

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09693

研究課題名（和文）腎臓内RASの日内変動における肝臓由来AGTの糸球体濾過圧の関与

研究課題名（英文）Angiotensinogen originating from liver by glomerular filtration pressure is involved in circadian rhythm of intrarenal renin-angiotensin system.

研究代表者

大橋 温 (Ohashi, Naro)

浜松医科大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：50397387

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）： 高血圧や腎臓障害に腎臓内レニン-アンジオテンシン系(RAS)活性化が関係し、血圧や腎臓を含む臓器障害の日内変動異常に腎臓内RAS活性が関与するが、そのメカニズムは不明であった。

今回の研究で、そのメカニズムが糸球体糸球体の破壊された状況下では、肝臓由来のアンジオテンシノーゲン(AGT)が糸球体の濾過圧依存性に漏れ出ることによることをin vivo imagingで直接捉え明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸球体濾過圧上昇の腎臓障害への関与は知られているが、糸球体濾過圧上昇により腎臓内RAS活性の基質であるAGTの漏出が増加し、腎臓障害や、臓器障害の原因となる日内変動異常の機序となることを明らかに出来た学術的意義は大きい。加えて、糸球体濾過圧を減弱することで腎保護効果がある新規糖尿病治療薬sodium glucose cotransporter (SGLT) 2阻害薬の腎保護の原因に、今回と同様の腎臓内AGTの濾過減少による腎臓内RAS活性抑制が提唱される可能性を有する。更にはSGLT2阻害薬が全ての慢性腎臓病への適応拡大につながる可能性も秘めている。以上より社会的意義も大きい成果と言える。

研究成果の概要（英文）： Intrarenal renin-angiotensin system (RAS) activation is associated with hypertension and renal damage. In addition, abnormal circadian rhythm of blood pressure (BP) and organ damage including kidney correlates with circadian rhythm of intrarenal RAS activation.

However, the reasons why circadian rhythm of intrarenal RAS activation is caused has not been known. We have used in vivo imaging and clarified that the mechanism depends on leakage by glomerular filtration pressure of AGT originating from liver in the situation where glomerular capillaries are destroyed diffusely.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓内レニン-アンジオテンシン系 アンジオテンシノーゲン 糸球体濾過圧 日内変動 in vivo imaging

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)は、心血管疾患や末期腎不全の危険因子であること、CKD 患者数は我が国で 1300 万人以上存在する国民病であること、今後も更なる患者数の増加が予想されることから、有効な治療法の確立が急務である。しかし、その発症、進展を抑制する有効な手段に乏しい。レニン-アンジオテンシン系(RAS)には、血圧上昇や体液量制御に関わる全身性(血漿)RAS と、それとは独立した組織固有の RAS が、心臓、腎臓、脳などの諸臓器に存在する。我々は、腎臓内 RAS の活性化が腎臓障害に関与すること、腎臓障害が腎臓内 RAS 活性化を生じることを明らかにしてきた。(Ohashi N, et al. Am J Physiol Renal Physiol 2008; 295: F1512-1518)

最近の研究により、血圧の絶対値のみならず、血圧の日内変動異常が心血管疾患や腎臓障害の進展に寄与することが明らかとなってきた。(Agarwal R, et al. Kidney Int 2006; 69: 1175-1180)我々も腎臓内 RAS の基質であるアンジオテンシノーゲン(AGT)の尿中排泄が、腎臓内 RAS 活性のサロゲートマーカーとなるという先行研究を流用し、尿中 AGT 排泄を用いた臨床研究を行い、腎臓内 RAS 活性の日内変動が、高血圧や血圧の日内変動異常、及び尿中アルブミンや尿タンパク排泄の日内変動と正に相関することを明らかにした。(Isobe S, et al. Clin Exp Nephrol 2014; 19: 231-239) 加えて、RAS 抑制薬と RAS 非依存性降圧薬による治療介入を行った慢性進行性の糸球体腎炎モデルでの動物実験から、全身血圧は RAS 抑制薬と RAS 非依存性降圧薬で同等に低下するが、腎臓内 RAS 構成要素である腎臓内 AGT とアンジオテンシン II(AngII)タイプ 1 受容体(AT1R)の活性亢進と腎臓障害は、RAS 非依存性降圧薬では改善せず RAS 抑制薬で改善すること、腎臓内 RAS 活性が、明期(休眠期)に亢進する日内変動を有し、血圧や尿蛋白排泄の日内変動とパラレルであること、その一方で肝臓内 AGT には日内変動が存在しないことを明らかにした。(Isobe S, et al. Hypertens Res 2016; 39: 312-320)

