

# 高血圧治療の腎保護効果における腎オートファジーの 関与 —悪性高血圧モデルラットを用いた検討—

高 見 勝 弘

近畿大学医学部内科学講座腎臓内科学

## 抄 録

近年, 様々な疾患でオートファジーの関与が注目されている。しかしながら, 高血圧と腎オートファジーの関連を検討した報告はない。今回, 悪性高血圧モデルである malignant stroke-prone spontaneously hypertensive rats (M-SHRSP) を用いて, 高血圧性腎障害とオートファジーの関連を検討した。M-SHRSP の腎では, オートファジー関連蛋白である LC3B-II, LAMP2a, HSC70 の発現が減少した。糸球体上皮, 尿細管, 集合管にオートファジー関連蛋白の発現を認めた。ヒドララジン (Hyd), アゼルニジピン (Aze) で降圧することにより, 血清クレアチニン値は低下し, 尿蛋白, 組織障害は軽快した。マクロオートファジーに関連する LC3B-II 蛋白発現量は, 髄質でのみ Hyd, Aze 群で増加した。シャペロン介在性オートファジーに関連する LAMP2a は, 髄質でのみ Hyd, Aze 群で蛋白発現量の増加を認めた。同様に, HSC70 蛋白発現量は皮質でのみ Hyd 群で軽度低下したが, その他には有意な差を認めなかった。HSC70 と LAMP2a の蛍光二重染色では, Aze 群でのみ集合管で共発現部位の増加を認めた。以上より, M-SHRSP に降圧治療を行うことで腎障害の進行を抑制でき, その際にマクロオートファジー, シャペロン介在性オートファジーが活性化することで臓器保護的に作用している可能性が考えられた。

**Key words:** オートファジー, 腎, 高血圧, マクロオートファジー, シャペロン介在性オートファジー, M-SHRSP

## 緒 言

細胞の恒常性を維持するうえで, 不要な蛋白や病的なオルガネラを適切に処理することは不可欠である。オートファジーはユビキチン-プロテアソーム系とともに細胞内構成成分を分解する主要な機構の一つである。オートファジーの概念は以前より知られていたが, 1990年代に酵母でオートファジーに関連する遺伝子 (ATG 遺伝子) 群が同定された<sup>1</sup> のを契機に, その分子機構についての研究が進み, 現在では動物細胞においても維持されていることが明らかとされている<sup>2</sup>。

リソソームで細胞内成分が分解されるまでの過程の違いから, オートファジーはマクロオートファジー, ミクロオートファジー, シャペロン介在性オートファジー (chaperone-mediated autophagy: CMA) など少なくとも 3 種類が知られている<sup>3</sup>。マク

ロオートファジーでは, 隔離膜と呼ばれる二重膜が形成され, 伸長することで細胞内成分が隔離される (オートファゴソーム) が, オートファゴソームがリソソームと癒合することで細胞内成分が処理される。microtubule associated protein 1 light chain 3 (LC3) は Atg8 の代表的な哺乳類ホモログであり, オートファゴソーム形成において重要な役割を果たしている。新生された LC3 は Atg4 によってプロセシングされ, LC3-I となる。その後, Atg7, Atg3, そして Atg12-Atg5・Atg16 複合体の作用を受けて phosphatidylethanolamine と結合する (LC3-II)<sup>4</sup>。LC3-II は隔離膜やオートファゴソームに局在し, LC3-II はマクロオートファジーのモニタリングに有用である。ミクロオートファジーでは, リソソーム膜が陥入し直接取り込むことで細胞内成分が処理される。CMA では, 基質と HSC70 を含むシャペロンの複合体がリソソーム膜の lysosomal associated

membrane protein type 2a (LAMP2a) に結合することで、基質がリソソーム内腔へと運ばれる。CMA は基質の選択性が高く、特定のアミノ酸配列を持つ蛋白をリソソーム内に取り込むことが知られている<sup>5</sup>。

オートファジーは発生や分化、飢餓、感染、加齢など様々な状況下で重要な役割を果たしていることが明らかとなってきたが、近年、神経変性疾患<sup>6-8</sup>や癌<sup>9,10</sup>、筋疾患<sup>11</sup>、炎症性腸疾患<sup>12</sup>、代謝性疾患<sup>13</sup>、自己免疫疾患<sup>14</sup>などの病態にも関与している可能性が報告されている。動物モデルを用いた検討で、虚血再灌流腎障害<sup>15</sup>、puromycin aminonucleoside 腎症<sup>16</sup>、adriamycin 腎症<sup>16</sup>、cyclosporine<sup>17</sup>や cisplatin<sup>18</sup> などによる薬剤性腎障害や糖尿病腎症<sup>19,20</sup>で、オートファジーが病態に関与していることが明らかにされている。また、圧負荷による心肥大においてもオートファジーが病態に関与していることが報告されている<sup>21</sup>。しかしながら、高血圧に伴う腎障害におけるオートファジーの関与については検討されておらず詳細は分かっていない。malignant stroke-prone spontaneously hypertensive rats (M-SHRSP/Kpo ラット、以下 M-SHRSP) は岡本らによって spontaneously hypertensive rats (SHR) から作製された悪性高血圧モデルであり、著明な血圧上昇により脳、心、腎など様々な臓器に急激な高血圧性障害を引き起こすことが知られている<sup>22</sup>。そこで今回、我々は高血圧性腎障害とオートファジーとの関連について明らかにするために、M-SHRSP を用いて腎臓でのオートファジーについて検討を行った。

## 方 法

### 実験動物

5 週齢の雄 M-SHRSP を用いて実験を行った。M-SHRSP は近畿大学医学部実験動物共同研究室より購入し、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ で管理飼育した。Wistar Kyoto rats (WKY) は日本クレア株式会社より購入した。標準飼料として SP(フナバシファーム)を用い、飲料水を与えた。全ての動物実験は近畿大学医学部動物実験委員会の承認を得て行った。

### 実験方法

まず、13週齢 WKY および M-SHRSP について腎臓でのオートファジー関連蛋白の発現をウェスタンブロット法にて検討した。

次に、5 週齢 M-SHRSP を、対照 (Con) 群、ヒドララジン (Hyd) 群 (5 mg/kg/day)、アゼルニジピン (Aze) 群 (5 mg/kg/day) の 3 群 (n=10 ずつ)

