

博士(医学) 黄 岩 杰

## 論文題目

Enhanced intrarenal receptor-mediated prorenin activation in chronic progressive anti-thymocyte serum nephritis rats on high salt intake

(高塩分摂取の慢性進行性抗胸腺細胞血清腎炎ラットにおける腎内受容体随伴プロレニン活性化促進)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

レニン・アンジオテンシン系(renin angiotensin system; RAS)には、腎での Na 再吸収と血管収縮によって体液量と血圧を調節する循環 RAS と、組織局所で RAS 関連因子が発現し活性化される組織 RAS がある。組織における RAS の病的亢進は組織傷害をきたし、RAS 抑制薬は臓器保護効果を有するが、循環 RAS を抑制する高塩分摂取に臓器保護効果はなく、むしろ慢性腎臓病では腎病変を悪化させる。このパラドックスに関し、組織 RAS は循環 RAS とは独立して制御されていることが考えられるが、高塩分摂取でいかなる組織 RAS が活性化されて臓器傷害が進むかは明らかではない。組織 RAS の一機構として 2002 年に Nguyen らは、従来は不活性なレニンの前駆体と考えられていたプロレニンは、(プロ)レニン受容体((pro)renin receptor; PRR)に結合すると立体構造変化をきたして非酵素的に活性化され、レニン酵素活性を獲得するという受容体随伴プロレニン系を発見した。本研究は、慢性進行性抗胸腺細胞血清(anti-thymocyte serum; ATS)腎炎ラットにおいて、循環 RAS を抑制する高塩分摂取が、腎病変と腎組織の受容体随伴プロレニン系の RAS 関連因子に与える影響、ならびに RAS を抑制するアンジオテンシン受容体拮抗薬オルメサルタンや RAS 抑制作用のない降圧薬ヒドララジンの投与でそれらがいかなる変化をきたすかを検討した。

[材料と方法]

慢性進行性 ATS 腎炎を 7 週齢、体重 150 g の雄ウイスターラットを片腎摘後に ATS を隔週で 2 回静注して作製し、シャム手術のみを対照群として以下の 5 群を作製した。

SN 群(n=8): シャム手術後に水道水飲水の正常塩分摂取対照群 UA 群(n=8): 片腎摘後に ATS 2 回静注、水道水飲水の正常塩分摂取腎炎群 UAH 群(n=8): 片腎摘後に ATS 2 回静注、0.5 % 食塩水飲水の高塩分摂取腎炎群 UAH+O 群(n=8): UAH ラットにオルメサルタン 10 mg/kg/日を投与した群 UAH+H 群(n=8): UAH ラットに塩酸ヒドララジン 5 mg/kg/日を投与した群

片腎摘と初回 ATS 投与後の 14 と 21 日目に血圧測定とメタボリックケージでの 24 時間蓄尿による尿蛋白定量を行い、21 日目に断頭屠殺して血液採取と腎摘出を行った。血漿レニン活性、血漿と腎皮質のアンジオテンシン II (Ang II)濃度は放射免疫測定法で測定し、腎組織病変は PAS 染色とマッソントリクローム染色で検討した。腎皮質のプロレニン、レニン、PRR、非酵素的活性化プロレニン、Ang II 1 型受容体(AT1-R)の蛋白量はウエスタンブロッ

トで、それらの腎組織内の分布は免疫組織染色で検討した。レニン、PRR、TGF- $\beta$ 1 の mRNA 発現は定量的 real-time RT-PCR で調べた。また、膜結合型 PRR を定量するため腎皮質を膜分画と細胞質分画に分け、それぞれの PRR 蛋白量をウエスタンブロットで調べた。

#### 〔結果〕

SN 群では尿蛋白、腎組織に明らかな変化はなく、一方、UAH 群では UA 群に比して尿蛋白、腎皮質 TGF- $\beta$ 1 mRNA が有意に増加し、腎線維化病変が進行した。

循環 RAS 活性を示す血漿レニン活性、血漿 Ang II は、SN 群に比して UA 群で有意に低下し、UAH 群ではさらに低下した。

腎皮質のプロレニン、レニン蛋白は、SN 群に比して UA 群で増え、UAH 群でさらに増加した。免疫組織染色でプロレニン、レニン蛋白は SN 群では傍糸球体細胞のみに認められ、それらは UA、UAH 群で減少した。一方、UA 群では集合管、遠位尿細管にプロレニン、レニン蛋白、PRR への結合で非酵素的に活性化されたプロレニンが弱く認められ、それらは UAH 群で増強した。しかし、腎皮質のレニン mRNA 発現は、SN 群に比して UA 群で有意に低下し、UAH 群ではさらに減少した。

腎皮質の Ang II は、SN 群に比して UA 群で有意に増加し、UAH 群ではさらに増加した。

一方、腎皮質の AT1-R の蛋白発現は、各群で有意差はなかった。

腎皮質の PRR の蛋白、mRNA 発現量は各群で有意差はなかったが、膜結合型の PRR の割合が UA 群では SN 群に比して増え、UAH 群でさらに増加し、また、免疫組織染色にて集合管における PRR の細胞質から尿腔側細胞膜への移動の増加と同部位におけるプロレニンの PRR 結合による非酵素的活性化が認められた。

オルメサルタン投与(UAH+O)群では、UAH 群に比して尿蛋白、腎線維化病変の軽減、腎皮質のプロレニン、レニン蛋白、Ang II の減少、集合管の尿腔側細胞膜の PRR の減少と同部位における非酵素的活性化プロレニンの減少が認められた。一方、ヒドララジン投与(UAH+H)群ではそのような変化は認められなかった。

#### 〔考察〕

高塩分摂取の慢性進行性 ATS 腎炎では循環 RAS 抑制にもかかわらず腎線維化が進行し、腎皮質のプロレニン、レニン蛋白と Ang II の増加、集合管での PRR の細胞質から尿腔側細胞膜への移動と同部位での非酵素的活性化プロレニンの増加が認められた。腎皮質レニン mRNA の増加はなく、集合管でのプロレニン、レニン蛋白の増加は集合管細胞膜上の PRR へのプロレニン、レニン蛋白のトラップの増加と考えられ、同部位におけるプロレニンの PRR 結合による非酵素的活性化が腎組織 RAS の亢進をきたし、腎線維化に関与すると考えられた。オルメサルタンによる集合管の細胞膜 PRR の減少は、細胞膜へ PRR の移動が Ang II 依存性であることを示唆している。

#### 〔結論〕

高塩分摂取の慢性進行性 ATS 腎炎では、Ang II 依存性の PRR の集合管尿腔側細胞膜面への移動が、それへのプロレニン、レニン蛋白の結合と受容体随伴プロレニン系の活性化を

きたして腎組織 Ang II を増加し、腎線維化を促進する可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

組織レニン・アンジオテンシン系(renin angiotensin system; RAS)の一機構としてのプロレニン(プロ)レニン受容体((pro)renin receptor; PRR)に結合すると非酵素的に活性化され、レニン酵素活性を獲得する。本研究は、ラットを片腎摘後の慢性進行性抗胸腺細胞血清(anti-thymocyte serum; ATS)腎炎ラットにおいて、循環 RAS を抑制する高塩分摂取が、腎病変と腎組織の受容体随伴プロレニン系の RAS 関連因子に与える影響を検討した。高塩分摂取の慢性進行性 ATS 腎炎では循環 RAS 抑制にもかかわらず腎線維化が進行し、腎皮質のプロレニン、レニン蛋白とアンジオテンシン II (Ang II) の増加、集合管での PRR の細胞質から尿腔側細胞膜への移動と同部位での非酵素的活性化プロレニンの増加が認められた。腎皮質レニン mRNA の増加はなく、集合管でのプロレニン、レニン蛋白の増加は集合管細胞膜上の PRR へのプロレニン、レニン蛋白のトラップの増加と考えられ、同部位におけるプロレニンの PRR 結合による非酵素的活性化が腎組織 RAS の亢進をきたし、腎線維化に関与すると考えられた。オルメサルタンによる集合管の細胞膜 PRR の減少は、細胞膜へ PRR の移動が Ang II 依存性であることを示唆している。結論として、高塩分摂取の慢性進行性 ATS 腎炎では、Ang II 依存性の PRR の集合管尿腔側細胞膜面への移動が、それへのプロレニン、レニン蛋白の結合と受容体随伴プロレニン系の活性化をきたして腎組織 Ang II を増加し、腎線維化を促進する可能性が示唆された。申請者の研究は、腎線維化における(プロ)レニン受容体および組織 RAS の関与を示した点を審査委員会は高く評価した。以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 林 秀晴

副査 北川 雅敏 副査 沖 隆