腎臓内 RAS 活性を制御する AGT の発生源は、糸球体糸脚の破壊が軽微で、尿蛋白が大量に漏れ出ない状況下では、約 1kD と小分子のために容易に糸球体から尿細管管腔内に濾過される AngII により positive feedback で産生される AGT がメインであるが(Nakano D, et al. J Am Soc Nephrol 2012; 23: 1847-1856)、糸球体糸脚の破壊が顕著で大量の尿蛋白を認める際には、肝臓で合成され糸球体で濾過される AGT がメインである (Matsusaka T, et al. J Am Soc Nephrol 2012; 23: 1181-1189)とされている。

しかしながら、腎臓内 RAS 活性、特にその制御因子である腎臓内 AGT の日内変動が生じるメカニズムは不明のままであった。

2. 研究の目的

全身血圧ではなく糸球体血圧の上昇による糸球体からの AGT の濾過亢進が、尿細管管腔の AGT を増加させ、これによる腎臓内 RAS 活性の亢進が、血圧の日内変動異常や腎臓障害を惹起するとの仮説を立て、これを明らかにすることを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) モデルとして、アドリアマイシン 5mg/kg を静脈注射し、高度のタンパク尿と糸球体硬化を伴う巣状分節性糸球体硬化症モデルであるアドリアマイシン腎症を使用した。コントロール群(C 群)とアドリアマイシン投与後、無治療で経過観察する群(A 群)、アドリアマイシン投与後 4 週間後から腎臓内 RAS 抑制薬であるオルメサルタンを投与する AO 群、腎臓内 RAS 抑制効果を認めない降圧剤であるヒドララジンを投与する AH 群の 4 群を作成し、アドリアマイシン投与 8 週間後に屠殺を行った。

屠殺日は日内変動の評価のため、13 時を休眠期(明期)、翌日 1 時を活動期(暗期)として、個別に評価した。

(2) モデルの評価として、体重、クレアチニンクリアランス(CCr)と尿タンパク排泄量による腎臓障害、血漿レニン活性と血漿 AngII による全身性 RAS 活性、腎臓内 RAS のエフェクターである腎臓内 AngII と腎臓内 AGT による腎臓内 RAS 活性を評価した。

日内変動の評価として、13 時の休眠期(明期)、1 時の活動期(暗期)の各々で血圧、尿タンパク排泄量、腎臓内 RAS 活性のサロゲートマーカーである尿中 AGT 排泄、腎臓内 AngII による腎臓内 RAS 活性を評価した。

(3) 更に、輸入細動脈/輸出細動脈比による糸球体濾過圧と、糸球体からのヒト AGT の濾過係数を、多光子顕微鏡を用いた *in vivo* imaging で評価した。

4. 研究成果

(1) 主な成果

コントロール群(C 群)、アドリアマイシン腎症群(A 群)、A 群にオルメサルタンを投与した群(AO 群)、A 群にヒドララジンを投与した群(AH 群)の 4 群で、群間の比較と、活動期(暗期)と休眠期(明期)の比較を行い、以下の結果を得た。

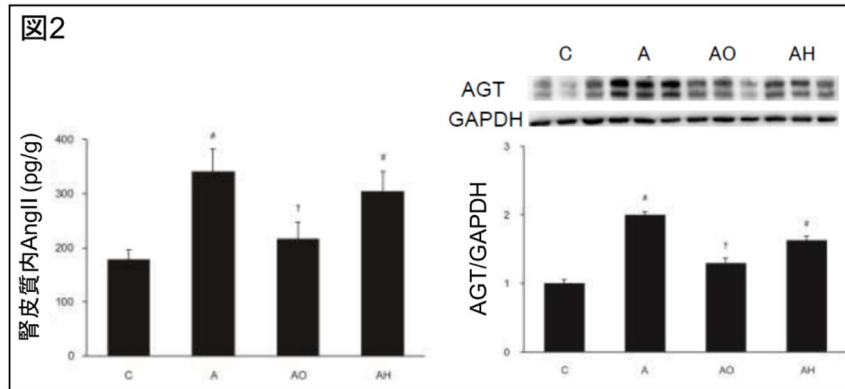
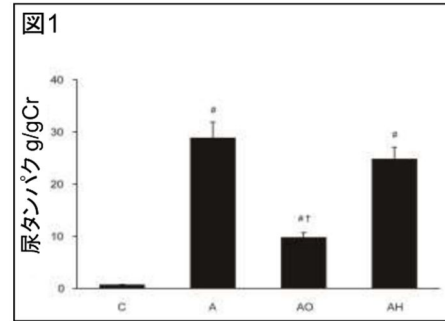
C 群に比較し、A 群では CCr は有意に低下したが、A 群に比較し、AO 群、AH 群との間に有意差を認めなかった。

