

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461207

研究課題名(和文)多発性嚢胞腎の高血圧に関わる嚢胞増悪因子の解析と治療法の解明

研究課題名(英文)Analysis of the cyst progress associated with hypertension in in ADPKD

研究代表者

西尾 妙織(Nishio, Saori)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：90463736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性遺伝性多発嚢胞腎(Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: ADPKD)は遺伝性腎疾患の中で最も頻度が多く、高率に高血圧を合併する。今回の研究で腎内Renin-angiotensin-system(RAS)が嚢胞増悪に影響することを明らかにし、直接的レニン阻害薬が嚢胞増悪を抑制することを明らかにした。  
また、150-water PETを用いて高血圧発症前のごく早期のADPKD患者における血管内皮機能を測定し、ADPKDでは血管内皮の障害より先に血管平滑筋の障害が起こることにより、高血圧が発症することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Hypertension is a well-recognized complication of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). Hypertension relates to progressive kidney enlargement and is significant independent risk factor for progression to end-stage renal disease. However, the definite mechanisms leading to hypertension in ADPKD are not well understood. The purpose of this study is to examine the effects of antihypertensive drugs for pkd1 conditional knockout mice, and the participation of intrarenal RAS in ADPKD. We generated the pkd1 conditional knockout mice (Pkd1 KO mice). To evaluate the effects of antihypertensive drugs, Pkd1 KO mice were treated by amlodipine or olmesartan or aliskiren, or vehicle for 12 weeks. Aliskiren treatment significantly reduced renal cystic index. Aliskiren treatment group improved tubulointerstitial fibrosis. Renin, Ang II and AGT expression were increased significantly in cystic kidneys. Aliskiren prevented intrarenal RAS activation and cystic progression.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：多発性嚢胞腎 腎内RAS 高血圧

## 1. 研究開始当初の背景

常染色体優性遺伝性多発嚢胞腎 (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: ADPKD) は遺伝性腎疾患の中で最も頻度が多く (約 1000 人に 1 人)、加齢とともに嚢胞が両腎に増加し、進行性に腎機能が障害され、70 才までに約半数が腎不全に陥る疾患であり、また高血圧、多発肝嚢胞、脳動脈瘤などさまざまな腎外症状をきたす全身疾患である。高血圧の合併は ADPKD 患者の 50~80%に見られ、腎機能障害の進行の悪化要因になり、高血圧の治療は嚢胞進行抑制に非常に重要とされている。ADPKD 患者の高血圧発症の機序はいくつか説がある。嚢胞が巨大化することにより腎臓の細動脈が圧迫され狭小化し、血流の低下と虚血をきたすこと、血管内皮機能の低下により一酸化窒素 (NO) の低下、活性酸素種 (ROS) の産生亢進がおこることなどにより、レニン・アンジオテンシン系 (Renin-angiotensin system: RAS 系) が亢進し高血圧が発症すると考えられているが、高血圧を有する ADPKD 患者で血漿レニン活性 (PRA) を測定した結果では、血圧と血漿レニン活性や血漿アルドステロン濃度との相関は示されておらず、その全容は未だ明らかではない。

ADPKD の原因遺伝子として *PKD1* と *PKD2* 同定されている。*PKD1* の遺伝子産物であるポリシスチン 1(PC1)ならびに *PKD2* の遺伝子産物であるポリシスチン 2(PC2)はともに腎の上皮細胞の繊毛に局在しており、尿流を感知する受容体である PC1 からの刺激がカルシウムチャンネルである PC2 へ伝達され、尿細管細胞内にカルシウムイオンが流入することにより、尿細管および集合管の径の調節が行われる。ADPKD では、PC1、PC2 のどちらかの機能が喪失するために、尿細管細胞内 Ca 濃度が低下し細胞増殖カスケードが活性化され、嚢胞形成が促進されると考えられており (Aguari G, et al. Am J Nephrol. 2013)、カルシウムチャンネル拮抗薬 (Calcium Channel

