

令和元年6月17日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05312

研究課題名(和文)心不全の腎うっ血における腎障害機序の解明

研究課題名(英文)Physiological and molecular mechanisms underlying renal congestion in congestive heart failure

研究代表者

森 建文(MORI, Takefumi)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：40375001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：腎うっ血に伴う腎内分子メカニズムと治療戦略を解明するため、下大静脈の両腎静脈間を閉塞する新しい腎うっ血モデルを開発した。このモデルは同じ個体でありながら左腎のうっ血腎とうっ血のない右腎を比較でき、個体差がない腎うっ血特異的な分子メカニズムを評価できる。本モデルと細胞培養系を用いて、腎うっ血に伴う腎臓障害に酸性オルガネラにおけるタンパク質輸送の障害や直血管の障害が関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、腎うっ血における腎間質線維化機序が明らかとなった。これにより体液貯留を呈する疾患における腎保護をしながら調節する治療法や治療の代用指標を解明することが可能となった。これまで、腎循環は動脈血流を中心として研究され、降圧剤など動脈圧を調節する薬剤が開発されており、腎静脈循環を調節する薬剤は開発されていない。本研究成果により、腎うっ血に伴う腎臓障害に酸性オルガネラにおけるタンパク質輸送の障害や直血管の障害が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We created a rat renal congestion model and investigated the effect of renal congestion on hemodynamics and molecular mechanisms. Tubulointerstitial injury and medullary thick ascending limb hypoxia were observed only in the congestive kidneys. Using this rat congestion model and cell culture system, we revealed that vacuolar ATPase system in acidic organelles and pericyte injury were involved in the development of renal interstitial fibrosis due to renal congestion.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎うっ血 腎循環 腎間質圧 腎間質線維化 心不全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心不全の病態ではしばしば体液貯留がみられるとともに腎障害がみられ、治療に難渋することがある。このような心腎連関における腎内メカニズムについて、その詳細は不明である。今までレニン・アンジオテンシン系などの体液因子の増加、腎血流の低下による腎虚血など多くのメカニズムが研究されてきた。しかしながら、心不全において下大静脈圧が腎機能の低下や体液貯留に関与することが示されていた(Mullens et al. J Am Col Card. 2009, Semple SJ et al. Cir Res., 1959)が、長年十分な検討がされていなかった。更に、近年、腎静脈圧の上昇による腎うっ血が心不全の病態に関与することが注目されている(Ross EA., J Card Fail. 2012)。

以前、我々はラットの腎動脈圧調節装置を開発し、腎動脈圧の上昇が腎内 TGF- β 1 を誘導し、上皮間葉転換(epithelial to mesenchymal transition, EMT)を介して線維化が引き起こされることを明らかにした(Mori et al. Hypertension 2004, Mori et al. J. Am Soc Neph. 2008)。さらに、腎動脈圧の上昇は腎間質圧を介し Na 排泄の低下と細胞傷害につながる酸化ストレスを誘導することを示した(Jin et al. Hypertension. 2009)。このように腎動脈圧の上昇を介した腎間質圧上昇による腎障害メカニズムは明らかになったが、腎静脈圧上昇による腎障害メカニズムは明らかになっていない。

60 年も前にイヌの実験で Gottschalk らは腎静脈圧の上昇が腎間質圧の上昇と腎網細血管の狭小化が生じることを報告している (Gottschalk CW et al. Am J Physiol. 1956)。しかしながら、腎静脈圧上昇による腎障害線維化機序については明らかになっていない。そこで我々は腎静脈クリップによる腎うっ血ラットモデルを開発し、腎うっ血による腎静脈圧上昇により腎間質圧が上昇し、腎網細管および尿細管の圧排による腎髄質血流および糸球体濾過の低下により、EMT 伴った虚血および線維化が起こることを明らかにした。さらにこの腎では TGF- β 1 の産生が亢進していた。近位尿細管において、TGF- β 1 による EMT 変化に液胞型 ATPase (vacuolar ATPase, V-ATPase)や(プロ)レニン受容体[(P)RR]の関与が示唆されている(Cao X et al. Am J Physiol. 2013)。