C 群に比較し、A 群では血圧は有意に上昇し、A 群に比較し、AO 群、AH 群では血圧は同程度に低下した。

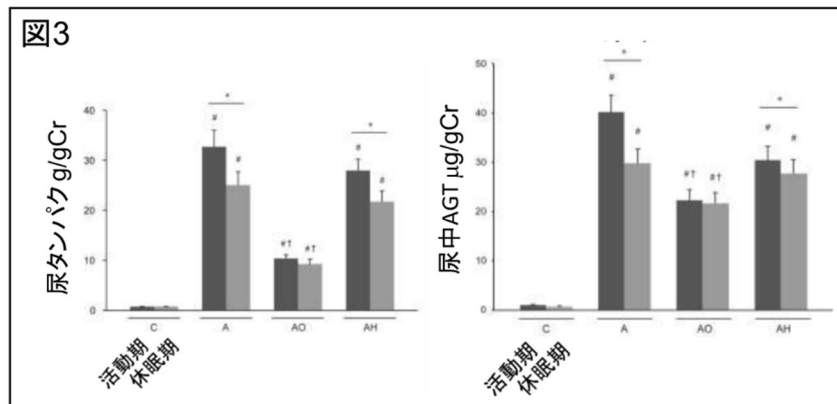
C群に比較し、A群では尿タンパクは有意に増加した。A群に比較し、AO群では有意に減少したが、AH群では有意な変化を認めなかった。(図1)

C群に比較し、A群では腎臓内 AngII や腎臓内 AGT は有意に増加した。A群に比較し、AO群では有意に減少したが、AH群では有意な変化を認めなかった。(図2)

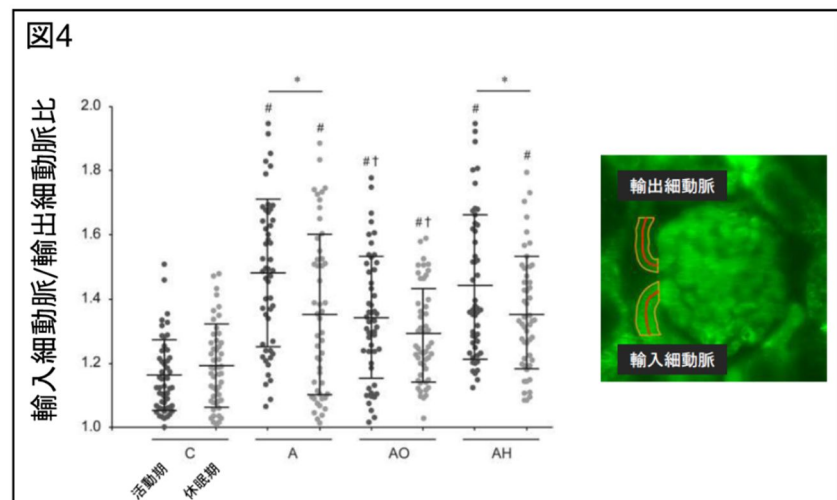
血漿レニン活性と血漿 AngII は AO 群で有意に高値であった。



尿タンパクと尿中 AGT の日内変動は、C群では認めないが、A群では休眠期に比較し活動期で有意に増加した。AO群では日内変動の傾向は残るものの有意差を認めなくなったが、AH群ではA群と同様の日内変動を示した。(図3)



in vivo imaging を用いた糸球体濾過圧の指標である輸入細動脈/輸出細動脈比は、C群に比較しA群で有意に増加し、A群に比較しAO群では有意に減少したがAH群では有意な変化を認めなかった。また輸入細動脈/輸出細動脈比の日内変動では、C群では認めないが、A群では休眠期に比較し活動期で有意に増加した。AO群では日内変動の傾向は残るものの有意差を認めなくなったが、AH群ではA群と同様の日内変動を示した。(図4)



in vivo imaging を用いたヒト AGT の濾過係数については、現在、preliminary なデータが集積

しつつあり、今後、ラットの数を増やすなどして確認していく予定である。

以上から、

腎臓障害は、血圧非依存性に腎臓内 RAS 活性を生じること、逆に、腎臓内 RAS 活性は腎臓障害を惹起させること

腎臓障害による腎臓内 RAS 活性により糸球体高血圧が生じること

腎臓内 RAS 活性化により、血圧の日内変動異常が生じること

を明らかとした。

また、糸球体過剰濾過により糸球体での AGT の濾過の増加が血圧の日内変動異常に関与することについては、現在、最終的な詰めの実験をしているところである。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