に分け、降圧剤混入食餌を 8 週間摂取させ、週 1 回血圧、脈拍、体重を測定し、それぞれの群について検討した。

Hyd は末梢細動脈血管平滑筋に直接作用することで血圧降下作用を示すが、交感神経系活性化やレニン分泌を亢進するなどの副作用も多く近年では一般的には妊娠高血圧症候群の際に使用されるにとどまる。Aze はジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬であり、細胞内へのカルシウムイオンの流入を抑制することで主に血管平滑筋の収縮を抑制し降圧効果を示し、大規模臨床試験による予後改善のエビデンスから高血圧治療の第一選択薬として推奨されている。

### 血圧、脈拍測定

収縮期血圧、拡張期血圧、脈拍は 5 週齢より 13 週齢まで 1 週間毎に Tail-Cuff 法 (BP-98A, Softron) を用いて測定した<sup>23</sup>。その際それぞれ 3 回測定を行い、その平均値を測定値とした。

### 血液、尿および腎組織の採取

血液採取については、5 週齢 M-SHRSP で尾静脈より採血を行った。13 週齢の M-SHRSP では、12 時間の絶食後、ペントバルビタール (10 mg/g) を皮下注射し全身麻酔を行った。麻酔後、腹部正中を切開し、下大静脈より血液を採取した。両腎臓は血抜きをしたのち速やかに摘出した。採取した血液は 3000 rpm で 10 分間遠心し、血清を分離した。レニン活性の測定にはレニン活性 (PRA) 「TFB」、アルドステロン濃度の測定にはスパック-S アルドステロンキット (TFB) をそれぞれ用い、WALLAC1460 (Wallac) にて測定を行った。尿採取については、実験開始時の 5 週齢 M-SHRSP と実験経過 8 週時の 13 週齢 M-SHRSP で、代謝ケージ (日本クレア) を用いてそれぞれ採取した。蛋白定量はマイクロ TP-AR (和光純薬工業)、尿中アルブミン定量はオートワコーマイクロアルブミン (和光純薬工業)、尿中クレアチニン定量はデタミナー L CRE (協和メデックス) を用いて測定を行った。

### 腎組織標本の作製

摘出した腎臓を一晩かけて 4 % paraformaldehyde にて固定を行った。10%、20%、30% sucrose にて 8 時間毎に脱水を行い、その後、パラフィン包埋ブロックを作製した。また、残りの腎臓はコンパウンドを用いて凍結ブロックを作製した。

### 免疫組織染色

腎臓パラフィン包埋ブロックから 4  $\mu\text{m}$  切片を作製し、脱パラフィン、再水和を行ったのち、0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  で 30 分間処理した。その後、Protein Block Serum-Free (Dako) にて常温で 30 分間ブロッキング

を行い、1.5% serum で希釈した一次抗体を 4℃で一晩反応させた。一次抗体には、オートファジーに関連する蛋白として rabbit anti-LC3 antibody (1:1000) (MBL), rabbit anti-LAMP2a antibody (1:1000) (abcam), goat anti-heat shock cognate protein 70 (HSC70) antibody (1:100) (Santa Cruz) を用いて検討を行った。洗浄後、二次抗体を常温で 30 分反応させた。二次抗体には、biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody (1:2000) (Invitrogen), biotinylated rabbit anti-rat IgG antibody (1:2000) (Vector), biotinylated rabbit anti-goat IgG antibody (1:2000) (Vector) を用いた。Standard Ultra-Sensitive ABC Peroxidase Staining Kits (Thermo) にて ABC 法を行い、3,3'-diaminobenzidine で発色した。

#### 蛍光二重染色

腎臓凍結ブロックから 4 μm で切片を作製し、染色を行った。1.5% serum にてブロッキング (常温, 30 分間) を行ったのち、一次抗体 (rabbit anti-LAMP2a antibody, goat anti-HSC70 antibody) を 4℃で一晩反応させた。洗浄後、二次抗体を常温で 30 分反応させた。二次抗体には、Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG antibody (1:400) (Invitrogen), Alexa Fluor 488 rabbit anti-goat IgG antibody (1:400) (Invitrogen) を用いた。ウェスタンブロット (WB)

凍結保存した腎の皮質、髄質からそれぞれ小切片を切除し、蛋白の抽出には Nuclear Extract Kit (Active Motif) を用いて行った。蛋白の定量は Bradford 法を用いて行った。それぞれの検体を 10 μg ずつ 0.01 A, 2 時間かけて電気泳動し、その後蛋白をゲルから PVDF 膜に 30 V, 10 時間かけて転写した。常温で 1 時間ブロッキング (5% bovine serum albumin, 0.1% Tween 20/PBS) を行い、一次抗体を 4℃で一晩反応させた。一次抗体には、mouse anti-microtubule associated protein 1 light chain 3 B (LC3B) antibody (1:2000) (nanotools), anti-LAMP2a antibody (1:500) (abcam), anti-HSC70 antibody (1:1000) (Santa Cruz) を用いた。0.1% Tween 20/PBS にて洗浄後、常温で 60 分間二次抗体を反応させた。二次抗体には goat anti-rabbit IgG-HRP antibody (1:2000) (Santa Cruz), goat anti-mouse IgG-HRP antibody (1:2000) (Santa Cruz) を用いた。Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) にて検出し、ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences) で撮影した。

#### RNA 抽出およびリアルタイム RT-PCR

凍結保存した腎の皮質、髄質からそれぞれ小切片を切除し、QIAshredder (QIAGEN) にて処理を行ったのち、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。total RNA から High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies) を用いて逆転写し cDNA を合成した。TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies), TaqMan Gene Expression probes (Life Technologies): collagen type I alpha 1 (Col1A1) (Rn01463848), collagen type IV alpha 1 (Col4A1) (Rn01482927), StepOnePlus システム (Life Technologies) を用いて PCR を行った。PCR は 40 サイクル行い、Ct 値を測定した。得られた Ct 値は β アクチンにて補正した。

#### 統計学的解析

すべてのデータは mean ± SE で表記した。すべての解析は Paired t 検定を用いて行った。p < 0.05 の場合を有意差ありと判定した。

### 成 績

#### ウェスタンブロット法を用いた WKY および M-SHRSP 腎におけるオートファジーの比較検討

M-SHRSP では、マクロオートファジーにてオートファゴソームの増加に関連する LC3 アイソフォームである LC3B-II の発現は皮質で 14% まで減少した (p < 0.05)。一方、髄質では変化しなかった。オートファゴソーム形成に伴い LC3-I が phosphatidylethanolamine と結合し LC3-II となることから、LC3B-II/LC3B-I についても検討を行った。LC3B-II/LC3B-I は、皮質では WKY に比し 28% まで低下したが、髄質では有意な差を認めなかった。(図 1 A-C)