2. 研究の目的

我々は腎血行動態と間質圧に着目し、以下の仮説を立てた：心不全による腎静脈圧の上昇が、腎間質流のうっ滞を生じ腎間質圧を上げる。腎間質圧の上昇により、腎髄質血管と尿細管を圧排し、腎髄質血流と糸球体濾過を減らし、体液貯留を引き起こす。腎髄質血流の低下と間質圧上昇による虚血・低酸素および酸化ストレスを介した細胞傷害により腎障害をきたす。この仮説を検証するために我々が開発したラット腎静脈狭窄モデルと細胞培養系を用い、上記仮説を検証するとともに、腎うっ血に伴う腎内分子メカニズムと治療戦略を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ラットを麻酔し、呼吸管理下に左腎静脈にシルバーマンクリップをかけ、腎静脈を狭窄して腎うっ血モデルを作成した。このモデルラットでは左腎静脈が完全閉塞しており、静脈内圧を測定することが困難であり、下大静脈の左右腎静脈分岐部間を結紮する新たなモデルを考案した。ラットの下大静脈の両腎静脈間を結紮することにより、右腎をコントロールとして左腎のうっ血状態を評価可能な腎うっ血モデルとして確立した。このモデルにおいて、腎臓の生理学的評価、組織学的評価、マイクロアレーによりコントロール右腎とうっ血左腎の遺伝子発現の差を評価した。

尿細管(集合管)細胞の M1 細胞に V-ATPase や(P)RR 受容体の存在を real time PCR やウェスタンブロット法、免疫染色で確認した。TGF- β 1 刺激を行い、Fibronectin の線維化を観察した。これに対する酸性オルガネラおよび V-ATPase の役割を V-ATPase 抑制薬の bafilomycin、siRNA により検証した。

4. 研究成果

まず、ラットの下大静脈にシルバーマンクリップをかけ、腎静脈を狭窄することにより腎うっ血モデルを作成した。このモデルは、左腎静脈を完全閉塞するため、静脈内圧を測定することが困難であった。次に、下大静脈の左右腎静脈分岐部間を結紮するモデルを考案した。このモデルではカテーテルをそれぞれ閉塞部の上流と下流に設置することにより静脈内圧を測定することができ、右腎の腎静脈分岐部付近の下大静脈圧を保ったまま左腎静脈分岐部付近の下大静脈圧を高く保たれていた(図 1)。これにより右腎をコントロールとした左腎の腎うっ血モデルが作成できた。

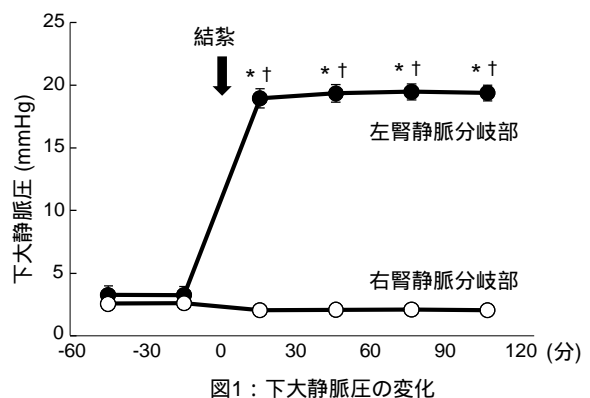


図1: 下大静脈圧の変化

腎内血流をレーザードップラー法で確認した所、腎皮質および髄質血流の減少が左腎に認め

られ、右腎では有意な変化が認められなかった。イヌリンクリアランスによる糸球体濾過率測定では両腎とも一過性に低下がみられたが、右腎では結紮後 60 分後に前値レベルに回復が認められ、左腎は低下したままであった。尿量もまた結紮後両腎で低下がみられたが、右腎は回復し左腎の尿量のみ持続して低下していた。腎間質圧は左腎で優位に上昇した。ピモニダゾールによる組織低酸素を確認した所、左腎では右腎に比べ腎髄質外層の尿細管を中心に低下酸素が確認された。さらに左腎では線維化とともに Fibronectin、smooth muscle actin などの線維化物質や Osteopontin などの尿細管障害関連マーカーの mRNA およびタンパク質の増加が観察された。また、被膜の除去によりこれらの反応は皮質に強く改善がみられた。加えて、低真空走査電子顕微鏡を用いてうっ血腎の組織を評価したところ、直血管の周皮細胞の脱落が認められた(図 2)。

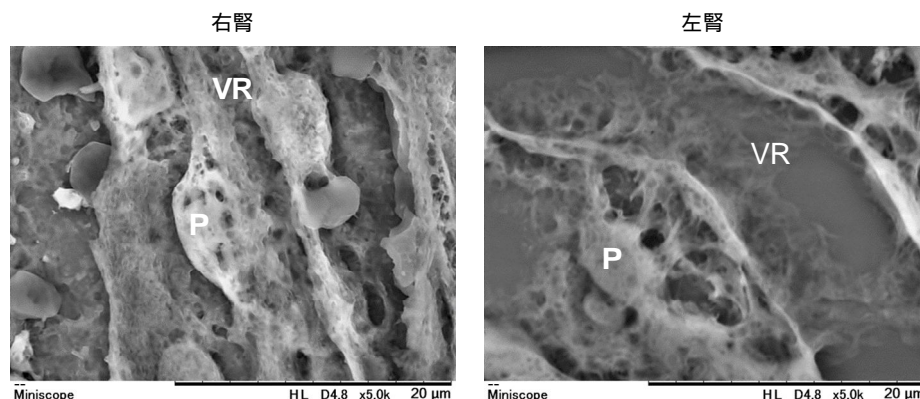


図2：低真空走査電子顕微鏡による腎直血管像
VR; 直血管、P; 周皮細胞(ペリサイト)

