

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590303

研究課題名(和文)腎内ミネラルコルチコイド受容体活性化による腎障害メカニズムの解明

研究課題名(英文)Possible mechanisms responsible for mineralocorticoid-induced renal injury

研究代表者

西山 成(Nishiyama, Akira)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：10325334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アルドステロン依存性高血圧ラット、食塩感受性高血圧ラット、アンジオテンシンII依存性高血圧マウスなどにおいて検討を行い、ミネラルコルチコイド受容体(MR)MRが腎老化や酸化ストレスを生じて腎障害に関わることを証明した。さらに、培養ラットメサンギウム細胞、マウスポドサイト、ヒト近位尿細管細胞、ラット血管平滑筋細胞を使用した実験によって、詳細な分子生物学的メカニズムも明らかにした。これらの研究結果の一部は、9報の英文雑誌に掲載され、学会でも発表された。また、本研究に関連して、申請者は日本腎臓学会大島賞を受賞した。尚、交付された助成金はすべて消耗品に使用された。

研究成果の概要(英文)：There is increasing evidence implicating aldosterone, in addition to angiotensin I I, in the pathogenesis of hypertension and renal diseases. We have demonstrated that aldosterone causes renal injury through the activation of MR in aldosterone-infused rats, Dahl salt-sensitive hypertensive rats, but in angiotensin II-infused hypertensive mice. In the kidney, MR is expressed not only in distal tubules, but also in glomerular mesangial cells, podocytes, proximal tubular cells, and fibroblasts. In these cells, MR activation causes cell injury via oxidative stress and senescence. These data suggest that MR blockers provide a potential therapeutic approach for patients with hypertension and renal impairment.

研究分野：薬理学一般

科研費の分科・細目：基盤研究(C)

キーワード：アルドステロン ミネラルコルチコイド受容体 腎障害 老化

1. 研究開始当初の背景

腎臓病は自覚症状がないままに進行し、いったん悪化すると治癒することはなく、最終的には生命を維持するために人工透析を行い続けることが必要となる。現在、慢性腎臓病患者は2,000万人いるとされているが、透析患者数も年々増加の一途をたどっていることから、医療財政の悪化をまねいている。さらに、腎機能が低下すると様々な脳心血管イベントの発症率が著明に増加することも明らかとなっており、早期発見・早期治療が望まれているものの、有効な解決法がないのが現状である。これに対して申請者らは腎症の進行のメカニズムについて、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の役割に着目して研究を行ってきた。特に最近、申請者はレニン・アンジオテンシン系の最終メディエーターであるアルドステロンが腎障害進行において重要な因子であることを発見したが、その詳細な障害進行メカニズムは明らかとなっていない。また、アルドステロンのミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の腎保護効果についても、薬理学的作用機序などは詳細に検討されていない。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、腎障害進行メカニズムにおけるミネラルコルチコイド受容体の役割の全容を解明し、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の薬理学的腎保護作用機序を明らかにすることである。最終目標到達のため、今回の研究期間では各種モデル動物と培養細胞を用いて実験を行い、ミネラルコルチコイド受容体による腎障害の分子生物学的メカニズムを明らかにすることを到達目標とする。合わせて、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬による腎保護作用の薬理学的機序をあらゆる角度から検討する。特に、これまでの申請者らの研究によって明らかとなってきた腎臓の老化現象に着目して、研究を進めて行くこととした。

3. 研究の方法

(1) 動物実験：

アルドステロンのミネラルコルチコイド受容体を介した腎臓老化

本実験は、アルドステロンのミネラルコルチコイド受容体を介した腎障害の分子生物学的メカニズムを明らかにするため、今回の研究開始以前より実行していたものである。実験はアルドステロンを慢性的に投与して高血圧を生じるラットを使用し、腎障害と腎組織老化現象を評価した。また、選択的ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬であるエプレレノンの腎保護効果について検討した。エプレレノンは、一日100 mg/kgを経口より連日投与し、アルドステロンの作用をブロックできるかについて検討を行った。

ダール食塩感受性高血圧ラットに対するミネラルコルチコイド受容拮抗薬の降圧と腎保護効果の検討

腎障害モデル動物のうち、ダール食塩感受性高血圧ラットを使用して、エプレレノンの腎保護効果について検討した。エプレレノンは、一日100 mg/kgを経口より連日投与した。また、ミネラルコルチコイド受容体と酸化ストレスとの関係を調べるため、抗酸化薬であるテンポール(0.5 mmol/L 飲水投与)の投与実験も行った。

