

平成21年 5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590071
 研究課題名（和文） 腎不全におけるレニン-アンジオテンシン系と Rho の病態生理的役割
 研究課題名（英文） Pathophysiological role of renin-angiotensin system and Rho in renal failure
 研究代表者
 吉田 真 (YOSHIDA MAKOTO)
 高崎健康福祉大学・薬学部・教授
 研究者番号：90201011

研究成果の概要：マウスを用いた実験的腎不全モデルを作成して、レニン-アンジオテンシン系および関連因子の病態生理学的役割の解明を行った。Cisplatin 投与により、血中 BUN、クレアチニン値などの生化学的指標、腎組織切片の病理学的指標から尿細管壊死を中心とした腎不全を確認した。この時、腎組織の COX-2、TGF- β などの炎症性因子の mRNA レベルの上昇が見られるとともに、Rho の活性化が観察され、その役割が注目された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：腎不全、Rho

1. 研究開始当初の背景

我が国における腎疾患患者は 50 万人を越えると言われ、その半数が根本的な治療のないままに透析治療を続けている。腎不全は糸球体と尿細管の炎症性傷害と言えるが、その成因メカニズムは複雑であり、免疫抑制薬などいくつかの治療薬があるに過ぎず、透析治療に追い込まれる前段階での腎保護が急務と考えられている。この腎保護作用を持つ薬物としてレニン-アンジオテンシン系の抑制薬が近年注目されている。アンジオテンシン II は主に Gq タンパク質連関型の AT₁ 受容体を介した血管収縮作用が知られている。しかし、近年においてはアンジオテンシ

ン II の AT₁ 受容体を介した細胞増殖・肥大が心肥大、血管狭窄、癌組織における血管伸長などに影響することが示されており、またその細胞内シグナルも G_{12/13}-Rho を介した系、MAPK、チロシンキナーゼなどを介した系など多種多様なものが報告されている。一方、AT₂ 受容体は AT₁ 受容体とほぼ同時期にクローニングされたが、その細胞内情報伝達系も生理的役割もいまだに明確にはなっていない受容体である。いくつかの報告では、AT₁ 受容体と生理的に拮抗する作用を示す他、胎児期・出生直後に多く発現していることから臓器形成などに関連していると想像されている。

2. 研究の目的

本研究では、レニン-アンジオテンシン系および関連因子の腎不全における病態生理学的役割の解明を通して、将来の腎不全治療薬・予防薬開発に向けた基礎研究を目的とした。アンジオテンシン変換酵素阻害薬が腎保護作用を示す事は知られているが、それが、腎血管を拡張させる事による代償的濾過機能保持によるものなのか、それとも糸球体や尿細管自体の障害を抑制するためなのかは明確にはなっておらず、またその際の関連因子の役割も不明である。

アンジオテンシン受容体を介するシグナル伝達機構のうち、近年特に注目されているものに、G_{12/13}タンパク質を介した Rho-Rho キナーゼ系の活性化が知られている。Rho-Rho キナーゼ系の活性化は、ストレスファイバーの形成、細胞の接着、平滑筋の Ca 感受性の調節、細胞周期および増殖の調節、アポトーシスなど広い範囲にわたり細胞機能を調節する事が知られている。我々も近年、炎症時に重要な役割を果たしているプロスタノイドの一種が Rho-Rho キナーゼ系を介して細胞の形態変化を起こし、グリオーシスなどの病態に関与している可能性を報告している (*Eur. J. Pharmacol.* 545:100-108, 2006)。そこで本研究において、特に Rho-Rho キナーゼ系に着目し、腎不全におけるレニン-アンジオテンシン系および関連因子の病態生理学的役割の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

5 週齢の雄性 BALB/c Cr Slc マウス (日本エスエルシー) を使用した。動物は 23±2°C に温度管理した飼育室において、通常食 (CE-2、日本クレア)、水道水の自由摂取下に飼育した。

(2) 薬物処置および尿・血清・腎臓の採取

薬物投与前日に動物を個別に代謝ケージに入れ 24 時間分のコントロール尿を採取し、体重を測定した。シスプラチンを 20 mg/kg (1 mg/mL) にて腹腔内に投与後、指定の日数飼育した。腎臓を摘出する前日にマウスを代謝ゲージに入れ 24 時間分の尿を採取し、体重を測定した。ペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下にて心臓採血をおこない、エッペンチューブに取り遠心分離法にて血清を得た。採血後直ちに摘出した左右の腎臓のうち、1 つは 2 分割の後 RNA およびタンパク抽出用として使用するまで -80°C に保存した。凍結切片作成用の腎臓は、摘出後に 2 分割の後、包埋皿にのせコンパウンド

(Tissue-Tek、Sakura Fintek) で包埋後、液体窒素で凍らせ使用するまで凍結ブロックを -80°C にて保存した。

(3) 凍結切片作成・染色

コンパウンドを用いて試料台に凍結ブロックを貼り付け、試料台をクリオスタット (CM1510S、ライカ) にセットし、マイクロトームで 10 μm の厚さに薄切をおこなった。薄切した腎凍結切片は 70% イソプロパノールで固定した。HE (Hematoxylin Eosin) 染色は、ギルヘマトキシリン V 液およびエオシン液を用いて染色をおこなった。アザン染色は、オレンジ G 液、アズカルミン G 液、ならびにアニリンブルー液で染色をおこなった。PAS (Periodic Acid Schiff) 染色は、過ヨウ素酸、シッフ試薬ならびにヘマトキシリン液で染色をおこなった。染色後、100% エタノール液で脱水し、キシレン液で透徹した後、封入剤で封入をおこなった。

(4) 血清尿素窒素 (BUN) の測定

BUN の測定はウレアーゼ・インドフェノール法にて行った。すなわち血清サンプルに発色試薬 ((尿素窒素 B-テストワコー (和光純薬)) を加え生成するインドフェノールの 570nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Sunrise、Tecan) を用いて測定し、尿素窒素標準液の検量線より尿素窒素濃度を求めた。

(5) クレアチニンの測定

血清および尿サンプルを除タンパク後、Jaffé 法にてピクリン酸 (クレアチニン-テストワコー (和光純薬)) を加え生成する橙赤色の縮合物の 520nm の吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。クレアチニン標準液の検量線よりクレアチニン濃度を求めた。

(6) 尿中 Na⁺、K⁺濃度の測定

尿サンプル中の Na⁺、K⁺濃度は、イオン電極法 (コンパクトイオンメーター CARDY (HORIBA)) にて測定した。

(7) 腎 lysate の作成

-80°C に保存した腎組織から 20mg を切り出し、PRO-PREP 液 (iNtRON Biotechnology) の入ったチューブに入れ、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズした。氷上で 20 分インキュベート後、13000rpm、4°C、5 分遠心し上清を腎 Lysate とした。

(8) タンパク質定量

腎 lysate 中のタンパク質濃度の定量には BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher

Scientific) を用い、生じる物質の 562nm における吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定し、BSA 標準液の検量線よりタンパク濃度を求めた。

(9) ウエスタンブロッティング

腎 lysate にサンプルバッファーを加えて、95°C で 5 分間煮沸し、完全にタンパク質を変性させた後、SDS-PAGE を行った。泳動終了後、セミドライ・トランスファー装置 (ATTO) を用い、ゲルから PVDF 膜へタンパク質を転写した。転写終了後、PVDF 膜を tris-buffered saline + 0.05% Tween20 (TBST) に 5% スキムミルクを加えた液でブロッキングを行った (4°C, overnight)。TBST で洗浄後、各抗体とインキュベートし (25°C, 90 分間)、その後、TBST で洗浄後、各二次抗体とインキュベートした (25°C, 90 分間)。TBST で洗浄後、ECL assay kit (GE Healthcare) を用いて抗体に標識されている HRP の酵素反応による発光を利用して、ルミノイメージアナライザー (LAS-3000, FUJIFILM) にて検出した。

(10) 腎 lysate 中の Rho 活性の測定

glutathione-S-transferase と rhotekin の Rho binding domain 融合タンパク質を glutathione アガロースに結合させたビーズと腎 lysate をインキュベートし (4°C, 1 時間)、遠心分離 (5,000 x g, 1 分間, 4°C) した。沈殿を wash buffer にて洗浄し、再び遠心分離 (5,000 x g, 3 分間, 4°C) 後、上清をできるだけ除き、サンプルバッファーを加え活性型 Rho 検出用サンプルとした。一方、腎 lysate にサンプルバッファーを加えたものを全 Rho 検出用サンプルとした。これらサンプルのウエスタンブロッティングを行い、イメージアナライザーによって検出したバンドの濃さを元に、全 Rho に対する活性型 Rho の比を Rho 活性とした。