Blocker: CCB) 投与が嚢胞進行に悪影響を与えるという報告もある (Nagao S, et al. Kidney Int. 2007)。また RAS 系抑制薬は腎機能悪化を抑制するという報告もあるが、確固たるエビデンスはない。実際の臨床の場で RAS 系阻害剤薬は第一選択ではあるが、CCB も広く使用されているのが現状であり、その可否は明らかではない。そこで、多発性嚢胞腎モデルマウスである *Pkd1<sup>lox/lox</sup>:MX1-Cre* マウスに降圧剤投与を行い、嚢胞増悪にどのように関わるかを検討することにした。

## 2. 研究の目的

常染色体優性遺伝性多発嚢胞腎 (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: ADPKD) のモデルマウスである *Pkd1<sup>lox/lox</sup>:MX1-Cre* マウスに対してカルシウム拮抗剤、レニン・アンジオテンシン系阻害剤などの降圧剤投与を行い、高血圧や降圧剤が嚢胞悪化に与える影響を明らかにし、そこから嚢胞増悪の機序を解明、今後の治療法の解明を目指す。

また、<sup>15</sup>O-water PET を用いて高血圧発症前のごく早期の ADPKD 患者における血管内皮機能を測定し、血圧上昇の機序を明らかにし、今後の治療に結びつける。

## 3. 研究の方法

ADPKD モデルマウスである *Pkd1<sup>lox/lox</sup>:MX1-Cre* マウスに対してカルシウム拮抗剤、レニン・アンジオテンシン系阻害剤などの降圧剤投与を行い、病理組織学的検討、アポトーシス、細胞増殖、腎内 RAS 系、Wnt signaling などについての検討を行い、嚢胞増悪の機序を解析する。これらの解析は免疫組織染色、ウェスタンブロッティング法、リアルタイム PCR などを使用して行った。

また、血圧が正常な早期の ADPKD 患者における血管内皮機能を <sup>15</sup>O water PET を用いて測定し、健常人と比較検討した。

## 4. 研究成果

(1) *pkd1* コンディショナルノックアウトマ

## ウスへの降圧薬投与実験

### ①表現型の解析

血圧は溶媒のみの Vehicle 群では上昇しているが降圧剤使用の3群では差を認めず一定した血圧コントロールができた。22週齢での腎組織を解析したところ、Amlodipine 群と Olmesartan 群では Vehicle 群と嚢胞形成に差を認めなかったが、Aliskiren 群で明らかに嚢胞形成が抑制されていた (Fig. 1A)。腎重量・体重比 (KW/BW%)、及び Cystic Index (腎臓を長軸で2分割した断面の総面積における嚢胞面積の割合) は Aliskiren 群で唯一有意差を持って低下しており、Aliskiren 群で嚢胞形成が抑えられた (Fig. 1B, C)。

腎間質線維化の評価のため、 $\alpha$  SMA 染色、及び Elastica-Masson (EM) 染色を施行した (図 2)。 $\alpha$  SMA 染色、EM 染色いずれにおいても有意に Olmesartan 群、Aliskiren 群で間質の線維化を抑制していた。

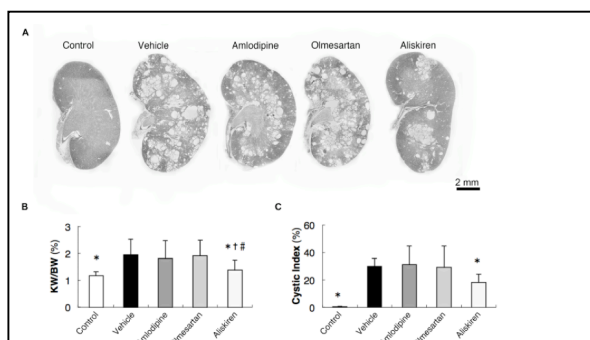


図 1: 各群における腎臓の表現型。A) 腎臓の病理像。生後 22 週で屠殺。HE 染色。B) 腎重量・体重比 (KW/BW %)。C) Cystic Index (%)。各群 n = 8

\* $p < 0.05$  vs vehicle, † $P < 0.05$  vs amlodipine, and # $P < 0.05$  vs olmesartan by Mann-Whitney U-test.