アンジオテンシン II 依存性高血圧マウスにおけるミネラルコルチコイド受容拮抗薬の効果

浸透圧ミニポンプ使用して、正常マウスに対してアンジオテンシン II を20 ng/minの速度で皮下投与し、高血圧モデルを作成した。また、エプレレノンは一日250 mg/kgを経口より連日投与した。同様の実験をp21ノックアウトマウスにおいても検討した。

(2) 培養細胞実験：アルドステロンによって生じるミネラルコルチコイド受容体を介した細胞障害機序の検討

各種培養細胞におけるアルドステロンのミネラルコルチコイド受容体を介した障害作用について、酸化ストレス、老化、Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)などに着目して研究を行った。培養細胞はラットメサングウム細胞、マウスポドサイト、ヒト近位尿管細胞、ラット血管平滑筋細胞を使用した。

4. 研究成果

(1)- アルドステロンのミネラルコルチコイド受容体を介した腎臓老化

アルドステロン依存性高血圧ラットで生じる腎障害には、腎臓の老化の指標であるSA-Galの発現、ならびに老化関連遺伝子であるp21, SIRT1の発現異常を伴っていた。また、これらアルドステロンの影響は、すべてエプレレノンによって完全にブロックされた。さらに、このようなエプレレノンの作用は、降圧によってもたらされるものではないことも合わせて証明した。これらの結果より、アルドステロンのミネラルコルチコイド受容体の活性化を介して腎臓の老化を生じ、これが腎障害の原因の一つであることが示唆された。

(1)- ダール食塩感受性高血圧ラットに対する選択的ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の降圧と腎保護効果の検討

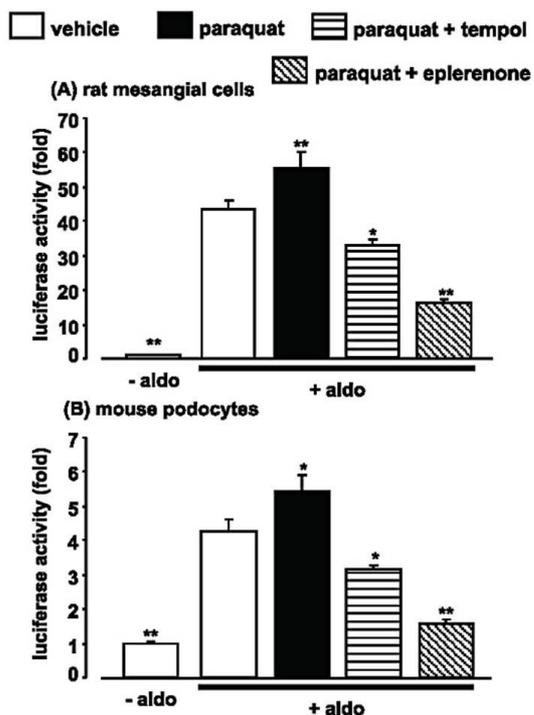
ダールラットに高食塩食を与えると、食塩感受性高血圧と腎障害を生じる。この際、腎臓の酸化ストレスは亢進しており、高食塩食を中止しても持続した。しかし、エプレレノンあるいはテンポールを投与すると、腎内酸化ストレス亢進、高血圧、腎障害は改善した。一方、腎内酸化ストレスの亢進は、p22phox の発現増加をとまっていた。これらの結果より、ミネラルコルチコイド受容体活性化による高血圧と腎障害の原因として、酸化ストレスの亢進が原因と考えられた。

(1)- アンジオテンシン II 依存性高血圧マウスにおけるミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の効果

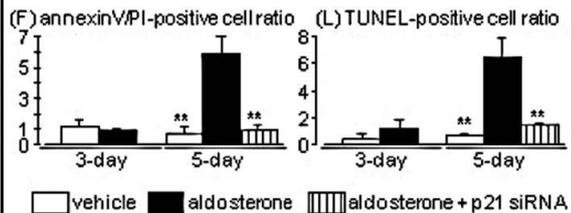
アンジオテンシン II の慢性投与は血中アルドステロン濃度を上昇させた。しかし、アンジオテンシン II によって生じる高血圧、腎臓老化、p21 の発現亢進は、エプレレノンによって改善されなかった。p21 ノックアウトマウスにおいても、アンジオテンシン II の作用は何ら影響がなかった。以上の結果より、アンジオテンシン II 依存性の高血圧と腎障害の病態では、アルドステロンは関与していないものと考えられた。

(2) 培養細胞実験：アルドステロンによって生じるミネラルコルチコイド受容体を介した細胞障害機序の検討

アルドステロンは培養系球体メサンギウム細胞（下図 A）やポドサイト（下図 B）において、ミネラルコルチコイド受容体を活性化するが、このような作用は paraquat による酸化ストレスの亢進によって増強されることが明らかとなった（ルシフェラーゼ法により評価）。



また、近位尿細管細胞では、アルドステロンがミネラルコルチコイド受容体活性化を介して p21 の発現を増加させ、直接老化を生じてアポトーシスを引き起こしていることが明らかとなった（下図 annexin V/PI 比、Tunel 陽性比によって評価）。



ラット血管平滑筋細胞を使用した実験では、ミネラルコルチコイド受容体の活性化が IGF-1 受容体を増加させ、インスリン抵抗性を生じ、これが MAP キナーゼの活性化を生じて細胞を障害していることが明らかとなった。

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 9 件)

Sherajee SJ, Rafiq K, Nakano D, Mori H, Kobara H, Hitomi H, Fujisawa Y, Kobori H, Masaki T, Nishiyama A. Aldosterone aggravates glucose intolerance induced by high fructose. *Eur J Pharmacol*, 査読有, 720, 2013, 63-68.

Sherajee SJ, Fujita Y, Rafiq K, Nakano D, Mori H, Masaki T, Hara T, Kohno M, Nishiyama A, Hitomi H. Aldosterone induces insulin-like growth factor-1 receptor and hybrid receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 査読有, 32, 2012, 257-63.

Kitada K, Nakano D, Liu Y, Fujisawa Y, Hitomi H, Shibayama Y, Shibata H, Nagai Y, Mori H, Masaki T, Kobori H, Nishiyama A. Oxidative stress-induced glomerular mineralocorticoid receptor activation limits the benefit of salt reduction in Dahl salt-sensitive rats. *PLoS ONE*, 査読有, 7, 2012, e41896.

Kitada K, Nakano D, Hitomi H, Kobori H, Deguchi K, Mori H, Masaki T, Nishiyama A. Aldosterone induces p21-regulated apoptosis via increased synthesis and secretion of tumour necrosis factor- in human proximal tubular cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 査読有, 39, 2012, 858-63.

Nakano D, Lei B, Kitada K, Hitomi H, Kobori H, Mori H, Deguchi K, Masaki T,

Minamino T, Nishiyama A. Aldosterone does not contribute to renal p21 expression during the development of angiotensin II-induced hypertension in mice. Am J Hypertens, 査読有, 25, 2012, 354-358.

〔学会発表〕(計 11 件)

西山 成、中野大介、人見浩史、小堀浩幸、Rafiq K、2 型糖尿病マウスにおける CCB の降圧を介さない A R B の脳腎保護効果の増強、第 86 回日本内分泌学会、平成 25 年 4 月 26 日、仙台

西山 成、小堀浩幸、RAAS と腎障害、第 86 回日本内分泌学会、平成 25 年 4 月 26 日、仙台

西山 成、中野大介、Liu Y、藤澤良秀、人見浩史、小堀浩幸、北田研人、食塩感受性高血圧で減塩治療しても蛋白尿が改善しないのは、腎糸球体で生じる酸化ストレスが鋳質コルチコイド受容体を活性化するのが原因である(ラットによる検討)、第 1 回臨床高血圧フォーラム、平成 24 年 5 月 13 日、大阪

西山 成、腎内局所レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の病態への関与、第 55 回日本腎臓学会学術総会、平成 24 年 6 月 2 日、横浜

北田研人、中野大介、人見浩史、小堀浩幸、西山 成、アルドステロンにより老化した細胞は TNF- α 発現および分泌の増大を介して近位尿細管細胞のアポトーシスを惹起する、第 49 回日本臨床分子医学会学術集会、平成 24 年 4 月 13 日、京都

中野大介、Bai L、Fan Y、北田研人、人見浩史、西山 成、アンジオテンシンは内因性アルドステロン分泌の増加とは関係なく、腎における P21 発現を亢進する、第 34 回日本高血圧学会、平成 23 年 10 月 21 日、宇都宮

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
なし

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kms.ac.jp/~yakuri/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西山 成 (NISHIYAMA, Akira)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：10325334

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし