

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590152

研究課題名（和文） アンジオテンシン II 受容体過剰発現による腎炎増悪機構解析

研究課題名（英文） Analytical study on aggravating mechanisms of glomerulonephritis through angiotensin-II type 1 receptor

研究代表者

小野 孝彦（ONO TAKAHIKO）

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：60243028

研究成果の概要：AT1a 受容体過剰発現マウスは塩分負荷により糸球体内の細胞数が増加し、細胞外基質や線維化促進サイトカイン（CTGF）陽性領域の増加が野生型マウスよりも顕著であった。IgA 腎症モデルマウス（HIGA マウス）に対してグラム陰性細菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライドを投与したところ、凝固系の活性化とともに細胞増殖反応が見られ、第 Xa 因子阻害剤によって抑制が見られた。さらに AT1a 受容体過剰発現マウスと HIGA マウスの交配により生まれた個体では、収縮期血圧は野生型と比べヘテロ接合型で 31 週以降では常に上回るとともに線維化促進、増殖因子の発現促進が観察された。これらのことから、慢性期における糸球体腎炎の進展に対して塩分負荷の軽減やアンジオテンシン受容体拮抗薬、利尿薬（サイアザイド類似薬）の有用性や、急性増悪時の抗 Xa 阻害剤の有用性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：遺伝子、細胞・組織、循環器・高血圧、薬理学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) IgA 腎症は慢性糸球体腎炎のなかでも最も多くの割合をしめ、予後比較的不良群では、腎糸球体硬化と間質線維化の進展により約 20 年以内に透析療法が必要となる。そこでこれらの進展機序を解析し明らかにすることが重要である。糸球体硬化や間質線維化の大きな要因として、細胞外基質の蓄積が根底にあると指摘され、レニンアンジオテンシン系の関与が細胞外基質の産生亢進・蓄積の要因の 1 つとして考えられている。

(2) 多くの IgA 腎症においては、軽度ないしは中等度の炎症の持続とともに線維化・硬化が進行するタイプの存在が認められ、このようなタイプの IgA 腎症に対しては、必ずしも明確な治療方針がない。

(3) われわれはこれまで実験腎炎を用いて活性型凝固因子 Factor Xa の阻害剤を用いて腎炎の活動性を制御しうることを報告した。また IgA 腎症モデル HIGA マウスを用いた研究では QTL 解析により多量体 IgA の遺伝子座を明らかにした。さらにアンジオテンシン II 受容体 AT1a

および AT1b の完全欠損マウスを作成し、受容体の役割を報告してきた。

## 2. 研究の目的

(1) 新規レニンアンジオテンシン系亢進 AT1a 過剰発現マウスと HIGA マウスを交配することにより、糸球体硬化の進行する系を開発し、その機構を解析することを目的とした。メサンギウム増殖性腎炎において、メサンギウム細胞が関与してメサンギウム領域内での凝固過程が進行し、さらにレニンアンジオテンシン系の関与で線維化が加速的に進行するという仮説を検証した。

(2) 本研究においては硬化進行型の IgA 腎症モデルマウスの系を確立することに特色がある。この病態モデルは腎不全の進行阻止の基礎的検討に有用と思われる。進行性の糸球体腎炎治療における薬効解析にあつた局面を開くことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) AT1a 受容体ホモ接合型過剰発現マウスおよび同腹仔野生型マウスに水道水もしくは 1%食塩水、1.5%食塩水を与え、血圧を測定した。23-25 週齢から週 1 回測定し、1%食塩水は 28-30 週齢から、引き続いて 1.5%食塩水は 32-34 週齢から与え、血圧の変動を観察した。

(2) HIGA マウスの凝固系活性化の特徴を検討するために、同マウスにリポポリサッカライド (LPS) を腹腔内投与し、炎症を惹起させた。そして細胞増殖、マクロファージ浸潤、凝固系 tissue factor, Factor V, Factor X, PAR1,2 の発現を観察した。さらに凝固第 Xa 因子阻害剤のダナパロイドの増殖抑制効果を検討した。

(3) AT1a 受容体過剰発現のホモ接合型、野生型に塩分を負荷し、サイアザイド系利尿薬インダパミドを投与して、糸球体増殖反応の抑制を評価した。8 週齢より自由飲水にて水道水あるいは 1.5%食塩水を摂取させた。24 時間尿を採取したのち、14 週齢にて屠殺して組織を採取した。光顕的に観察するとともに、抗 AT1a 受容体抗体による免疫組織学的検討を行った。

(4) HIGA マウスと AT1a 受容体過剰発現マウスを交配し F1 を得た。F1 の遺伝子解析により AT1a 受容体ヘテロ接合型と野生型に分け、雄性で各 5 匹の群とし、50 週齢まで体重・血圧を観察し、その後 sacrifice して組織の所見を観察した。

## 4. 研究成果

(1) 28-30 週齢以降の比較的週齢が進んだマウスに対する塩分負荷の結果、雄性ホモ接合型マウスに塩分負荷したところ負荷直

後から収縮期血圧が上昇した。野生型でも塩分負荷により上昇傾向にあった。塩分濃度を 1.5% に上げた後にはこのような変化は見られなかったが、実験を通して、ホモ接合型と野生型には収縮期血圧の上昇に対する塩分負荷の影響に有意な差が見られた (図 1)。

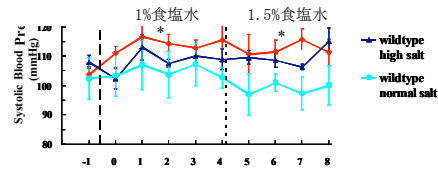


図 1. 雄性 AT1aR 過剰発現マウスにおける収縮期血圧推移  
\*p<0.05 vs. wildtype

一方、雌性マウスでは、一時的に high salt 群で高値を示す時点もあったが、base line との差がほとんどの時点で見られず、実験を通して見ると、収縮期血圧に対する遺伝型の影響はみられず、一方、雄性ホモ接合型マウスでは塩分応答血圧上昇が見られ、ホモ接合型マウスにおける塩分応答性に性差が見られた (図 2)。

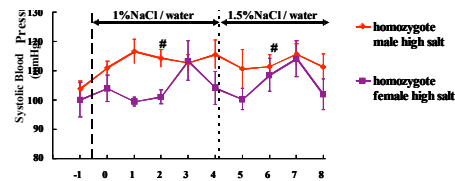


図 2. ホモ接合型における収縮期血圧の塩分負荷応答性に対する性差  
\*p<0.05 vs. female homozygote, high salt.

(2) HIGA マウスに LPS を投与した 8 日後に、顕著な凝固系の亢進とメサンギウム細胞の増殖が認められたが、これには HIGA における TLR4 の発現増加が腎炎急性増悪の準備状態を呈していると考えられた。ダナパロイド投与により蛋白尿、細胞増殖、フィブリン沈着が減少した。今回の結果から微生物感染による IgA 腎症の増悪に対して factor Xa を制御する治療の有用性が期待される (図 3)。

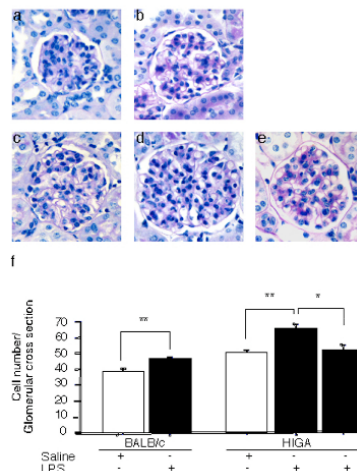


図 3. 正常マウス (BALB/c) と HIGA マウスに LPS を投与したときの細胞増殖反応の違いと、ダナパロイドによる抑制効果。

(3) 若齢期では、塩分負荷により AT1a 受容体過剰発現マウスも野生型においても血圧の変化は認められなかったが、AT1a 受容体過剰発現マウスでは糸球体内細胞数の顕著な増加を呈し、血圧と糸球体増殖変化は連動しないことが示唆された。またこの糸球体増殖変化と蛋白尿にはインダバミドが抑制的に効果をもたらすことが示唆された (図 4)。

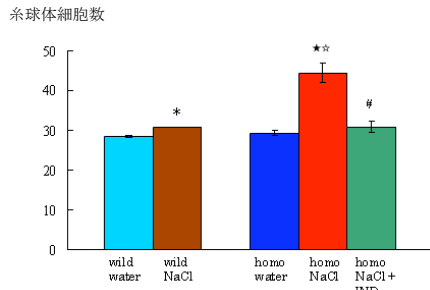


図 4. AT1a 受容体過剰発現マウスと野生型における塩分負荷およびインダバミド投与時の糸球体内細胞数の変化  
\* $p < 0.05$ : vs. wild water, \*\* $p < 0.05$ : vs. homo water, # $p < 0.05$ : vs. homo NaCl, \* $p < 0.05$ : vs. wild NaCl