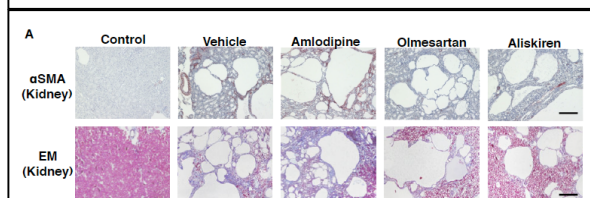


図 2: 腎間質線維化の評価。A)  $\alpha$  SMA 染色 (茶色), Scale bar 100 $\mu$ m。B) EM 染色 (青色), Scale bar 50 $\mu$ m。Vehicle 群、Amlodipine 群と比較し有意に線維化を抑制していた。

### ②腎内 RAS 活性

ADPKD に腎内 RAS が関与している可能性が示されている。腎内 RAS とは、腎組織内に RAS を構成する全てのコンポーネントを有し、腎

局所内で RAS が完結するという概念であり、そして Kobori らは、腎内 RAS のバイオマーカーとして、アンジオテンシノーゲン (Angiotensinogen : AGT) の尿中排泄量が指標となる可能性を提唱している。最近の報告では、腎内 RAS は、糸球体硬化や腎間質線維化にも関与していることが示唆されている。

そこで ADPKD における腎内 RAS の関与をみるために尿中 AGT 排泄量を生後 22 週で計測した。Vehicle 群で、有意差を持って高値を示しており、Aliskiren 群で有意に減少していた (図 3)。免疫組織学的検査においては Renin、angiotensin II (Ang II)、AGT いずれも Vehicle 群で最も染色が強い傾向があり Olmesartan 群、Aliskiren 群で染色が抑制されていた (図 3)。Renin は主に遠位尿細管、集合管で染色されており、Ang II は近位尿細管、遠位尿細管の両方で染色され、AGT は主に近位尿細管で染色されていた。これらの結果から ADPKD の嚢胞増悪には腎内 RAS が関与しており、Aliskiren 投与によって腎内 RAS が抑制されることによって、嚢胞形成が抑制されることが明らかとなった。また、腎内 RAS は ADPKD の腎線維化に関与し、RAS 阻害薬を投与することでそれを抑制できることが明らかとなった。

### (2) $^{15}\text{O}$ -water PET の評価

#### ① 患者背景

健常コントロール群 9 例と高血圧発症前のごく初期の ADPKD 患者 9 例で比較検討を行った。Table 1 に患者背景を示す。血清 Cre が ADPKD 群で低かったが、eGFR は有意差はなく、その他の結果も両群には差を認めなかった (Table 1)。

#### ② $^{15}\text{O}$ -water PET の結果

Myocardial blood flow (MBF) を刺激なし (rest) と寒冷刺激下 (Cold Pressor Test : CPT)、ATP による薬物刺激下にて測定を行った。MBF<sub>CPT/rest</sub> に有意差を認めず、

MBF<sub>ATP/rest</sub> に有意差を認めたことから (図 4)、ADPKD 患者では、血管内皮障害にさきがけて血管平滑筋障害が起こることにより高血圧が発症することを明らかにした。

