

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月8日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591189

研究課題名（和文） Apelin-APJ systemを標的とした腎線維化治療の検討

研究課題名（英文） The study for the potential therapeutic option of targeting apelin-APJ system for renal fibrosis.

研究代表者

西田 眞佐志 (NISHIDA MASASHI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：50275202

研究成果の概要（和文）：片側尿管結紮によるマウス腎線維化モデルにおいて、Apelin 皮下投与などの実験により、Apelin-APJ system が Akt-eNOS 経路を介し NO 産生を亢進することにより、腎保護作用を示すことが示唆された。さらに同モデルにおいてロサルタン投与および APJ レセプター拮抗剤投与などの実験により、ロサルタンによる腎保護作用は、一部には Apelin-APJ system を介するものであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In a mouse model of unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis, the experiments with subcutaneous administration of apelin suggested that the apelin-APJ system exerts renoprotective effect through increased NO production via Akt-eNOS pathway. Furthermore, treatments with losartan and an APJ receptor antagonist in this model suggested that the renoprotective effect with losartan treatment is, at least in part, through the apelin-APJ system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：腎線維化、Apelin、APJ receptor、UUO、Nitric Oxide、アンギオテンシン II、アンギオテンシン受容体拮抗薬

1. 研究開始当初の背景

腎糸球体および間質の線維化は、原因の如何を問わずほぼすべての腎疾患において認められる最終的な病理組織像であり、この病変が広がることにより臨床的に末期腎不全を呈する。特に、腎間質に線維化が起こると病変は不可逆的となり、腎不全に至る。しかし、このような腎間質線維化の進展メカニズムの詳細については未だ不明な点も多く、そ

の有効な治療法も確立されていない。我々は現在まで、非免疫学的機序により短期間に腎間質線維化が誘導される動物モデルである片側尿管結紮(UUO)モデルを用い、特にその間質浸潤マクロファージに焦点をあてて腎間質線維化進展のメカニズムについて研究を進めてきた。

一方、UUOモデルでは、尿管結紮後早期より腎組織中におけるレニンやアンギオテンシ

ン II (Ang II) の産生の亢進が認められ、アンジオテンシン変換酵素阻害剤 (ACE 阻害剤) や angiotensin II type 1 receptor 拮抗剤 (ARB) などの投与により腎線維化の軽減がみられることから、renin-angiotensin 系 (RA 系) の亢進が腎線維化の重要な促進因子と考えられてきた。実際に、現在腎線維化を来す種々の腎疾患において RA 系の亢進が重要な線維化促進因子と考えられており、ACE 阻害剤や ARB の投与により臨床的にも腎障害の軽減が認められ、これらの薬剤は臨床的に腎疾患の治療のためにしばしば用いられている。

Apelin の receptor である APJ は、angiotensin II type 1 receptor (AT1 receptor) と多くの相同性をもつ G-protein-coupled receptor として 1993 年に同定された。さらに 1998 年に APJ receptor の ligand として Apelin が発見され、その後 Apelin-APJ system の生理作用に関する研究が進められてきた。現在までの研究により、Apelin とその receptor である APJ は心血管系、中枢神経系、腎臓、肺などの種々の臓器において発現と活性が認められ、その幅広い生理作用が明らかになってきた。心血管系の作用に関しては、2000 年に始めてラットにおいて Apelin の静脈内投与により収縮期/拡張期血圧の一過性の低下が報告され、その後この作用は Apelin の血管内皮細胞における PI3K/Akt-eNOS を介する Nitric Oxide (NO) の産生による作用であることが報告された。さらに、APJ knockout マウスでは Ang II に対する昇圧反応が増強されることより、Apelin-APJ system の Ang II-AT1 system に対する拮抗的な作用が想定されてきた。さらに ApoE knockout マウスにおける Ang II 投与による動脈硬化や腹部大動脈瘤の形成についても、Apelin の同時投与によりこのような Ang II による反応の消失がみられ、この Apelin の Ang II に対する拮抗的作用は NO を介するものであることが報告された (Chun HJ et al. J Clin Invest 2008)。腎においてもラット腎の皮質、髄質で APJ の発現が報告され、Apelin は腎糸球体においても Ang II の作用に拮抗する血管作動性作用を有することが報告された (Hus-Citharel A et al. Kidney Int 2008)。これらの報告より、Apelin は腎に対しても種々の生理作用を示すことが想定されるが、その詳細は不明であり、腎線維化に対する Apelin の作用についても現在まで報告されていない。

2. 研究の目的

以上の背景より、今回 Apelin-APJ system の腎線維化に対する影響の詳細を検討し、Apelin-APJ system を標的とした腎線維化に対する治療応用の可能性を検討する目的で

研究を行った。

3. 研究の方法

腎線維化に対する Apelin の影響を検討する目的で、マウス UUO モデルにおいて、ミニ浸透圧ポンプを用い、(Pyr1)-apelin-13 (2mg/kg/day) を UUO day 0 から day 7 にかけて皮下投与した。このモデルでコントロール群、Apelin 投与群、Apelin+L-NAME 投与群で UUO day 7 の腎組織における腎線維化の程度、myofibroblast 蓄積量、アポトーシスの程度、間質浸潤マクロファージ数をそれぞれ腎組織を用いた Masson 染色、腎組織中ハイドロキシプロリン含有量の HPLC による定量、 α -SMA 染色、TUNEL 法、F4/80 免疫染色などにより検討した。また UUO 腎における APJ receptor 蛋白の発現、リン酸化 eNOS、リン酸化 Akt 蛋白の発現をウエスタンブロット法により検討した。さらに ARB 投与による腎保護作用における Apelin の関与を検討する目的で、マウス UUO モデルでロサルタンを UUO day 0 から day 7 にかけて経口投与し、コントロール群、ロサルタン投与群、ロサルタン+F13A (選択的 APJ receptor 拮抗剤) 投与群、ロサルタン+L-NAME 投与群について検討を行った。本モデルでも UUO day 7 の腎組織で腎線維化の程度、myofibroblast 蓄積量、間質浸潤マクロファージ数を検討し、また UUO 腎におけるリン酸化 eNOS、リン酸化 Akt 蛋白の発現をウエスタンブロット法により、Apelin mRNA、APJ receptor mRNA の発現を real time RT-PCR 法により検討した。

4. 研究成果

(1) 結果

① UUO 腎における Apelin mRNA、APJ receptor mRNA、APJ receptor 蛋白の発現

UUO day 7 において、UUO 腎では nonobstructed kidney (NOB) と比べ、Apelin mRNA、APJ receptor mRNA の発現はともに有意に増加しており (the ratio to GAPDH mRNA, apelin: 0.37 ± 0.04 vs. 0.65 ± 0.12 , $p < 0.05$, $n = 6$ in each group; APJ receptor: 0.13 ± 0.01 vs. 0.97 ± 0.03 , $p < 0.01$, $n = 6$)、APJ receptor 蛋白の発現も増加を認めた (the ratio of APJ receptor to α -tubulin protein; 0.41 ± 0.06 vs. 0.70 ± 0.04 , $P < 0.01$, $n = 5$)。

② Apelin 投与の血圧に対する影響

Apelin 投与により、マウス収縮期血圧は、UUO 前、UUO day 3、day 7 において有意な変動を認めなかった (UUO 前; 109 ± 5 vs. 110 ± 5 mmHg, NS; day 3; 101 ± 5 vs. 98 ± 5 , NS; day 7; 103 ± 4 vs. 98 ± 3 , NS, $n = 6$ in each group)。

③ Apelin 投与の腎線維化に対する影響

Apelin投与により、UUO day 7においてMasson point count法による間質collagen indexはコントロール群と比べ有意に減少し(67 ± 3 vs. 42 ± 4 / 1000 points, P < 0.01, n = 8 in control and n = 9 in apelin group)、HPLC法による腎組織中コラーゲン量も有意に減少した(hydroxyproline; 8.0 ± 0.4 vs. 6.3 ± 0.3 nmol/mg wet weight, P < 0.01, n = 8 in control and n = 7 in apelin group)。しかしApelinと同時にL-NAMEを投与した場合、collagen index、コラーゲン量ともにApelin投与群、コントロール群と比べ有意に増加した(collagen index; 83 ± 3 in apelin + L-NAME group, P < 0.01 vs. apelin group, P < 0.05 vs. control, n = 8; hydroxyproline; 9.3 ± 0.4 in apelin + L-NAME group, P < 0.01 vs. apelin group, P < 0.05 vs. control, n = 7)。