(4) 雄性的 AT1a 受容体 ヘテロ接合型は、野生型に比べて、32 週齢以降で血圧は収縮期約 5 mmHg の軽度の上昇にとどまったが常に上回った。50 週齢での組織の検索では糸球体内細胞数・マッソントリクローム青色染色領域、AT1a 受容体免疫染色陽性領域、CTGF 陽性領域、fibronectin 蓄積の有意な増加を認めた (図 5)。また尿細管上皮細胞の空胞変性を認めた。一方、IgA の蓄積には有意な変化は認めなかった。これらのことから過剰な AT1a 受容体が IgA 腎症のメサンギウム細胞増殖・基質増生を引き起こし、血圧上昇は軽度であっても加齢とともに腎炎の病態を進行させることが考えられた。

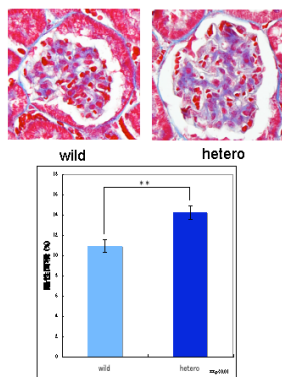


図 5. 糸球体内基質の割合は wild に比べ AT1a 受容体ヘテロ接合型の方が有意に増加した。

## 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 3 件)

- ① Makiko Shimosawa, Koji Sakamoto, Yuki Tomari, Kohei Kamikado, Hidetaka Otsuka, Ning Liu, Hisayo Kitamura, Kazuhide Uemura, Fumiaki Nogaki, Noriko Mori, Eri Muso, Haruyoshi Yoshida, and Takahiko Ono. Lipopolysaccharide-triggered acute aggravation of mesangioproliferative glomerulonephritis through activation of coagulation in a high IgA strain of ddY mice. *Nephron Exp Nephrol* (in press) (査読あり)
- ② 大塚秀隆、上村和秀、北村久代、吉川俊博、大門貴志、山田浩、伊藤正樹、小野孝彦：アンジオテンシン II 受容体過剰発現マウスの塩分負荷血圧変動と性差・組織障害. *Pharma Medica* 27: 160-162, 2009 (査読なし)
- ③ Ning Liu, Noriko Mori, Noriyuki Iehara, Kazuhide Uemura, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Michio Matsuda and Takahiko Ono. Soluble fibrin formation in the mesangial area of IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 11: 71-76, 2007 (査読あり)

[学会発表] (計 14 件)

- ① Ayaka Sumi, Natsuko Yamanaka, Ning Liu, Hisayo Kitamura, Kazuhide Uemura, Takahiko Ono: Heminephrectomy accelerates glomerular matrix expansion and coagulation pathway in diabetic nephropathy of db/db mice. *Renal Week 2008 by Am. Soc. Nephrol. (Philadelphia, USA) Abstract, p.411A, November 7, 2008*
- ② 小野孝彦、上村和秀、大塚秀隆、北村久代、吉川俊博、大門貴志、山田浩、伊藤正樹：アンジオテンシン II 受容体過剰発現マウスの塩分負荷による血圧変動と性差・組織障害. 第 31 回日本高血圧学会総会 (札幌)、抄録集、p. 266, 2008 年 10 月 9 日
- ③ 加藤こずえ、北本将幸、齊藤宏樹、北村久代、上村和秀、野垣文昭、森 典子、武田敏也、小野孝彦：実験的腹膜線維症における凝固第 Xa 因子阻害剤の抑制効果. 日本透析医学会第 53 回学術集会 (神戸)、講演抄録集、p. 628, 2008 年 6 月 20 日
- ④ 隅 彩香、山中奈津子、劉 寧、北村久代、上村和秀、小野孝彦：2 型糖尿病モデル db/db マウスの片腎摘による糸球体内基質増生と凝固の進行. 第 51 回日本腎臓学会 (福岡)、日本腎臓学会誌、第 50 巻、p. 375, 2008 年 6 月 1 日
- ⑤ 泊 裕輝、隅 彩香、劉 寧、北村久代、上村和秀、小野孝彦：凝固第 Xa 因子によるメサンギウム細胞の細胞外基質産生亢進と内因性第 V 因子の役割. 第 51 回日本腎臓学会 (福岡)、日本腎臓学会誌、第 50 巻、p. 363, 2008 年 5 月 31 日
- ⑥ 上村和秀、三瓶祐貴、大塚秀隆、野垣文昭、