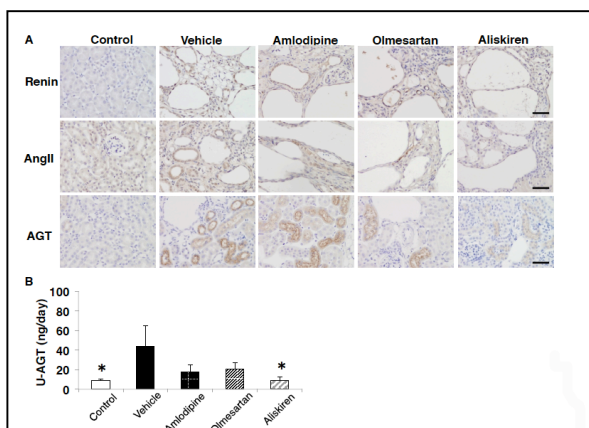


図 3: 腎内 RAS の解析  
A) 免疫組織学的解析。Renin、Ang II、AGT いずれも Vehicle 群で最も染色が強く、Olmesartan 群、Aliskiren 群で染色が抑制されていた。尿中 AGT 排泄量。\* $p < 0.05$  vs vehicle by Mann-Whitney U-test. Vehicle 群で、有意差を持って高値を示しており、Aliskiren 群で有意に減少していた。  
AngII: angiotensin II、AGT: angiotensinogen

Table 1.	Healthy (n=9)	Normotensive patients with ADPKD (n=9)
Demographics		
Age (years)	36.9±12.0	33.7±6.10
Gender (men: women)	9: 0	3: 6
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.5±1.60	22.7±2.86
Urine analysis		
UACR (mg/gCr)	ND	19.1±12.7
Blood chemistry		
BUN (mg/dL)	14.0±3.63	14.1±3.14
Scr (mg/dL)	0.80±0.05	0.69±0.11*
eGFR (mL/min)	89.3±9.90	89.7±17.0
LDL-cholesterol (mg/dL)	97.6±34.3	104.6±24.7
HDL-cholesterol (mg/dL)	58.2±8.93	60.6±11.3
triglycerides (mg/dL)	80.2±71.2	75.4±26.4
Blood sugar (mg/dL)	87.7±6.73	90.1±18.0
Hemoglobin A1c (%)	5.19±0.23	5.35±0.37
hs-CRP (ng/mL)	269.1±198.9	204.3±196.5

Table1. 患者背景

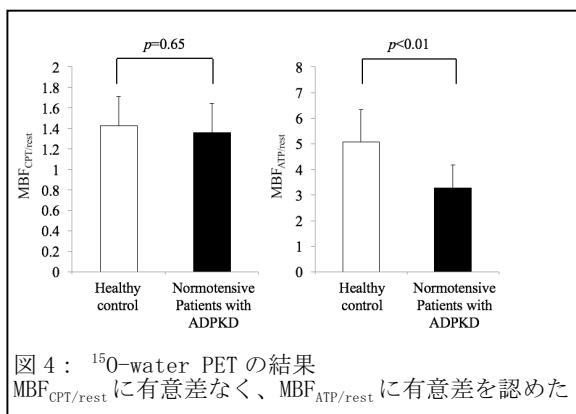


図 4: <sup>15</sup>O-water PET の結果  
MBF<sub>CPT/rest</sub> に有意差なく、MBF<sub>ATP/rest</sub> に有意差を認めた

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)

1. Yamamoto J, Nishio S, Hattanda F, Nakazawa D, Kimura T, Sata M, Makita M, Ishikawa Y, and Atsumi T. Branched-chain Amino Acids Enhance Cyst Development in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Kidney Int.* 2017 Mar21 (Epub ahead on print) 査読有
2. Kusunoki Y, Nakazawa D, Shida H, Hattanda F, Miyoshi A, Masuda S, Nishio S, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A. Peptidylarginine deiminase inhibitor suppresses neutrophil neutrophil extracellular trap formation and MPO-ANCA production. *Front Immunol.* 8:7:227. 2016. 査読有
3. Nakazawa D, Shida H, Kusunoki Y, Miyoshi A, Nishio S, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A. The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis. *J Autoimmun.* 67:19-28. 2016. 査読有
4. Horie S, Mochizuki T, Muto S, Hanaoka K, Fukushima Y, Narita I, Nutahara K, Tsuchiya K, Tsuruya K, Kamura K, Nishio S, Suwabe T, Ubara Y, Ishimura E, Nakanishi K, Furukawa K, Kimura K, Matsuo S. Evidence-based clinical practice guidelines for polycystic kidney disease 2014. *Clin Exp Nephrol.* 20(4):493-509. 2016. 査読有
5. Sakuhara Y, Nishio S, Morita K, Abo D, Hasegawa Y, Yuasa N, Mochizuki T,

