおける血管内皮と動脈硬化。日本泌尿器科学会総会。2005

Fig.1

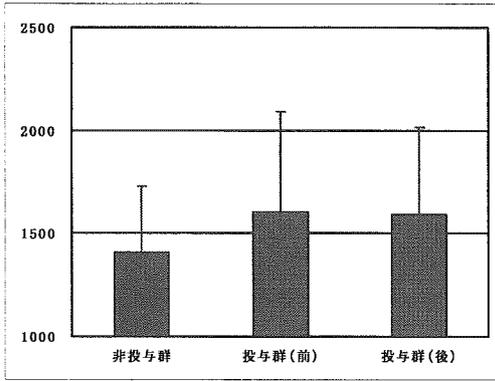


Fig.2

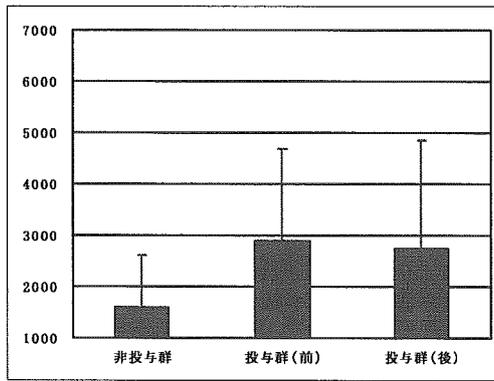


Fig.3

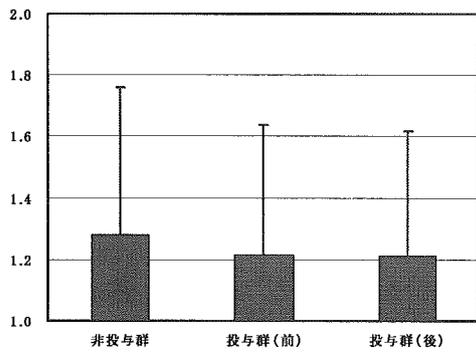


Fig.4

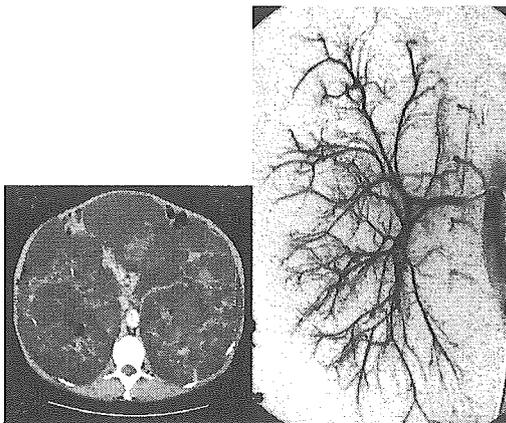
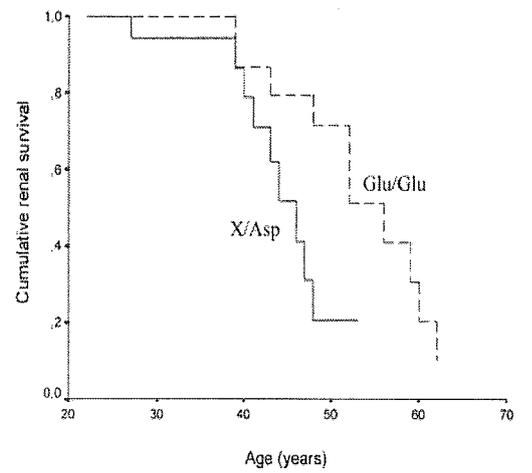


Fig.5



遺伝子操作動物による進行性腎障害
疾病モデル開発に関する研究班
分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
進行性腎障害に関する調査研究
遺伝子操作動物による進行性腎障害疾病モデル開発に関する研究班
分担研究報告書