④ Apelin 投与の myofibroblast 蓄積量に対する影響

Apelin投与により、UUO day 7において α -SMA scoreによる間質myofibroblast蓄積量はコントロール群と比べ有意に減少した(α -SMA score; 1.89 ± 0.09 vs. 1.32 ± 0.08, P < 0.01, n = 8 in control and n = 9 in apelin group)。しかしApelinと同時にL-NAMEを投与した場合、間質myofibroblast蓄積量はApelin投与群と比べ有意に増加した(2.32 ± 0.13 in apelin + L-NAME group, P < 0.01 vs. apelin group, n = 8)。

⑤ Apelin 投与の尿細管アポトーシスに対する影響

TUNEL陽性アポトーシス細胞はUUO day 7において尿細管上皮でみられたが、Apelin投与により、UUO day 7におけるTUNEL陽性細胞数はコントロール群と比べ有意に減少した(8.2 ± 0.5 vs. 3.7 ± 0.05 / ×400 field, P < 0.01, n = 8 in control and n = 9 in apelin group)。しかしApelinと同時にL-NAMEを投与した場合、TUNEL陽性細胞数はApelin投与群、コントロール群と比べ有意に増加した(11.2 ± 0.7 in apelin + L-NAME group, P < 0.01 vs. apelin group, P < 0.05 vs. control, n = 8)。

⑥ Apelin 投与の間質マクロファージ浸潤に対する影響

Apelin投与により、UUO day 7における間質浸潤マクロファージ数はコントロール群と比べ有意な変動を認めなかった(24.1 ± 1.4 vs. 23.6 ± 1.5 / ×400 field, NS, n = 8 in control and n = 9 in apelin group)。しかしApelinと同時にL-NAMEを投与した場合、間質浸潤マクロファージ数はApelin投与群、コントロール群と比べ有意に増加した(37.4 ± 1.4 in apelin + L-NAME group, P < 0.01 vs. apelin group, P < 0.01 vs. control, n = 8)。

⑦ Apelin 投与のリン酸化 eNOS およびリン

酸化 Akt 蛋白の発現に対する影響

phospho-eNOSおよびphospho-Akt蛋白発現は、UUO day 7においてNOBと比べともに有意に増加していた(the ratio to α -tubulin protein; p-eNOS; 0.17 ± 0.02 vs. 1.12 ± 0.11, P < 0.01, n = 6 in each group; p-Akt; 0.13 ± 0.02 vs. 0.41 ± 0.03, P < 0.01, n = 6 in each group)。Apelin投与により、これらの蛋白発現はコントロール群と比べさらに有意に増加した(p-eNOS; 2.43 ± 0.14, P < 0.01 vs. control, n = 6; p-Akt; 0.75 ± 0.03, P < 0.01 vs. control, n = 6)。

⑧ ロサルタン投与の UUO 腎における Apelin mRNA、APJ receptor mRNA 発現に対する影響

UUO day 7においてUUO腎のApelin mRNAおよびAPJ receptor mRNA発現はNOBと比べ有意に増加したが、ロサルタン投与によりApelin mRNAの発現はコントロール群と比べさらに有意に増加した(0.90 ± 0.03, P < 0.05 vs. control group, n = 6)。APJ receptor mRNAの発現については有意な変化を認めなかった(0.98 ± 0.03, NS vs. control group, n = 6)。

⑨ ロサルタン投与の血圧に対する影響

コントロール、ロサルタン投与、ロサルタン + F13A投与、ロサルタン + L-NAME投与の各群間で、マウス収縮期血圧は、UUO前、UUO day 3、day 7において有意な変動を認めなかった(control; losartan; losartan + F13A; losartan + L-NAME groups, respectively; UUO前: 108 ± 4; 97 ± 2; 96 ± 2; 98 ± 4 mmHg, NS among groups; day 3: 97 ± 3; 94 ± 1; 97 ± 2; 95 ± 1, NS among groups; day 7: 102 ± 3; 94 ± 2; 95 ± 2; 93 ± 6, NS among groups; n = 9 in control group, n = 8 in losartan group, n = 6 in losartan + F13A and losartan + L-NAME groups)。

