

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：藤田 陽子

専攻分野：内科学（腎臓・高血圧内科）

指導教授：柴垣 有吾

主論文の題目：

Angiotensin II Type 1a Receptor Loss Ameliorates Chronic

Tubulointerstitial Damage after Renal Ischemia Reperfusion.

（アンジオテンシン II type 1a 受容体（AT1a）欠損は、腎虚血再灌流後の慢性腎障害を抑制する）

共著者：

Daisuke Ichikawa, Takeshi Sugaya, Keiichi Ohata, Jun Tanabe,

Kazuho Inoue, Seiko Hoshino, Tatsuru Togo, Minoru Watanabe, Kenjiro

Kimura, Yugo Shibagaki, Atsuko Kamiyo-Ikemori

緒言

高齢化に伴い、慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease; CKD）の罹患者は増加している。CKDは進行すると末期腎不全（透析導入）や心血管死亡などの重大な転帰をもたらすため、CKDの根治療法が強く求められている。近年、CKDには、最初からCKDとして発症するタイプに加え、急性腎障害（Acute Kidney Injury ; AKI）後にCKDに移行するタイプが存在することが明らかとなり注目されている。AKIは従来、可逆性と考えられていたが、加齢による腎臓の予備機能が低下した患者においては、軽症のAKIでもCKDへ容易に進展することが明らかになり、AKIからのCKD進展抑制対策の創生が強く求められる。CKD治療薬として広く推奨されているアンジオテンシンII受容体拮抗薬（ARB）はAKIを悪化させる薬剤とされているが、AKI後のCKD進展への影響は十分に検討されていない。そこで、本研究では、ARBを服用する状況を再現するため、アンジオテンシンII受容体欠損マウスを使用し、重度のAKIモデル（片腎虚血再灌流）を作成して、AKI後のCKDの病態を野生型マウスと比較し検討した。

方法・対象

アンジオテンシン II 受容体のアイソタイプ AT1a を欠損させたオス

AT1a 欠損 (Ko) マウスと、遺伝的背景が同じオス C57BL/6J 野生型 (WT) マウスを使用した。吸入麻酔下で、マウスの右腎動静脈茎を 45 分間クランプして腎虚血を誘導し、その後開放した。腎虚血再灌流 (IR) 後、3 日、14 日、28 日、70 日に右腎臓および IR70 日目の IR 腎のコントロールとして左腎臓を摘出した。また、Ko マウスは低血圧を示すことから、低血圧による CKD 進展への影響を見るため、一部の WT マウスには、血管拡張薬 (ヒドララジン、1mg/kg/day) を IR 7 日前から投与した。さらに、右腎 IR による左腎への影響を除外するため、IR3, 14, 28 日後の IR 腎のコントロールとして、sham マウスを作成した。

摘出された腎臓を使用し、腎重量・腎断面積の測定、PAS 染色、免疫染色 (type I collagen、type III collagen、F4/80、Aquaporin-1、PCNA) を行った。また、リアルタイム定量 PCR を用いた遺伝子 (*α -1 collagen type I*、 *α -1 collagen type III*、*TGF- β* 、*TNF- α* 、*MCP-1*、*IL-18*、*IL-1 β* 、*Wnt4*、 *β -catenin*、*AT2*) の発現解析、Western blotting による蛋白 (HIF-1 α 、CD34) の発現解析を行った。腎臓での酸化ストレスの程度は、Malondialdehyde (MDA) で評価した。

なお本研究は聖マリアンナ医科大学動物実験委員会 (承認番号 TG200325-4) の承認を得たものである。統計手法は平均値±標準誤差で表し、統計学的有意差は $p < 0.05$ に設定した。Kruskal-Wallis test で一元配置分析、続いて Steel test で多重比較、グループ間の比較に Student' s *t*-test を行なった。