「遺伝子操作動物による進行性腎障害疾病モデル開発に関する研究」

分担研究者 林松彦 慶応義塾大学医学部内科学・助教授
研究協力者 佐々木成 東京医科歯科大学医学部腎臓内科・教授
下田耕二 慶応義塾大学医学部実験動物センター・専任講師

研究要旨

組織特異的に遺伝子発現をコントロールする仕組みとして、Cre-loxPシステムを用いて腎疾患に重要と考えられる遺伝子を特定のネフロンに過剰発現したマウスを作製し、腎疾患の研究のためのモデルマウスを作製することを目的とする。近位尿細管特異的なCreマウスとして、AQP7-Creマウスを作製するとともに、Cre recombinase存在下で特定の遺伝子を過剰に発現する、LoxP-hMR、LoxP-LIF、LoxP-IkBANの3系統のトランスジェニックマウス（LoxP-マウス）を作製した。CreマウスとLoxPマウスを様々に組み合わせることにより、特定の細胞集団に特定の遺伝子を過剰発現するモデルマウスの作製が可能となる。

A. 研究目的

モデル動物作製において、遺伝子操作動物であるトランスジェニックマウス、ノックアウトマウスはきわめて有効な手法である。しかし、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスでは遺伝子改変がすべての体細胞でおこるため、目的臓器や細胞以外の遺伝子改変の影響を受けたり、遺伝子の過剰発現または欠損によって胎生致死となり目的の動物を得られないという欠点があった。このような欠点を克服する目的で、組織特異的に遺伝子発現をコントロールする仕組み

として、Cre-loxPシステムが近年脚光を浴びている。Cre-LoxPシステムについて簡単に説明する。まず、特定の細胞集団に特異的に発現する遺伝子のプロモーターを利用することで、特定の細胞にCre recombinaseを発現するCreマウスを作製する。Cre recombinaseは2つの並んだLoxP配列を認識して切り出す。次に、相同組み換えによって特定の遺伝子の両端にLoxP配列を2つ挿入したマウス、または、特定の遺伝子の上流に2つのLoxP配列に挟まれたStopコドンを入れたトランスジェニックを導入されたトランスジェニ

ックマウス (LoxP マウス) を作製する。Cre マウスと LoxP マウスを交配すると、Cre recombinase を発現している細胞でのみ遺伝子のノックアウトまたは過剰発現を起こすことが可能である。

Cre-LoxP システムを用いて、腎臓の各ネフロン特異的に特定の遺伝子を過剰発現させたマウスを作製することにより、腎疾患の発症、進行を検討し、創薬対象としての可能性を検証するとともに、各因子の役割を確定する。さらに、疾患の進行を促進させることにより、新規治療薬の有用性を短期間で明らかとすることを可能とするようなモデル動物作製を目的とする。具体的には尿細管セグメント特異的な Cre マウスを作製するとともに、これまで我々が腎疾患で重要であることを見いだしてきた LIF、MR、I κ B タンパク (またはそのドミナントネガティブ体) の LoxP マウスを作製し、両者を様々な組み合わせで交配することでモデルマウスを作製する。

B. 研究方法

1. AQP7-Cre マウスの作製

近位尿細管特異的な Cre マウスを作製するために、近位尿細管特異的な遺伝子発現を認める Aquaporin-7(AQP7) に注目し、AQP7-Cre マウスの作製を行った。AQP7 は近位尿細管の中でも、虚血の影響を受けやすく、尿細管の再生現象がもっとも観察される S3 セグメントに特異的に発現している。マウスゲノム DNA 鋳型として、AQP7 遺

伝子のプロモーター5.7kbp を PCR で増幅し、塩基配列を確認した。AQP7 プロモーターの下流に rabbit beta-globin のイントロン、核移行シグナルのついた Cre recombinase cDNA、SV40 由来の polyA シグナルをつなげたものをトランスジーンのコストラクトとした。KpnI で切断してベクター配列を取り除いた後、C57BL/6 x C3H/He の受精卵の前核にマイクロインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジーンの確認は tail DNA を PCR することで確認した。