CMA の過程において HSC70 とともに重要な役割を果たす蛋白である LAMP2a は、皮質で 35%、髄質で 52% まで減少した (p < 0.05)。また HSC70 は、M-SHRSP の皮質で 45% まで減少した。同様に髄質でも減少傾向であった。(図 1 D, E)

#### 対照群および降圧剤投与群の血圧、脈拍の推移

Con 群, Hyd 群, Aze 群の 3 群間における収縮期血圧、拡張期血圧、脈拍数の経時的な推移を図 2 に示す。Con 群 (n=8) は 13 週齢で、収縮期血圧 285.1 ± 19.2 mmHg, 拡張期血圧 237.8 ± 24.0 mmHg と著明な血圧上昇を認めた。一方、同週齢の Hyd 群 (n=10, 収縮期血圧 224.7 ± 13.5 mmHg, 拡張期血圧 186.2 ± 13.3 mmHg), Aze 群 (n=10, 収縮期血圧 209.1 ± 21.2 mmHg, 拡張期血圧 167.9 ± 17.9 mmHg) は、Con 群に比して血圧上昇は有意に抑制

されていた ( $p < 0.05$ )。全期間を通じて Hyd 群と Aze 群はほぼ同程度の血圧で推移した。(13週齢で

の拡張期血圧のみ Aze 群で Hyd 群に比し有意に低値であった。) 脈拍数は Hyd 群に比し Con 群, Aze 群で低い傾向であった。体重に関しては, 3 群で同様に増加し, 実験経過中にほぼ差を認めなかった。

5 週齢および13週齢時点での各 3 群における血清, 尿検査比較検討

5 週齢および13週齢の血液, 尿検査結果を表 1 に示す。5 週齢の血液検査では, 総蛋白 (T.P), アル

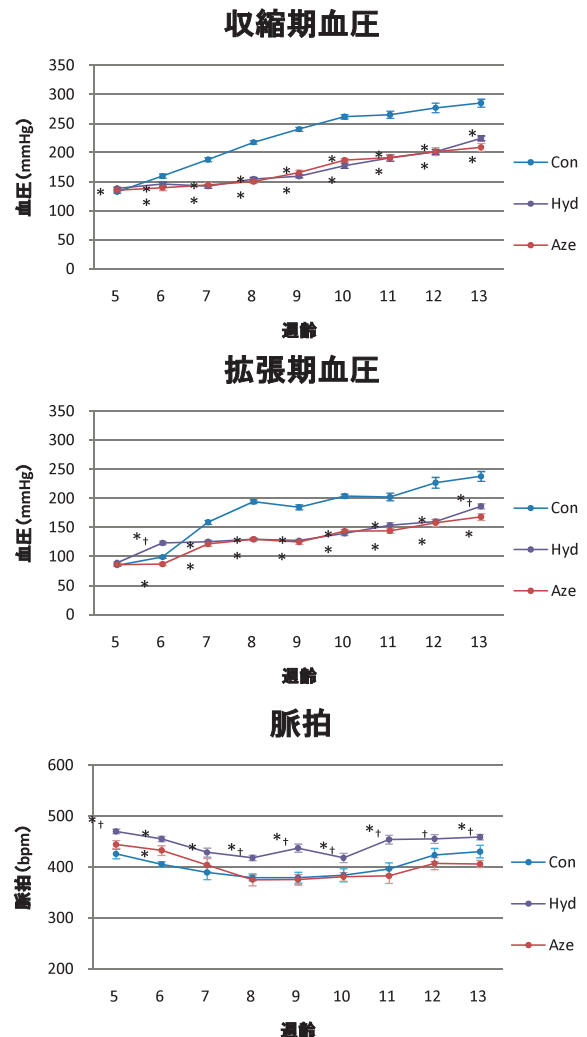
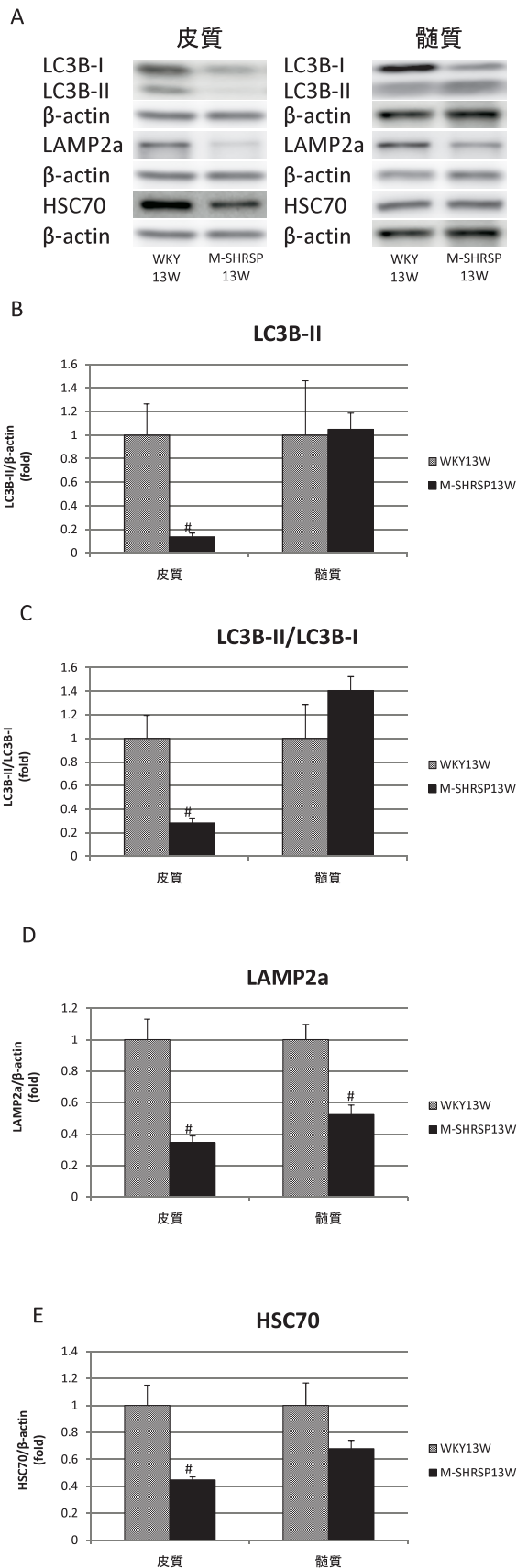


