

# 論文内容の要旨

論文題目

アンジオテンシン II 投与による腎障害と酸化ストレス

および脂質動態異常について

指導教官 永井良三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 齋藤 幹

## 第1章-緒言-

大規模試験の結果から ACE 阻害薬や AT1 受容体拮抗薬が、心筋梗塞後のリモデリングの抑制や心不全の予後改善などの心保護作用、また蛋白尿減少などの腎保護作用を有することが明らかとなった。

レニン-アンジオテンシン(R-A)系は循環血中のR-A系と、組織内のR-A系の2つに分けられる。かつてR-A系は全身の循環ホルモンとしての作用が主に考えられてきたが、心臓や血管壁などの局所ではアンジオテンシノーゲンやレニン、アンジオテンシン変換酵素などが存在し、循環血中のR-A系とは独立にアンジオテンシン II (ANG II) が産生されている可能性もある。

ANG II は様々な機序で臓器障害に関与する。酸化ストレスもその一因と考えられている。ANG II はラットの培養平滑筋細胞や大動脈において NADPH オキシダーゼを活性化し活性酸素の産生を亢進することが確認されている。また、ANG II 投与ラットへの SOD 投与は高血圧の発症を抑制したが、ノルアドレナリン(NE)投与ラットでは SOD は同様の効果を及ぼさない。これらの知見は ANG II による血圧上昇へ酸化ストレスが関与していることを示唆している。

酸化ストレスは生体の寿命を規定する重要な因子であると考えられている。Klotho マウスは Kuro-o らにより報告された老化モデルマウスであり、動脈硬化、肺気腫、骨粗鬆症、不妊、短命など全身的な症状をきたす。腎臓での *klotho* 遺伝子の発現は代謝異常や高血圧を有する動物モデル、さらにヒト腎不全症例で減少することが報告されている。われわれは ANG II 投与ラットの腎臓で *klotho* 遺伝子の発現が低下することを報告した。

体内の遊離鉄はフェントン反応により細胞毒性の非常に強いヒドロキシラジカルを産生する。HO-1 ノックアウト動物や欠損症症例では肝臓および腎臓に鉄の沈着が認められ、生体における鉄の再利用と酸化ストレスに対する防御因子として HO-1 の重要性が証明された。われわれは ANG II 投与ラットにおいて腎機能の低下と蛋白尿の増加が認められること、腎尿細管に HO-1 の発現が亢進すること、さらに同部位に鉄の沈着が認められること、カテコラミン投与では同様の所見が認められないことを報告した。これらのことは ANG II 投与が腎臓への鉄沈着とそれに引き続く酸化ストレス亢進というメカニズムにより腎機能を悪化させている可能性を推測させる。

今回実験 1 では ANG II 投与による腎での *klotho* 遺伝子の発現と酸化ストレスの関連について検討した。実験 2 では線維化関連遺伝子である TGF- $\beta$  1, collagen 遺伝子の発現と酸化ストレスの関連についても検討を行った。さらに実験 3 ではスーパーオキシドと TGF- $\beta$  1 の局在について検討を行った。

## 第2章-実験1-

### 鉄のキレーターとフリー・ラジカル・スカベンジャーの投与は アンジオテンシン II 投与ラットにおける抗老化遺伝子 *klotho* の 発現低下を抑制する

*Klotho* マウスは老化徴候類似の症状をしめすことが知られている。*Klotho* マウスで欠損している *klotho* 遺伝子は主に腎尿細管に発現している。最近ヒトにおいて *klotho* 遺伝子が寿命や冠動脈疾患と関係している可能性が指摘されている。このことは *klotho* 遺伝子の発現がヒトにおいても老化と関係していることを類推させる。

われわれは ANG II 投与がラットの腎 *klotho* 遺伝子の発現を低下することを報告した。また別の実験では ANG II の投与により腎尿細管に鉄の沈着が認められるがカタコラミンの投与では認められないことを報告した。今回われわれは ANG II 投与による腎での *klotho* 遺伝子の発現低下が鉄のキレーションで抑制されるかどうか、逆に鉄の負荷により *klotho* 遺伝子が抑制されるかどうかについて検討した。