結果

IR 後 70 日目における AKI 後の CKD 評価: WT マウスでは、著明な腎萎縮、腎間質線維化 (Collagen type I、Collagen type III)、近位尿細管脱落 (Aquaporin-1) が認められたが、Ko マウスでは、それらが有意に抑制された ($P < 0.05$)。Ko マウスと同程度の低血圧を示したヒドララジン投与 WT マウスでは、Ko マウスと同様の所見は認められなかった。これらの結果は、AT1a 欠損が血圧非依存的に AKI 後の CKD 進展を著明に抑制することを示した。そこで、そのメカニズムを明らかにするため、IR 後の急性期 (IR 後 3 日目) および慢性期 (IR 後 14、28 日目) の評価を経時的に行った。

IR 後 3 日目における急性期腎評価: WT マウスと Ko マウスでは、腎腫大、急性尿細管壊死を含む尿細管障害 (PAS 染色)、近位尿細管脱落 (Aquaporin-1)、マクロファージ浸潤 (F4/80)、尿細管再生程度 (PCNA) は、同程度であった。炎症性サイトカイン *MCP-1* の遺伝子発現は WT マウスと比較し、Ko マウスで有意に抑制された ($P < 0.05$) が、炎症性サイトカイン *TNF- α* と線維化に関与するサイトカイン *TGF- β* の遺伝子発現は同程度であった。これらの結果は、AKI の程度が、両群で同程度であ

ったことを示した。

IR 後 14 日目, 28 日目における AKI 後の慢性期腎評価: IR 後 14 日目では、*MCP-1* 発現およびコラーゲン type III の発現は、Ko マウスで有意に抑制された ($P < 0.05$) が、間質へのマクロファージ浸潤、コラーゲン type I 発現、近位尿細管脱落は、WT マウスと Ko マウスで同程度であった。一方、IR 後 28 日目では、間質の炎症や線維化、近位尿細管脱落、各種サイトカイン産生が、WT マウスと比較し、Ko マウスで有意に抑制された ($P < 0.05$)。IR 後 14 日目において、WT マウスで増加した腎酸化ストレス (MDA) や腎低酸素素 (HIF-1 α) 程度は、Ko マウスで有意に低く ($P < 0.05$)、血管内皮細胞発現 (CD34) が有意に高値であった ($P < 0.05$)。腎線維化促進因子である Wnt/ β -Catenin 系は、*Wnt4* 遺伝子発現は IR 後 28 日目において、 *β -Catenin* 遺伝子発現は IR 後 14 日目、28 日目において WT マウスと比較し、Ko マウスで有意に抑制された ($P < 0.05$)。さらに、腎線維化への抑制効果が指摘されているアンジオテンシン II 受容体のアイソタイプ AT2 の遺伝子発現が、IR 後 28 日目では、WT マウスと比べて Ko マウスが有意に高値であった ($P < 0.05$)。これらの結果は、AT1a 欠損が、腎炎症抑制、酸化ストレス軽減、内皮細胞維持による低酸素素抑制、線維化抑制作用により、AKI 後の CKD 進展を抑制したと考えられた。

考察

本研究により、AT1a 欠損は、血圧非依存的に重度の IR 後の CKD 進展を抑制することが明らかにされた。さらに、その機序として、AT1a 欠損による抗炎症作用、抗酸化ストレス作用、低酸素素抑制作用、抗線維化作用、AT2 発現維持作用が考えられた。

本研究では、AT1a 欠損により、IR 後急性期の腎組織障害の増悪は認められず、むしろ炎症性サイトカインの一部の発現は抑制されていたことから、AKI 発症リスクが高いと予想される症例において、早期からの ARB 服用が AKI 後の CKD 抑制に重要であると考えられる。しかし、高齢者において、ARB は、糸球体ろ過量の低下や低血圧により AKI 発症の頻度を増加させることが知られており、ARB による AKI 後の CKD 進展抑制効果が得られる年代を明らかにする必要がある。

結論

AT1a 欠損により、IR 後の慢性腎障害が抑制されたことから、ARB は AKI 後の CKD 進展を抑制する可能性が示された。