

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461261

研究課題名(和文) 高血圧発症ApoE欠損マウスへのスタチン投与による腎保護のメカニズムの検討

研究課題名(英文) Examination of the mechanism of the renal protection with the statin administration to hypertension-induced ApoE deficient mouse

研究代表者

星賀 正明 (Hoshiga, Masaaki)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：90309154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂質異常症+高血圧モデルとしてApoE欠損マウスにAngiotensin II持続投与を行ったところ、糸球体の膨化および硬化所見とアルブミン尿が認められた。ARBオルメサルタンは、この腎障害を抑制したが、血管拡張薬ヒドララジンでは認められなかった。スタチン投与により、オルメサルタンと同様の腎障害抑制が認められた。脂肪沈着は限定的で、腎障害の主たるメカニズムではないと考えられた。この腎障害は、脂質異常症+高血圧の合併で認められたもので、臨床で認められる慢性腎臓病の初期を反映していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In ApoE deficient mouse with angiotensin II continuous infusion for 4 weeks as dyslipidemia combined hypertension model, glomerular swelling and sclerosis findings, and albuminuria were found. ARB olmesartan inhibited these renal injuries, but vasodilator hydralazine did not. Statin inhibited the renal injury as well as olmesartan. As the fatty deposition was restrictive, suggesting fatty accumulation is not a main mechanism of the renal injury in these mice. This renal injury is occurred when dyslipidemia and hypertension are combined, suggesting that this renal injury resembles early stage of CKD in human.

研究分野：循環器内科

キーワード：慢性腎臓病 高血圧 脂質異常症 アンジオテンシン

1. 研究開始当初の背景

脂質異常症は、心筋梗塞や脳血管障害など ADL を著しく損なう可能性のある疾患の背景因子として重要である。NIPPON DATA80 でも示されているように、脂質異常症は高血圧や糖代謝異常と相乗的にこれらの疾患のリスクを増加する。高血圧や脂質異常症が合併した場合の、より厳格なコントロールの必要性については、高血圧ガイドライン 2009 の血圧管理目標や、メタボリックシンドロームへの国民の注意喚起や特定健診・保健指導などの精神に現れているといえる。

血圧降下については、さまざまなクラスの降圧薬の使用が可能になってきているが、「臓器保護」という観点からレニンアンジオテンシン系 (RAS) の抑制薬が注目されている。ことに、AT1 受容体拮抗薬 (ARB) は、糖代謝異常症例に認められる蛋白尿の減少に有効性があることに加え、長期的な腎機能障害進行を抑制することが報告されており、腎保護という観点から ARB が注目されていた。

一方、脂質異常症+高血圧のモデル動物として、高脂血症モデルである ApoE 欠損マウスにアンジオテンシン II を持続投与する実験系が、腹部大動脈瘤や動脈硬化性プラークの進展などの研究に広く用いられてきた。われわれは、このモデルを用いて、大動脈弁硬化進展の検討を行い、RAS の関与および ARB の有効性を報告した (Fujisaka, Hoshiga, Hotchi, Takeda, Jin, Takai, Hanafusa, Ishizaka. Angiotensin II promotes aortic valve thickening independent of elevated blood pressure in apolipoprotein-E deficient mice. *Atherosclerosis*. 226;82-7, 2013)。しかし、このモデルで腎障害についての検討はほとんど行われていなかった。わずかに ApoE 欠損マウスにおいて、24 週齢以上の高齢や高脂肪食負荷状態において、腎系球体への脂肪沈着が報告されているが、これらは臨床においてはリポ蛋白代謝異常に伴う腎症で認められるもので、動脈硬化進展の危険因子として頻度の高い脂質異常症とは異なる。

アンジオテンシン II を持続投与するモデルでは、ラットにおいて腎臓の尿細管に鉄および脂肪沈着が生じることを研究分担者の石坂らが、報告してきた

(Ishizakaら *Lab Invest*. 82; 87-96, 2002 および Saito, Ishizakaら *Hypertension*46; 1180-5, 2005)。しかし、マウスにおけるアンジオテンシン投与の報告は限られている。