図 2 対照群および降圧剤投与群の血圧, 脈拍の推移

$n = 8-10$ , \*:  $p < 0.05$  vs Con, †:  $p < 0.05$  vs Aze

図 1 ウェスタンブロット法を用いた WKY および M-SHRSP 腎におけるオートファジーの比較検討  
(B)皮質, 髓質における LC3B-II 蛋白発現の比較  
(C)皮質, 髓質における LC3B-II/LC3B-I の比較  
(D)皮質, 髓質における LAMP2a 蛋白発現の比較  
(E)皮質, 髓質における HSC70 蛋白発現の比較  
 $n = 8$ , #:  $p < 0.05$  vs WKY13W



表1 各群における血液, 尿検査の比較

血清: n=10, Paired t-test, mean±SD, 尿: n=3, Paired t-test, mean±SD

## 5週齢

血清	Con 群	Hyd 群	Aze 群	有意差 (p 値)
T.P (g/dl)	5.80±0.15	6.15±0.08	6.00±0.07	n.p
Alb (g/dl)	4.55±0.05	4.75±0.08	4.60±0.07	n.p
BUN (mg/dl)	15.7±0.5	16.4±0.9	16.3±0.5	n.p
Cre (mg/dl)	0.37±0.05	0.39±0.06	0.31±0.03	n.p

## 13週齢

血清	Con 群	Hyd 群	Aze 群	有意差 (p 値)
T.P (g/dl)	5.63±0.13	5.77±0.06	5.80±0.04	n.p
Alb (g/dl)	3.70±0.08	3.97±0.03	3.95±0.04	n.p
BUN (mg/dl)	26.1±1.4	*†19.2±0.4	*17.9±0.4	* : vs Con † : vs Aze p<0.05
Cre (mg/dl)	0.38±0.02	*0.25±0.01	*0.26±0.01	* : vs Con p<0.05
Aldosterone (pg/ml)	1115±312	*199±51	*320±56	* : vs Con p<0.05
renin 活性 (ng/ml/hr)	20.7±2.3	*10.4±0.8	*9.1±0.8	* : vs Con p<0.05

## 5週齢

尿	Con 群	Hyd 群	Aze 群	有意差 (p 値)
T.P (g/gCr)	0.059±0.002	0.068±0.004	0.060±0.009	n.p
Alb (mg/gCr)	3.97±0.96	†3.52±0.29	2.55±0.03	† : vs Aze p<0.05

## 13週齢

尿	Con 群	Hyd 群	Aze 群	有意差 (p 値)
T.P (g/gCr)	9.13±3.95	†2.33±0.07	1.87±0.14	† : vs Aze p<0.05
Alb (mg/gCr)	601.8±212.3	42.5±3.1	35.1±3.3	n.p

ブミン(Alb), 尿素窒素(BUN), クレアチニン(Cre)についてそれぞれ各群で有意な差を認めなかった。13週齢では, Hyd 群, Aze 群で Con 群に比し BUN および Cre は低値であった。Cre は Hyd 群, Aze 群間で差を認めなかったが, BUN は Hyd 群で Aze 群に比し高値であった。各群間で T.P や Alb に差を認めなかった。レニン活性やアルドステロン濃度は, Con 群に比し Hyd 群, Aze 群で低値であった。Hyd 群と Aze 群間には有意な差を認めなかった。5週齢の尿検査では, 尿中 T.P は各群間に差を認めなかった。尿中 Alb は Aze 群で Hyd 群に比し低値であった。13週齢では, 尿中 T.P, 尿中 Alb について降圧剤投与群で減少傾向がみられた。尿中 T.P は Aze 群で Hyd 群に比し低値であった。尿中 Alb は Aze 群, Hyd 群で差を認めなかった。

## 対照群および降圧剤投与群の腎組織学的検討

Periodic acid Schiff (PAS) 染色と Masson trichrome 染色にて行った組織学的検討の結果を図3に示す。

Con 群では, 約10%の糸球体に全節性硬化や分節性硬化病変を認め, 約20~30%の糸球体にメサングウム細胞の増殖, 基質の増加を認めた。細小動脈の内膜肥厚が高度であり, 硝子化病変も認めた。Hyd 群, Aze 群では, 糸球体硬化性病変を全く認めなかった。Hyd 群, Aze 群でも Con 群と同様に, 20~30%の糸球体にメサングウム細胞の増殖, 基質の増加を認めた。Masson trichrome 染色の検討では, Con 群に比して Hyd 群, Aze 群で線維化の程度は軽度であった。Hyd 群, Aze 群間では, PAS 染色, Masson trichrome 染色の検討で明らかな染色範囲の違

いを認めなかった。

RT-PCR 法を用いて行った組織学的検討の結果

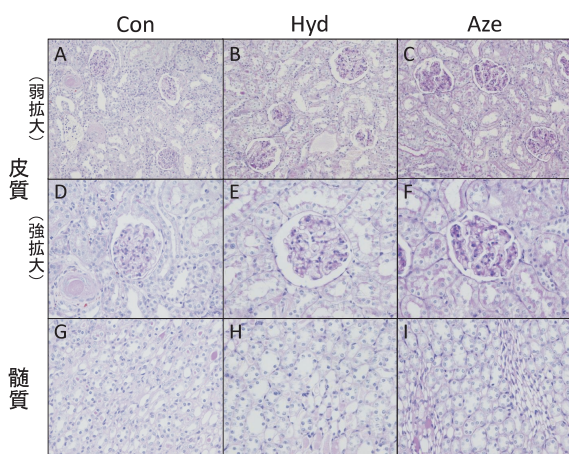


図 3-1 PAS 染色における腎組織学的検討  
(A)-(C)腎皮質, ×200倍  
(D)-(F)腎皮質, ×400倍  
(G)-(I)腎髄質, ×400倍