その結果、ANG II 投与ラットでは、腎での *klotho* 発現は低下した。鉄の負荷も ANG II と同程度まで *klotho* 発現が低下した。また ANG II による *klotho* の発現低下は鉄のキレーター (DFO) とラジカル・スカベンジャー (T-0970) により緩和された。

また、ANG II 投与ラットでは 8-epi-PGF<sub>2α</sub> 値は上昇していた。一方鉄負荷ラットでも ANG II 投与ラットと同程度まで上昇していた。ANG II 投与による 8-epi-PGF<sub>2α</sub> 値の上昇は DFO により部分的に T-0970 により完全に抑制された。また、T-0970 は ANG II による蛋白尿を改善した。

これらの結果から、ANG II 投与による *klotho* の発現低下には、腎における鉄動態異常が関与していることを示唆している。また、ANG II 投与ラットへラジカル・スカベンジャーを投与することにより *klotho* の発現低下が抑制されたことから、活性酸素種 (ROS) の増加が ANG II 投与による *klotho* 遺伝子の発現に重要な影響を与えている可能性が示唆される。

*klotho* の発現は自然発症高血圧ラットや DOCA-salt ラット、OLETF ラットなどの、循環系や代謝系の疾患の動物モデルにおいて発現低下することが報告されている。循環系や代謝系を改善する薬剤の投与により *klotho* の腎での発現低下が改善することから *klotho* の発現には遺伝的な背景の他に循環系や代謝系の因子も関与していると考えられる。*in vitro* での *klotho* を発現する細胞の報告は少なく、培養細胞系で *klotho* の発現調節の経路を解明するのは現在のところ困難である。

今回の実験ではわれわれは、ラジカル・スカベンジャーの投与により ANG II 投与による *klotho* 遺伝子の発現低下を抑制することを示したが、このことは腎臓での *klotho* 遺伝子の発現には酸化ストレスが関与していることを示唆している。NE は血漿で 8-epi-PGF<sub>2α</sub> を増大させたが、腎臓で *klotho* 発現を減少させなかった。このことは血中の酸化ストレスマーカー上昇がそのまま、腎における *klotho* の発現低下につながることを意味している。

フリー・ラジカル・スカベンジャーは腎クレアチニン・クリアランスを改善しなかったが ANG II による蛋白尿は著明に改善した。このことは ANG II 投与による腎障害が *klotho* の発現改善により軽減していることと一致している。しかし、OPC-15161 やジメチル・チオ尿素などの抗酸化剤が蛋白尿を改善することも報告されており、抗酸化剤による蛋白尿の改善が *klotho* の発現低下を介した現象かどうかは更なる研究が必要である。

## 第3章-実験2-

### アンジオテンシン II 投与高血圧ラットの腎臓における TGF-β1 の発現亢進に対する鉄動態異常の役割

Transforming Growth Factor (TGF-β) は腎の糸球体や尿細管の線維化の進展や腎不全の進行に関与する重要な因子であることが知られている。また、AT1 受容体のブロックは糸球体硬化症や高血圧、糖尿病での腎発症時の TGF-β の発現亢進を抑制する。逆に ANG II 投与は TGF-β の発現を亢進することや、糖尿病モデルラットや片側腎モデルラットへの抗 TGF-β 抗体の投与により腎障害が改善するなどの報告は、R-A 系の活性化が TGF-β の作用を介して臓器障害に働く可能性を示唆している。

鉄負荷が TGF- $\beta$  1 や線維化関連遺伝子の発現を亢進することが肝臓や心筋細胞で報告されている。さらにラット腎の間質線維芽細胞は鉄の負荷により TGF- $\beta$  1 の発現を亢進することが報告されている。これらの所見からわれわれは ANG II 投与による腎における鉄動態異常が TGF- $\beta$  の発現亢進に何らかの関係があると推測した。実験2では、鉄のキレーターとフリー・ラジカル・スカベンジャーが ANG II 投与による腎の TGF- $\beta$  や collagen 遺伝子の発現亢進に対する影響について検討した。

この結果、ANG II を投与することにより腎臓で TGF- $\beta$  1, collagen type I, collagen type IV の発現が亢進すること、またこの現象が鉄のキレーターとラジカル・スカベンジャーにより抑制されることを示した。逆に鉄負荷はこれらの遺伝子発現を亢進した。以上から ANG II 投与による TGF- $\beta$  1, collagen type I, collagen type IV の腎での発現亢進の少なくとも一部は、腎での鉄の動態異常とそれに伴う酸化ストレスの亢進の結果によるものと推測された。

