

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 26 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860668

研究課題名(和文)慢性腎臓病におけるアンドロゲン受容体シグナルの重要性

研究課題名(英文)The role of an androgen receptor signal on progression of kidney diseases

研究代表者

坂入 徹(Sakairi, Toru)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20455976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、マウスを用いてアンドロゲン受容体(AR)シグナルの腎疾患への関与を解析した。まず、免疫染色でARがマウスの腎皮質の近位尿細管細胞に発現していることを確認した。次に、片腎摘後の野生株(WT)マウスへのテストステロンの投与が、アルブミン尿と血圧上昇を誘発することが示された。一方、ARノックアウトマウス(ARKO)を用いた片側尿管結紮モデルでは、線維化マーカーの α -SMAのmRNAの発現がWTに比べ亢進し、ARKOを用いた片腎摘+虚血再灌流モデルでは、24時間後の血清尿素窒素がWTに比べ昇した。以上よりARシグナルは過剰状態でも欠乏状態でも腎疾患増悪に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the role of an androgen receptor (AR) signal for the progression of kidney diseases using mouse models. Immunostaining revealed that the androgen receptors were localized in the nucleus of proximal tubular cells. Next, we found that exogenous administration of testosterone to hemi-nephrectomized wild type (WT) mice induced albuminuria and high blood pressure. On the other hand, expression levels of α -smooth muscle actin and COL1A1 mRNA in unilateral ureteral obstruction kidneys of AR-knockout (ARKO) mice were higher than those of WT mice. Further, when the ARKO and WT mice were subjected to hemi-nephrectomies and ischemia-reperfusion of the contralateral kidneys, the serum levels of urea nitrogen at 24 hours after re-perfusion were higher in ARKO mice than those in WT mice. Our results suggest that both excess and deficiency of the AR signal are associated with progression of kidney diseases.

研究分野：腎臓病学

キーワード：アンドロゲン受容体 片側尿管結紮モデル 虚血再灌流モデル 腎線維化

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)は、本邦の成人の人口の約 13%、1330 万人と多くが罹患している疾病であり、末期慢性腎不全(ESKD)の予備軍として、また、心血管疾患の独立した危険因子として、その重要性が認識されてきている。また、ESKD による維持透析患者数の増加は、医療経済の面からも大きな問題である(日本腎臓学会、CKD 診療ガイド2012)。その進行阻止のために、糖尿病や慢性糸球体腎炎などの原因疾患の治療や、レニン-アンジオテンシン系阻害薬を中心とした厳格な降圧療法が行われているが、その効果は限定的で、病態解明と治療法の開発が急務となっている。

複数の疫学研究により、男性は女性に比べ、CKDの罹患率が高く、男性であることが、CKD 発症の独立した危険因子であることが明らかとなっている (J Am Soc Nephrol. 2012 Sep;23(9):1569-78. *Pediatr Nephrol.* 2012 Aug;27(8):1213-9.)。また、アンドロゲン作用のある蛋白同化ステロイドホルモンを乱用するボディービルダーの中に、巣状糸球体硬化症を発症する者がいることが報告されている(J Am Soc Nephrol. 2010 Jan;21(1):163-72)。更に、動物を用いた研究では、アンドロゲンの投与が、尿細管におけるナトリウム再吸収を促進し、高血圧を惹起することや、急性腎不全モデルの病態を増悪させること、更には、去勢により、片腎摘出ラットでの尿蛋白や腎肥大が改善する等の報告があり、アンドロゲンが、付加的に、腎臓病の増悪因子として作用していることが示唆されている(Kidney Blood Press Res 2008;31:71-79, *J Biol Chem.* 2004 Dec 10;279(50):52282-92, *Eur J Clin Invest.* 1990 Aug;20(4):360-5)。しかし、これらのアンドロゲンの作用が、腎臓におけるアンドロゲン受容体(AR)を介していることを証明した研究はこれまでにない。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、アンドロゲン受容体シグナルの腎臓病の発症と進行における役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) 腎における AR の発現の解析

AR の正常腎における発現の有無を調べるために、ホルマリン固定、パラフィン包埋した野生株マウスの腎組織を用い、AR に対する抗体を用いて酵素抗体法で免疫染色を行った。また、AR の局在を調べるために、AR 抗体と各尿細管セグメントマーカーに対する抗体またはレクチンでの蛍光 2 重染色を行った。