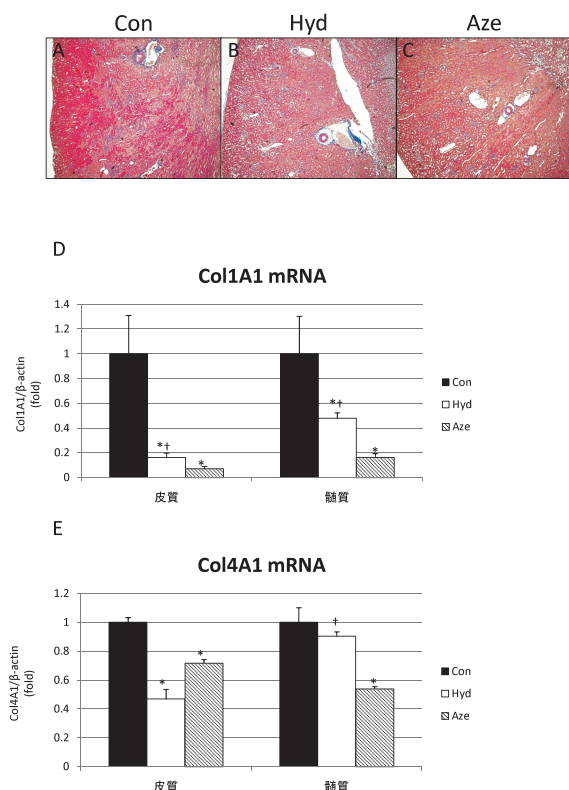


図 3-2 対照群および降圧剤投与群の腎臓における Masson trichrome 染色  
(A)-(C)×40倍  
(D)(E) RT-PCR 法を用いた腎皮質, 髄質における Col1A1 遺伝子 (collagen I alpha 1 gene) 及び Col4A1 遺伝子 (collagen IV alpha 1 gene) 発現の検討  
n=2, \*: p<0.05 Con, †: p<0.05 vs Aze

を図 3-2 D, E に示す。

組織間質障害を示す Col1A1 発現量は, 皮質, 髄質ともに Con 群に比し Hyd 群, Aze 群で有意に減少した (p<0.05). 皮質では Con 群に比して Hyd 群で約16%, Aze 群では約7%にまで減少していた. 同様に髄質では Con 群に比して Hyd 群で約48%, Aze 群では約16%にまで減少していた. 基底膜の障害を示す Col4A1 発現量の検討では, 皮質では Con 群に比し Hyd 群, Aze 群で有意に減少し, それぞれ47%, 72%まで低下した (p<0.05). 髄質では, Aze 群で有意に減少していた (p<0.05).

### 免疫染色および WB 法によるマクロオートファジーについて 3 群間での比較検討

マクロオートファジーの変化を検討するために行った LC3 の免疫組織染色と WB 法の結果を図 4-1 に示す. LC3 は, 皮質では主にポドサイトや遠位尿細管, ヘンレ係蹄の太い上行脚で染色を認め, 核, 細胞質ともほぼ均一に染色された. 髄質では, 主に集合管で染色を認めた. 3 群間で染色部位, 範囲に明らかな差を認めなかった.

皮質では, オートファゴソームに局在することが知られている LC3B-II は 3 群間で有意な差を認めなかった. 一方, 髄質では, LC3B-II の蛋白発現は Con 群に比し Hyd 群で147%, Aze 群で160%と増

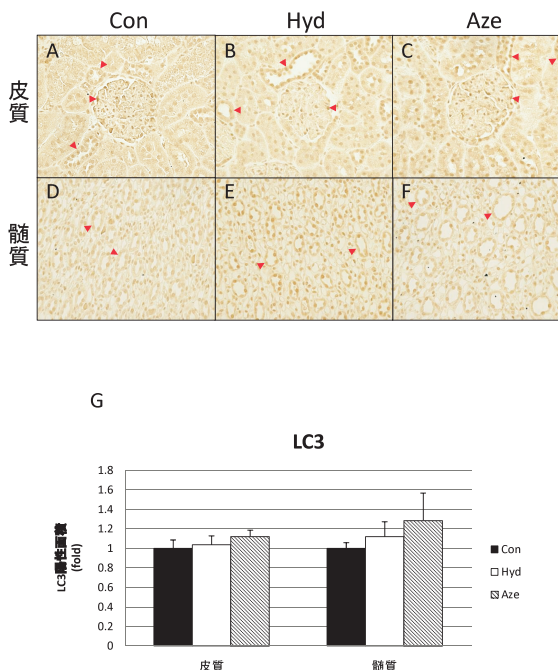


図 4-1 対照群および降圧剤投与群の腎臓における LC3 免疫組織染色  
(A)-(F) DAB 染色 (A)-(C)腎皮質, ×400倍  
(D)-(F)腎髄質, ×400倍  
(G) LC3 陽性面積の比較  
n=2

加していた ( $p < 0.05$ )。LC3B-II/LC3B-I についても検討を行ったが、皮質、髓質ともに有意な差を認めなかった。(図 5 A-C)。

#### 免疫染色および WB 法によるシャペロン介在性オートファジーについて 3 群間での比較検討

CMA の変化を検討するために、LAMP2a、HSC70 について実験を行った。免疫組織染色では、LAMP2a は皮質で主に近位尿細管で染色を認め、髓質では集合管の細胞質、特に基底膜側が強く染色された。皮質では 3 群間に明らかな染色範囲の違いを認めなかった。一方、髓質では Con 群に比べ、Hyd 群、Aze 群で染色範囲がそれぞれ 35%、54% 増加した ( $p < 0.05$ )。(図 4-2)

HSC70 は、皮質ではポドサイドや遠位尿細管、ヘンレ係蹄の太い上行脚を中心に染色を認め、近位尿細管の一部でも染色された。核、細胞質ともにほぼ均一に染色された。髓質では、集合管の核および細胞質でほぼ均一の染色を認めた。Con 群、Hyd 群、Aze 群間で明らかな陽性面積の差を認めなかった。(図 4-3)

WB 法では、皮質において LAMP2a の蛋白発現は 3 群間で有意な差を認めなかった。髓質でも有意な差を認めなかったが、Aze 群では他の 2 群に比し増加傾向がみられた。(図 5 D)

