

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 24 年 4 月 24 日現在

機関番号：32620
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2010～2011
課題番号：22790803
研究課題名（和文） 近位尿細管の尿中 L 型脂肪酸結合蛋白を介した腎内 RAS の調節機構並びに関連病態の解析
研究課題名（英文） Amelioration of AngiotensinII-induced salt-sensitive hypertension by L-FABP in proximal tubules
研究代表者
谷藤 千暁（TANIFUJI CHIAKI）
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：80449058

研究成果の概要（和文）：高血圧の病態や進行には、腎内レニン・アンジオテンシン系（RAS）が生成する酸化ストレスが関与している。ヒト近位尿細管で産生される L 型脂肪酸結合蛋白（L-FABP）の抗酸化作用が、腎内 RAS の活性化を抑制すると考え、近位尿細管 L-FABP と腎内 RAS の高血圧発症における役割を検証したところ、近位尿細管の L-FABP の存在が抗酸化ストレス作用を介して、腎内 RAS の産生を抑制させることで食塩感受性高血圧の発症を抑制する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Recent findings indicated that inappropriate activation of the intrarenal renin-angiotensin system (RAS) induces reactive oxygen species production, which may contribute to salt-sensitive hypertension. On the other hand, L-FABP is expressed in renal proximal tubules in humans and may play an endogenous antioxidant role. The present study is to examine the antioxidative effect of L-FABP on salt-sensitive hypertension. The present findings indicated that L-FABP in proximal tubules may protect against AngII-induced SSHT in combination with attenuation of intrarenal RAS activation, oxidative stress. Therefore, L-FABP of proximal tubules may play a pathological role in SSHT.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：L-FABP、食塩感受性高血圧、レニン・アンジオテンシン系、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

本邦における高血圧や Chronic Kidney Disease (CKD) の患者数は増加の一途をたどっており、CKD 患者の心血管病変による死亡数も急速に増えている。よって、日本国民の

健康を守り、医療費の抑制を行うことは急務である。

腎内 RAS は全身の RAS とは独立して存在し、高血圧、CKD や CVD の病態に重要な役割をしている。腎内 RAS は酸化ストレスの産生を介

して炎症性サイトカインの産生を惹起し、T細胞の腎尿細管間質への浸潤を促す。浸潤したT細胞はそれ自体がアンジオテンシンII (Ang II) の供給源となるため、腎局所のRAS活性はさらに亢進するという悪循環がCKDの進展のみならず、高血圧、特に食塩感受性高血圧の病態形成に深く関わるとされる。

一方、L-FABPはヒトの近位尿細管細胞に発現し、抗酸化作用を有している。げっ歯類の近位尿細管細胞にはL-FABPが発現していないため、ヒトL-FABP染色体遺伝子を近位尿細管に強発現させた遺伝子改変マウス(L-FABPTg)が作成され、L-FABPが抗酸化作用を介して腎保護的に働くことや、早期腎障害のバイオマーカーとなりうることなどが報告されている(*Am J Pathol.* 2004, *Kidney Int.* 2007, *JASN.* 2007, *NDT.* 2009)。

近位尿細管L-FABPは、腎内RAS活性の律速部位である近位尿細管に発現しており、その抗酸化作用を介して腎内RASの活性化ならびに炎症細胞の浸潤を抑制し、腎内RAS活性化の悪循環を断ち切り、CKD・高血圧の治療の新しい切り口となる可能性が考えられるが、L-FABPが腎内RASに与える影響はいまだ不明である。

2. 研究の目的

今回の実験では、近位尿細管L-FABPが抗酸化作用により、腎内RASがもつ酸化ストレスを介する炎症性サイトカイン産生による炎症細胞浸潤並びにその後の食塩感受性高血圧の発症に対して抑制的に働くことを実験的に証明することを目的とする。具体的には、L-FABPを発現しているL-FABPトランスジェニックマウス(L-FABPTg)とL-FABPを発現しないWild typeマウスにAng IIを持続皮下注することで腎内RASを活性化させ、腎臓内でのRASの活性化の度合いと腎内RASの活性化により引き起こされる食塩感受性高血圧やCKDの程度を比較する。また、マウス近位尿細管細胞とL-FABPをトランスジーンしたマウス近位尿細管細胞を用い、L-FABPの有無でAng IIに対する反応を検討することでL-FABPによる腎内RASの抑制のより詳細な機序を解明する。

