

発表番号 48 (0532)

レプチンの腎臓作用の分子機構と病態生理的意義に関する研究

菅波 孝祥 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)
小川 佳宏 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)
田中 都 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)
笠原 正登 (神戸市立中央市民病院腎臓内科)

肥満、糖脂質代謝異常、高血圧などの動脈硬化症のリスクファクターが集積するメタボリックシンドロームは、心血管イベントのみならず腎疾患の増悪因子と報告されているが、その分子機構はほとんど明らかでない。レプチンは脂肪細胞から産生・分泌される代表的なアディポサイトカインであり、主に視床下部を介して摂食やエネルギー代謝調節に働くが、最近、レプチン受容体が末梢組織にも存在して多彩な生理作用を示すことが明らかになってきた。本研究では、一側尿管結紮 (unilateral ureteral obstruction; UUO) による腎尿細管間質障害モデルを用いて、レプチンの腎臓作用の分子機構と病態生理的意義の解明を試みた。

遺伝的にレプチンを欠損する *ob/ob* マウスおよび対照野生型マウスに対してUUOを作製し、14日目まで観察した。野生型マウスと比較して *ob/ob* マウスでは、UUO による腎盂の拡大、腎実質の菲薄化、尿細管上皮細胞の変性・脱落、間質の線維化などの組織学的変化が著しく抑制されていた。UUO 作製後、野生型マウスでは、腎における炎症性サイトカインやケモカイン

(MCP-1, M-CSF, RANTES)、マクロファージマーカー (F4/80, CCR2, CD68)、細胞外マトリックス関連 (TGF- β , 1型コラーゲン, fibronectin) 遺伝子の発現が経時的に増加したが、*ob/ob* マウスでは優位に抑制されていた。このような *ob/ob* マウスにおける腎保護効果や抗炎症性効果は、後天的にレプチンを投与することによりほぼ完全に消失した。さらに、レプチン受容体 long-form (Ob-Rb) を遺伝的に欠損する *db/db* マウスにおいても *ob/ob* マウスとほぼ同様の結果を得たことより、レプチン/Ob-Rb 系が重要な役割を果たすことが示唆された。

本研究により、腎尿細管間質障害において、レプチンの存在が炎症や線維化に関して促進的に作用することが明らかとなり、腎障害におけるレプチンの病態生理的意義が示唆された。今後、レプチンの作用部位や作用機序を明らかにすることにより、尿細管間質障害の分子機構の解明や新しい腎保護戦略の創出に寄与すると考えられる。レプチンによるNa再吸収作用についても、本研究で確立した系を用いて現在検討中である。

助成番号 0532

レプチンの腎臓作用の分子機構と病態生理的意義に関する研究

菅波 孝祥 (東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野)
 小川 佳宏 (東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野)
 田中 都 (東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野)
 笠原 正登 (神戸市立中央市民病院腎臓内科)

1. 研究目的

肥満、糖脂質代謝異常、高血圧などのリスクファクターを重複して有する場合には、動脈硬化症の前駆病態としてメタボリックシンドロームと呼ばれている。メタボリックシンドロームは、心血管イベントのみならず腎疾患の増悪因子と報告されているが¹⁾、その詳細や分子機構はほとんど明らかでない。一方、肥満、特に内臓脂肪型肥満はメタボリックシンドロームの診断基準の必須項目であることから、脂肪細胞の機能異常を明らかにすることはメタボリックシンドロームの病態生理を理解する上で大変重要であると考えられる。実際、脂肪細胞はエネルギーの貯蔵のみならず、アディポサイトカインと総称される生理活性物質を分泌する生体内最大の内分泌臓器であることが証明されている。レプチンは代表的なアディポサイトカインであり、主に視床下部を介して摂食やエネルギー代謝調節に働くが、最近、レプチン受容体が末梢組織にも存在して、多彩な生理作用を示すことが明らかになってきた。腎は、肺などと並び、レプチン受容体が比較的多く存在する臓器の一つとされているが²⁾、腎におけるレプチンの生理的、病態生理的意義はほとんど明らかでない。