2) アンドロゲン全身投与の腎への影響の解析

アンドロゲン全身投与の腎への影響を調べるために、オスの CD1 マウス(10 週齢)に片腎摘 + 去勢術を行い、3 週間後よりテストステロンエナント酸エステル 500 µg またはプラセボを 2 回/週で皮下投与した。投与開始 0, 14, 28, 56, 84 日目の尿中アルブミン/クレアチニン比を測定し、84 日目に血圧を測定した。84 日目に安楽死させ腎を摘出。重量を測定した後、ホルマリン固定・パラフィン包埋・薄切・PAS 染色を行い組織学的に解析した。

3) AR ノックアウトマウスを用いた片側尿管結紮モデルの解析

9 週齢 AR の全身ノックアウトマウス (*Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jan 3;300:167-71) またはコントロールの C57BL/6 野生株マウスに腎線維化モデルである片側尿管結紮モデル (UUO) を作成し、14 日後に腎を摘出。マッソン・トリクローム染色を用いた半定量的な尿細管間質線維化スコア測定、免疫染色とウエスタンブロットによる線維化マーカーの α -smooth muscle actin (α -SMA) 蛋白の発現解析、および、定量的 PCR 法による α -SMA, と COL1A1 (型

コラーゲン 1 鎖) の mRNA 発現解析を行い、尿細管間質線維化の程度を AR ノックアウトマウスの UUO 腎と野生株マウスの UUO 腎と比較した。

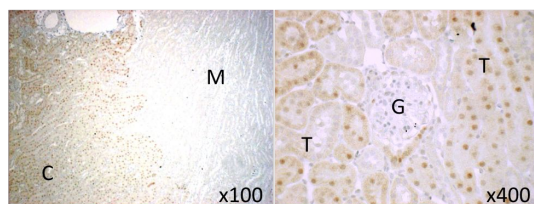
4) AR ノックアウトマウスを用いた片腎摘+虚血再灌流モデルの解析

11 週齢の AR ノックアウトマウスまたは同週齢の C57BL/6 野生株マウスを用いて、まず右腎摘出し、その後左腎門部をクリップすることで腎を虚血させ 30 分後に再灌流させた。再灌流後 24 時間、72 時間、7 日目、14 日目の血清を採取し尿素窒素を測定した。

4. 研究成果

1) 腎における AR の発現の解析

酵素抗体法での免疫染色により、AR は腎皮質の多くの尿細管細胞の核に発現していることが分かった(図 1)。また、免疫蛍光染色により、AR を発現している細胞では近位尿細管マーカーであるアクアポリン 1 (AQP1) も同時に発現していることが分かった(図 2)。一方、AR はヘンレ係蹄の太い脚のマーカーである THP や集合管に結合するレクチンの DBA が陽性の細胞では発現していなかった(非提示)。以上より AR は皮質の近位尿細管細胞に発現していることが示された。



C: cortex, M: medulla G: glomerulus, T: tubules

図1

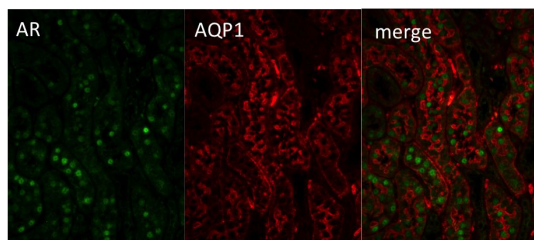


図2

2) アンドロゲン全身投与の腎への影響の解析

片腎摘+去勢術を行い、テストステロン

を投与したマウスでは、プラセボを投与した群に比べ、投与開始 14、28、56 日目で有意に尿中アルブミン/クレアチニン比が高かった(図 3 上段)。また、テストステロンを投与した群では、84 日目に測定した収縮期血圧および平均血圧が有意に高かった(図 3 下段左)。また、テストステロン投与群では 84 日目に摘出した腎の重量が多かった(図 3 下段右)。組織学的解析では、テストステロン投与群で明らかな糸球体障害や尿細管間質障害はみられず、コントロール群との差は見出だせなかった。以上より、テストステロンの投与は尿中アルブミンの増加、血圧上昇、腎