これまでに、近位尿細管L-FABPによる高血圧発症に対する自己防御機構を直接的に証明した報告はない。前述のように、げっ歯類には近位尿細管にL-FABPが発現していないことから、これまでマウスやラットを用いたモデルでの証明が困難であった。しかし、我々の有するL-FABPTgマウスを用いることで、自己防御機構の証明ならびに詳細な機序の証明が可能となった。

本研究により、L-FABPを介して高血圧発症抑制が明らかになれば、近年注目されている心腎連関の病態の解明・診断並びに治療の新しい切り口となり、CKD・高血圧・心血管障

害の診療や膨大な医療費削減に与える影響ははかりしれない。

3. 研究の方法

(1)マウスにAng IIを4週間持続皮下注することで、腎内RASの活性化を惹起することが出来る。腎内RASの活性化により尿細管間質へのT細胞の浸潤が誘発された後に高食塩食を負荷すると、食塩感受性高血圧が誘発されることが証明されている。この食塩感受性高血圧モデルをwild typeマウスとL-FABPTgに対して用いることで近位尿細管L-FABPと腎内RASの関係について検討する。

1. 浸透圧ミニポンプを用い、Vehicleコントロール群とAng IIを500ng/kg/minの濃度で持続皮下注するアンジオテンシン投与群に分け、C57BL/6Jの雌のWild typeマウスとL-FABPTgにそれぞれ4週間持続皮下注を行った。そして、Ang II持続皮下注終了後、高食塩食(6%食塩食、生理食塩水)投与した。

2. 各群の血圧、腎内RASの活性化、腎臓内の酸化ストレス、炎症性サイトカインの産生やT細胞の浸潤について評価した。腎内RASの活性化は腎並びに尿中のアンジオテンシノーゼン(AGT)、腎内酸化ストレスマーカーとして4-HNE、HO-1、8-OHdG、炎症性サイトカインとしてMCP-1、T細胞浸潤はCD3の免疫染色で評価した。

(2)マウス近位尿細管細胞のcell lineであるmProxとmProxにヒトL-FABPを遺伝子導入した細胞(mProxTg)をAng IIで刺激し、AGT、炎症性サイトカイン(MCP-1)や酸化ストレスマーカー(HO-1)などの発現を検討する。

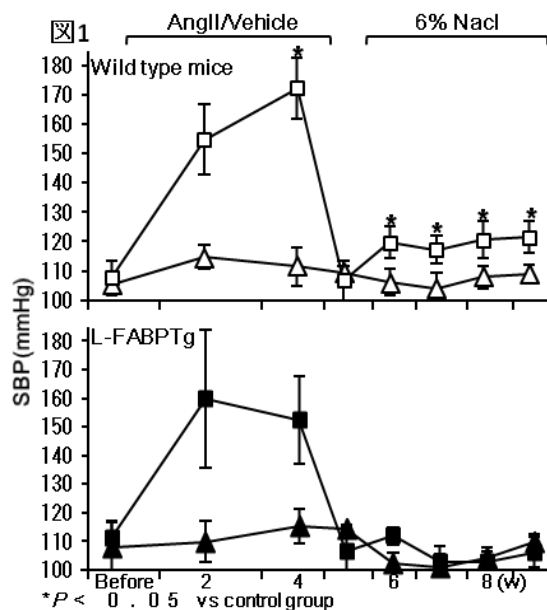
4. 研究成果

(1)

1. 血圧の変動および食塩感受性高血圧の誘発の有無

wild typeマウスとL-FABPTgに対しAng IIの投与後の高食塩負荷で、食塩感受性高血圧の誘発の有無を検討した。

図1の上段に示すように、Wild typeマウスではAng II投与中に持続的な血圧の上昇を認め、Ang IIの投与終了後の高食塩負荷で食塩感受性高血圧が誘発されたが、下段に示すL-FABPTgではAng II投与で血圧の上昇は認められたものの2週間で血圧の上昇が止まり、その後の高食塩食による食塩感受性高血圧は認められなかった。