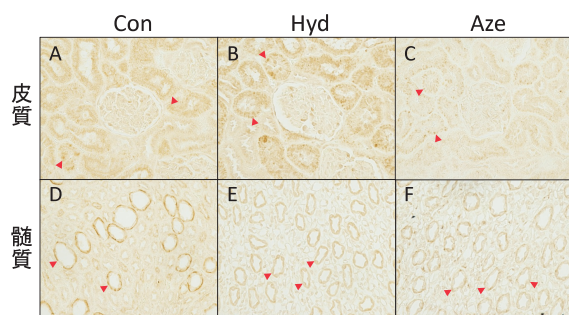


図 4-2 対照群および降圧剤投与群の腎臓における LAMP2a 免疫組織染色 (A)-(F) DAB 染色 (A)-(C) 腎皮質,  $\times 400$  倍 (D)-(F) 腎髓質,  $\times 400$  倍 (G) LAMP2a 陽性面積の比較  $n=2$ , \*:  $p < 0.05$  vs Con, †:  $p < 0.05$  vs Aze

HSC70 の蛋白発現は、皮質では Hyd 群で Con 群に比し 75% にまで低下していた。髓質では 3 群間に有意な差を認めなかった。(図 5 E)

CMA では HSC70 を含むシャペロン複合体と LAMP2a が結合することで基質がリソソーム内へ取り込まれることから、HSC70 と LAMP2a の蛍光二重染色にて検討を行った。(図 6)

皮質では、主に尿細管で HSC70 (緑色) と LAMP2a (赤色) の共発現 (黄色) を認めたが、3 群間に明らかな差を認めなかった。Aze 群ではポドサイドにも共発現を認めた。髓質では、主に集合管で HSC70 と LAMP2a の共発現を認めた。Con 群、Hyd 群に比し、Aze 群で共発現面積が増加していた。

#### 考 察

M-SHRSP では、極めて重症の高血圧により悪性サイクルが誘起され、急速に脳、心、腎などの臓器が障害される。ほぼ全例で脳卒中を発症し、平均生存期間は雄 90 日、雌 120 日程度と短い。腎では 10 週齢で血管壊死が出現し、その後糸球体硬化や間質の線維化を認める。その病態にはレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の亢進が関与しており、血圧の上昇とともに血漿および腎レニン濃度、血漿アルドステロン濃度の著明な上昇がみられることが報告さ

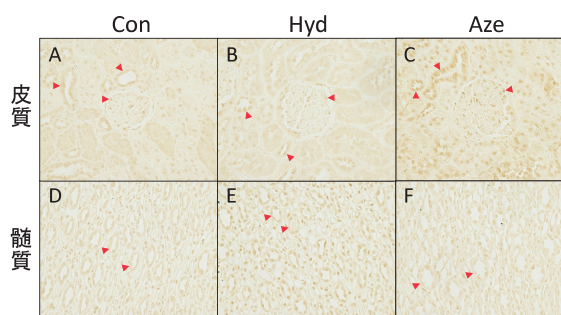


図 4-3 対照群および降圧剤投与群の腎臓における HSC70 免疫組織染色についての検討 (A)-(F) DAB 染色 (A)-(C) 腎皮質,  $\times 400$  倍 (D)-(F) 腎髓質,  $\times 400$  倍 (G) HSC70 陽性面積の比較  $n=2$



れている<sup>24,25</sup>。

オートファジーは、飢餓や growth factor deprivation, 低酸素, 活性酸素種, 小胞体ストレス, 感染など種々のストレス時に活性化されることが報告さ

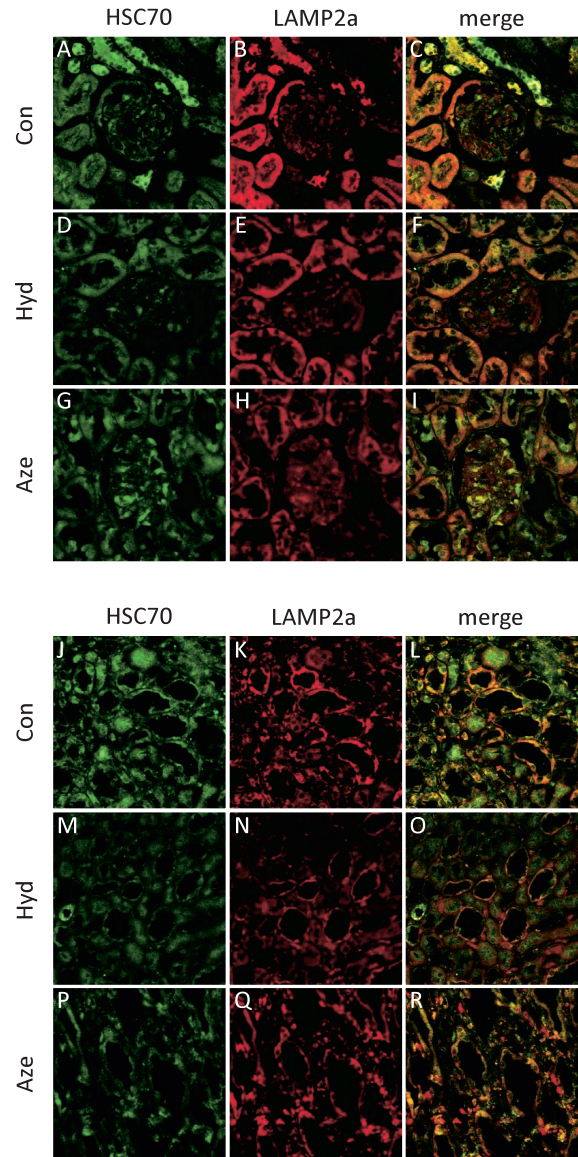
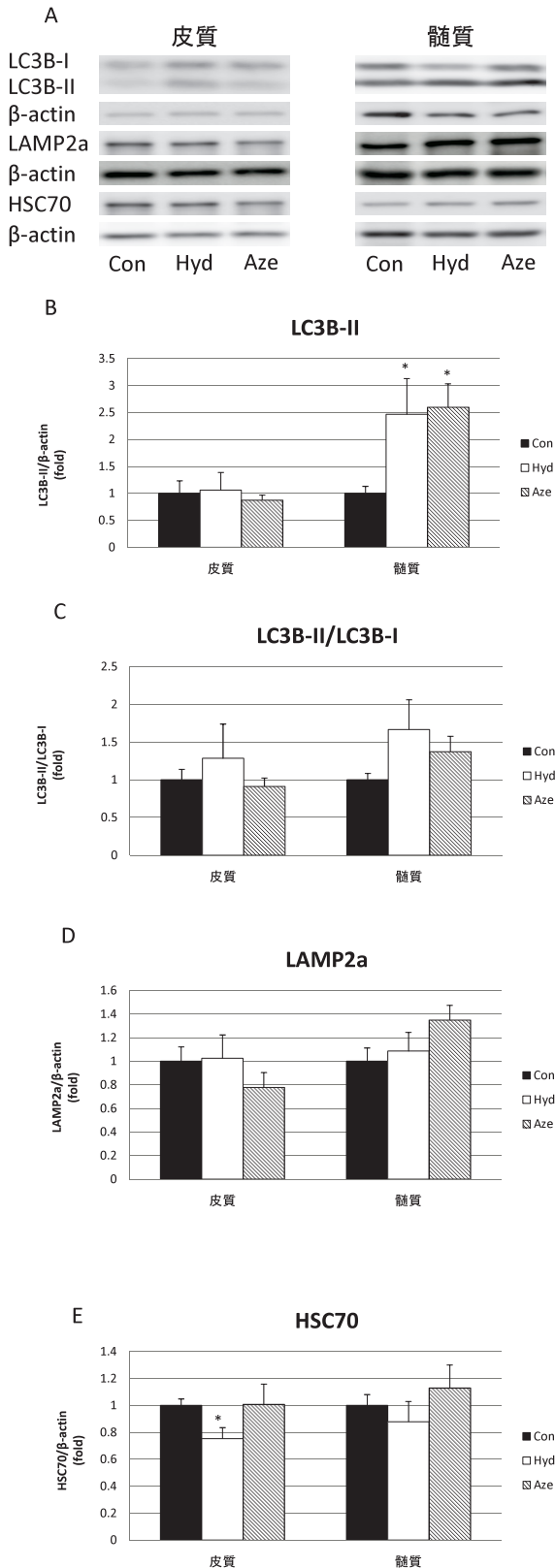


図6 13週齢 M-SHRSP 対照群および降圧剤投与群の腎臓組織蛍光二重染色についての検討  
HSC70：緑色，LAMP2a：赤色，HSC70とLAMP2の重ね合わせ：黄色  
(A)-(I)腎皮質×400倍，(J)-(R)腎髄質×400倍

図5 ウェスタンブロット法を用いた13週齢 M-SHRSP 対照群および降圧剤投与群の腎におけるオートファジー関連蛋白の発現についての検討  
(B)各群間での皮質，髄質における LC3B-II 蛋白発現の比較  
(C)各群間での皮質，髄質における LC3B-II/LC3B-I の比較  
(D)各群間での皮質，髄質における LAMP2a 蛋白発現の比較  
(E)各群間での皮質，髄質における HSC70 蛋白発現の比較  
n=8, \*: p<0.05 vs Con



れている<sup>26</sup>。さらに、急性腎障害時にはオートファジーが腎保護的に作用することが報告されている<sup>15</sup>。M-SHRSP では種々のストレスが増強しているにもかかわらず、オートファジーが減弱しており、腎障害の進行に寄与している可能性が考えられた。

腎には、筋原反応、尿管系球体フィードバック、交感神経系、レニン-アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system : RAS) など腎血流量を一定に保つ機構が備わっているが、血圧が自動調節の限度を超えると、血管内皮障害が誘起され、フィブリノイド壊死へと至る。さらに血管内脱水や血管内凝固が促進されることによる血栓性微小循環障害も加わることで、臓器の虚血が増強され、尿管の萎縮や間質の線維化を伴う。糸球体血流量の減少はさらにRASを活性化し、血圧上昇、臓器障害の進行を加速させるという悪循環を形成する。すなわち、重症の高血圧に伴う腎疾患において悪循環から離脱するために降圧療法が非常に重要となる。

今回、HydあるいはAzeの投与により血圧上昇と血清Cre値の上昇を有意に抑制できたことから、降圧治療で腎機能障害の進行を抑制できると考えられた。しかしながら、Hyd群に比してAze群で尿蛋白減少効果が強いことから、薬剤により腎への影響が異なる可能性が考えられた。蛋白尿は腎不全だけでなく心血管疾患のリスクファクターでもあることが以前より知られており<sup>27</sup>、高血圧治療において尿蛋白の抑制は非常に重要となる。薬剤間の腎への影響の差異については、Azeの交感神経抑制作用やAzeが糸球体高血圧を増悪することなく血圧を低下させることが尿蛋白の抑制、すなわち腎保護的に作用したものと考えられた。Shokojiら<sup>28</sup>はAzeを投与したSHRにおいて腎交感神経活動を評価し、Azeが交感神経抑制作用を有することを報告している。Aze群で脈拍数が増加しなかったことも交感神経抑制による影響であることが示唆される。また、Azeは輸入細動脈のみならず輸出細動脈も拡張し<sup>29</sup>糸球体高血圧を是正することが報告されており、尿蛋白を有意に減少させた原因の一つと考えられた。

腎硬化症では自動調節能の破綻による糸球体過剰濾過と虚血の2つの異なるプロセスが病態に関与していると考えられている。オートファジーと高血圧性腎障害との関連についての詳細な報告は乏しく、今回、我々はM-SHRSPに降圧剤を投与することによりオートファジーがどのように変化するかどうかについて検討を行った。

これまでの腎臓におけるマクロオートファジーに関する報告としては、ポドサイト<sup>16,30</sup>や近位尿管<sup>18</sup>、ヘンレ係蹄の太い上行脚<sup>31</sup>、メサンジウム細

胞<sup>32</sup>、集合管<sup>33</sup>など様々な腎構成細胞にてオートファジーがみられることが報告されている。

今回の実験で、LC3は皮質では主にポドサイトや遠位尿管、ヘンレ係蹄の太い上行脚、髓質では主に集合管で染色を認めた。これまでの報告でポドサイトや近位尿管におけるLC3の発現については検討されている<sup>16,18,30</sup>が、遠位尿管や集合管ではLC3の発現に関する報告は少なく<sup>33</sup>、M-SHRSPでは遠位尿管や集合管での発現が亢進している可能性が考えられた。また、降圧剤投与によって免疫組織染色ではLC3陽性面積や局在に明らかな変化を認めなかったが、WB法では降圧剤投与により髓質でのLC3B-IIの蛋白発現が増加傾向となった。降圧剤投与により腎機能が改善するとともに組織の線維化病変も軽快していることから、マクロオートファジーが活性化することで臓器保護的に作用している可能性が考えられた。薬剤間では、LC3B-IIの蛋白発現はHyd群、Aze群間で皮質、髓質ともに有意な差を認めず、マクロオートファジーの変化は薬剤よりも降圧効果の影響が大きいものと考えられた。

