

## 論文の内容の要旨

論文題目 ポドサイト障害におけるアルドステロン-TRPC6-  
カルシウムシグナルの関与

指導教員 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

高良 洋平

近年、糖尿病や高齢化人口の増加を背景に透析人口が増加しており、医療費を含めて社会問題になっている。さらに、腎機能障害は透析療法にいたる前の段階から心血管疾患の高リスクとなることがわかり、その早期発見・治療の重要性が唱えられるようになってい

る。腎機能障害進行の共通機転として、糸球体高血圧に続いて起こるポドサイト障害と、それに伴う蛋白尿が重要であると認識されるようになってきた。ポドサイト障害を生じる因子として、機械的刺激 (stretch, flow)、レニン-アンギオテンシン-アルドステロン系 (RAAS) の亢進、酸化ストレス増大などが挙げられているが、その機序は明らかではない。近年、アンギオテンシン II 阻害薬を含めた従来治療に対する、抗アルドステロン薬の相加的な抗蛋白尿効果がメタ解析で示され、腎保護効果が期待されるとともに、アルドステロンのポドサイト障害作用が注目されている。また、最近、家族性ネフローゼ症候群の

原因遺伝子として、カルシウムチャネルの一つである、TRPC6 が同定され、Ca<sup>2+</sup>シグナル変化がポドサイト障害に重要な役割を果たしている可能性が推測されるようになってきている。これまでアルドステロンによるポドサイト障害と TRPC6 を介した Ca<sup>2+</sup>シグナルとの関連を検討した報告は無いため、本研究では「アルドステロンが TRPC6 からの Ca<sup>2+</sup>シグナルを増強して、ポドサイト障害を引き起こし、早期から腎障害に関わっている」という仮説を立てて動物実験（ラット）と細胞実験（培養ポドサイト）で検証した。

動物実験では、3 週齢のオス Sprague-Dawley (SD) ラットに片腎摘を施し高食塩を負荷して、糸球体高血圧から糸球体硬化へいたるモデルを作成し、ポドサイト障害の有無と TRPC6、血圧・蛋白尿の変化を検討した。また抗アルドステロン薬である eplerenone、血管拡張薬の hydralazine 投与の効果と比較検討した。偽手術をして普通食を与えたオス SD ラットを対照とした。ポドサイト障害を、組織所見と desmin 染色で評価し、ポドサイト関連分子の発現変化を糸球体分画で real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法とウェスタンブロット法を用いて評価した。さらに、尿中酸化ストレスマーカー測定により酸化ストレス産生の変化を評価した。細胞実験では、TRPC6 からの Ca<sup>2+</sup>流入を刺激する 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) を用いて、アルドステロンによる Ca<sup>2+</sup>シグナルの変化と、TRPC6 蛋白発現・局在変化を検討した。また酸化ストレスの関与を調べるために、過酸化水素投与による Ca<sup>2+</sup>シグナルの変化と、局在変化を検討した。さらに TRPC6 蛋白発現増加の影響を TRPC6-GFP を過剰発現させた細胞で検討した。そしてジヒドロエチジウム染色でアルドステロンによる酸化ストレス産生の有無を検討した。