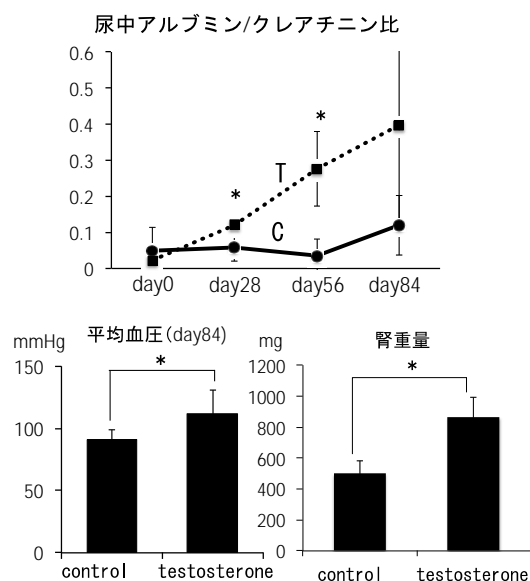


図3

重量増加に関与していることが分かった。

3) AR ノックアウトマウスを用いた片側尿管結紮モデルの解析

次に、AR ノックアウトマウスの解析を行った。通常状態の AR ノックアウトマウスは野生株マウスと比べ、

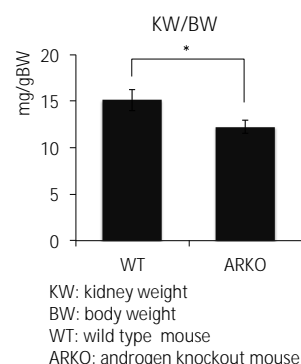


図4

KW: kidney weight
BW: body weight
WT: wild type mouse
ARKO: androgen knockout mouse

腎の重量が有意に少なかった (図 4)。また、尿中アルブミン/クレアチニンは両群間で差がなく、組織学的にも差がなかった(非提示)。

続いて、AR ノックアウトマウスと野生株マウスを用いて UUO モデルを作成し、14 日目の腎を摘出し解析した。AR ノックアウトマウスの UUO 腎では、COL1A1 と SMA の mRNA の発現が野生株マウスの UUO 腎に比べ有意に上昇していた(図 5)。しかし、ウエスタンブロットと酵素抗体法での免疫染色では SMA 蛋白発現レベルの両群間で明らかな差異を見出すことが出来ず、また、マッソン・トリクローム染色での組織学的検討でも両群間の腎線維化スコアに明らかな違いは見だせなかった。

4) AR ノックアウトマウスを用いた片腎摘+虚血再灌流モデルの解析

片腎摘+虚血再灌流を行った AR ノックアウトマウスでは、同じ処置をした野生株マ

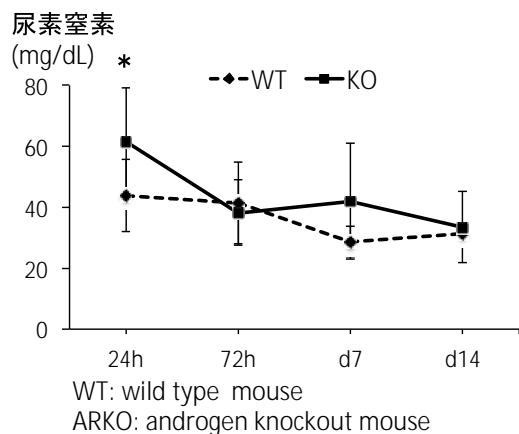


図6

ウスと比べ、再灌流 24 時間後の血清尿素窒素が上昇していた (図 6)。血清尿素窒素の上昇は一過性であり、72 時間後、7 日後、14 日後では両群間で差は認めなかった(図 6)。

5) 結果のまとめ

テストステロン投与が尿中アルブミン増加と血圧上昇を引き起こすことから AR シグナルの過度の亢進は腎臓病増悪に關与する可能性が示唆された。しかし一方で、AR ノックアウトマウスでは UUO モデルで腎線維化マーカーの mRNA が上昇し、片腎摘+虚血再灌流モデルでは一過性に血清尿素窒素が上昇することから、AR シグナルの欠如が腎疾患増悪に寄与する可能性も同時に示された。以上より、AR シグナル経路の作用は亢進状態でも欠乏状態でも腎疾患を増悪させることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

群馬生体統御内科学ホームページ
<http://mcs.dept.med.gunma-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂入 徹 (SAKAIRI TORU)
群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・
助教

研究者番号：20455976

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：