2. LoxP-I κ B Δ N マウスの作製

LoxP-I κ B Δ N は Cre 存在下に I κ B のドミナントネガティブ体を過剰発現するトランスジェニックマウスである。NF κ B は、一般には p65、p50、I κ B の三種のタンパク質が形成する三量体をさすが、この三量体はサイトカインあるいは free radical などの刺激が加わると、まず I κ B がリン酸化され、遊離する。この I κ B が引き続きユビキチン化を受け、代謝酵素により分解される。一方、p65、p50 は遊離して核内に移行し、転写領域にある NF κ B コンセンサス配列に結合して転写促進を行う。I κ B Δ N は I κ B の N 末端 54 アミノ酸を欠いた変異体であり、リン酸化を受けないために、p65、p50 は遊離できない。したがって、I κ B Δ N を過剰発現すると、NF κ B 活性化を完全に抑制できるとことを我々は示している (Takase ら、Kidney Int. 2003;63:501-13)。また、アデノウイルスによる I κ B Δ N の遺伝子

導入が尿細管間質病変を抑制することを示している。

東京大学医科学研究所齊藤泉教授より分与された pCALNL5 ベクターを用いることで、CAG プロモーター-LoxP-neo-LoxP-I κ B Δ NcDNA というコンストラクトを作製した。本コンストラクトでは、Cre recombinase 非存在下では、CAG プロモーターにより neo が発現するが、Cre recombinase 存在下では、LoxP には含まれた neo が切り出され、CAG プロモーターにより I κ B Δ N が発現する。本コンストラクトを SalI-HindIII で切断し、ベクター配列を取り除いた後、C57BL/6 x C3H/He の受精卵の前核にマイクロインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックマウスの確認は tail DNA を PCR することで確認した。

3. LoxP-LIF マウスの作製

LoxP-LIF は Cre 存在下に LIF (Leukemia Inhibitory Factor) を過剰発現するトランスジェニックマウスである。我々は、虚血再灌流モデルにおいて、近位尿細管 S3 セグメントに LIF が発現し、尿細管の再生を促進していることを報告した (Yoshino ら、J Am Soc Nephrol. 2003;14:3090-101)。

マウス胎児腎臓の RNA より PCR によって得た LIF cDNA を pCALNL5 ベクターに挿入することで、CAG プロモーター-LoxP-neo-LoxP-LIF cDNA というコンストラクトを作製した。本コンストラクトでは、Cre recombinase 非存在下では、CAG プロモーターにより

neo が発現するが、Cre recombinase 存在下では、LoxP には含まれた neo が切り出され、CAG プロモーターにより LIF が発現する。本コンストラクトを SalI-HindIII で切断し、ベクター配列を取り除いた後、C57BL/6 x C3H/He の受精卵の前核にマイクロインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックマウスの確認は tail DNA を PCR することで確認した。

4. LoxP-hMR マウスの作製

LoxP-hMR は Cre 存在下にヒト Mineralocorticoid Receptor (MR) を過剰発現するトランスジェニックマウスである。ヒト MR cDNA (Salk 研究所 Evans 博士より分与) を pCALNL5 ベクターに挿入することで、CAG プロモーター-LoxP-neo-LoxP-hMR cDNA というコンストラクトを作製した。本コンストラクトでは、Cre recombinase 非存在下では、CAG プロモーターにより neo が発現するが、Cre recombinase 存在下では、LoxP には含まれた neo が切り出され、CAG プロモーターにより human MR が発現する。本コンストラクトを SalI-HindIII で切断し、ベクター配列を取り除いた後、C57BL/6 x C3H/He の受精卵の前核にマイクロインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックマウスの確認は tail DNA を PCR することで確認した。

(研究の倫理面への配慮)