⑩ ロサルタン投与の腎線維化に対する影響

ロサルタン投与により、UUO day 7においてMasson point count法による間質collagen indexはコントロール群と比べ有意に減少した(64 ± 3 vs. 41 ± 4/1,000 points, P < 0.01, n = 9 in control group and n = 8 in losartan group)。しかしロサルタンと同時にF13AまたはL-NAMEを投与した場合、collagen indexはロサルタン投与群、コントロール群と比べ有意に増加した(83 ± 3 in losartan + F13A group, P < 0.01 vs. losartan group, P < 0.05 vs. control group, n = 6; 84 ± 3 in losartan + L-NAME group, P < 0.01 vs. losartan group, P < 0.05 vs. control, n = 6)。

⑪ ロサルタン投与の myofibroblast 蓄積量に対する影響

ロサルタン投与により、UUO day 7において α -SMA scoreによる間質myofibroblast蓄積量はコントロール群と比べ有意に減少した

(α -SMA score; 1.88 ± 0.09 vs. 1.32 ± 0.08 , $P < 0.01$, $n = 9$ in control group and $n = 8$ in losartan group)。しかしロサルタンと同時にF13AまたはL-NAMEを投与した場合、間質myofibroblast蓄積量はロサルタン投与群、コントロール群と比べ有意に増加した(2.38 ± 0.14 in losartan + F13A group, $P < 0.01$ vs. losartan group, $P < 0.05$ vs. control group, $n = 6$; 2.43 ± 0.08 in losartan + L-NAME group, $P < 0.01$ vs. losartan group, $P < 0.05$ vs. control group, $n = 6$)。

⑫ ロサルタン投与の間質マクロファージ浸潤に対する影響

ロサルタン投与により、UUO day 7における間質浸潤マクロファージ数はコントロール群と比べ有意に減少した(24.0 ± 1.2 vs. $17.6 \pm 1.5/\times 400$ field, $P < 0.01$, $n = 9$ in control group and $n = 8$ in losartan group)。しかしロサルタンと同時にF13AまたはL-NAMEを投与した場合、間質浸潤マクロファージ数はロサルタン投与群、コントロール群と比べ有意に増加した(34.4 ± 1.5 in losartan + F13A group, $P < 0.01$ vs. losartan group, $P < 0.01$ vs. control group, $n = 6$; 36.0 ± 1.6 in losartan + L-NAME group, $P < 0.01$ vs. losartan group, $P < 0.01$ vs. control, $n = 6$)。

⑬ ロサルタン投与のリン酸化 eNOS およびリン酸化 Akt 蛋白の発現に対する影響

phospho-eNOSおよびphospho-Akt蛋白発現は、UUO day 7においてともにNOBと比べ有意に増加していた(the ratio to α -tubulin protein, p-eNOS: 0.20 ± 0.02 vs. 0.72 ± 0.11 , $P < 0.01$, $n = 6$ in each group; p-Akt: 0.13 ± 0.02 vs. 0.41 ± 0.03 , $P < 0.01$, $n = 6$ in each group)。ロサルタン投与により、これらの蛋白発現はコントロール群と比べさらに有意に増加した(p-eNOS: 2.74 ± 0.18 , $P < 0.01$ vs. control group, $n = 6$; p-Akt: 0.83 ± 0.07 , $P < 0.01$ vs. control group, $n = 6$)。しかしロサルタンと同時にF13Aを投与した場合、ロサルタンのこれらの蛋白発現に対する影響は有意に抑制された(p-eNOS: 0.81 ± 0.12 , $P < 0.01$ vs. losartan group, $n = 6$; p-Akt: 0.43 ± 0.03 , $P < 0.01$ vs. losartan group, $n = 6$)。

(2) 考察

本研究ではUUO腎においてApelin mRNA、APJ receptor mRNA、APJ receptor 蛋白の発現増強がみられることが示された。これはUUO腎における腎線維化にApelin-APJ systemが関与していることを示唆するものであった。

さらに本研究で、マウスUUOモデルにおいてApelinを持続的に皮下投与した場合、腎線維化、myofibroblast蓄積量、尿管管におけるアポトーシスの減少がみられ、UUO腎に

におけるApelinの腎保護作用が示された。以前の報告において、Apelinが血管内皮に作用してNOの産生を亢進させること、UUO腎においてNOが腎保護作用を示すことなどが明らかとなっているため、Apelinの腎保護作用の機序につき検討する目的で、本モデルにおいてApelin投与によるNO産生経路であるAkt、eNOSのリン酸化に対する影響、NO合成阻害剤であるL-NAMEの影響などについて検討した。今回の検討で、Apelin投与により、UUO腎においてAkt、eNOSのリン酸化が亢進することが示され、L-NAMEをApelinと同時に投与した場合は、Apelinによる腎保護作用はすべて抑制されることが明らかとなった。これらの結果は、Apelinによる腎保護作用に、Akt-eNOS経路を介するNO産生亢進が関与していることを裏付けるものであった。