片腎摘高食塩負荷ラットの血圧は負荷 2 週目より対照ラットに比較して有意に高値を示

し ( $108.8 \pm 3.4 \text{mmHg}$  vs.  $130.6 \pm 4.1 \text{mmHg}$ ,  $P < 0.001$ ), 4 週目には高食塩負荷ラットが  $208.4 \pm 8.0 \text{mmHg}$ , 対照ラットが  $117.3 \pm 3.4 \text{mmHg}$  であった ( $P < 0.001$ )。蛋白尿は, まだ血圧の上昇していない負荷 1 週目よりすでに, 対照ラットに比較して有意に増加しており ( $0.35 \pm 0.10 \text{mg/day}$  vs.  $2.90 \pm 0.44 \text{mg/day}$ ,  $P < 0.001$ ), 4 週目まで有意に高値であった ( $11.96 \pm 0.63 \text{mg/day}$  vs.  $173.5 \pm 58.3 \text{mg/day}$ ,  $P < 0.001$ )。Eplerenone 投与ラットは, 4 週目の血圧は高食塩負荷ラットより有意に低く, 対照ラットより有意に高かったが ( $150.2 \pm 2.3 \text{mmHg}$ ,  $P < 0.05$ ), 蛋白尿は終始抑制され, 対照ラットと差を認めなかった。Hydralazine 投与ラットの血圧は高食塩負荷ラットに比較して eplerenone 投与ラットと同等に抑制されたが ( $144.8 \pm 4.3 \text{mmHg}$ ,  $P < 0.05$ ), 4 週を通して蛋白尿の抑制は認めず, eplerenone の降圧効果と独立した抗蛋白尿効果が示唆された。

片腎摘高食塩負荷ラットの腎組織は負荷 1 週目に最も強く細胞増殖性変化, ポドサイト足突起の融合, 内皮細胞の fenestration の消失を認め, 4 週目には巣状分節性の糸球体硬化 (FSGS) 所見を呈した。Desmin 染色の程度は高食塩負荷ラットで対照ラットに比べ有意に強く ( $P < 0.001$ ), ポドサイト関連分子である podocin, VEGF-A の発現は有意に低下していた ( $P < 0.05$ )。高食塩負荷ラットの TRPC6 は対照ラットに比べ有意に亢進していた ( $P < 0.05$ )。Eplerenone 投与ラットでは, これらの変化は全て抑制されていた。

尿中酸化ストレスマーカーである, 8-iso-PGF $2\alpha$  は高食塩負荷ラットで対照ラットに比べ有意に高く ( $1507 \pm 118.2 \text{pg/day}$  vs.  $3055 \pm 292.7 \text{pg/day}$ ,  $P < 0.01$ ), 8-OHdG は対照ラットとは有意差を認めなかったが eplerenone 投与ラットに比較して有意に高値であった ( $151.0 \pm 9.54 \text{pg/day}$  vs.  $440.8 \pm 69.6 \text{pg/day}$ ,  $P < 0.01$ )。

培養ポドサイトでは、アルドステロンの投与により、OAGによるCa<sup>2+</sup>流入が用量依存性に有意に増強し (P<0.05, 0.01), eplerenone と抗酸化薬である tempol の投与により各々コントロールレベルに復した。TRPC6 の蛋白発現は、アルドステロン投与により有意に亢進し (P<0.05), eplerenone により抑制された。また、過酸化水素の投与で用量依存性に OAG による Ca<sup>2+</sup>流入の有意な増強を認めた (P<0.05, 0.01)。

TRPC6 を過剰発現させた細胞では OAG による Ca<sup>2+</sup>流入の増強は認めなかったが、過酸化水素を投与した場合の増強反応に関しては、TRPC6 の過剰発現により更に有意な上昇を認め (P<0.05), TRPC6 の発現増加が OAG による Ca<sup>2+</sup>流入の増強に結びつくためには酸化ストレスが必要であることが示唆された。

TRPC6-GFP を遺伝子導入した細胞のイメージングでは、過酸化水素投与により TRPC6 の細胞内局在がダイナミックに変化する様子が観察された。アルドステロン投与および過酸化水素の投与により膜画分の TRPC6 の発現が亢進し、アルドステロンによる膜画分 TRPC6 の増加は eplerenone と tempol により抑制された。

アルドステロン投与により用量依存性に酸化ストレスの産生が有意に上昇し (P<0.01), eplerenone または tempol により抑制された。

以上の結果より、アルドステロンは腎障害早期から TRPC6 の発現を亢進させるとともに、酸化ストレス産生を介した TRPC6 の膜移行を促進することで、相加的にポドサイトへの Ca<sup>2+</sup>流入を増強して細胞障害を引き起こし、糸球体硬化形成に関与している可能性が示唆された。