

機関番号：33802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590967

研究課題名(和文) 腎線維化で塩分負荷が腎内アンジオテンシン活性と受容体随伴プロレニン系に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of salt load on the intrarenal angiotensin activity and receptor-mediated prorenin system in kidney fibrosis

研究代表者

山本 龍夫 (YAMAMOTO TATSUO)

浜松大学・健康プロデュース学部・教授

研究者番号：30200819

研究成果の概要(和文)：腎線維化にはレニン・アンジオテンシン系(RAS)の亢進が関与するが、循環RASを抑制する塩分負荷による腎線維化の機序は不明である。本研究は、高塩分摂取の慢性抗胸腺細胞血清清炎ラットにおいて集合管、結合尿細管での(プロ)レニン受容体の尿腔側細胞膜面への移動が、レニン mRNA 発現増加を伴わないプロレニン、レニン蛋白の結合とプロレニンの非酵素的活性化を惹起し、アンジオテンシン II 産生亢進、腎線維化に関与することを明かにした。

研究成果の概要(英文)：Although activation of intrarenal renin angiotensin system (RAS) is involved in the progression of kidney fibrosis, it is unknown how salt load that suppresses circulating RAS aggravates kidney fibrosis. This study demonstrated that high salt intake increased the apical membranous transition of (pro)renin receptor in collecting ducts and connecting tubules, resulting in the increased binding of prorenin and renin proteins without concomitant renin mRNA expression, followed by non-proteolytic activation of prorenin and angiotensin II generation, with resultant worsening of renal fibrosis in chronic anti-thymocyte serum nephritis on high salt intake.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：レニン・アンジオテンシン系、高塩分、プロレニン、腎線維化

1. 研究開始当初の背景

(1) レニン・アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system; RAS) には血管の収縮と腎での Na 再吸収などによって体液量と血圧を維持する循環RASと、組織局所でRAS関連因子が発現する組織RASがあり、腎組織RASの亢進は慢性腎臓病(chronic kidney disease; CKD)において腎線維化の進

行に関与する。一方、塩分負荷は循環RASを抑制するが、腎保護効果はなく、むしろ悪化をきたす。しかし、塩分がどのような機序で腎組織RASに影響を及ぼし、腎線維化に関与するかは明らかではない。

(2) プロレニンは不活性なレニン前駆体で、傍糸球体細胞の分泌顆粒内では酵素による

プロセッシングで酵素活性部位を覆うプロセグメントが切断、除去され、活性型のレニンとして血中に分泌されて循環 RAS を制御する。一方、傍糸球体細胞以外ではプロレニンはエキソサイトーシスでプロレニンのまま放出される。ヒト血漿にはプロレニンがレニンの約 10 倍高濃度で存在するが、不活性のプロレニンの病的意義は不明であった。しかし、2002 年に Nguyen らによってプロレニンは (プロ) レニン受容体 (pro)renin receptor; PRR) に結合すると立体構造が変化し、プロセグメントが酵素的に切り離されることなく酵素活性中心が露出してレニン酵素活性を發揮するプロレニンの非酵素的活性化 (受容体随伴プロレニン系) が見いだされた。

2. 研究の目的

本研究の目的は高塩分摂取が CKD において

- (1) 腎組織の PRR の発現や分布をいかに変化させるか
- (2) 腎組織 RAS 活性にどのような影響をもたらすか
- (3) 腎線維化にいかに関与するか

について慢性進行性腎炎ラットモデルを用いて検討する事である。

3. 研究の方法

片腎摘後にヒツジ抗ラット胸腺細胞血清 (anti-thymocyte serum; ATS) の 2 回静注で作成した慢性 ATS 腎炎ラットを 0.5% 食塩水飲水の高塩分摂取群と水道水飲水の正常塩分摂取群に分け、それらに加えてオルメサルタン 10mg/kg/日あるいはヒドララジン 5mg/kg/日を投与した高塩分摂取慢性 ATS 腎炎群、シャム手術後に水道水飲水のコントロール群において、初回 ATS 静注から 14 と 21 日目に血圧、体重測定、一日尿蛋白量定量し、21 日目で断頭屠殺にて採血、腎を摘出して以下の検討を行った。