さらに本研究では、ARB(ロサルタン)投与による腎線維化抑制作用におけるApelin-APJ systemの関与につき検討した。ロサルタン投与時にはコントロール群と比べUUO腎におけるApelin mRNAの発現増加がみられ、同時にAktおよびeNOSのリン酸化にも増加がみられた。このAkt、eNOSのリン酸化の亢進はAPJ receptorの拮抗剤であるF13Aをロサルタンと同時に投与することにより抑制された。それと同時に、F13A投与により、ロサルタン投与による腎線維化軽減作用は消失し、ロサルタンと同時にL-NAMEを投与した場合も腎障害の増悪がみられた。これらの結果より、ARB投与による腎保護作用においても、Apelin-APJ-Akt-eNOS経路を介するNO産生の亢進が関与していることが示唆された。

今回の研究成果は、Apelin-APJ systemの腎線維化への関与を始めて明らかにした意義深いものと考えられる。現在、腎線維化の進展を抑制するための治療法としてACE阻害剤やARBなどのRA系を阻害する薬剤が広く使用されているが、今回このARBの作用にもApelin-APJ systemが関わっていることが示された。今後さらにApelin-APJ systemを標的とした腎線維化に対する治療法開発が期待され、今回の研究成果はそのための足がかりとなるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Nishida M, Hamaoka K. The Apelin-APJ system: its role in renal physiology and potential therapeutic applications for renal disease. *OA Nephrology* 2013;01:1:7. (査読有)
<http://www.oapublishinglondon.com/o-a-nephrology>
- ② Nishida M, Okumura Y, Oka T, Toiyama K, Ozawa S, Itoi T, Hamaoka K. The role

of apelin on the alleviative effect of angiotensin receptor blocker in unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis. Nephron Extra 2012;2:39-47. (査読有) DOI: 10.1159/000337091

③ Nishida M, Okumura Y, Oka T, Toiyama K, Ozawa S, Itoi T, Hamaoka K. Exogenous apelin ameliorates renal fibrosis in obstructive nephropathy. Current Topics in Biochemical Research 2012;14:17-24. (査読有) <http://www.researchtrends.net/tia/volumes.asp?id=40>

④ Nishida M, Hamaoka K. The apelin-APJ and renin-angiotensin systems. Current Topics in Biochemical Research 2011;13:21-25. (査読有) <http://www.researchtrends.net/tia/volumes.asp?id=40>

[学会発表] (計7件)

① Nishida M, Okumura Y, Hamaoka K. The role of apelin for the alleviative effect of angiotensin receptor blocker in UUO-induced renal fibrosis. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, 2011. 6. 2-4. Fukuoka.

② 西田眞佐志、奥村保子、濱岡建城 : UUO腎線維化モデルにおけるARB投与時のApelinの役割、第54回日本腎臓学会総会、2011. 6. 15-17. 横浜

③ Nishida M, Okumura Y, Hamaoka K. The effects of apelin on obstructive nephropathy. The 43rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2010. 11. 18-21. Denver, CO, USA.

④ 西田眞佐志、奥村保子、濱岡建城 : UUOモデルの腎線維化における内因性Apelinの役割、第53回日本腎臓学会総会、2010. 6. 16-18. 神戸

⑤ 西田眞佐志、奥村保子、濱岡建城 : UUOモデルの腎線維化における内因性Apelinの役割、第45回日本小児腎臓病学会、2010. 7. 2-3. 大阪

⑥ 西田眞佐志、奥村保子、濱岡建城 : 腎線維化の進展に対するApelinの影響、第52回日本腎臓学会総会、2009. 6. 3-5. 横浜

⑦ 西田眞佐志、奥村保子、濱岡建城 : 腎線維化の進展に対するApelinの影響、第44回日本小児腎臓病学会、2009. 6. 26-27. 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 眞佐志 (NISHIDA MASASHI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号 : 50275202

(2) 研究分担者

浜岡 建城 (HAMAOKA KENJI)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 60189602

(3) 連携研究者

なし