- Soyama T, Oba K, Shirato H, Kudo K.  
Transcatheter arterial embolization with ethanol injection in symptomatic patients with enlarged polycystic kidneys. *Radiology*. 277(1):1277-85. 2015. 査読有
6. Yokoyama H, Sugiyama H, Narita I, Saito T, Yamagata K, Nishio S, Fujimoto S, Mori N, Yuzawa Y, Okuda S, Maruyama S, Sato H, Ueda Y, Makino H, Matsuo S. Outcomes of primary nephrotic syndrome in elderly Japanese: retrospective analysis of the Japan Renal Biopsy Registry (J-RBR). *Clin Exp Nephrol*. (3):496-505. 2015. 査読有
7. Yazaki M, Yoshinaga T, Sekijima Y, Nishio S, Kanizawa Y, Kametani F, Miyashita K, Hachiya N, Higuchi K, Ikeda S. The first pure form of Ostertag-type amyloidosis in Japan: a sporadic case of hereditary fibrinogen A $\alpha$ -chain amyloidosis associated with a novel frameshift variant. *Amyloid*. 22(2):142-4. 2015. 査読有
8. Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, Yoshida M, Nishio S, Atsumi T, Ishizu A. Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase ANCA-associated microscopic polyangiitis. *J Am Soc Nephrol*. 25(5):990-7. 2014. 査読有
9. Toyonaga T, Manabe O, Gaertner FC, Nakagaki T, Nishio S, Suzuki A, Tamaki N. Diffuse renal (18)F-FDG uptake of a patient with fever of unknown origin revealed sarcoidosis. *Clin Nucl Med*. 39(7):648-9. 2014. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 西尾妙織: 疾患モデル動物-病態解明と

創薬における有用性と限界を知る「PKD」,  
第37回腎臓セミナー Nexus Japan, 東京  
医科歯科 鈴木章夫記念講堂 (東京都文京  
区) 2015

2. 西尾妙織: シンポジウム 3 PKD~発症機  
序解明・新規治療開発から 「PKD と高血  
圧」 第 57 回日本腎臓学会 2014 年 7 月  
5 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[図書] (計 4 件)

1. 西尾妙織: 「多発性嚢胞腎の高血圧に関わ  
る嚢胞増悪因子の解析と治療法の解明」。  
160-4 別冊 (堀江重郎 編集: BIO Clinica  
慢性炎症と疾患 泌尿器の慢性炎症、北隆館、  
東京) (2016)
2. 西尾妙織: 「ADPKD における代謝系細胞内  
情報伝達」。813-6 (腎と透析編集委員会編  
集: 腎と透析 第 80 巻 6 号、東京医学社)  
(2016)
3. 西尾妙織: 「多発性嚢胞腎患者の動脈塞栓  
療法」。300-4 (山縣邦弘・南学正臣 編集:  
腎疾患・透析 最新の治療 2017-2019、南  
江堂) (2016)
4. 西尾妙織: 疾患モデル動物: 病態解明と創  
薬研究における有用性と限界を知る 多発性  
嚢胞腎 (PKD), 日本腎臓学会誌 57 巻 8  
号: 134-135, 2015

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 妙織 (NISHIO SAORI)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：90463736

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )