

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790592
 研究課題名（和文） 特異的阻害薬、遺伝子操作動物によるアルドステロン臓器障害での NF- κ B の役割の検討
 研究課題名（英文） Roles of NF- κ B in aldosterone-induced organ injury
 研究代表者
 福田 誠一（FUKUDA SEIICHI）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：50338026

研究成果の概要：

アルドステロンは特異的受容体を介し臓器障害を生じるが、種々のサイトカインや酸化ストレスに重要な役割をもつ情報伝達系の NF- κ B 関連遺伝子の重要性が示唆されている。本研究ではアルドステロンの直接の臓器障害における NF- κ B の役割につき NF- κ B 阻害薬および細胞特異的に NF- κ B を阻害した遺伝子操作動物を用いて検討した。結果としてアルドステロンによる臓器障害は腎臓では NF- κ B の活性化が関与しているが、心臓においては中心的役割を果たしていないことが推測された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

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：アルドステロン、NF- κ B、腎障害、心筋障害

1. 研究開始当初の背景

これまでの報告から、種々の病態において、アルドステロンが心臓、血管、腎臓などに対して組織障害性を有し、その拮抗薬である spironolactone がこのアルドステロンによる組織障害を抑制することから、特異的な鉱質コルチコイド受容体を介する作用であることが明らかとなっている。実際に臨床例においても spironolactone は心不全治療などに広く用いられ（Pitt et al. N Engl J Med 1999;341:709-717）、その効果が確認されて

おり、さらに慢性腎炎モデル動物においても spironolactone が有効であることを我々が報告している（Hypertens Res. 2004;27:971-978）。しかし、腎機能低下例では高カリウム血症を生じる場合があり（Juurlink et al. N Engl J Med. 2004;351:543-51）、時に重篤となることが最大の欠点と考えられ、進行性腎障害での応用は極めて限定されている。したがって、アルドステロンの尿細管に対する作用を阻害することなく、組織障害性の作用のみを阻害することが可能であれば、臨床

的にも非常に有用な治療薬となると想定される。アルドステロンの尿細管作用は、腎皮質集合管にある上皮性ナトリウムチャネル (ENaC) の活性化、Na-K-ATPase の活性化によるカリウム排泄とナトリウム再吸収の増加を主な作用としているが、これまでの研究により、我々は、この ENaC の拮抗薬であるトリウムテレンでは、アルドステロンの臓器障害作用の一部を抑制するのみであることを明らかとした。

Spirinolactone はアルドステロンの臓器障害を完全に抑制することから、アルドステロンは、その特異的受容体を介して臓器障害を生じるものの、その発症には ENaC の関与は小さく、異なる標的分子、あるいは、異なる情報伝達系を介している可能性が支持されたといえる。その標的分子、情報伝達系の候補として多くの仮説が報告されているが、特に酸化ストレスの重要性と、種々の炎症性サイトカインの関与が指摘されている。当研究室では、かねてより酸化ストレスにおいて中心的な役割を果たす nuclear factor κ B (NF κ B) の進行性腎障害に注目して研究を進めてきたが (Kidney Int. 2003;63:501-13、Kidney Int. 2005;68:464-473)、アルドステロンの臓器障害においても、この NF κ B が重要な役割を果たす可能性を我々が行った microarray による解析結果等から示唆された。種々のサイトカイン、あるいは酸化ストレスなどにおいて重要な役割を果たす情報伝達系である NF κ B は、通常は細胞質内において p65、p50 の 2 量体が I κ B と結合した状態にある。刺激下においては、I κ B キナーゼが活性化され、I κ B がリン酸化され、p65、p50 が遊離して核内へと移動し転写が開始されるというものである。これまでアルドステロン作用と NF κ B の関係についての詳細な検討は行われていないことから、本研究が立案された。

2. 研究の目的

本研究においては、これまでの成果を踏まえ、アルドステロンの臓器障害における NF κ B 阻害薬の重要性を、当研究室が開発中の遺伝子操作動物と、最近開発された I κ B キナーゼの特異的拮抗薬を用いて明らかとしていく。

前者の遺伝子操作動物は、Cre-lox 系を用いて、リン酸化部位を欠損した I κ B、すなわち、刺激時にもリン酸化されず、p65、p50 と遊離しない I κ B を細胞特異的に発現させる系であり、全身的な NF κ B の欠損マウスが胎生期致死であるため各臓器での NF κ B の役割を同定できない欠点を改良したものである。このマウスを用いることにより、たとえ