従来まで、腎臓内 RAS 活性を制御する AGT の発生源は、2つのセオリーがあった。すなわち 1 つ目のセオリーとして、糸球体糸球体の破壊が軽微で、尿蛋白が大量に漏れ出ない状況下では、血中の AGT は濾過されず、約 1kD と小分子のために容易に糸球体から尿細管管腔内に濾過される AngII により positive feedback で産生される AGT がメインであることが *in vivo* imaging で証明されていた(Nakano D, et al. J Am Soc Nephrol 2012; 23: 1847-1856)。その一方で、2 つ目のセオリーとして糸球体糸球体の破壊が顕著で大量の尿蛋白を認める際には、肝臓で合成され糸球体で濾過される AGT がメインであるとされているが(Matsusaka T, et al. J Am Soc Nephrol 2012; 23: 1181-1189)、AGT が糸球体から漏れ出るところを直接的に捉えられていなかった。今回の本研究にて、糸球体糸球体の破壊された状況下では、AGT の糸球体糸球体の濾過が増加する様子を直接的に *in vivo* imaging で捉えられたことの意義は大きい。加えて、この AGT の濾過量が糸球体濾過圧に依存していることを明らかに出来たことの意義は大きいと考えられる。更には、現在、実験途中であるが、AGT の糸球体糸球体からの濾過量が、血圧の日内変動異常に関与することが提唱出来れば、その意義は更に大きいものとなると考えられる。

(3) 今後の展望

今回の実験で、肝臓で産生され糸球体を漏れ出た AGT が近位尿細管で取り込まれることで血圧の日内変動異常が生じるのか、糸球体からの AGT の濾過ではなく、腎臓内 RAS 活性亢進が血圧の日内変動異常を生じるのかは明らかと出来ていない。

そこで、肝臓・腎臓特異的な AGT ノックアウトマウスを用いることによって、血圧の日内変動異常が生じる原因を明らかにする。

新規糖尿病治療薬である Sodium glucose cotransporter (SGLT) 2 阻害薬は、腎臓保護効果がある。その機序として、1)尿細管糸球体フィードバックを介する糸球体過剰濾過の抑制や、2)腎臓内レニン-アンジオテンシン系(RAS)抑制があるが一定の見解はない。そこで、今回の AGT の *in vivo* imaging を用いて、SGLT2 阻害薬による尿細管糸球体フィードバックを介する AGT の糸球体過剰濾過の抑制が腎臓保護効果の原因ではないかという仮説をたてており、その機序を明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohashi N, Isobe S, Ishigaki S, Aoki T, Matsuyama T, Sato T, Fujikura T, Kato A, Yasuda H.	4. 巻 23
2. 論文標題 Increased heart rate is associated with intrarenal renin-angiotensin system activation in chronic kidney disease patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol.	6. 最初と最後の頁 1109-1118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-019-01746-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohashi N, Ishigaki S, Isobe S, Matsuyama T, Sato T, Fujikura T, Tsuji T, Kato A, Yasuda H.	4. 巻 58
2. 論文標題 Salt Loading Aggravates the Relationship between Melatonin and Proteinuria in Patients with Chronic Kidney Disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med. 2019 Jun 1;58(11):.	6. 最初と最後の頁 1557-1564
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.1929-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohashi N, Isobe S, Matsuyama T, Ishigaki S, Suzuki T, Tsuji T, Otsuka A, Kato A, Miyake H, Yasuda H.	4. 巻 58
2. 論文標題 The Intrarenal Renin-angiotensin System Is Activated Immediately after Kidney Donation in Kidney Transplant Donors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med. 2019	6. 最初と最後の頁 643-648.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.1756-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Aoki T, Ohashi N, Ishigaki S, Matsuyama T, Fujikura T, Kato A, Yasuda H.
2. 発表標題 Chronotherapy of renin-angiotensin system (RAS) inhibitor ameliorates renal damage via suppression of intrarenal RAS activity.
3. 学会等名 Kidney Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohashi N, Isobe S, Ishigaki S, Aoki T, Matsuyama T, Sato T, Fujikura T, Kato A,
2. 発表標題 Increased heart rate reflects intrarenal renin-angiotensin system activation in chronic kidney disease patients but not in
3. 学会等名 Kidney Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石垣 さやか, 大橋 温, 青木 太郎, 田代 傑, 後藤 大樹, 松山 貴司, 永田 総一郎, 佐藤 太一, 内藤善隆, 藤倉知行, 加藤明彦, 安田日出夫
2. 発表標題 CKDにおける尿中アンジオテンシノーゲン排泄量と腎機能低下の関係
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 明彦 (Kato Akihiko) (60324357)	浜松医科大学・医学部附属病院・准教授 (13802)	