この新しい腎うっ血モデルにおいて、オルガネラ内の細胞内タンパク質輸送に関与している V-ATPase、(P)RR の発現を評価したところ、V-ATPase を構成するタンパク質、(P)RR の発現共に減少していた。

マウス集合管細胞およびラット糸球体上皮細胞を培養し、1 および 10ng/ml の TGF- β 1 を添加し、24 時間観察すると免疫染色により細胞周囲にフィブロネクチン陽性の線維化が観察された。V-ATPase を抑制する bafilomycin A1 を 10 - 100nM 投与すると TGF- β 1 による線維化は抑制された。bafilomycin A1 による細胞増殖能を WST-1 Cell Proliferation Assay で評価した所、bafilomycin A1 100nM 以上では細胞増殖能の抑制傾向がみられた。Lysotracker Red を用いて V-ATPase 活性を検討した所、TGF- β 1 刺激により、V-ATPase の活性亢進が観察され、パフィロマイシン A1 10nM で抑制された。また、smooth muscle actin mRNA は TGF- β 1 刺激により増加し、パフィロマイシン A1 の存在下では TGF- β 1 刺激増加しなかった。

以上より、腎うっ血に伴う腎臓障害に酸性オルガネラにおけるタンパク質輸送の障害や直血管の障害が関与していることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Wang A, Hirose T, Ohsaki Y, Takahashi C, Sato E, Oba-Yabana I, Kinugasa S, Muroya Y, Ito S, Mori T. Hydrochlorothiazide ameliorates polyuria caused by tolvaptan treatment of polycystic kidney disease in PCK rats. *Clin Exp Nephrol*. 2019 Apr;23(4):455-464. DOI: 10.1007/s10157-018-1669-9. 査読有.

Yoshida M, Nakamichi T, Mori T, Ito K, Shimokawa H, Ito S. Low-energy extracorporeal shock wave ameliorates ischemic acute kidney in rats. *Clin Exp Nephrol*. 2019 May;23(5):597-605. DOI: 10.1007/s10157-019-01689-7. 査読有.

Mori T, Hirose T, Kinugasa S. Treatment of renal congestion by tolvaptan. *Hypertens Res*. 2019 May;42(5):745-748. DOI: 10.1038/s41440-019-0215-9. 査読有.

Shimada S, Hirose T, Takahashi C, Sato E, Kinugasa S, Ohsaki Y, Kisu K, Sato H, Ito S, Mori T. Pathophysiological and molecular mechanisms involved in renal congestion in a novel rat model. *Sci Rep*. 2018 Nov;8(1):16808. DOI: 10.1038/s41598-018-35162-4. 査読有.

Sato E, Wang AY, Satoh M, Nishikiori Y, Oba-Yabana I, Yoshida M, Sato H, Ito S, Hida W, Mori T. Urinary angiotensinogen excretion level is associated with elevated blood pressure in the normotensive general population. *Am J Hypertens*. 2018 May;31(6):742-749. DOI: 10.1093/ajh/hpy020. 査読有.

Oba-Yabana I, Mori T, Takahashi C, Hirose T, Ohsaki Y, Kinugasa S, Muroya Y, Sato E, Nguyen G, Piedagnel R, Ronco PM, Totsune K, Ito S. Acidic organelles mediate TGF- β 1-induced cellular fibrosis via (pro)renin receptor and vacuolar ATPase trafficking in human peritoneal mesothelial cells. *Sci Rep*. 2018 Feb;8(1):2648. DOI:

10.1038/s41598-018-20940-x. 査読有.

Mori T, Ohsaki Y, Oba-Yabana I, Ito S. Diuretic usage for protection against end-organ damage in liver cirrhosis and heart failure. *Hepato Res*. 2017 Jan;47(1):11-22. DOI: 10.1111/hepr.12700. 査読有.