ば心筋特異的なアルドステロンの細胞障害における NF κ B の役割が初めて同定可能となる。また、この遺伝子操作はマウスにおいてのみ可能であるのに対し、慢性腎炎モデルなど幾つかの重要な腎障害モデルはラットにおいてのみ可能である。今回の検討では、最近開発された特異的 I κ B キナーゼ阻害薬である IMD1041 を用いてラットでも検討していく。この IMD 1041 は医薬分子設計研究所が開発、特許を取得して臨床応用を進めている小分子化合物であり (Tanaka et al. Blood. 2005;105:2324-2331)、特異性、安全性ともに非常に高く、第 2 相の臨床試験も行っている疾患があり、臨床での実用化が近く、腎疾患に関しては当研究室のみが使用可能である。独自の遺伝子操作動物の利用と、特異的阻害薬の使用により、これまで報告の少ない、アルドステロンの臓器障害作用における NF κ B の役割を明らかとすることを目的とした。

さらに、本研究により NF κ B の阻害とアルドステロン受容体拮抗薬の作用との差異から、高カリウム血症を生じない、アルドステロンの臓器障害抑制薬が開発される可能性があり、既に臨床応用可能な NF κ B 阻害薬が存在することと合わせて、新たな進行性腎障害の治療薬が創出されることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 臓器障害動物モデル 慢性腎炎モデルラット

6 週齢の Wistar ラットの片腎を摘出後、抗 Thy1.1 抗体を尾静脈より投与する。8 週から 12 週で慢性腎炎に類似の組織障害を生じる。これまでの当研究室の検討により、この組織障害にアルドステロンが重要な役割を果たすことが証明されている (Hypertens Res. 2004;27:971-978)。

この慢性腎炎モデルラットを無治療群、およびアルドステロン拮抗薬であるスピロノラクトン (200mg/kgBW/day)、NF κ B 阻害薬 IMD1041 (100mg/kgBW/day) を投与する 3 群に分け、10 週間、血圧、尿蛋白を観察する。10 週後に屠殺して、血液サンプル、腎、心を摘出し組織学的検索ならびに mRNA を抽出して、炎症・線維化の指標である遺伝子の発現量を比較する。

アルドステロン負荷ラット

6 週齢の Wistar ラットの片腎を摘出後、アルドステロンを皮下に埋め込んだ浸透圧ミニポンプで 0.75 μ g/hr で持続投与し、飲水

として1%NaCl 水を与える。無治療群、およびスピロラクトン(200mg/kgBW/day)、NF B 阻害薬(100mg/kgBW/day)を投与する3群に分け、4週間、血圧、尿蛋白を観察する。4週後に屠殺して、血液サンプル、腎、心を摘出し組織学的検索ならびに mRNA を抽出して、炎症・線維化の指標である遺伝子の発現量を比較し、また EMSA を行う。

(2)遺伝子操作動物

loxP-I B N-マウス

CAG プロモーターの下流に loxP site で挟まれた stop codon 配列を有し、そのさらに下流に、リン酸化部位を欠失する I B (I B N) の cDNA を組み込んだベクターを transgene したマウスである。細胞・組織特異的 Cre-recombinase 発現ラットと組み合わせることにより loxP site により囲まれた stop codon が切り出され、I B N を発現する。この I B N は NF B 活性化に必要なリン酸化部位を欠失することから、Cre-recombinase を発現した細胞では、NF B の活性化を生じない。

Cre-recombinase 発現マウス

これまでに開発されている Cre-recombinase 発現マウスを用いる。具体的には、心筋特異的マウスとして MHC-Cre マウス (Yamaguchi et al. J Clin Invest 2004;114:937-43) を用いる。

MHC-Cre マウスと、loxP-I B N-マウスを交配し、心筋特異的に NF B を阻害したマウス (MHC-I B N-マウス) を作成する。このマウスと野生型マウスの各々にコントロール群およびアルドステロンを 0.75µg/hr で持続投与し、飲水として 1%NaCl 水を与えた群に分け(計 4 群)、4週間、血圧、尿蛋白を観察する。4週後に屠殺して血液サンプル、腎、心を摘出し組織学的検索ならびに mRNA を抽出して、炎症・線維化の指標である遺伝子の発現量を比較する。

