

論文の内容の要旨

論文題目

腎障害における **Rac1**・ミネラルコルチコイド受容体系の役割についての検討

指導教員 藤田敏郎教授

東京大学大学院医学系研究科

2006年4月1日 入学

医学博士課程

内科学専攻 腎臓内科

氏名 河原崎和歌子

本研究では遺伝子改変により先天的にレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (RAAS) が亢進したツクバ高血圧マウスにおいて、食塩負荷によりリガンド非依存性に **Rac1**・ミネラルコルチコイド受容体 (MR) 系が活性化し、腎障害発症に関わることを示し、**Rac1** 制御が食塩感受性腎障害の治療に有効であることを示した。RAAS 亢進モデルにおける食塩感受性腎障害で **Rac1**-MR 系活性化が腎障害発症に関与することや、**Rac1** の活性化因子としての食塩の同定は新しい知見であり、本研究が、慢性腎臓病の新たな治療戦略として **Rac** 阻害薬の臨床応用を実現する上で有用と思われここに報告する。

まず、実験 1 において、RAAS の亢進のない野生型 C57 群と RAAS 亢進下であるが厳格な減塩下にある LS 群、RAAS 亢進と過剰食塩の併存する HS 群を設定したところ、C57 群に対し、THM の LS 群では高血圧や腎障害が出現しなかった。一方、THM に食塩を負荷すると、驚くことに、高血圧とともに、著明な腎障害を生じた。また、MR の下流または関連遺伝子発現も、厳格な減塩下では変化しないが、食塩負荷により有意に上昇しており、本モデルにおいては、食塩感受性に高血圧と腎障害を呈し、食塩は腎障害促進因子であること、食塩過剰下の腎組織では MR 活性が亢進し、腎障害発症に関与している可能性が示唆された。しかし、このときの血漿アルドステロン濃度 (PAC) を見てみると、LS 群では有意に上昇していたが、HS 群では LS 群に比し減少していたことから、本モデルの食塩感受性腎障害において、アルドステロン非依存性機序が腎

障害形成の病態に関与している可能性が示唆された。

このように、アルドステロンが低値にもかかわらず、**MR** 活性が亢進し、食塩感受性腎障害を生じることは、他のモデルでも経験されており、本モデルにおいても、**MR** 活性亢進にアルドステロン以外のリガンドまたは、リガンド以外の因子の関与が想定された。リガンド以外の **MR** 活性化因子としては、酸化ストレスなどが推測されていたが、我々は低分子量 G 蛋白質 **Rac1** がリガンド非依存性に **MR** の活性化を介して腎障害を惹起することを報告してきた。しかし、**Rac1-MR** 系活性化による腎障害の存在が判明するも、**Rac1** が生体内のどのような環境や刺激にて活性化するかは不明であった。本モデルの食塩負荷群における腎障害はアルドステロン非依存性に生じており、同時に、減塩下では認めないが、高食塩負荷で、腎組織における **Rac1** と **MR** の活性亢進を認めたことから、アルドステロンが低値の状況でも、食塩負荷が引き金となり **Rac1-MR** 系の活性化を介した腎障害が惹起されていることが想定された。そこで実際に食塩負荷により腎障害を生じている時の腎組織において、**Rac1** 活性と **MR** 活性を測定してみると、両者が共に亢進していた。

このように、本モデルの食塩感受性腎障害発症に **Rac1-MR** 系亢進が関わり、それに食塩の存在が必須であることは新しい知見であると考えられたが、実際に治療への臨床応用できる可能性としては、食塩負荷時の **Rac1** や **MR** 活性の制御が、生体内で腎障害を抑制しうるかを、**Rac1** 及び **MR** 阻害薬投与により確認する必要があると考え、実験 2 を行った。

実験 2 においては、野生型 **C57** 群と食塩感受性腎障害モデルである **THM** を厳格な減塩下においた **LS** 群、食塩過剰下においた **HS** 群、食塩過剰下に選択的 **MR** 拮抗薬エプレレノンにて介入した **Epl** 群および **Rac1** 阻害薬 **EHT1864** 投与にて介入した **EHT** 群を設定した。**C57** や **LS** 群に比し、**HS** 群では有意な血圧の上昇、著明なアルブミン尿、糸球体硬化や尿中蛋白円柱形成、尿細管間質障害を呈したが、**Epl** 群は軽度血圧が低下し、有意に腎障害を抑制した。**EHT** 群も軽度血圧が低下したが、**Epl** 群と同等以上の腎障害抑制作用を示した。また、糸球体濾過装置の蛋白漏出防御機構を糸球体内皮細胞や基底膜とともに構成する糸球体上皮細胞の障害は蛋白尿の重要な原因とされているが、足細胞を電子顕微鏡下で観察した所見では、**LS** 群では足細胞障害をほぼ認めなかったのに比し、**HS** 群では明らかな障害が存在し、これらは **Epl** 群や、**EHT** 群では著明に改善していた。足細胞機能は **RAAS** をはじめとする血管作動性物質や機械的刺激、酸化ストレス、核内リガンドなどに調整されており、我々の研究室でも、アルドステロンが足細胞の **MR** を介して酸化ストレスを惹起し、足細胞障害に関与することを報告してきた。本研究でも **MR** 拮抗薬及び **Rac1** 阻害薬投与により足細胞保護作用があること示された。次に、**MR** の下流遺伝子であり、**MR**

