

# 低比重リポ蛋白受容体欠損による高脂血症マウス腎における単球遊走因子(MCP-1)の発現

加藤真帆人 鈴木淳一\* 林晋一郎 磯部光章

信州大学医学部第1内科学教室

## Renal Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice with Diet-Induced Hypercholesterolemia

Mahoto KATO, Jun-ichi SUZUKI, Shinichiro HAYASHI and Mitsuaki ISOBE

Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine

Abnormalities in lipid metabolism appear to play a pivotal role in progressive renal diseases. Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 plays pivotal roles in several inflammatory conditions including renal damage in diabetes. However, the pathogenesis of MCP-1 in renal injury induced by hypercholesterolemia remains unclear. To clarify the pathophysiology of hypercholesterolemia in renal diseases, we performed immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction to detect MCP-1 and the adhesion molecules vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in kidneys from low density lipoprotein receptor knockout (LDLRKO) mice fed lipid-rich chow (n=12). They were harvested at 5 to 10 weeks. For the control study, kidneys from wild mice fed lipid-rich chow and LDLRKO mice fed normal chow were also harvested. Severely high levels of hypercholesterolemia were seen in the serum of the LDLRKO mice, while no serum cholesterol elevation was observed in the wild mice. MCP-1 was enhanced in the glomerular endothelial cells and proximal tubular cells in the kidneys of LDLRKO mice, and this enhancement appeared prior to the expression of adhesion molecules and interstitial cell infiltration. Conversely, this expression was not enhanced in the control mice. We conclude that MCP-1 expression in renal glomerular and tubular cells may play important roles in renal diseases induced by hypercholesterolemia, and that the expression can be a useful marker for the early diagnosis of renal injury. *Shinshu Med J* 47: 397-400, 1999

(Received for publication January 18, 1999; accepted in revised form May 26, 1999)

---

**Key words** : hypercholesterolemia, low-density lipoprotein receptor knockout mice, monocyte chemoattractant protein  
高脂血症, 低比重リポ蛋白受容体欠損マウス, 単球遊走因子

---

### I 緒 言

脂質代謝異常, 特に高脂血症は腎臓疾患の原因もしくは進展要因になることが知られている<sup>1)2)</sup>。単球遊走

因子 (monocyte chemoattractant protein : MCP)-1 の発現は炎症の進展において重要な役割を演じており, 様々な腎疾患の原因となる炎症状態で発現している<sup>3)</sup>。しかし, 高脂血症によって惹起される腎臓の免疫反応における MCP-1 の役割は十分には解明されていない。そこで, 我々は高脂血症に関連した腎における MCP-

\* 別刷請求先: 鈴木 淳一 〒390-8621  
松本市旭 3-1-1 信州大学医学部第1内科

1の役割を解明するため、低比重リポ蛋白受容体欠損 (low-density lipoprotein receptor knockout: LDLRKO) マウス<sup>4)</sup>を用いて、免疫染色と reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) 法により、高脂血症動物の腎臓における MCP-1の発現を検討した。

## II 方 法

LDLRKO マウス (オス, 5~8 週齢, Jackson Lab., Bar Harbor, ME) に高脂食 (1.25% コレステロール, 7.5% ココアバター, 7.5% カゼイン, 0.5% 食塩) を生後5週より与え, 両側腎臓を投与開始後5から10週後に摘出した (n=12)。コントロールとして野生型マウス (C57BL/6, オス, 5~8 週齢) に高脂食を同様に与えたモデルと LDLRKO マウスに通常食を与えたモデルを作成し, 実験開始5-10週目に腎臓を摘出した (各 n=6)。マウスの麻酔には抱水クロラルール (3.6% w/v, 1cc/100g 体重, 和光純薬, 大阪) を用いた。腎臓摘出直前の末梢血中の総コレステロールとクレアチニンを計測した。摘出した腎臓は右側を凍結切片の作成に, 左側は RNA 抽出に供した。凍結切片は 6-8  $\mu\text{m}$  に薄切し, ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色と免疫染色に用いた。免疫染色には一次抗体として市販の抗マウス MCP-1抗体 (PharMingen, San Diego, CA), 当教室でハイブリドマより作成した抗マウス intercellular adhesion molecule (ICAM)-1抗体 (YN1/1.7), 抗マウス vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1抗体 (MK/2) を用いた。二次抗体にはそれぞれに適合するビオチン化抗免疫グロブリン抗体を用い, さらに Vectastain ABC kit (Vector Lab. Inc., Burlingame, CA) を用いて発色させた。発現強度は半定量的に検討し (スコア 0-3), 統計学的に解析した。免疫染色のコントロールとして, 一次抗体を反応させない連続切片を用いた。MCP-1の転写発現は Isogen (日本ジーン, 東京) を用いて抽出した RNA を用い, 既報のプライマーと温度サイクル (35サイクル) による RT-PCR にて検討した<sup>3)</sup>。PCR の陽性コントロールとして GAPDH を用いた。

## III 結 果

血清中総コレステロールは野生型マウスに比し LDLRKO マウスで著しく高値であった (図1) が, 血清中のクレアチニン値は両群で有意差を認めなかった。

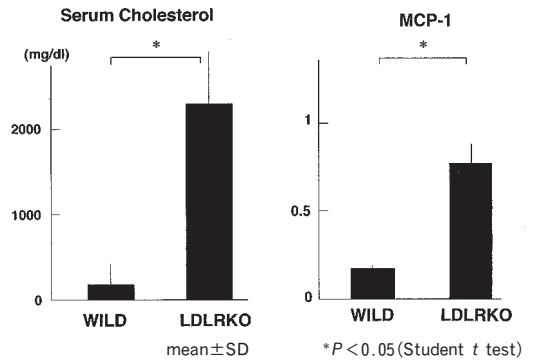


図1 高脂食を与えられた LDLRKO マウスと野生型マウスにおける血清コレステロール値および腎臓内 MCP-1発現  
いずれも LDLRKO マウスで有意に高値であった。

MCP-1の発現は LDLRKO マウスの糸球体内皮細胞と遠位尿細管に発現した。ICAM-1と VCAM-1発現も MCP-1の発現と同様の部位に観察されたが, それらの発現より MCP-1の発現が先行した。また, 間質への単核球浸潤も認められた。このような病理所見は通常食を与えられた野生型マウス, 高脂食を与えられた野生型マウスおよび通常食を与えられた LDLRKO マウスの腎臓には観察されなかった (図1, 2)。一次抗体を反応させない免疫染色のコントロールでは, いずれの切片も発色しなかった。RT-PCR 法による観察では, MCP-1転写が LDLRKO マウスの腎臓では確認できたのに対し, 野生型マウスの腎臓では確認されなかった (図3)。

## IV 考 察

最近の研究によると, 高脂血症は腎疾患の発症と進展に重大な影響を与えることが示されている。LDLは糸球体の内皮細胞やメサンジウム細胞, 尿細管の細胞を活性化し, 細胞接着分子や MCP-1を発現させる<sup>1)</sup>。LDLRKO マウスは高脂血症の病態解明のために確立され, 動脈硬化や黄色腫に影響する環境要因や遺伝的背景の解明に広く用いられている<sup>4)</sup>。本研究では MCP-1の転写と蛋白のいずれも LDLRKO マウスの腎臓で増強しており, 野生型マウスでは増強していなかった。MCP-1は LDLRKO マウスの腎臓で細胞浸潤や細胞接着分子と同様に発現していたことから, 高脂血症による腎臓の早期の炎症性変化として重要であると考えられた。

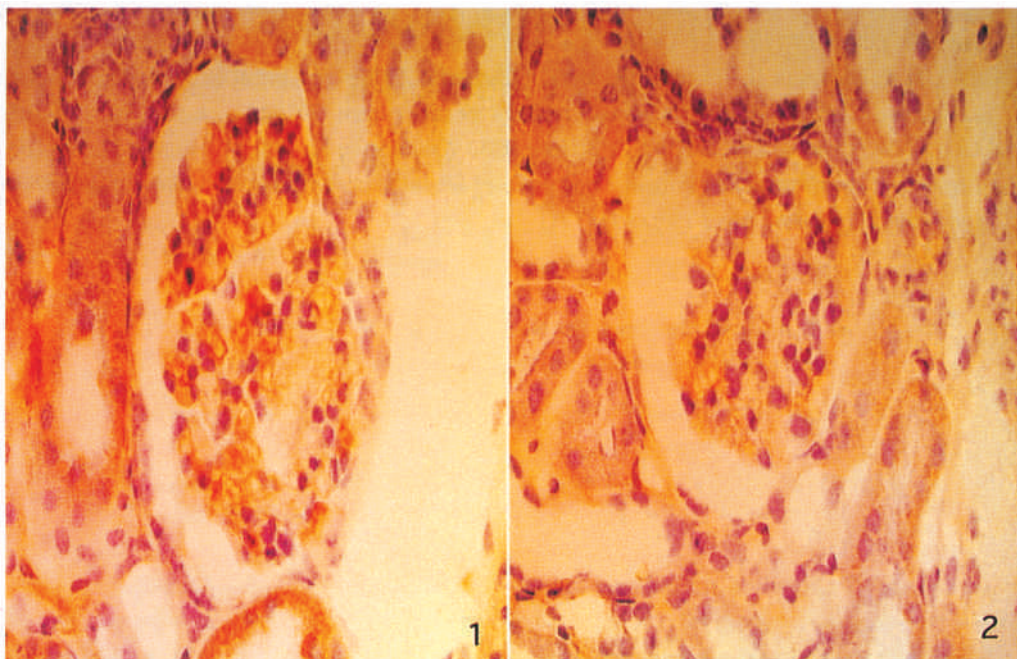


図2 腎臓の免疫染色

腎臓糸球体における MCP-1免疫染色の代表的結果を示す。高脂食を与えられた LDLRKO マウスでは MCP-1発現は増強していたのに対し(1), 野生型マウスではその発現は微弱であった(2)。(×100)

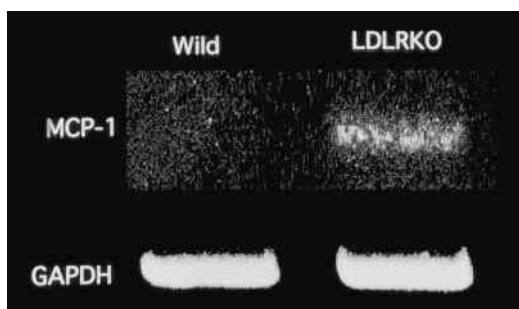


図3 RT-PCRによる MCP-1転写発現の代表的結果

高脂食を与えられた LDLRKO では明らかな MCP-1 発現が認められるのに対し, 野生型マウスでは確認されなかった。(GAPDH: コントロール)

## V 結 語

以上の結果から, MCP-1は高脂血症によって惹起される腎臓の免疫反応の進展に重要な役割を演じており, この発現を確認することは腎障害の診断に有用であることが示唆された。

## VI 謝 辞

今回の自主研究演習に際して, 親切にご指導いただいた信州大学第1内科第1及び第3研究室的諸先生方, 有意義な討論をしてくれた見学生生の Andreas Schoenbeck 君, 実験手技を指導して下さいた大池みどりさん, 塩原理恵さんに感謝いたします。

## 文 献

- 1) Kamanna VS, Bassa BV, Kirschenbaum MA: Atherogenic lipoproteins and human disease: extending concepts beyond the heart to the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6: 205-211, 1997
- 2) Eddy AA: Interstitial inflammation and fibrosis in rats with diet-induced hypercholesterolemia. *Kidney Int* 50: 1139-1149, 1996
- 3) Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TN, Salant DJ, Gutierrez-Ramos JC: RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of

crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med* 185: 1371-1380, 1997

- 4) Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns DK: Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest* 93: 1885-1893, 1994
- 5) Lukacs NW, Chensue SW, Smith RE, Strieter RM, Warmington K, Wilke C, Kunkel SL: Production of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha by inflammatory granuloma fibroblasts. *Am J Pathol* 144: 711-718, 1994

(H 11. 1. 18 受稿; H 11. 5. 26 受理)

---