(11) SOD Assay

血清サンプルおよび腎 lysate に WST working solution (SOD Assay Kit-WST (DOJINDO)) および Enzyme working solution を加え、37°C で 20 分間インキュベート後に生じる WST-1 formazan の 450nm の吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。

(12) Total RNA の抽出およびリアルタイム PCR

-80°C に保存した腎組織から約 40mg を切り出し、lysis solution (Gen Elute Mammalian Total RNA Kit (Sigma)) の入ったチューブに入れ、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズした。Total RNA を抽出

後、DNase 処理をおこない、逆転写酵素 (ReverTra-Plus (TOYOBO)) による逆転写反応を行った。SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いて PCR 反応を行い、Mx3000P analyzer (Stratagene) を用いて解析した。PCR 反応に用いたプライマーは以下の通りである。

COX-2:

sense,

5'-CCCCCTGCTGCCCCGACACCTT-3'

antisense,

5'-CCCCAGCAACCCGGCCAGC-3'

TGF-β:

sense,

5'-CCGCAACAACGCCATCTATGA-3'

antisense,

5'-GGGGGTCAGCAGCCGGTTAC-3'

4. 研究成果

(1) シスプラチン投与のマウスの特徴

シスプラチン投与により、3 日後に体重、尿量ともに減少が見られた。一方、7 日後および 14 日後には体重および尿量がシスプラチン処置前と同程度まで回復していた。

続いてシスプラチン投与による尿中および血清中因子の解析をおこなった。腎機能を評価する際には血清尿素窒素 (BUN) および血清クレアチニン値の測定が行われるが、シスプラチン投与 3 日後に BUN 値に増加が見られた (図 1)。体重、尿量の結果と同様に、7 日後および 14 日後では BUN 値は vehicle 群と同程度に回復していた。また、シスプラチン投与後 3 日の血清クレアチニン値は増加し、尿中のクレアチニン値は減少していた。BUN 値が変化したシスプラチン投与後 3 日の尿中 Na⁺濃度は減少し、尿中 K⁺濃度は増加していた。これらの変動はいずれもシスプラチン投与後 7 日には回復していた。

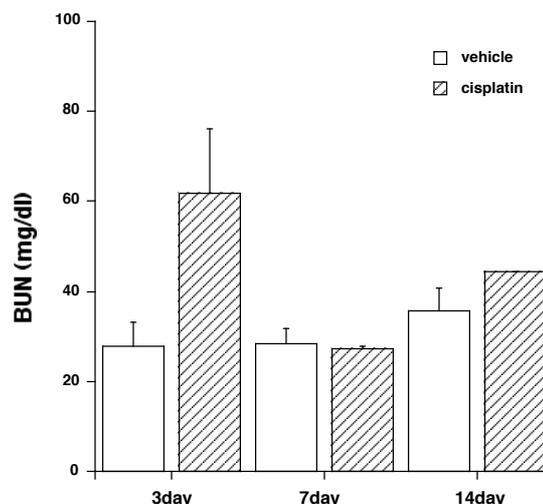
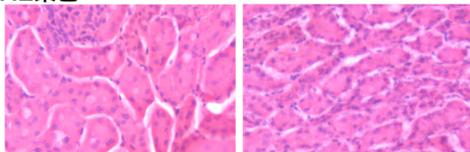


図 1. シスプラチン投与による血清尿素窒素の上昇

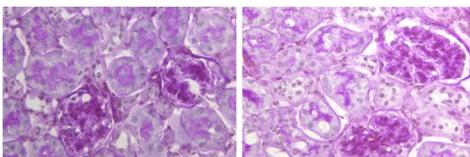
(2) 組織染色

シスプラチン投与3日後の腎凍結切片を一般的な染色法である HE 染色をしたところ、対照群と比べて尿細管腔がつぶれてヘマトキシリン陽性の核が増えているのが観察された (図 2A)。また、腎生検の中心的な染色法である PAS 染色をおこなったところ、間質部位が増えていた (図 2B)。一方、膠原線維を染色するアザン染色ではほとんど変化は観察されなかったが、尿細管においては組織の障害が観察された (図 2C)。

