

論文の内容の要旨

論文題目 腎障害における LOX-1 発現亢進について

指導教官 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年入学

医学博士課程

内科学専攻

学生証番号 97391 上野 知子

様々な原因による慢性腎不全の進行因子として、糸球体過剰濾過を中心とする血行力学的因子やレニン・アンジオテンシン系の活性が重視されている。その他の因子として TGF- β 等の液性因子や酸化ストレス、さらに脂質代謝異常の関与が示唆されている。これらの因子は腎臓のメサンギウム細胞や血管内皮細胞等に作用して種々のサイトカインや growth factor を放出し、最終的に糸球体硬化や間質の繊維化に至ると考えられているが、その詳細な機序については未だ明らかではない。近年、腎障害の進展における動脈硬化と糸球体硬化の類似性が指摘されていることから、酸化 LDL の重要性が注目されている。

酸化 LDL は腎臓にて様々なサイトカインや接着因子等の放出を促し、これらの結果として細胞増殖、細胞外基質増生、泡沫細胞の浸潤等を生じ、腎障害をきたすことが想定されている。腎不全モデル動物を用いた実験においても、高脂血症の原因となる脂質代謝異常が腎障害に関与していることが示唆されている。

このように、酸化 LDL と腎障害の進展に何らかの関与があることは様々な報告から示唆されているものの、その詳細な機序や他の腎機能増悪因子との関連については未だ明らかではない。

1997 年に沢村らによって血管内皮細胞に存在する酸化 LDL 受容体がクローニング

され、細胞外にレクチン様ドメインを持つために Lectin-like oxidized LDL receptor, LOX-1 と命名された。LOX-1 を介して酸化 LDL の細胞障害作用が生じること、炎症性サイトカイン、shear stress、酸化ストレス、アンジオテンシン II 等の種々の因子で発現が誘導されること、血管内皮細胞の他にマクロファージ、血管平滑筋細胞にも発現することが報告されている。また、LOX-1 はヒトの動脈硬化病変部位での発現が亢進している報告などから、動脈硬化形成との関連についても示唆されている。

当教室の長瀬らは、遺伝的高血圧モデルラットである Dahl 食塩感受性 (DS) ラットを用いて腎臓での LOX-1 の発現を解析し、DS 高食塩負荷群では対照群に比べて著明な血圧上昇と、血清クレアチニン、尿素窒素上昇、尿蛋白量増加といった腎障害の発症と並行して腎臓における LOX-1 の発現が亢進していることを報告した。これらの結果から LOX-1 と腎障害に何らかの関連があることが示唆された。

しかしながら、Dahl 食塩感受性ラットは食塩感受性高血圧の遺伝的モデルラットであるので、より一般的な腎障害モデルにおける LOX-1 発現を解析することを考え、私は慢性腎不全モデル動物である 5/6 腎摘ラットを作成してその残存腎における LOX-1 発現とその降圧剤投与による変化を調べ、腎臓での LOX-1 の発現機序と腎障害の関連についての考察を加えることとした。

プロトコール1：体重 200-220 g のオス SD ラットを購入し、右腎を全摘出しその後左腎を 2/3 摘出する 5/6 腎摘を施行した。コントロールは同様に麻酔をして開腹したのみの Sham ope を施行したラットを用いた。5/6 腎摘ラットの一部は、アンジオテンシン type I 受容体拮抗薬カンデサルタンを 10mg/kg/day で経口投与した。6 週間 0.5%NaCl 含有の普通食にて飼育後に tail cuff 法にて血圧を測定し、残存腎を摘出して LOX-1 mRNA、LOX-1 蛋白発現、残存腎組織内のアンジオテンシン II を測定した。その他、尿蛋白、血清クレアチニン、血清尿素窒素、総コレステロール値などを測定した。LOX-1 の mRNA は Northern blot 法で解析した。蛋白発現は、一次抗体に抗ラット LOX-1 ポリクローナル抗体を用いて凍結切片上にて免疫染色を行った。腎組織内アンジオテンシン II 含有量は radioimmunoassay 法にて測定した。

プロトコール2：同様に 5/6 腎摘をした慢性腎不全ラットに降圧剤ヒドララジンを 6mg/kg/day 飲水投与し、6 週間後の血圧、尿蛋白、血清クレアチニン、血清尿素窒素、総コレステロールなどを測定した。残存腎における LOX-1 の発現は Poly A Northern blot 法にて解析した。

プロトコール1の結果、5/6 腎摘ラット群では収縮期血圧の上昇、腎機能低下、糸球体肥大や間質での著明な単球の浸潤を伴う腎組織障害とともに、残存腎での LOX-1 発現はコントロールと比較して約 4.5 倍に亢進していた。アンジオテンシン II type I 受容体拮抗薬カンデサルタン投与によって、収縮期血圧降下、腎障害改善と共に LOX-1 の発現は抑制された。収縮期血圧、血清クレアチニン、尿素窒素、尿蛋白と LOX-1 発現量には相関関係を認めたが、最も相関係数が高かったのは尿蛋白であった。免疫染

色では LOX-1 蛋白発現は間質を中心に認められており、5/6 腎摘ラット群での抗 vWF 抗体、抗 ED-1 抗体、抗 α smooth muscle cell 抗体での染色結果から、LOX-1 は傍尿細管血管内皮細胞、マクロファージ、myofibroblast での発現の可能性が考えられた。尚、糸球体での発現はわずかしこ認められなかった。その他、5/6 腎摘ラット群の残存腎組織内におけるアンジオテンシン II 含有量はコントロール群と比べて上昇が認められた。

プロトコール 2 の結果、ヒドララジン投与群ではコントロールと同程度の降圧効果を認めたが、腎機能障害は改善しないにもかかわらず LOX-1 の発現はコントロールと比較して約 4.8 倍に増加していた。

これまでに LOX-1 の発現と動脈硬化病変との関連が示唆されており、腎臓での LOX-1 発現亢進は細動脈硬化を進展させ二次的に間質障害の進行や糸球体硬化の原因となりうると考えられた。また、血管内皮細胞では LOX-1 を介して MCP-1 の発現が亢進することが報告されており、LOX-1 の発現によって間質へのマクロファージの浸潤が増加して腎障害を悪化させる可能性も考えられた。マクロファージや fibroblast といった間質障害に直接関与している細胞でも LOX-1 が発現している可能性が認められ、LOX-1 を介した酸化 LDL の細胞障害作用が間質での腎障害を進行させる可能性も考えられた。プロトコール 2 の結果からは、慢性腎不全モデルラットにおける LOX-1 の発現亢進には、血圧上昇よりもむしろアンジオテンシン II の影響が強いと示された。

私は一般的な慢性腎不全モデルである 5/6 腎摘ラットを用いて、腎臓での LOX-1 発現亢進を示した。各種降圧剤を用いた検討と、残存腎組織内アンジオテンシン II 含有量の測定結果より、残存腎での LOX-1 発現亢進はアンジオテンシン II の影響を強く受けていると考えられた。また、腎間質中心の発現であること、腎機能低下と並行して LOX-1 発現が亢進したことから、LOX-1 が進行性の腎障害の病態、特に間質の病変進行に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。