武曾恵理、吉田治義、小野孝彦：IgA 腎症モデル

HIGA マウスにおける von Willebrand Factor の糸球体への沈着. 第 51 回日本腎臓学会 (福岡)、日本腎臓学会誌、第 50 巻、p. 338, 2008 年 5 月 30 日

- ⑦ 小野孝彦、下沢真木子、泊 裕輝、大塚秀隆、劉 寧、北村久代、上村和秀、野垣文昭、森 典子、武曾恵理、吉田治義：HIGA マウスは Toll-like receptor 4 を発現し、LPS 投与により凝固系活性化を介して腎炎を増悪する. 第 51 回日本腎臓学会 (福岡)、日本腎臓学会誌、第 50 巻、p. 338, 2008 年 5 月 30 日
- ⑧ 大塚秀隆、上村和秀、北村久代、吉川俊博、大門貴志、山田浩、伊藤正樹、小野孝彦：アンジオテンシン II 受容体過剰発現マウスの血圧に対する塩分負荷および性差の影響. 第 51 回日本腎臓学会 (福岡)、日本腎臓学会誌、第 50 巻、p. 335, 2008 年 5 月 30 日
- ⑨ Masayuki Kitamoto, Hiroki Saito, Hisayo Kitamura, Kazuhide Uemura, Fumiaki Nogaki, Toshiya Takeda, Noriko Mori, Takahiko Ono: Effects of the herbal medicine Sairei-to on rat peritoneal fibrosis partly through suppression of oxidative stress. Renal Week 2007 by Am. Soc. Nephrol. (San Francisco, USA) Abstract, p.278A, November 2, 2007
- ⑩ Yuki Tomari, Yorimichi Horiuchi, Ning Liu, Kazuhide Uemura, Takahiko Ono: Factor Xa in combination with endogenous factor V promotes production of extracellular matrix proteins in cultured human mesangial cells. Renal Week 2007 by Am. Soc. Nephrol. (San Francisco, USA). Abstract, p.203A, November 2, 2007.
- ⑪ 小野孝彦、森典子：ワークショップ「腎障害と免疫・凝固異常」、腎炎における凝固系と炎症の関連. 第 37 回日本腎臓学会西部 (福井)、日本腎臓学会誌、第 49 巻、p. 691, 2007 年 10 月 19 日
- ⑫ 北本将幸、齊藤宏樹、北村久代、上村和秀、野垣文昭、森 典子、武田敏也、小野孝彦：実験的被嚢性腹膜硬化症 (EPS) における柴苓湯の抑制効果. 日本透析医学会第 52 回学術集会 (大阪)、講演抄録集、p. 715, 2007 年 6 月 17 日
- ⑬ 下沢真木子、日浅俊介、劉 寧、上村和秀、野垣文昭、森 典子、武曾恵理、吉田治義、小野孝彦：IgA 腎症モデルマウス (HIGA) への LPS 投与における酸化ストレスと凝固系活性化を介した腎炎増悪機序. 第 50 回日本腎臓学会 (浜松)、日本腎臓学会誌、第 49 巻、p. 336, 2007 年 5

月 27 日

- ⑭ 足立秀樹、劉 寧、長谷川貴通、北村久代、上村和秀、小野孝彦：実験的メサンギウム増殖性腎炎の尿細管上皮細胞における凝固過程の進行と上皮細胞障害. 第 50 回日本腎臓学会 (浜松)、日本腎臓学会誌、第 49 巻、p. 306, 2007 年 5 月 25 日

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 下沢真木子、日浅俊介、劉 寧、上村和秀、野垣文昭、武曾恵理、吉田治義、小野孝彦：IgA 腎症モデルマウス (HIGA) への LPS 投与による酸化ストレス・凝固系活性化を介した腎炎増悪. 腎とフリーラジカル第 9 集、p116-120、東京医学社、2008

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~byoutai/staff.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野 孝彦 (ONO TAKAHIKO)  
静岡県立大学・薬学部・教授  
研究者番号：6 0 2 4 3 0 2 8

### (2) 研究分担者

上村 和秀 (UEMURA KAZUHIDE)  
静岡県立大学・薬学部・准教授  
研究者番号：2 0 3 0 3 8 4 4  
伊藤 正樹 (ITO MASAKI)  
千葉科学大学・薬学部・教授  
研究者番号：7 0 2 9 5 5 5 9