腎においてレプチン受容体は、尿細管細胞やマクロファージ、血管内皮細胞などに発現することが知られている^{2,4)}。また、レプチンの生理作用として、交感神経系を介して、あるいは腎に直接作用して、血圧調節や Na 再吸収に関与することが知られている^{2,5)}。最近、我々は、全身の脂肪組織を消失する脂肪萎縮性糖尿病モデルマウスが、著しい糖脂質代謝異常とともに糖尿病性腎症に合致する腎病変を呈することを明らかにした⁶⁾。この時、脂肪萎縮性糖尿病モデルマウスとレプチン過剰発現トランスジェニックマウスを交配、あるいは脂肪萎縮性糖尿病モデルマウスに対してリコンビナントレプチンを持続投与することにより、糖脂質代謝異常の改善と並行して蛋白尿や細胞外マトリックスの過剰産生など腎病変の著明な改善を認めた⁶⁾。このように、レプチンは脂肪萎縮性糖尿病における腎障害の病態生理に深く関与することが証

明されたが、レプチンの効果が糖脂質代謝異常の改善を介する間接的なものか、腎構成細胞に対する直接的なものかに関しては未だ明らかでない。そこで本研究では、一側尿管結紮 (unilateral ureteral obstruction; UUO) による腎尿細管間質障害モデルを用いて、レプチンの腎臓作用の分子機構と病態生理的意義の解明を試みた。

2. 研究方法

2.1 動物

動物は 8 週齢雄性 *ob/ob* マウス、*db/db* マウスおよび各々の対照野生型マウス (C57BL/6J, C57BL/Ksj) を用いた (日本チャールス・リバー)。*ob/ob* マウスはレプチンを、*db/db* マウスはレプチン受容体を遺伝的に欠損するため、著しい過食や肥満を呈することが知られている^{7,8)}。

2.2 UUO

ob/ob マウス、*db/db* マウスおよび各々の対照野生型マウスに対して、UUO を施行して腎尿細管間質障害モデルを作製した。UUO は定法に従い、右腎下極レベルで尿管を結紮および切離して作製した。経時的に腎のサンプリングを行い、14 日目まで観察した。

2.3 遺伝子発現

real-time RT-PCR 法により、サイトカイン・ケモカイン (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), regulated on activation normal T cells expressed and secreted (RANTES))、マクロファージマーカー (F4/80, CC chemokines receptor 2 (CCR2), CD68)、線維化関連 (transforming growth factor- β (TGF- β), fibronectin, type 1 collagen α 1 chain (COL1A1)) の遺伝子発現を経時的に評価した。

2.4 組織学的解析

Periodic acid-Schiff (PAS) 染色にて腎組織構築を、Masson's Trichrome 染色にて腎線維化を、F4/80 免疫染色にてマクロファージの浸潤を評価した。

2.5 レプチン持続投与

ob/ob マウスに対して、浸透圧ポンプを用いてマウスリコンビナントレプチン 0.4 μg/g 体重/日を持続皮下投与し、UUO による腎障害に及ぼす影響を検討した。すなわち、レプチン投与開始後3日目にUUOを施行し、さらに7日間あるいは14日間観察後にサンプリングを行った。対照として、phosphate buffered saline (PBS) 投与群を用いた。

3. 研究結果

3.1 *ob/ob* マウスにおける腎障害の軽減

3.1.1 腎組織重量と腎外観像 (Fig. 1)

UUO 施行後14日目において、*ob/ob* マウスは対照野生型マウスと比較して、有意の体重増加および血糖値の上昇を認めた。野生型マウスでは、UUO 側の尿管および腎盂が著明に拡大するとともに腎実質の菲薄化が認められたが、*ob/ob* マウスでは尿管の拡大に関しては野生型マウスと同等以上に認めたものの、腎盂や腎実質の

変化は軽度であった。実際、腎組織重量を測定したところ、野生型マウスでは UUO 側重量の低下を認めたのに対し、*ob/ob* マウスでは腎組織重量の低下が抑制される傾向にあった。

3.1.2 腎組織像 (Fig. 2)

次に、UUO 施行後14日目の腎組織像を検討した。UUO 作製により、野生型マウスでは、腎実質の菲薄化とともに尿細管腔の拡大や尿細管上皮細胞の壊死・脱落などの著しい障害を認めたのに対し、*ob/ob* マウスでは障害が軽度に抑えられていた。また、Masson's Trichrome 染色において、*ob/ob* マウスでは野生型マウスと比較して腎間質領域の線維化が明らかに抑制されていた。なお、対側腎に関しては、*ob/ob* マウスと野生型マウスの間に明らかな差を認めなかった。このように、*ob/ob* マウスでは、野生型マウスと比較して、UUO による腎尿細管間質障害が有意に軽減していることが明らかとなった。

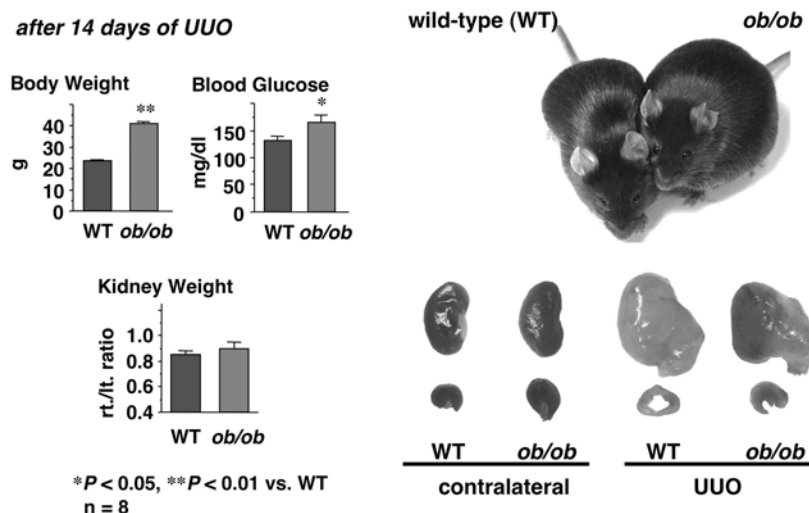


Fig. 1. Gross appearance and kidney weight of *ob/ob* and WT mice

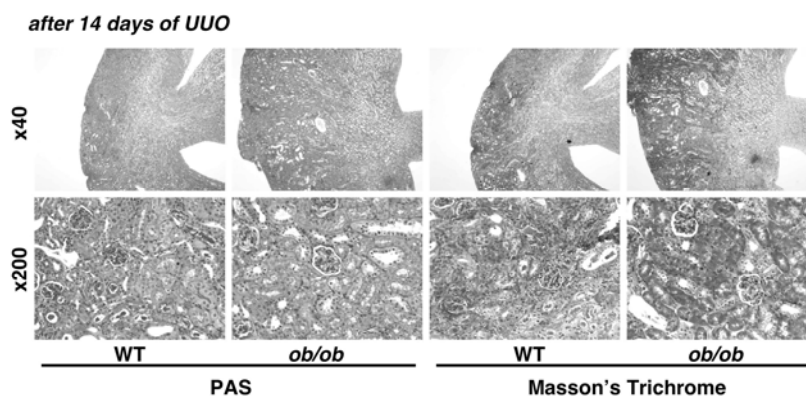


Fig. 2. Renal histology of *ob/ob* and WT mice

3. 1. 3 遺伝子発現の変化(Fig. 3)

この分子機構を明らかにする目的で、UUO による腎尿細管間質障害の機序として重要であることが証明されている以下の各ステップに関して、遺伝子発現変化を検討した。すなわち、腎局所におけるサイトカイン・ケモカイン産生(MCP-1, M-CSF, RANTES)、マクロファージ浸潤(F4/80, CCR2, CD68)、細胞外マトリックス産生(COL1A1, fibronectin, TGF- β)に関連する遺伝子発現を経時的に評価した。すると、*ob/ob* マウスでは野生型マウスと比較して、これらすべての項目に関して発現誘導が有意に抑制されていた。

3. 1. 4 マクロファージ染色(Fig. 4)

さらに、マクロファージの浸潤を F4/80 免疫染色により経時的に観察した。遺伝子発現と同様に、野生型マウスでは腎間質領域における F4/80 陽性細胞数は経時的に増加したが、*ob/ob* マウスでは著明に抑制されていた。このように、*ob/ob* マウスでは、腎尿細管間質障害の進展に重要な炎症性変化(サイトカイン・ケモカインの産生やマクロファージの浸潤)が野生型マウスと比較して有意に抑制されていた。

3. 2 *ob/ob* マウスに対するレプチン持続投与の効果

3. 2. 1 体重および血糖値の変化(Fig. 5)

ob/ob マウスは発生段階よりレプチンを欠損する遺伝的モデルのため、*ob/ob* マウスに対してレプチンを後天的に補充することにより腎障害軽減効果が解除されるかどうかを検討した。すなわち、浸透圧ミニポンプを用いてマウスリコンビナントレプチンあるいは PBS を持続的に皮下投与しながら UUO を作製し、腎障害の程度を比較検

討した。*ob/ob* マウスに対してレプチンを投与すると、体重は翌日から速やかに減少し、観察終了時には野生型マウスとほぼ同程度まで減少し、高血糖も是正された。

3. 2. 2 遺伝子発現および腎組織像の変化(Fig. 6)

UUO 作製後 7 日目の腎組織における遺伝子発現を解析したところ、レプチンを投与した *ob/ob* マウスでは、PBS 投与群で認められた MCP-1 や F4/80 遺伝子発現の抑制効果は消失し、野生型マウスとほぼ同程度に増加していた。また、UUO 作製後 14 日目の腎組織像において、レプチン投与により *ob/ob* マウスで認められた間質線維化の抑制効果が消失した。以上の結果より、後天的なレプチン投与により、*ob/ob* マウスで認められた腎保護効果は解除されることが明らかとなった。

3. 3 *db/db* マウスにおける腎障害の軽減(Fig. 7-8)

次に、このレプチンの作用がレプチン受容体を介するかどうかを明らかにする目的で、*db/db* マウスを用いた検討を行った。レプチン受容体には 6 種類のアイソフォームの存在が報告されているが、摂食やエネルギー代謝調節作用のほとんどはレプチン受容体 long-form (Ob-Rb) を介することが証明されている⁸⁾。*db/db* マウスは、遺伝的に Ob-Rb に変異を有し、*ob/ob* マウスと同様に著しい過食や体重増加を示す。この *db/db* マウスおよび対照野生型マウスを用いて UUO を施行した結果、*ob/ob* マウスの結果と同様に、*db/db* マウスにおいて腎障害が有意に抑制された。以上の結果より、レプチン/Ob-Rb 系が腎尿細管間質障害の進展に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

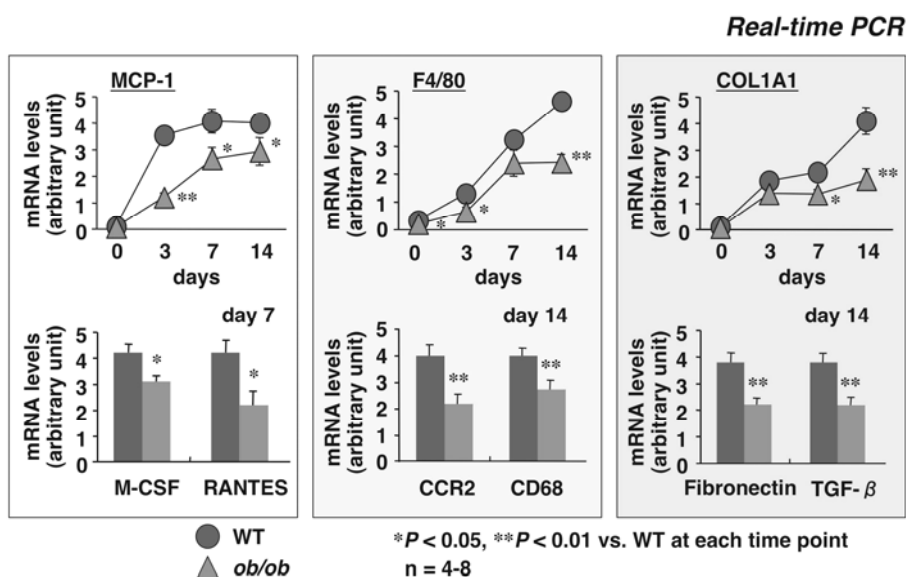


Fig. 3. Time course of renal mRNA expression in *ob/ob* and WT mice

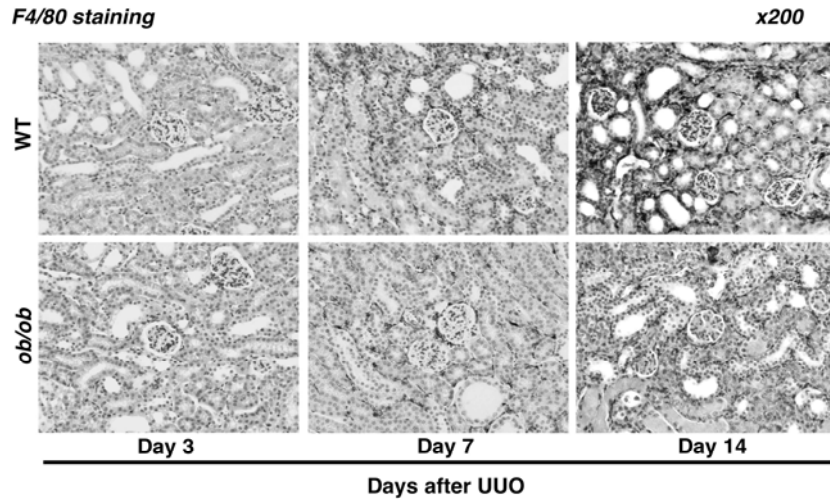


Fig. 4. Renal macrophage infiltration in *ob/ob* and WT mice

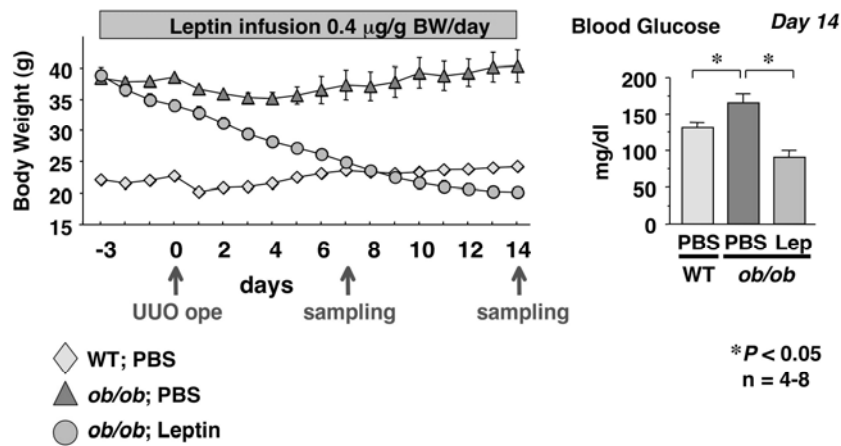
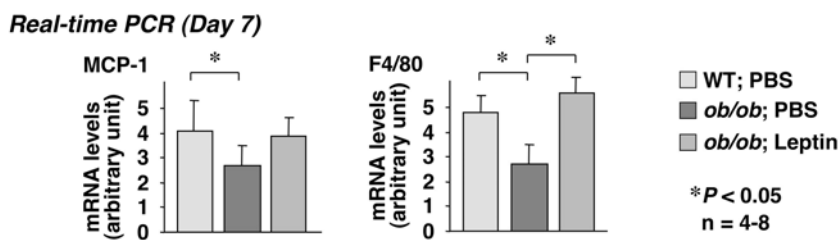


Fig. 5. Effects of leptin infusion on body weight and blood glucose



Masson's Trichrome (Day 14)

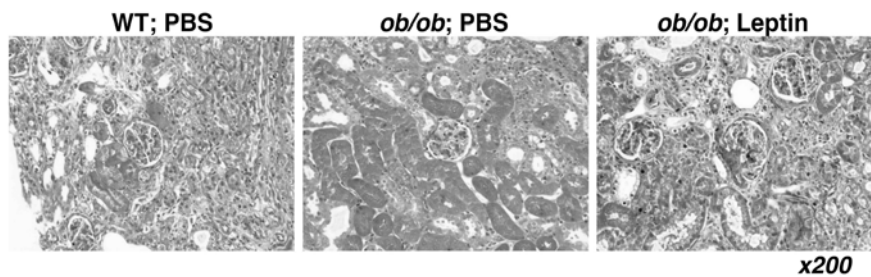


Fig. 6. Effects of leptin infusion on renal mRNA expression and fibrosis

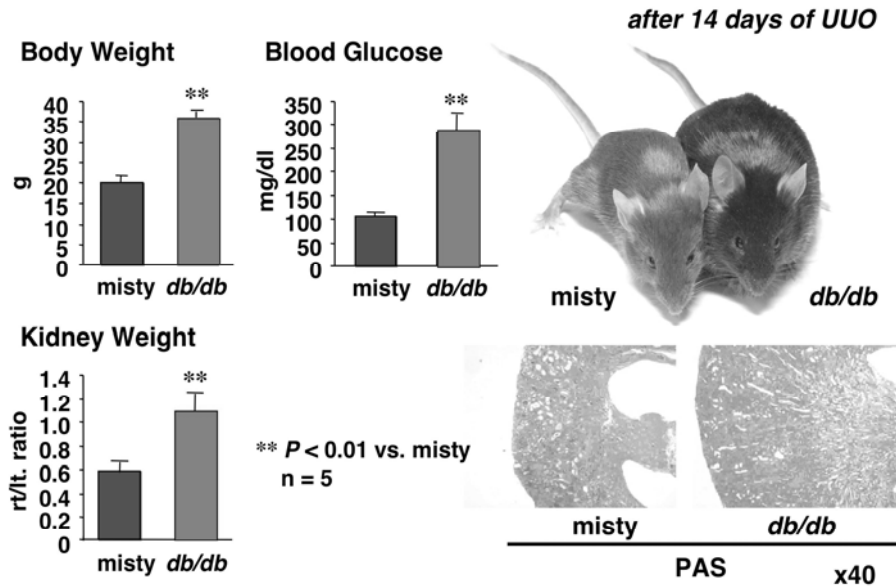


Fig. 7. Gross appearance and kidney weight of *db/db* and WT mice

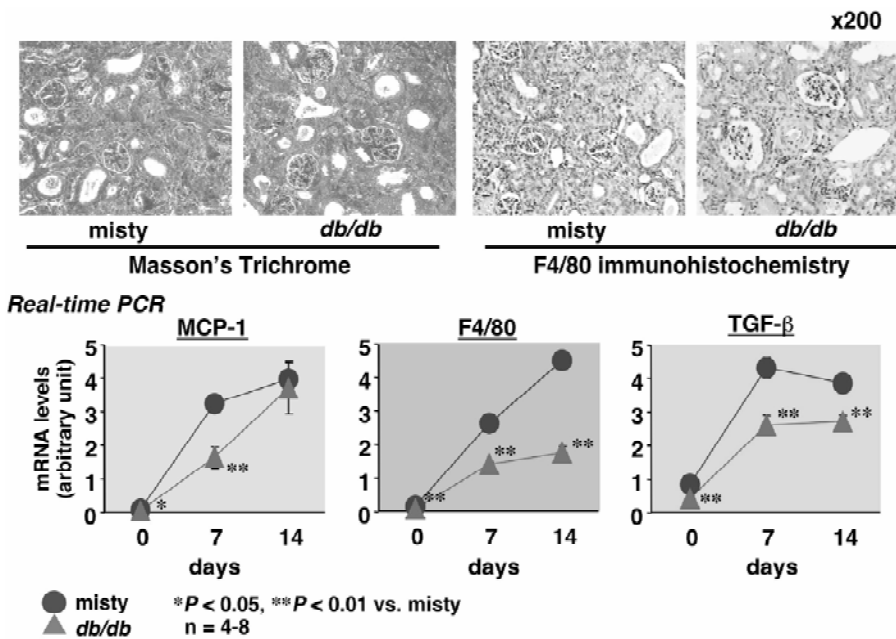


Fig. 8. Renal histology and mRNA expression in *db/db* and WT mice

4. 考 察

本研究により、レプチンシグナルを欠損するマウスにおいて、腎尿細管間質障害が抑制されることが初めて明らかとなった。これまでに腎尿細管間質障害の進展の分子機構として、尿細管上皮細胞からのサイトカインやケモカインの産生、腎局所へのマクロファージの浸潤、尿細管上皮細胞とマクロファージの相互作用および TGF-β の産生、細胞外マトリックスの過剰産生などが知られている。本研究において、この過程を経時的に観察した結果、

ob/ob マウスでは野生型マウスと比較して、すべての段階で炎症性変化が有意に軽減していたことより、レプチンが腎構成細胞に直接的に作用する可能性が考えられた。一方、*ob/ob* マウスは遺伝的にレプチンを欠損するため、腎や免疫系の発生・分化段階に変化が生じている可能性が否定できない。そこで、*ob/ob* マウスに対して後天的にレプチンを投与することにより、*ob/ob* マウスで認められた腎障害軽減効果が阻害されるかどうかを検討した。レプチン 3 日間の前投与により、遺伝子発現と組織像のい

ずれにおいても *ob/ob* マウスで認められる腎保護効果は消失したことから、レプチンが組織発生や分化に関係なく、炎症性変化に対して促進的に作用することが示唆された。

レプチンの作用部位に関しては未だ明らかでないが、*db/db* マウスにおいても *ob/ob* マウスとほぼ同様の結果を得たことより、レプチン作用の大部分は Ob-Rb を介するものと考えられる。全身に発現する Ob-Ra アイソフォームと比較して、Ob-Rb は主に視床下部に発現して摂食やエネルギー代謝調節に働くことが知られている。しかしながら、最近、Ob-Rb は腎や肺など末梢組織にも少量発現することが証明されており、その機能的意義が注目されている。我々は、*ob/ob* マウスおよびレプチン過剰発現トランスジェニックマウスを用いて、レプチンが血管内皮細胞に直接作用することにより、糖尿病網膜症モデルである虚血性網膜血管新生を促進することを証明した⁹⁾。また、最近、動脈硬化モデルや肝線維化モデルにおいて、レプチンシグナルを欠損するマウスでは組織障害が軽減すると報告されている^{10,11)}。このように、レプチンは末梢組織においては炎症性変化を促進する可能性が示唆されるが、実際に Ob-Rb は、サイトカイン受容体のシグナル伝達分子である gp130 と高い相同性を有しており、Janus activated kinase (JAK) /signal transducers and activators of transcription (STAT) 系や mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ系を活性化することが証明されている¹²⁾。一方、レプチンは視床下部/交感神経系を介して、骨代謝を調節するという報告もあり¹³⁾、レプチンが間接的に末梢組織に作用している可能性もある。

5. 今後の課題

本研究により、腎尿細管間質障害において、レプチンの存在が炎症や線維化に関して促進的に作用することが明らかとなり、腎障害におけるレプチンの病態生理的意義が示唆された。今後、レプチンの作用部位や作用機序を明らかにすることにより、尿細管間質障害の分子機構の解明や新しい腎保護戦略の創出に寄与すると考えられる。肥満にともなう高レプチン血症では、視床下部において「レプチン抵抗性」が生じるために、レプチンの作用不全が認められるが、末梢組織においても「レプチン抵抗性」が認められるかどうかに関しては今後検討が必要であると考えられた。また、レプチンによる Na 再吸収作用に関しても、慢性効果に関する報告はほとんどないため、本研究で確立した系を用いて現在検討中である。

文献等

1. Kurella M, Lo JC, Chertow GM. Metabolic syndrome and the risk for chronic kidney disease among nondiabetic adults. *J Am Soc Nephrol* 16: 2134-2140, 2005.
2. Sharma K, Considine RV. The Ob protein (leptin) and the kidney. *Kidney Int* 53: 1483-1487, 1998.
3. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 371-379, 2004.
4. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR. Biological action of leptin as an Angiogenic factor. *Science* 281: 1683-1686, 1998.
5. Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, Ebihara K, Satoh N, Iwai H, Matsuoka N, Hayashi T, Hosoda K, Inoue G, Yoshimasa Y, Nakao K: Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J Clin Invest* 105: 1243-1252, 2000.
6. Suganami T, Mukoyama M, Mori K, Yokoi H, Koshikawa M, Sawai K, Hidaka S, Ebihara K, Tanaka T, Sugawara A, Kawachi H, Vinson C, Ogawa Y, Nakao K. Prevention and reversal of renal injury by leptin in a new mouse model of diabetic nephropathy. *FASEB J* 19: 127-129, 2005.
7. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432, 1994.
8. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379: 632-635, 1996.
9. Suganami E, Takagi H, Ohashi H, Suzuma K, Suzuma I, Oh H, Watanabe D, Ojima T, Suganami T, Fujio Y, Nakao K, Ogawa Y, Yoshimura N. Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells. *Diabetes* 53: 2443-2448, 2004.
10. Stephenson K, Tunstead J, Tsai A, Gordon R, Henderson S, Dansky HM. Neointimal formation after endovascular arterial injury is markedly attenuated in *db/db* mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 2027-2033, 2003.
11. Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M,

- Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T, Sato N. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 122: 1399-1410, 2002.
12. Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF, Tartaglia LA. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8374-8378, 1996.
13. Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111: 305-317, 2002.

0532

Pathophysiological role of leptin in renal injury

Takayoshi Suganami¹, Yoshihiro Ogawa¹, Miyako Tanaka¹, Masato Kasahara²

¹Department of Molecular Medicine and Metabolism, Medical
Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan,

²Division of Nephrology, Kobe City General Hospital, Kobe, Japan.

Summary

The metabolic syndrome is constellation of visceral fat obesity, impaired glucose metabolism, atherogenic dyslipidemia, and blood pressure elevation, which all independently increase a risk of atherosclerotic diseases. The metabolic syndrome is also a risk factor for chronic kidney diseases. However, little is known about the molecular basis. Leptin is an important adipocytokine that acts directly on the hypothalamus and regulates food intake and energy expenditure. Leptin is also reported to have peripheral action as a pro-inflammatory cytokine in atherosclerosis and hepatic fibrosis models. Here we demonstrate that leptin exerts the pro-inflammatory effects in a mouse model of tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. Up-regulation of inflammatory cytokines and chemokines and infiltration of macrophages were significantly reduced in leptin-deficient *ob/ob* mice as compared with wild-type mice, thereby leading to attenuated renal fibrosis. Continuous subcutaneous administration of leptin not only reduced body weight and blood glucose levels in *ob/ob* mice comparable to wild-type mice but also canceled the renoprotective phenotype. Moreover, renal injury induced by unilateral ureteral obstruction was significantly reduced in long-form leptin receptor (Ob-Rb)-deficient *db/db* mice, suggesting the significance of the leptin/Ob-Rb pathway. These findings indicate that leptin plays an important role in the progression of tubulointerstitial renal injury. This study will provide a novel insight into the pathophysiological role of leptin in the relationship between the metabolic syndrome and chronic kidney diseases.