組織の線維化の進展における鉄の役割は肝臓においてよく研究されている。アルコール性肝機能障害、C型肝炎、遺伝性ヘモクロマトーシスで肝臓での TGF- $\beta$  の発現亢進や線維化の進展において鉄の過剰がメカニズムのひとつとして考えられている。過酸化脂質が鉄負荷モデルの動物の肝臓で増加しており、また抗酸化剤の投与により鉄負荷モデルでの線維化の進展が抑制されるといった現象から、鉄過剰が ROS の発生増加に関与していることが示唆される。今回の実験は ANG II 投与ラットの腎臓では、鉄の動態変化が線維化関連遺伝子発現を調節している可能性を示している。

ANG II 投与による TGF- $\beta$  1 mRNA の発現は主に腎尿細管細胞で認められ、その他糸球体細胞や炎症細胞でも認められることを示した。糖尿病性腎症や虚血性腎症など他の腎障害モデルでも尿細管細胞が TGF- $\beta$  1 の発現に大きくかかわっていることが報告されている。糖尿病ラットや抗酸化剤制限ラットなどの動物モデルを用いた実験により、腎での TGF- $\beta$  1 の発現亢進には ROS が細胞内伝達物質として働いていると考えられている。今回の実験では ANG II 投与による TGF- $\beta$  1 の発現亢進は DFO と T-0970 により抑制され、ANG II により惹起された酸化ストレス関連遺伝子である HO-1 の発現は、DFO と T-0970 により抑制された。われわれは以前 ANG II 投与による ROS の産生は DFO により抑制され、逆に鉄デキストランの投与により ROS の産生が亢進することを示した。鉄動態の異常により増加した酸化ストレスが、ANG II 投与のラットモデルによる腎での TGF- $\beta$  1 発現の原因のひとつとして考えられる。今回の実験では TGF- $\beta$  1 の高発現部位は必ずしも鉄が沈着した細胞とは一致していない。鉄沈着と TGF- $\beta$  1 の発現部位の解離の理由については不明であった。

ANG II 投与ラットで沈着がみられる鉄の由来は明らかではない。尿細管で鉄の沈着が認められることや、同部位で HO-1 の発現が認められることなどヘムタンパクの過剰投与と ANG II 投与モデルの間には類似点があることから、ANG II 投与はヘムタンパクの負荷となっていることが類推される。実際、ANG II の投与では心筋や骨格筋の変性が起こることが報告されており、ミオグロビンが放出され全身に循環していることが推測される。

T-0970 が ANG II で誘導された腎臓のフェリチンタンパクの発現亢進を抑制するメカニズムについては明らかではない。しかし、ラジカル・スカベンジャーは ANG II による筋肉の障害を抑制し、結果的に腎臓での鉄動態の異常を緩和している可能性がある。われわれはスーパーオキシドの産生が ANG II 投与ラットの腎臓で増加していることを、蛍光顕微鏡で明らかにした。過去の研究により鉄の負荷によりミトコンドリアのスーパーオキシドの産生亢進が認められている。スーパーオキシドの産生は顆粒状の物質の周辺で最も強く確認されたが、この顆粒状物質は鉄染色陽性ではなかった。

#### 第4章-実験3-

##### アンジオテンシン II 投与ラットの腎臓における 脂質集積と酸化ストレスについて

高脂血症は高血圧・糖尿病・喫煙などとともに心血管イベントの危険因子として知られている。大規模臨床試験では、スタチン系などの高脂血症に対する薬剤の心血管イベントの抑制効果が認められている。高コレステロールの食事を与えたラットでは、尿蛋白が増加し血中クレアチニン

濃度が上昇し腎の間質や尿細管で脂質の集積が認められ、自然発症高コレステロールラットではアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の投与により血漿総コレステロールが減少し蛋白尿を軽減するとの報告などから、R-A 系の抑制は脂質低下作用や蛋白尿の軽減作用があることが推測される。

実験2で示したようにグリセオールによるヘム鉄負荷モデルと ANG II 投与モデルには共通点が多い。Zager らはヘム鉄負荷モデルにより腎皮質におけるコレステロール濃度上昇することを報告している。このことから鉄の投与が腎でのコレステロール集積に関与している可能性がある。