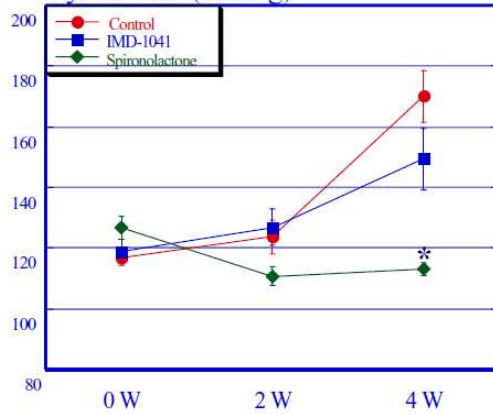
4. 研究成果

(1)臓器障害動物モデル

慢性腎炎モデルでは NF B 阻害薬 IMD1041 投与による尿蛋白排泄量の減少を認めず、このモデルでは NF B 阻害薬の効果は認められなかった。

アルドステロン負荷ラットでは 4 週後に無治療群で収縮期血圧の著明な上昇を認め、スピロラクトン投与群では血圧上昇が有意に抑制された。IMD1041 投与群では血圧上昇はほぼ無治療群と同等であった。

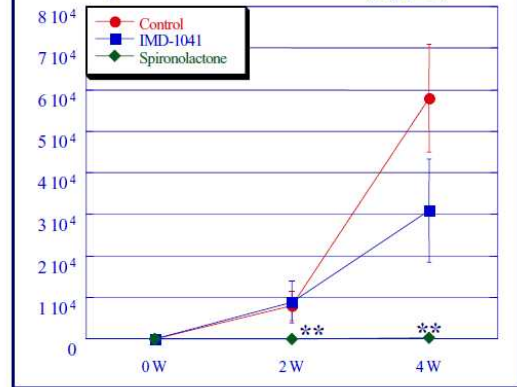
Systolic BP (mmHg)



* p < 0.05 compared with control group

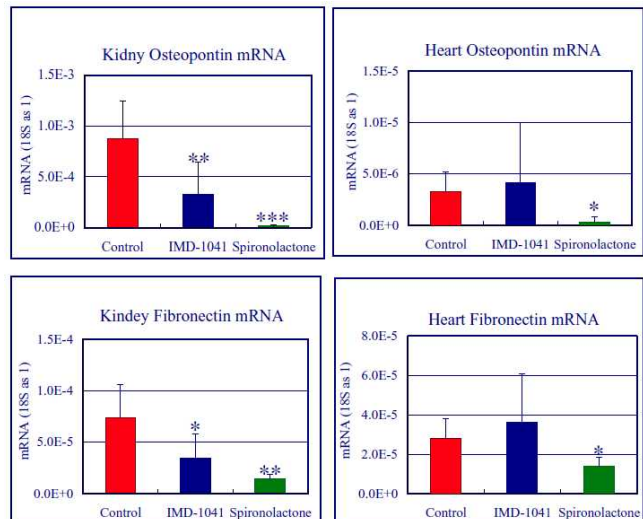
尿中アルブミン排泄量は無治療群に対し、スピロラクトン投与群では有意に抑制され、IMD1041 投与群においても抑制される傾向を認めたが統計的に有意ではなかった。

Urinary albumin to creatinine ration (mg/g Cr)



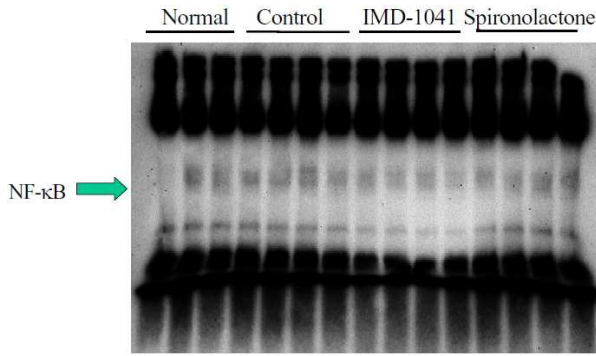
** p < 0.01 compared with control group

炎症や線維化マーカーの遺伝子発現量を比較検討したところ、腎臓ではオステポンチンおよびフィブロネクチンの発現量は無治療群に対しスピロラクトン投与群では著明に抑制され、IMD1041 投与群においても有意に抑制された。心臓では無治療群に対しスピロラクトン投与群は有意に抑制されたものの、IMD1041 投与群では抑制されなかった。