の活性化を表現するとされる PAI-1 や CTGF の発現は HS 群で有意に亢進していたが、Epl や EHT 投与で抑制されていた。これらのことより、本モデルの食塩感受性腎障害においては、食塩負荷が引き金となり、Rac1-MR 系が亢進し、腎障害に関与していることが示唆された。また、本モデルでは、T 細胞やマクロファージの活性化も食塩存在下で増強、MR 拮抗薬や Rac 阻害薬にて改善したことより、炎症細胞の浸潤も食塩存在下では Rac1-MR 系の亢進に伴って出現しており、腎障害形成に関与している可能性が考えられた。

一般的に Rac1 を活性化する刺激因子については、cAMP, cGMP, superoxide, stretch, Vascular endothelial growth factor (VEGF)などが報告されている。Rho ファミリー-small GTPase には Rac1 のほか RhoA, Cdc42 などがあり、時間・空間依存的に細胞骨格すなわち細胞形態の制御に関わっている。Rho ファミリー-GTPase 間で各々が互いにどのように統制し合うかに関しては刺激により異なり、多彩な機能保持につながっていると考えられる。

本例の THM においては、食塩存在下で Rac1 が活性化しているわけであるが、このモデルにおいて Rac1 を活性化しうる因子について考察してみると、食塩以外にも、体液増加による血管壁伸展、血管内皮透過性の変化、レドックス状態による ROS 供給の変化、RAAS 亢進による恒常的 AngII 刺激の存在等が考えられる。そして、実際には GTP 結合型の活性型 Rac1 と GDP 結合型の不活性型 Rac1 のスイッチングを統制している GEF や GAP、GDI の活性を、これらの刺激が、単独で、あるいは複合的に調整していると思われる。つまり、Rac1 制御の手段としては、Rac1 活性化因子の制御以外に、GEF や GAP の制御が考えられる。例えば、Rac1 の活性化に特異的な GEF である Tiam1 は Rac1 の活性化を介して、膵β細胞のグルコース刺激依存性インスリン分泌に関わっており、Tiam1 特異的阻害薬の投与により、インスリン分泌が阻害される。実際、Rho ファミリー-GEF の異常は、発生異常やがん、神経疾患などに関わることが知られ、生体での役割は重要と考えられている。多数知られる GEF や GAP の中から、食塩負荷時に活性化しているものを同定できれば、食塩感受性腎障害の新治療につながるかも知れない。

また、本モデルの THM 食塩負荷群における腎障害は MR 拮抗薬や Rac 阻害薬では完全に抑制できないことより、THM への食塩負荷による Rac1-MR 系の活性化以外に、AngII、食塩、高血圧による直接的な腎障害惹起の可能性のあることについて触れておきたい。なお、過剰な循環血中の AngII がどれだけ腎障害に関与しているかについては、THM の食塩負荷群に副腎摘出を行い、その腎障害や腎組織 MR 活性がどの程度の影響を受けるかを検討する必要がある、今後の課題としたい。

ところで、なぜ非リガンド依存性の MR 活性化機構は存在するのであろうか。

その存在意義について考えてみると、厳しい生物の進化過程が想像される。**RAAS**系がなくとも塩分や体液環境の調整が容易であった水中生活から、塩分がなく乾燥の取り巻く陸上生活に移行する上で、**RAAS**の発達とアルドステロン-MRの存在は不可欠であっただろう。**RAAS**系が未発達な生物に、そのような環境を生き抜いて進化していく過程で、塩分が存在すればリガンドがなくとも**MR**が活性化し、塩分と体液の保持に働く機構は大いに有用であったのかもしれない。本来は体液保持のために発達した**RAAS**、アルドステロン-MR系のように、**Rac1-MR**系においても食物による塩分摂取が容易になった現代では、塩分という重要なシグナルに対する感受性は、過剰な**MR**活性化と腎障害の発症という期待外の結果として表れてしまうのかもしれない。

以上、本研究では、先天的に**RAAS**が亢進した食塩感受性腎障害モデルマウスである**THM**では、食塩負荷により、リガンド非依存性に**Rac1-MR**系が活性化し、腎障害発症に関与することが示された。また、本モデルでは**Rac1**の活性化には食塩の存在が必要であることを示した。**THM**への食塩負荷による腎障害には、**Rac1-MR**系の活性化以外に、**AngII**、食塩、高血圧による直接的な影響の可能性について検討の必要があるが、**RAAS**亢進モデルにおける食塩感受性腎障害で**Rac1-MR**系活性化が腎障害発症に関与することは報告されておらず、また、**Rac1**の活性化因子として食塩を同定したことは、**Rac1-MR**系の制御戦略に有用であり、かつ新規性の高いものとしてここに報告した。

また、**RAAS**亢進下の食塩感受性腎障害モデルにおいて実際に**Rac**阻害薬が腎保護に有効であることを示し、生体反応のスイッチングを担う低分子量**G**蛋白質とその調節因子を治療のターゲットとする新しい視点を食塩感受性腎障害の治療に提示した。今後、未知の**Rac1**の活性化因子を始め、その活性化機構をより明らかにすることが、**Rac1**阻害薬が有用な病態を解明し、臨床応用を実現するうえで必要と思われ、慢性腎臓病の新たな治療戦略のひとつとして、今後の課題としたい。