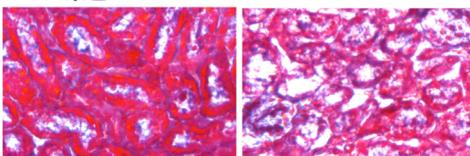
A) HE染色



B) PAS染色



C) Azan染色



Control

Cisplatin

図 2. 腎切片の組織染色像

(3) SOD Assay

シスプラチンによる腎不全には、活性酸素種による尿細管障害の関与が報告されている。そこで活性酸素の一つであるスーパーオキシドを消去する superoxide dismutase (SOD) の活性を測定した。シスプラチン投与14日の時点で、投与により血清の SOD 活性が低下し、腎 Lysate の SOD 活性も低下傾向を示した。

(4) 腎タンパク質のウエスタンブロッティング

病態因子の検出のため、腎タンパク質を各種抗体でウエスタンブロッティングをおこなった。細胞増殖に関わる ERK、Akt、細胞ストレスのシグナルに関わる p38MAPK、JNK、脂質酸化損傷マーカーである 4-HNE、線維化マーカーである Hsp47、結合組織増殖因子の CTGF、アポトーシスの誘導に関わる TNF- α についてシスプラチン投与3日後のサンプルを用いて検討したが、シスプラチンの有無で顕著な差は認められなかった。

(5) 腎 lysate の Rho の活性

Rho-Rho キナーゼ系の活性化は細胞の接着、増殖の調節、アポトーシスなど広い範囲にわたり細胞機能を調節することが知られている。そこで、シスプラチンの有無による腎タンパク質の Rho の活性を測定した。シスプラチン投与3日後の時点で、シスプラチン投与群はコントロールに比べて Rho の活性が上昇していた (図 3)。

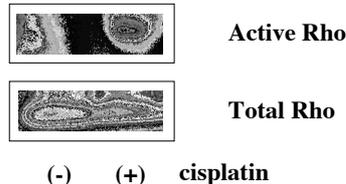


図 3. シスプラチンによる腎 lysate の Rho 活性上昇

(6) 腎 mRNA のリアルタイム PCR

腎組織から Total RNA を抽出後、逆転写反応をおこなって得た cDNA に対して炎症に関与する COX-2、線維化に関与する TGF- β の発現の変化をリアルタイム PCR にて検討した。シスプラチン投与3日後の時点で、投与により COX-2 の発現は約 3.9 倍、TGF- β の発現は約 2.7 倍に増加した (図 4)。

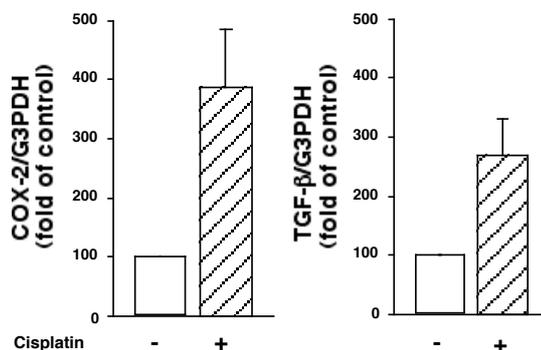


図 4. シスプラチンによる COX-2 および TGF- β 遺伝子発現の上昇

(7) まとめ

以上の結果より、我々はシスプラチンを用いたマウスの実験的急性腎障害モデルを作成し、その BUN 値、クレアチニン値、組織染色像から腎障害を確認した。このモデルにおいて、障害初期の時点で炎症の指標となる COX-2 および TGF- β の遺伝子発現が上昇しており、また SOD 活性も上昇したことから、速い段階から組織障害および炎症に関わる重要な因子の変動が関わっていることが示唆された。また興味深いことに、この時、低分子 G タンパク質である Rho の活性化が認められた。レニン-アンジオテンシン系の活性化は G_{12/13} タンパク質を介して Rho、Rho キ

ナーゼ系を活性化するため、レニン-アンジオテンシン系の特異的遮断薬が腎不全に対する保護効果を示している一因としてのRhoの役割の解明がますます重要になると考えられる。

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)

現時点では未発表

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 真 (YOSHIDA MAKOTO)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：90201011

(2) 研究分担者

本間 成佳 (HONMA SHIGEYOSHI)

高崎健康福祉大学・薬学部・助教

研究者番号：20344682

(3) 連携研究者