実験2では ANG II 投与によるスーパーオキシドの発現が腎尿細管の顆粒状物質の周辺で起こること、さらに腎尿細管での TGF- $\beta$  1 の発現亢進が鉄陽性細胞とは一致しなかったことを示した。われわれはこの顆粒状物質が脂質ではないかと推測した。実験3では ANG II 投与により尿細管に認められる顆粒状の物質について同定を行い、またこの物質が DFO と T-0970 により集積が緩和されるかについて検討を行った。

実験3では ANG II 投与により腎尿細管に脂質の集積が認められた。また、位相差顕微鏡により認められた顆粒状物質は脂質と確認された。脂質の集積は NE では認めず、DFO および T-0970 の投与にて軽減した。また、ANG II 投与により血清総コレステロール、中性脂肪の上昇が認められた。ANG II 投与ラットの腎皮質ではコントロールと比較して SREBP-1 の発現が有意に亢進していた。また NE 投与では SREBP-1 の発現亢進は認められず、DFO と T-0970 の投与にて ANG II による SREBP-1 の発現亢進は抑制された。また、脂質集積細胞の周囲でのスーパーオキシドの産生増加が確認された。TGF- $\beta$  1 による *in situ* hybridization により、腎尿細管と一部の血管に TGF- $\beta$  1 の発現亢進が認められた。脂質染色と比較したところ、脂質沈着と一致して TGF- $\beta$  1 の発現が認められた。脂質染色と鉄染色陽性細胞との一致は一部分で、TGF- $\beta$  1 の発現亢進は脂質の集積した細胞に認められた。さらに TGF- $\beta$  1 の発現が認められた血管壁には脂質の集積が認められた。

腎臓へ脂質の集積をきたす疾患がいくつか報告されている。糖尿病性腎症のラットや高脂血症食ラットでは腎尿細管と間質に脂質の沈着を認め、グリセオール負荷マウスや虚血腎、敗血症、熱ショックにより腎皮質でもコレステロール濃度が上昇することが報告されている。

高脂血症食ラットで腎尿細管と間質に脂質の沈着を認めるという報告からは、血中のコレステロール濃度の上昇が結果的に脂質集積に関与していることが類推される。実際われわれの実験でも脂質集積を認めた ANG II 投与ラットでは血清脂質濃度は上昇していたが、脂質集積を認めないその他のモデルでは血清脂質濃度は上昇していなかった。しかし、血清脂質濃度の上昇がどのような機序で脂質沈着に結びつくかは不明である。

SREBP-1 は脂質の取り込みと脂質合成を調節する転写因子として知られている。ストレプトゾトシン・ラットでは血糖値の上昇により腎臓での SREBP-1 が上昇し腎臓に脂質の集積が認められる。血糖値の改善により SREBP-1 の発現が低下し腎での脂質集積が改善することから、腎での脂質集積には SREBP-1 の発現が関与している可能性が考えられる。われわれの実験でも ANG II 投与により腎臓で SREBP-1 の発現が亢進したが、DFO や T-0970 の投与により SREBP-1 の発現亢進が抑制された。これらの結果から ANG II 投与による腎臓での脂質の集積には腎臓での脂質合成亢進が脂質集積の原因のひとつと推測される。

実験2で ANG II により腎での TGF- $\beta$  1 の発現が亢進し、尿細管でスーパーオキシドの産生が亢進することを示した。実験3ではスーパーオキシドの産生は脂質集積細胞の周辺で起こり、この部位と一致して TGF- $\beta$  1 の産生が亢進していることが明らかになった。糖尿病ラットや抗酸化剤制限ラットなどの動物モデルを用いた実験により、腎での TGF- $\beta$  1 の発現亢進には ROS が細胞内伝達物質として働いていると考えられており、今回の実験結果と一致する。

実験3ではさらに ANG II 投与ラットの腎血管壁においても TGF- $\beta$  1 の発現亢進部位と一致して脂質集積が確認された。このことは ANG II による脂質の集積と TGF- $\beta$  1 の発現亢進が腎以外の心血管系でも起こりうることを示唆しているが、それについては今後の研究課題である。