以上のことから、汎用される普通食飼育下 ApoE 欠損マウスにアンジオテンシン II 持続投与するモデルにおいては、脂質

異常症+高血圧という臨床上頻度の高い病態の腎障害が観察される可能性がある。そのメカニズムの解明および治療法の開発は、非常に意義深いと考えられた。治療法としては、降圧作用を超える腎保護効果が報告されている ARB の有効性が期待されるが、このようなモデルにおける検討はほとんどなかった。また、脂質異常症に対する脂質低下作用および抗炎症作用などの多面的作用をもつスタチンが脂質異常症+高血圧の腎病変に効果があるかどうか、については報告がなかった。

2. 研究の目的

脂質異常症+高血圧の動物モデルである ApoE 欠損マウスに普通食下でアンジオテンシン II を持続投与するモデルを用い、腎障害を生化学的および組織学的に検討し、発症メカニズムを明らかにすること。特に、野生型マウスと高脂血症マウスの 2 系統にそれぞれアンジオテンシン II を投与することにより、高脂血症と高血圧の影響を区別して検討すること。次に、上記モデルに ARB、他の血管拡張性降圧薬、スタチンを投与し、腎障害に対する効果を検討すること。

また、臨床例において、高血圧および脂質異常症の有無や腎機能などの臨床情報を蓄積し、尿サンプルの保存体制の完備を並行して行う。

3. 研究の方法

ApoE 欠損マウスおよび野生型マウス (C57BL/6) の雄性 12 週齢に対し、背部に、浸透圧ミニポンプを植込み、コントロール (生食群)、アンジオテンシン II (1.44mg/kg/day) およびノルエピネフリン (5.6mg/kg/day) を 28 日間投与した。普通食で飼育し、経過中の血圧を覚醒下で tail cuff 法を用い 1 週間毎に測定した。25 日目以降に代謝ケージにて 24 時間の蓄尿を行った。28 日目に採血後にマウスを安楽死せしめ、心臓、肝臓、腎臓などを摘出し、生化学的および組織学的および免疫組織学的な検討を行った。

生化学では、血清コレステロール、中性脂肪、クレアチニン、および 24 時間蓄尿中のアルブミンおよびクレアチニン値を測定した。また、ApoE 欠損マウスにアンジオテンシン II を投与するモデルを 4 群に分け、1) コントロール群 (普通食) 2) ARB 群 (オルメサルタン含有食) 3) ヒドララジン群 (ヒドララジン含有食) 4) スタチン群 (アトルバスタチンを経口ゾンデで毎日投与) で 28 日間飼育する実験系を用いた。

組織学的には、ヘマトキシリン・エオジン染色、マッソントリクローム染色、お

よび脂肪染色オイルレッド O 染色、酸化ストレスマーカーのジヒドロエチジウム染色を行った。また、免疫組織染色では、平滑筋細胞、マクロファージ、および内皮細胞の細胞マーカー染色を行った。定量は、糸球体/ポーマン氏嚢の面積比およびマツソントリクロームを用いて線維化の状態をスコア化した。画像解析には Image J ソフト、統計解析には JMP および SPSS を用いた。

4. 研究成果

アンジオテンシン II 投与により投与1週間より高血圧が持続するモデルが再現された (コントロール 104 ± 13 mmHg vs. アンジオテンシン II 投与 147 ± 16 mmHg) が、ノルエピネフリン投与では殆どが2週間以内に突然死をきたしモデルとしては確立できなかった。

高脂血症 (ApoE 欠損) の状態では、糸球体の膨化のみが認められた。一方、高血圧 (Angiotensin II 持続投与) では、糸球体の膨化および硬化所見が認められた。高脂血症 + 高血圧 (ApoE 欠損 + Angiotensin II) では、糸球体病変は最大になり、尿中アルブミンの排泄 ($300 \mu\text{g}/24\text{h}$) を認めた。