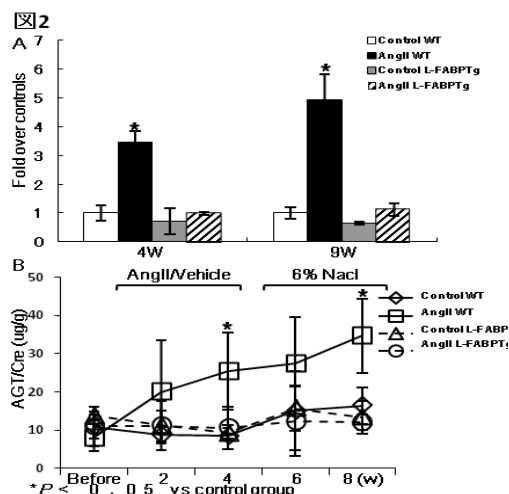


2. 腎内 RAS の活性化の評価

腎内 RAS の活性化の評価として、腎内 RAS の活性化と相関することが証明されている腎内 AGT の発現を確認した。腎内 AGT の発現の評価として、腎内 AGT の免疫染色と腎内 AGT の発現量との相関が報告されている尿中 AGT の濃度を測定した。

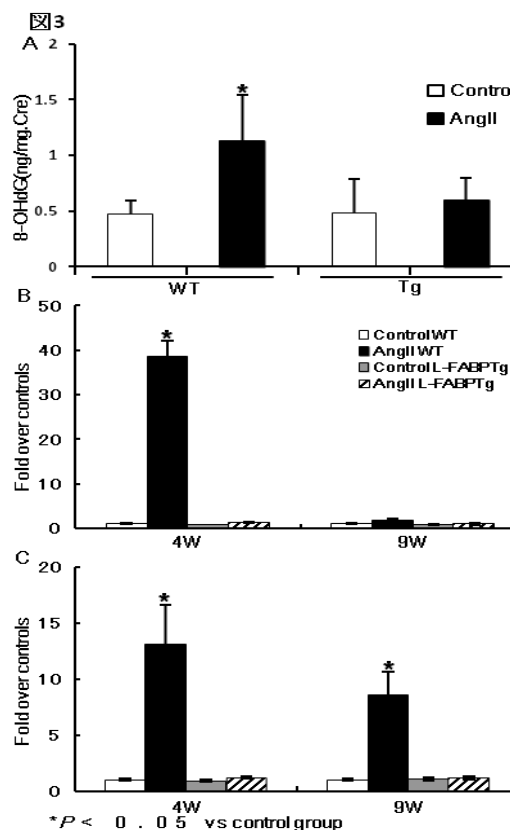
腎内 AGT を免疫染色したものを KS-400 で定量化した (図 2. A)。腎内 AGT の主要産生部位である近位尿細管の AGT の発現は、Ang II 投与中の wild type マウスの Ang II 投与群で増加し、Ang II 投与後も AGT の発現は亢進していた。L-FABPTg では全過程において、Ang II 投与群でも AGT のタンパク発現は抑制されていた。

図 2. B は尿中 AGT の濃度をクレアチニン補正したものである。wild type マウスでは尿中 AGT も Ang II 投与中から増加し、高食塩食投与でさらに増加したが、L-FABPTg では全行程を通して尿中 AGT の増加は認められなかった。



3. 腎内酸化ストレスの評価

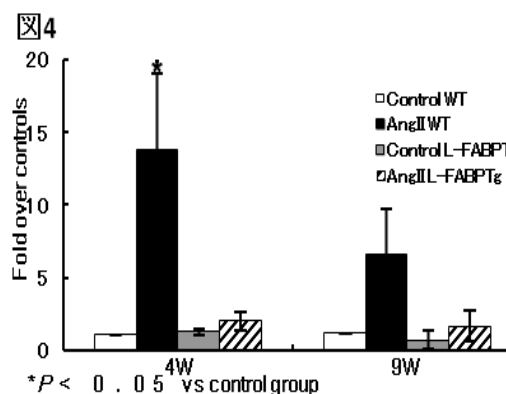
腎内酸化ストレスの程度を、尿中 8-OHdG と腎臓 4 HNE と HO-1 で各々評価した。尿中 8-OHdG の ELISA 測定 (図 3. A) と腎組織の 4 HNE の免疫染色 (図 3. B)、腎組織の HO-1 の免疫染色 (図 3. C) は共に Ang II 投与中の wild type マウスに比べ、L-FABPTg では発現が有意に抑制された。



4. 腎内炎症性サイトカインの発現の評価

腎臓の炎症性サイトカインの発現を MCP-1 で確認した。(図 4)

wild type マウスの MCP-1 の発現は、Ang II 投与で増加し、Ang II 投与中止後もその発現は亢進していた。一方、L-FABPTg では全過程において、Ang II 投与でも MCP-1 のタンパク発現は抑制されていた。