細胞・動物実験に関しては、倫理面の問題は生じないが、動物愛護上の問題

はあり、Helsinki 宣言を遵守し、慶應義塾大学動物実験指針に則って研究を行った。

C. 結果

AQP7-Cre マウスは現在、15 ラインのファウンダーが生まれており、今後、Cre recombinase の発現の特異性検討をおこなう。

また、糸球体内皮細胞および尿細管周囲間質血管内皮細胞に Cre recombinase を発現する Tie2-Cre マウスをテキサス大学の柳沢教授、ジョージア医科大学の Koni 準教授より分与を受け、慶應義塾大学医学部動物実験センター下田講師が系統維持をおこなっている。また、糸球体上皮細胞特異的な Cre 発現マウスとして、東海大学松阪泰二助教授より Nphs1-Cre マウス（ネフリンプロモーター下に Cre recombinase を発現するマウス）の分与を受けることが決まっております。現在、受け入れ準備中である。

一方、これらの Cre マウスと交配すべく、LoxP-hMR、LoxP-LIF、LoxP-IκBΔN の3系統のトランスジェニックマウスを作製した。LoxP-hMR は Cre 存在下にヒトミネラルコルチコイド受容体を過剰発現するマウス、LoxP-LIF は Cre 存在下に Leukemia Inhibitory Factor を過剰発現するマウス、LoxP-IκBΔN は Cre 存在下に IκB のドミナントネガティブ体を過剰発現するマウスである。現在、LoxP-hMR は 10 ライン、LoxP-LIF は 5 ライン、LoxP-IκBΔN は 9 ラインのファウンダ

ーが生まれており、適当な Cre マウスと交配することによって実際に LoxP を切り出されるか確認し、それぞれ数ラインに絞って検討を進めていく予定である。

D. 考察

作製した4系統のトランスジェニックマウスはいずれも十分なライン数のファウンダーを得ており、これらの中から、実際に今後の研究に使用できる適切なラインを同定していく。その後、Cre マウスと LoxP マウスの交配を行い、モデル動物の作製をおこなう。

時間的なコントロールを行うための手段としては、現在、エストロゲン受容体を用いた Cre-ER システムや Tetracyclin transactivator を用いた Tet システムがある。他臓器での使用例の多い Cre-ER システムを利用すべく、開発元のストラスブール大学の Metzger 教授に共同研究を申し込んでいる。AQP7-Cre を時間特異的なシステムに改変するとともに、すでに、プロモーターの組織特異性が十分に検討されている KAP (S1 から S3 までのすべての近位尿細管に発現する) および Ksp-Cadherin (遠位系尿細管に発現する) を用いて、尿細管のほぼ全域にわたって、空間的、時間的に発現をコントロールする仕組みを構築する予定である。

E. 結論

Cre-LoxP システムを用いたトランス

ジェニックマウスとして、AQP7-Cre、LoxP-I κ B Δ N、LoxP-LIF、LoxP-MR を作製し、ファウンダーマウスを得た。この中から、実験に用いるためのラインを数ラインに絞り込み、交配によりモデルマウスの作製を行う。