〔学会発表〕(計40件)

廣瀬卓男, 島田佐登志, 松木琢磨, 高橋知香, 矢花郁子, 中村はな, 衣笠哲史, 室谷嘉一, 谷淳一, 森建文. 腎うっ血における(プロ)レニン受容体の発現. 第92回日本内分泌学会学術総会(仙台). 2019.5.10. (ポスター)

Moriyama S, Takeuchi W, Kaburaki T, Shimada K, Hirose T, Kinugasa S, Matsuki T, Oba-Yabana I, Muroya Y, Mori T. Low-vacuum scanning electron microscopy analysis for formalin-fixed paraffin-embedded rat kidney sections. World Congress of Nephrology 2019 (Melbourne, Australia). 2019.4.14. (ポスター)

Hirose T, Shimada S, Matsuki T, Takahashi C, Nakamura H, Kinugasa S, Muroya Y, Tani J, Mori T. Expression of (pro)renin receptor in rat renal congestion model. World Congress of Nephrology 2019 (Melbourne, Australia). 2019.4.13. (ポスター)

松木琢磨, 廣瀬卓男, 島田佐登志, 高橋知香, 矢花郁子, 中村はな, 衣笠哲史, 室谷嘉一, 谷淳一, 伊藤貞嘉, 森建文. ラット腎うっ血モデルにおける(プロ)レニン受容体の発現. 第11回(プロ)レニン受容体フォーラム(中央区). 2019.3.16. (口頭)

Hirose T, Shimada S, Takahashi C, Sato E, Kinugasa S, Ito S, Mori T. Pericyte-myofibroblast transition induced tubulo-interstitial injury in a novel rat venous congestion rat model. ASN Kidney Week 2018 (San Diego, California). 2018.10.25. (ポスター)

廣瀬卓男, 島田佐登志, 高橋知香, 佐藤恵美子, 衣笠哲史, 金須清美, 佐藤博, 伊藤貞嘉, 森建文. ラット腎うっ血モデルの作出とその腎障害機序の検討. 第41回日本高血圧学会総会(旭川). 2018.9.16. (口頭)

大崎雄介, 高橋知香, 伊藤貞嘉, 森建文. うっ血により惹起される腎障害機序におけるカルボニルストレスの役割. 第61回日本腎臓学会学術総会(新潟). 2018.6.10. (ポスター)

廣瀬卓男, 衣笠哲史, 島田佐登志, 高橋知香, 矢花郁子, 大崎雄介, 室谷嘉一, 伊藤貞嘉, 森建文. 低真空走査電子顕微鏡によるラット腎臓光学顕微鏡用組織標本の検討. 第61回日本腎臓学会学術総会(新潟). 2018.6.10. (口頭)

島田佐登志, 大崎雄介, 高橋知香, 廣瀬卓男, 佐藤恵美子, 伊藤貞嘉, 森建文. 腎うっ血による腎障害機序の解明. 第61回日本腎臓学会学術総会(新潟). 2018.6.8. (口頭)

Shimada S, Hirose T, Takahashi C, Sato E, Kinugasa S, Ito S, Mori T. Pericyte detachment is involved in renal congestion in a novel rat model. Council on Hypertension (Chicago, Illinois). 2018.9.6. (ポスター).

森建文. 腹膜透析におけるV-ATPaseと(pro)renin受容体の役割. 第10回(プロ)レニン受容体フォーラム(中央区). 2018.3.31. (口頭)

Ohsaki Y, Takahashi C, Ito S, Mori T. Carbonyl stress could enhance renal fibrosis and tubular injury induced by the renal congestion. ISN Frontiers (Tokyo). 2018.2.23. (ポスター)

Shimada S, Ohsaki Y, Takahashi C, Sato E, Ito S, Mori T. Pathophysiological analysis of renal congestion using a novel rat model. ISN Frontiers (Tokyo), 2018.2.23. (ポスター)

森建文, 高橋知香, 矢花郁子, 大崎雄介, 衣笠哲史, 伊藤貞嘉. 腎線維化における集合管酸性オルガネラの役割. 第60回日本腎臓学会学術総会(仙台). 2017.5.28. (ポスター)

大崎雄介, 森建文, 美間健二, 王安邑, 高橋知香, 伊藤貞嘉. うっ血性心不全により誘導される腎障害に対する腎生理学的検討. 第60回日本腎臓学会学術総会(仙台). 2017.5.26. (ポスター)

〔その他〕

ホームページ等

東北医科薬科大学 内科学第三(腎臓内分泌内科)教室

<https://tohokupd.jimdo.com>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 佐藤 恵美子

ローマ字氏名: (SATO, Emiko)

所属研究機関名: 東北大学

部局名: 大学院薬学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：20466543

研究分担者氏名：伊藤 貞嘉

ローマ字氏名：(ITO, Sadayoshi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：40271613

研究分担者氏名：大崎 雄介

ローマ字氏名：(OHSAKI, Yusuke)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：40509212

研究分担者氏名：矢花 郁子

ローマ字氏名：(YABANA, Ikuko)

所属研究機関名：東北医科薬科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：60778596

(2)研究協力者

研究協力者氏名：島田 佐登志

ローマ字氏名：(SHIMADA, Satoshi)

研究協力者氏名：高橋 知香

ローマ字氏名：(TAKAHASHI, Chika)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。