* p < 0.05
** p < 0.01
*** p < 0.001 compared with control group

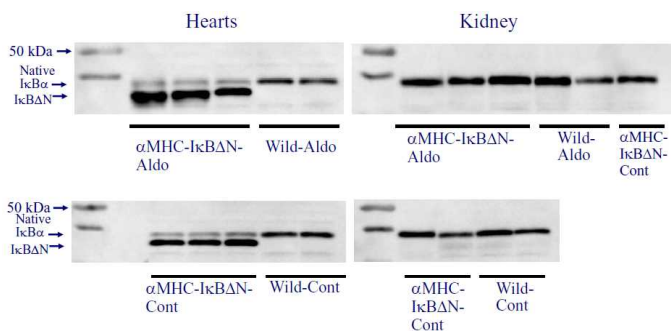
組織学的にはアルドステロンによる腎線維化所見はスピロラクトン投与群およびIMD1041投与群において軽減を認めた。心臓では血管周囲の炎症細胞浸潤、線維化はスピロラクトン投与群で軽減を認めたものの、IMD1041投与群では改善を認めなかった。なお下図は腎臓でのNF- κ B活性化につきEMSAで検討したもので、IMD1041投与群でNF- κ B活性化が抑制されていることが確認された。



Competitor + -

(2) 遺伝子操作動物

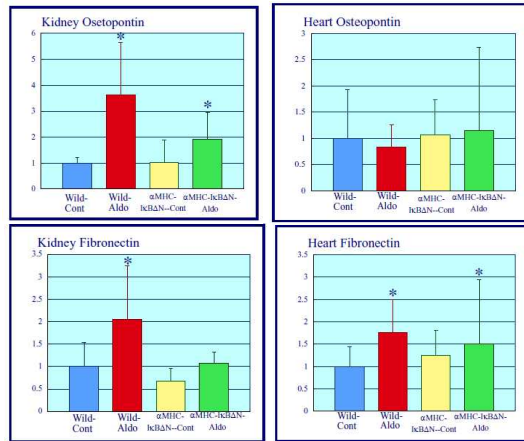
MHC-Cre マウスと, IoxP-I β N-マウスを交配し、心筋特異的にNF- κ Bを阻害したトランスジェニックマウスを作成した。下図のウエスタンプロット法の結果に示したようにMHC-I β N-マウスでは心臓のみでI β Nが発現し、I β Nの発現が抑制されており、心筋特異的にNF- κ Bが阻害されていることが示された。



尿中アルブミン排泄量はMHC-I β N-マウスおよび野生型マウスにアルドステロンを投与した群で、増加を認めたが、両群に有意な差は認めなかった。

心機能評価として心エコーを施行したところ、アルドステロン投与群はともに拡張末期および収縮末期左室径の拡大を認め、コントロール群と比べ、心機能は悪化していた。MHC-I β N-マウスは野生型マウスと比較し、有意な心機能悪化の抑制を認めなかった。炎症や線維化マーカーの遺伝子発現量を比較検討したところ、腎臓ではオステオポンチ

ンやフィブロネクチンはアルドステロン投与群で発現量が増加し、野生型マウスに比べ、MHC-I β N-マウスではコントロール群、アルドステロン投与群の間で、各々有意差を認めなかった。また、心臓でもMHC-I β N-マウスは野生型マウスと比べ、有意な遺伝子発現の抑制は認めなかった。



* p<0.05 compared with respective control. Values were calculated as values in wild-control group is 1.0.

以上よりアルドステロンによる臓器障害は腎臓ではNF- κ Bの活性化が関与しているが、心臓においては中心的役割を果たしていないことが推測された。

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)

[学会発表](計1件)

発表者名

Hayashi M, Fukuda S, Monkawa T, Saito N, Yanase T, Fukasawa H, Muto S, Itai A, Shimoda K

発表表題

NF- κ B activation is involved in aldosterone-induced tissue injury in the kidney but not in the heart.

学会名

The 41th Annual Meeting of the American Society of Nephrology

発表年月日

2008年11月6日

発表場所

フィラデルフィア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 誠一 (FUKUDA SEIICHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 50338026

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者