F. 健康危険情報

本研究はヒトを対象とした検討を行っていないので、該当する情報はない。

G. 知的所有権の出現登録状況

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuji M, Monkawa T, Yoshino J, Asai M, Fukuda S, Kawachi H, Shimizu F, Hayashi M, Saruta T. Microarray analysis of a reversible model and an irreversible model of anti-Thy-1 nephritis. *Kidney Int.* in press.
2. Araki T, Hayashi M, Saruta T. Anion-exchange blocker enhances cytoplasmic vacuole formation and cell death in serum-deprived mouse kidney epithelial cells in mice. *Cell Biol Int.* 2006; 30(1): 93-100.
3. Kato Y, Ohno Y, Hayashi M, Suzawa T, Shibagaki K, Sasaki T, Saruta T. Divergent effects of unilateral and subtotal nephrectomy on insulin sensitivity in rats. *Ren Fail.* 2005; 27(4):451-7.
4. Yamauchi K, Yang SS, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Apical localization of renal K channel was not altered in mutant WNK4 transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 332(3): 750-5.
5. Takase O, Marumo T, Imai N, Hirahashi J, Takayanagi A, Hishikawa K, Hayashi M, Shimizu N, Fujita T, Saruta T. NF- κ B-dependent increase in intrarenal angiotensin II induced by proteinuria. *Kidney Int.* 2005; 68(2): 464-73.
6. Hara-Chikuma M, Sohara E, Rai T, Ikawa M, Okabe M, Sasaki S, Uchida S, Verkman AS. Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J Biol Chem.* 2005; 280 (16): 15493-6.
7. Hishikawa K, Marumo T, Miura S, Nakanishi A, Matsuzaki Y, Shibata K, Ichianagi T, Kohike H, Komori T, Takahashi I, Takase O, Imai N, Yoshikawa M, Inowa T, Hayashi M, Nakaki T, Nakauchi H, Okano H, Fujita T. Musculin/MyoR is expressed in kidney side population cells and can regulate their function. *J Cell Biol.* 2005; 169(6): 921-928.
8. Sohara E, Rai T, Miyazaki J, Verkman AS, Sasaki S, Uchida S. Defective water and glycerol

- transport in the proximal tubules of AQP7 knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289(6): F1195-200
9. Uchimura H, Marumo T, Takase O, Kawachi H, Shimizu F, Hayashi M, Saruta T, Hishikawa K, Fujita T. Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16(4): 997-1004.
 10. Morii T, Ohno Y, Hirose H, Kawabe H, Ogata T, Hirao K, Eguchi T, Maruyama T, Kanno Y, Hayashi M, Saito I, Saruta T. Cellular insulin resistance in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblasts from young insulin-resistant Japanese men. *Metabolism.* 2005; 54(3): 370-5.
2. 学会発表
1. 市原淳弘、金城 雪、武光智子、迫田万里代、鈴木文昭、中川 寅、岩田英之、西山 成、稻上 正、猿田享男、林 松彦、「高血圧性腎硬化における receptor associated prorenin system」第 48 回日本腎臓学会総会、2005 年 6 月
 2. 今井直彦、菱川慶一、松崎有未、丸茂丈史、林 松彦、岡野榮之、藤田敏郎、「HDAC 阻害薬によるクロマチン修飾は組織幹細胞における BMP7 発現を介して慢性腎炎進展を抑制する」第 48 回日本腎臓学会総会、横浜、2005 年
 3. 辻美保子、門川俊明、吉野 純、河内 裕、清水不二雄、林 松彦、猿田享男、「尿細管間質障害におけるマクロファージの活性化と Thymosin β 4」第 48 回日本腎臓学会総会、2005 年
 4. 吉野 純、門川俊明、辻美保子、林 松彦、猿田享男、「尿細管上皮間葉形質転換における転写制御因子 slug の役割」第 48 回日本腎臓学会総会、2005 年
 5. 平尾圭一、丸山達也、大野洋一、広瀬 寛、島田 朗、武井 泉、村田 満、森居俊行、江口 高、林 松彦、猿田享男、「NADPH oxidase の糖尿病性腎症への関与」第 48 回日本腎臓学会総会、2005 年
 6. Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Suzuki F, Nakagawa T, Nishiyama A, Iwata H, Ishida Y, Inagami T, Saruta T, Hayashi M. "Receptor-associated prorenin system contributes to hypertensive end-organ damage." The 15th European Meeting on Hypertension, 2005
 7. Hirao K, Maruyama T, Ohno Y, Hirose H, Shimada A, Takei I, Murata M, Morii T, Eguchi T, Hayashi M, Saruta T. "Implication of antibodies to oxidized