ARB オルメサルタンまたは血管拡張薬ヒドララジン投与により、血圧は同程度に有意に低下が認められたが、糸球体病変はオルメサルタン群のみに有意な抑制が認められた。この結果から、ARB には降圧効果以外の作用で、腎障害の軽減をもたらすことが示唆された。また、スタチン投与により、オルメサルタンと同様に尿中アルブミン排泄の軽減および糸球体病変の抑制が認められた。一方、オイルレッド O 脂肪染色では、ApoE 欠損 + Angiotensin II 群において、糸球体に脂肪沈着を認めたが、その頻度は 10% 以下であり、脂質沈着が今回の腎障害の主たるメカニズムではないと考えられた。これまで ApoE 欠損マウスの腎障害は認められないといった報告や、24 週齢以降の高齢マウスや高脂肪食負荷による脂質沈着を主体にする報告がある。今回認められた腎障害は、高脂血症 + 高血圧の合併ではじめて認められたものであり、軽微であるが尿蛋白の漏出を認めたものであることから、臨床で認められる CKD 初期を反映していると考えられた。腎障害のメカニズムについては、抗酸化作用を介したものが推察された。スタチンは、臨床試験のメタ解析において、尿中蛋白の排泄を抑制することが示されていた。しかし、そのメカニズムについては検討が少なかったが、本研究においては、臨床試験と同様に尿中アルブミン排泄の軽減が認められた。

これらの結果により、本モデルが臨床での CKD 進展抑制を検討するのに適したモデルであることが示された。また、その進展を阻害する方策として、ARB およびスタチンが有効であることが動物実験で証明された。今後さらに詳細なメカニズムを検討していく予定である。(第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会発表予定 2016.7.14 東京 および論文準備中)。上記動物実験に加え、循環器病棟の入院患者について、承諾書を得たのちに、腎機能指標と臨床背景のデータの蓄積を行った。腎障害マーカーである尿中 L-FAB (Liver type Fatty Acid Bind Protein) と血圧および LDL コレステロールの関連について検討を行ったが、有意な関連は認められなかった。この結果については論文準備中である。また、腎機能にて層別化した循環器患者において、末梢血の好酸球数やカルシウムリン代謝関連因子との関連を見出し、学会発表を行った。

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 4 件)

1. Suguru Tanaka, Masaaki Hoshiga, Tomohiro Fujisaka, Nobukazu Ishizaka. Angiotensin II infusion in apoE deficient mice- A new renal injury animal model of hypercholesterolemia and hypertension.
第48回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (予定) 2016.7.15 (東京)

2. 星賀正明, 石井壘, 藤田修一, 森田英晃, 宗宮浩一, 石坂信和
Increased prevalence of eosinophilia among patients with chronic kidney disease- A possibility of underdiagnosis of cholesterol embolization
第 46 回日本動脈硬化学会総会
2014 年 7 月 東京

3. Shun Kizawa, Masaaki Hoshiga, Yuusuke Okamoto, Shuichi Fujita, Kensaku Shibata, Koichi Sohmiya,

Nobukazu Ishizaka.

Association between Serum FGF23 Levels and Left Ventricular Hypertrophy in Various CKD Stages.

第78回日本循環器学会学術集会

2014.3.21-24 (東京)

4. Kensaku Shibata, Shuichi Fujita, Hideaki Morita, Yusuke Okamoto, Kohichi Sohmiya, Masaaki Hoshiga, Nobukazu Ishizaka

Association between circulating fibroblast growth factor 23, -Klotho, and the left ventricular ejection fraction and left ventricular mass in cardiology inpatients.

American Heart Association 2013

2013.11.16-20, アメリカ ダラス

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

星賀 正明 (HOSHIGA Masaaki)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90309154

(2)研究分担者

石坂 信和 (ISHIZAKA Nobukazu)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20270879

(3)連携研究者

なし