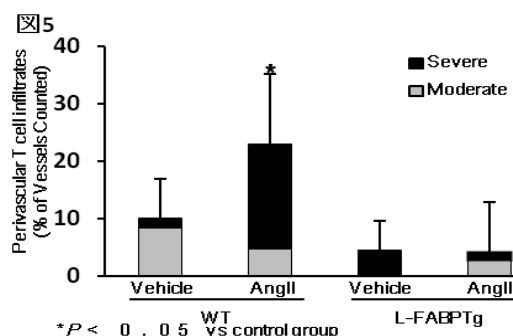


5. 腎血管周囲へのT細胞の浸潤の評価

前述の通り、尿細管間質に浸潤したT細胞は、食塩感受性高血圧の病態形成に深く関わっている。そこで、T細胞を認識する抗CD3抗体を用い、T細胞の腎血管周囲への浸潤の程度を検討した。

定量的評価法だが、血管周囲へのT細胞の数を、全くなしをNormal、1個から4個をMinimal、5個から10個をModerate、11個以上をSevereとした。*(Kidney Int 1998)*

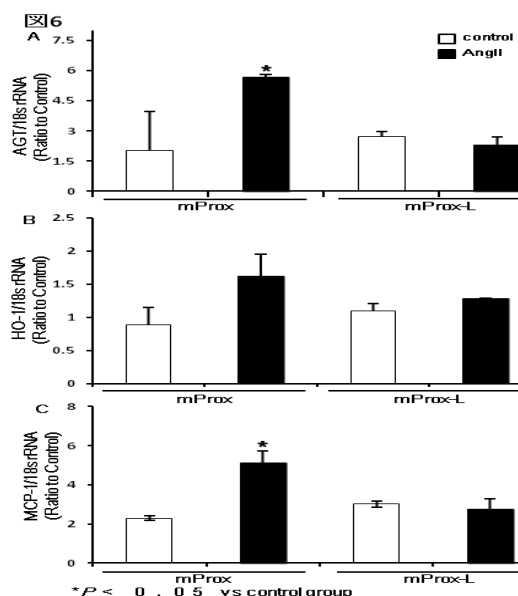
図5に示す通り、腎血管周囲へのT細胞の浸潤はwild typeマウスでは、AngII投与により著増していたが、L-FABPTgでは有意に抑制されていた。



(2)mProxとmProx-Lを用いたAngIIに対する近位尿細管細胞の反応の検討

この現象が近位尿細管細胞に特異的な現象であるか否かを調べるため、mProxとmProx-LをAngIIで刺激し、L-FABPの有無で各種マーカーの変化を検討した。

AngII刺激でAGTはmProxでは増加したが、mProx-Lでは有意に抑制された(図6.A)。さらに、AngII刺激で酸化ストレスマーカーであるHO-1(図6.B)と炎症性サイトカインであるMCP-1(図6.C)は、mProxでは増加したが、mProx-Lでは有意に抑制された。



(3) 考察

当研究グループは、これまでも近位尿細管L-FABPは抗酸化作用を通じて1)尿蛋白に伴う糸球体障害、2)腎虚血障害、3)尿細管間質障害に対し腎保護的に働くこと、また糸球体病変の進行抑制につながることを報告してきた。これらは、腎尿細管間質の炎症を惹起する腎内RASの活性化を誘発する律速部位である腎近位尿細管で、L-FABPの抗酸化作用が腎内RASの活性に対し抑制的に働くことを期待させるものであった。

今回の研究により、腎近位尿細管に発現したL-FABPは、抗酸化作用を介して腎内RAS活性と炎症性サイトカイン発現を抑制することで食塩感受性高血圧の原因となるT細胞の腎臓内への浸潤の抑制が示唆された。このことより、近位尿細管のL-FABPによる酸化ストレスの調節が、食塩感受性高血圧の感受性に関与していることが考えられた。

今後、L-FABPの腎内RAS活性並びに食塩感受性高血圧の抑制の詳細な機序についての検討が必要であるが、近位尿細管L-FABPの発現増強が高血圧の新たな治療の切り口となる可能性が考えられる。

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)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷藤 千暁 (TANIFUJI CHIAKI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80449058