- low-density lipoprotein in hypertension with diabetes mellitus." The 15th European Meeting on Hypertension, June 2005
8. Eguchi T, Ohno Y, Maruyama T, Hirao K, Morii T, Hirose H, Hayashi M, Kawabe H, Saito I, Saruta T. "Association of insulin resistance, abnormalities in tumor necrosis factor network and TNF receptor 2 gene polymorphism with essential hypertension." The 15th European Meeting on Hypertension, 2005
 9. Tsuji M, Monkawa T, Yoshino J, Hayashi M, Saruta T. "The role of thymosin β 4 in renal fibrosis." The 3rd World Congress of Nephrology, 2005
 10. 金城 雪、市原淳弘、武光智子、迫田万里代、中川 寅、鈴木文昭、西山 成、猿田享男、林 松彦、「食塩が腎プロレニン受容体発現に及ぼす影響」第 78 回日本内分泌学会総会、2005 年
 11. 市原淳弘、金城 雪、武光智子、迫田万里代、鈴木文昭、中川 寅、岩田英之、西山 成、稲上 正、猿田享男、林 松彦、「高血圧性心肥大における receptor-associated prorenin system と組織レニン・アンジオテンシン系活性化」第 78 回日本内分泌学会総会、2005 年
 12. 市原淳弘、金城 雪、武光智子、迫田万里代、本間康一郎、猿田享男、林 松彦、「レニン・アンジオテンシン系の抑制が末期腎不全血液透析患者の血清脂質と動脈伝播速度におよぼす影響」第 37 回日本動脈硬化学会総会、2005 年
 13. 金城 雪、市原淳弘、武光智子、迫田万里代、鈴木文昭、中川 寅、稲上 正、林 松彦、「ヒトプロレニン受容体遺伝子トランスジェニックラットにおける腎皮質シクロオキシゲナーゼ 2 発現亢進」第 28 回日本高血圧学会総会、2005 年
 14. 武光智子、市原淳弘、金城 雪、迫田万里代、西山 武、鈴木文昭、中川 寅、稲上 正、林 松彦、「腎血管性高血圧モデルラットの非狭窄側腎におけるプロレニン受容体発現増加」第 28 回日本高血圧学会総会、2005 年
 15. 市原淳弘、金城 雪、武光智子、迫田万里代、鈴木文昭、中川 寅、岩田英之、西山 成、稲上 正、林 松彦、「高血圧性心臓器障害における受容体随伴プロレニン系の関与」第 28 回日本高血圧学会総会、2005 年
 16. Takemitsu T, Ichihara A, Kaneshiro Y, Sakoda M, Suzuki F, Nakagawa T, Nishiyama A, Inagami T, Hayashi M, "Involvement of "receptor associated prorenin system" in development of hypertensive renal damage." The 38th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2005
 17. Yamaji Y, Hayashi M, Nakazato Y,

- Ohkubo K, Tsuganezawa H,
“1 α ,25-dihydroxy-vitamin D
protects renal proximal tubular cells
from advanced glycation end
products and cytokines.” The 38th
Annual Meeting of the American
Society of Nephrology, 2005
18. “Expression and regulation of Snail
during tubular
epithelial-mesenchymal transition in
renal fibrosis.” Yoshino J,
Monkawa T, Tsuji M, Hayashi M,
Saruta T, The 38th Annual Meeting
of the American Society of
Nephrology, 2005
19. Tsuji M, Monkawa T, Yoshino J,
Kawachi H, Shimizu F, Hayashi M,
Saruta T, “Thymosin β 10 and β 4
are involved in renal fibrosis
through macrophage activation.”
The 38th Annual Meeting of the
American Society of Nephrology,
2005
20. Yoshino J, Monkawa T, Tsuji M,
Okano H, Hayashi M, Saruta T,
“Activation of signal transducer and
activator transcription-3 during
tubular regeneration in mice.” The
38th Annual Meeting of the
American Society of Nephrology,
2005
21. Kaneshiro Y, Ichihara A, Takemitsu
T, Sakoda M, Nishiyama A, Suzuki
F, Nakagawa T, Inagami T, Hayashi
M, “Transgenic rats overexpressing
the human prorenin receptor gene
develop glomerular sclerosis without
hypertension or diabetes.” The
38th Annual Meeting of the
American Society of Nephrology,
2005