- (1) PAS 染色、マッソントリクローム染色による腎組織病変の病理学的検討
- (2) 血漿クレアチニン定量、血漿レニン活性の測定 (RIA)、血漿と腎組織抽出液のアンジオテンシン II (AngII) の定量 (ELISA)
- (3) 腎組織のレニン、PRR、AT1 受容体、TGF- β 1mRNA の定量 (定量的 RT-PCR)
- (4) 腎組織のプロレニン、レニン、PRR、AT1

受容体の蛋白量と発現部位を各々 western blot (WB) と免疫組織染色 (immunohistochemistry; IHC) で検討

- (5) 非酵素的活性化プロレニンは、抗プロレニン gate 領域 (GR) 抗体を用いた IHC で検討
- (6) 腎組織をホモゲナイズ後に膜分画と細胞質分画に分け、膜結合型と細胞質内の PRR を各々 WB にて定量
- (7) PRR の発現尿細管は、PRR、aquaporin 2 (AQP2)、calbindin-D-28k の連続切片の IHC で同定

4. 研究成果

(1) 高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎では血漿レニン活性、血漿 AngII が低下して循環 RAS は抑制されており、また、傍糸球体細胞の総レニン (レニンとプロレニン) が減少していたが、尿蛋白増加、血清クレアチニン上昇、腎線維化病変の進行がみられた。

(2) 血圧は、慢性 ATS 腎炎惹起後 14 日目は各群で差はなく、21 日目に高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎群でのみ有意に高値であった。

(3) 腎組織 RAS に関しては、

- ① 高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎では集合管、結合尿細管にプロレニン、レニンの蛋白と非酵素的活性化プロレニンが増加し、腎皮質の AngII 量が上昇していた。
- ② 一方、腎皮質のレニン mRNA 発現や AT1 受容体、PRR の蛋白と mRNA 量は、高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎群、正常塩分摂取の慢性 ATS 腎炎群、コントロール群間で有意差はなかった。
- ③ しかし、PRR の集合管細胞内の分布が、コントロール群では細胞質内に塊～顆粒状にみられるのに対し (図 1 a、中抜き矢印)、高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎では PRR が尿腔側細胞膜面に移動していた (図 1 b、黒矢印)。そして、連続切片での観察で PRR に結合して非酵素的に活性化されたプロレニンは、この高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎でみられる PRR が尿腔側細胞膜面に移動して認められる集合管、結合尿細管のみに認められた (図 2 b、黒矢印)。

(4) オルメサルタンは、腎皮質のプロレニン、非酵素的活性化プロレニン、PRR の尿腔側細胞膜への移動、AngII を減少し、腎線維化を抑制したが、ヒドララジンではそのような変

化はみられなかった。

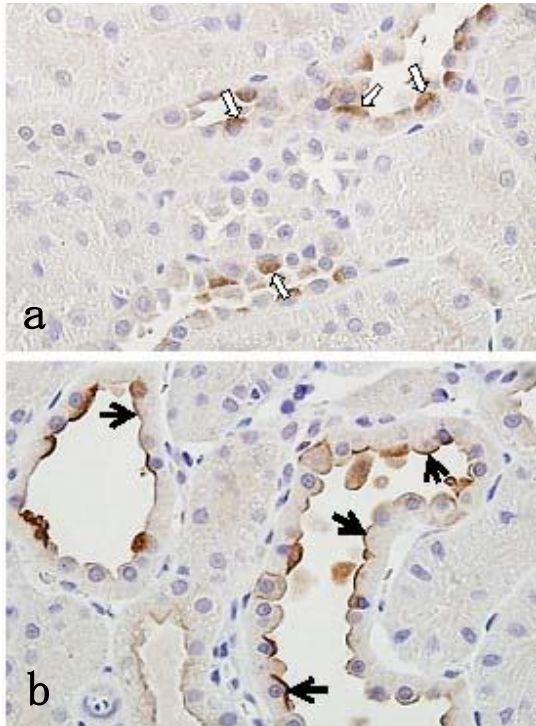


図1 コントロール群(a)と高塩分摂取の慢性ATS腎炎群(b)の(プロ)レニン受容体(PRR)の免疫組織染色

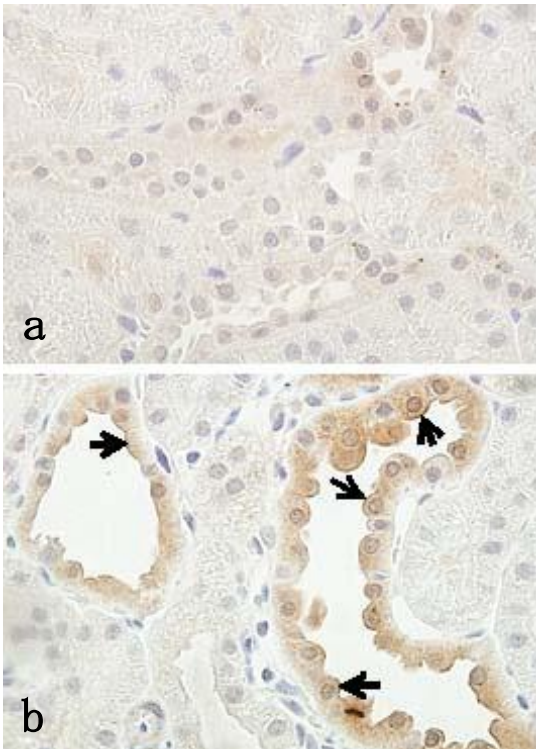


図2 図1の連続切片でのコントロール群(a)と高塩分摂取の慢性ATS腎炎群(b)の非酵素的活性化プロレニンの免疫組織染色

(5) 以上より、高塩分摂取による慢性ATS腎

炎の腎線維化の進行は、レニン遺伝子の発現増加や PRR、AT1 受容体量の増加ではなく、集合管、結合尿細管細胞において AngII 依存性に PRR が細胞質内小胞から尿腔側細胞膜面に移動してプロレニン、レニンをトラップし、局所でプロレニンは非酵素的に活性化、レニンはその酵素活性を増強させて腎内 AngII 産生、腎組織 RAS 活性化をきたし、腎線維化を進行させる可能性が示唆された。

(6) AngII による尿中への H⁺排泄の促進では、AngII が集合管 α 介在細胞の細胞内小胞の V-ATPase を尿腔側の細胞膜微絨毛に移動させるが、PRR は V-ATPase 結合蛋白としての機能を有していることから、高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎ラットで認められる集合管での PRR の尿腔側細胞膜面への移動は、AngII による V-ATPase の尿腔側細胞膜微絨毛への移動と並行して起こっている可能性が考えられる。今後は、培養尿細管細胞を AngII で刺激して細胞質内の PRR が細胞膜面に移動し、そこでプロレニンが非酵素的に活性化されるかを in vitro 実験などで確認する必要がある。

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)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. 山本龍夫: 塩分負荷と腎組織レニン・アンジオテンシン系. 腎と透析 70: 293-299, 2011. 査読無
2. Sullivan JC, Bhatia K, Yamamoto T, Elmarakby AA: Angiotensin (1-7) receptor antagonism equalizes angiotensin II-induced hypertension in male and female spontaneously hypertensive rats. Hypertension 56: 658-666, 2010. 査読有
3. Schneider M, Sullivan JC, Wach PF, Boesen EI, Yamamoto T, Fukai T, Harrison DG, Pollock DM, Pollock JS: Protective role of extracellular superoxide dismutase in renal ischemia/reperfusion injury. Kidney Int. 78: 374-381, 2010. 査読有
4. Fukasawa H, Yamamoto T, Fujigaki Y, Masaki T, Ohashi N, Takayama T, Mugiya S, Oda T, Uchida C, Kitagawa K, Hattori T, Suzuki S, Hayashi H, Ozono S, Kitagawa M, Hishida A: Reduction of transforming growth factor- β type II receptor is caused by the enhanced ubiquitin-dependent degradation in human renal cell carcinoma. Int. J. Cancer 127: 1517-1525, 2010. 査読有
5. Guan Z, Fuller BS, Yamamoto T, Cook AK,

- Pollock JS, Inscho EW. Pentosan Polysulfate Treatment Preserves Renal Autoregulation in Ang II-Infused Hypertensive Rats via Normalization of P2X1 Receptor Activation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2010 Mar 3 [Epub ahead of print] 査読有
6. Misaki T, Yamamoto T, Suzuki S, Fukasawa H, Togawa A, Ohashi N, Suzuki H, Fujigaki Y, Oda T, Uchida C, Kitagawa K, Hattori T, Kitagawa M, Hishida A: Decrease in tumor necrosis factor-alpha receptor-associated death domain results from ubiquitin-dependent degradation in obstructive renal injury in rats. *Am. J. Pathol.* 175: 74-83, 2009. 査読有
 7. Kobori H, Ohashi N, Katsurada A, Miyata K, Satou R, Saito T, Yamamoto T: Urinary angiotensinogen as a potential biomarker of severity of chronic kidneys diseases. *J. Am. Soc. Hypertens.* 2:349-354, 2008. 査読有
 8. Ohashi N, Yamamoto T, Huang Y, Misaki T, Fukasawa F, Suzuki H, Togawa A, Suzuki S, Fujigaki Y, Nakagawa T, Nakamura Y, Suzuki F, Kitagawa M, Hishida A: Intrarenal RAS activity and urinary angiotensinogen excretion in anti-thymocyte serum nephritis rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 295(5):F1512-F1518, 2008. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. Huang Y: Increased intrarenal prorenin and renin are involved in the renal damage in chronic anti-thymocyte serum (ATS) nephritis rats on high salt intake. 第 53 回日本腎臓学会学術総会, 2010 年 6 月 17 日, 神戸
2. Suzuki H: Role of Rho-kinase (ROCK) and epidermal growth factor receptor (EGFR) activation in glomerular injuries induced by angiotensin II (AngII)-dependent hypertension. Renal Week 2010, 43rd Annual Meeting and Scientific Exposition of American Society of Nephrology, 2010 年 11 月 19 日, Denver, USA
3. Huang Y: Increases in intrarenal prorenin and renin are mediated by angiotensin II in chronic anti-thymocyte serum (ATS) nephritis rats on high salt intake. Renal Week 2010, 43rd Annual Meeting and Scientific Exposition of American Society of Nephrology, 2010 年 11 月

20 日, Denver, USA

4. Yamamoto T: Intrarenal prorenin and renin are increased in chronic anti-thymocyte serum (ATS) nephritis rats on high salt intake. International Society of Nephrology NEXUS, 2010 年 4 月 17 日, Kyoto, Japan
5. Huang Y: Increased tubular prorenin and renin in rats with chronic anti-thymocyte serum (ATS) nephritis under high salt intake (HSI). Renal Week 2009, 42nd Annual Meeting and Scientific Exposition of American Society of Nephrology, 2009 年 10 月 30 日, San Diego, USA
6. Huang Y: Upregulation of intrarenal renin angiotensin system (RAS) in rats with chronic anti-thymocyte serum (ATS) nephritis under high salt intake (HSI). 第 52 回日本腎臓学会学術総会, 2009 年 6 月 3 日, 横浜
7. 鈴木洋行: アンジオテンシン II (AngII) 依存性高血圧における Rho-kinase (ROCK) 活性化が腎障害に及ぼす影響. 第 52 回日本腎臓学会学術総会, 2009 年 6 月 3 日, 横浜
8. Suzuki H: Role of Rho-Kinase (ROCK) Activation in Kidney Injury Induced by AngiotensinII (AngII)-Dependent Hypertension. Renal Week 2008, 41st Annual Meeting and Scientific Exposition of American Society of Nephrology, 2008年10月18日, Philadelphia, USA

[図書] (計 1 件)

1. 山本龍夫, 西山成: 東京医学社, 日本腎臓学会誌特集号 腎とレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系、腎と RAS オーバービュー(腎障害・高血圧への関与), 2010, pp87-91.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 龍夫 (YAMAMOTO TATSUO)
 浜松大学・健康プロデュース学部・教授
 研究者番号: 30200819

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

菱田 名 (HISHIDA AKIRA)
 浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：70111812

鈴木 洋行 (SUZUKI HIROYUKI)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：10452179

石田 淳子 (ISHIDA JYUNKO)

浜松大学・健康プロデュース学部・助教

研究者番号：50410501

小田巻 真理 (ODAMAKI MARI)

浜松大学・健康プロデュース学部・教授

研究者番号：00347387

(4)研究協力者

黄 岩杰 (Huang Yanjie)

浜松医科大学・医学部・リサーチアシスタント

ト

研究者番号：30535563

三崎 太郎 (MISAKI TARO)

浜松医科大学・医学部・リサーチアシスタント

ト

研究者番号：20464125

戸川 証 (TOGAWA AKASHI)

浜松医科大学・医学部・医員

研究者番号：90467225