腎臓におけるCMAに関しては、1999年にCervoらは<sup>34</sup>2,2,4-trimethylpentaneにより生じるhyaline droplet nephropathyでは、 $\alpha 2$ マイクログロブリンの蓄積を阻止するためにHSC70を介した蛋白のリソソームへの取り込みが亢進することを報告している。また、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットでは、皮質においてCMAにて選択的に処理されるKFERQモチーフが増加し、LAMP2aやHSC70が減少していることが報告されている<sup>20</sup>。in vitroではCMAの抑制はcell growthの制御に関与することが報告されており<sup>35</sup>、腎疾患の病態とCMAの関与が強く示唆される。今回の検討では、M-SHRSPにHydおよびAzeを投与し降圧を行うことにより、髓質において免疫組織染色、WB法ともにLAMP2aが増加した。HSC70はHyd群で皮質における蛋白発現が低下したのを除いて、その他には明らかな差を認めなかった。CMAではHSC70は基質の取り込みに不可欠であり、HSC70の増加に伴いその活性が増強される。しかし、リソソームのHSC70が基質の取り込みに十分になると、CMAはリソソーム膜上のLAMP2a依存的に制御されることが報告されている<sup>36</sup>。すなわち、M-SHRSPに降圧治療を行うことで腎髓質、特に集合管でのCMAが活性化され、腎保護的に作用していることが考えられた。薬剤間では、Hyd群でAze群に比しLAMP2aの染色範囲や蛋白発現およびLAMP2aとHSC70の共発現部位が少なく、HydとAzeではCMAへの影響が異なる可能性が考えられた。

詳細な機序について完全には明らかでないものの Aze は優れた抗酸化作用を有することが報告されている<sup>37,38</sup>。Nakamura ら<sup>37</sup> は、慢性腎臓病合併高血圧患者に Aze を 6 か月間投与し、投与前に比べ腎内酸化ストレスのマーカーである尿中 L-FABP、尿中 8-OHdG が投与前に比して有意に減少することを明らかにした。酸化ストレスは CMA を活性化する代表的なストレスであり、CMA の障害は酸化ストレス亢進時の細胞の脆弱性を誘起する<sup>39</sup>。Aze の投与で CMA が強く活性化されることが、Aze の臓器保護作用や抗酸化作用に関与している可能性が考えられた。皮質にて HSC70 の蛋白発現が Hyd 群で低下傾向を認めたことが両薬剤の差異に関与している可能性も考えられた。

今回の検討では、髄質に比し皮質でのマクロオートファジーや CMA について明らかな変化を認めなかった。これまで多くの腎構成細胞でオートファジーについて報告がおこなわれているが、それぞれの細胞においてその活性や機能は異なることが考えられている<sup>40</sup>。ポドサイトでは非ストレス時でも基礎のオートファジー活性が高いことが知られている。糖尿病ではポドサイトでのオートファジーが減弱し、オートファジーの活性化により糸球体障害が軽減されることが報告されている<sup>41</sup>。一方、尿細管では非ストレス時のオートファジー活性は低く、虚血などのストレス時には活性化され保護的に働くことが知られている。すなわち、降圧治療により尿細管や集合管など髄質でのオートファジーの活性化はみられたが、糸球体を含む皮質でのオートファジーの変化が軽微であった原因の一つとして、それぞれの腎構成細胞におけるオートファジーの機能や制御機構の違いが考えられた。今回の検討では、それぞれの細胞におけるオートファジーの変化については評価できておらず、in vitro も含めた今後の更なる検討が必要と考えられた。

以上、M-SHRSP に降圧加療を行うことで腎、特に髄質でのマクロオートファジー、CMA は活性化し、腎機能障害、線維化の進行を抑制したものと考えられた。

#### 謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御協力いただきました有馬秀二教授、中谷嘉寿講師ならびに教室員の方々に深謝いたします。また近畿大学ライフサイエンス研究所の方々には格別の御指導、御協力いただきましたことを深謝いたします。

#### 参考文献

1. Tsukada M, Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS 333, 169-174.
2. Meijer WH, van der Klei IJ, Veenhuis M, Kiel JA (2007) ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. Autophagy 3, 106-116.
3. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature 451, 1069-1075.
4. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation. Annu Rev Cell Dev Biol 27, 107-132.
5. Massey A, Kiffin R, Cuervo AM (2004) Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. Int J Biochem Cell Biol 36, 2420-2434.
6. Hara T, et al. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. Nature 441, 885-889.
7. Nixon RA, Cataldo AM, Mathews PM (2000) The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. Neurochem Res 25, 1161-1172.
8. Bauer PO, et al. (2010) Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. Nat Biotechnol 28, 256-263.
9. Ogier-Denis E, Codogno P. (2003) Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. Biochim Biophys Acta. 1603, 113-128.
10. Liang XH, et al. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. Nature 402, 672-676.
11. Tanaka Y, et al. (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. Nature 406, 902-906.
12. Stappenbeck TS, et al. (2011) Crohn disease: a current perspective on genetics, autophagy and immunity. Autophagy 7, 355-374.
13. Ebato C, et al. (2008) Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. Cell Metab 8, 325-332.
14. Harley JB, et al. (2008) Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci. Nature Genet 40, 204-210.
15. Kimura T, et al. (2011) Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury. J Am Soc Nephrol 22, 902-913.
16. Hartleben B, et al. (2010) Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. J Clin Invest 120, 1084-1096.
17. Pallet N, et al. (2008) Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity. Autophagy 4, 783-791.
18. Periyasamy-Thandavan S, et al. (2008) Autophagy is cytoprotective during cisplatin injury of renal proximal

- tubular cells. *Kidney Int* 74, 631-640.
19. Tanaka Y, et al. (2012) Autophagy as a therapeutic target in diabetic nephropathy. *Exp Diabetes Res* 2012, 628978.
20. Sooparb S, Price SR, Shaoguang J, Franch HA (2004) Suppression of chaperone-mediated autophagy in the renal cortex during acute diabetes mellitus. *Kidney Int* 65, 2135-2144.
21. Oyabu J, et al. (2013) Autophagy-mediated degradation is necessary for regression of cardiac hypertrophy during ventricular unloading. *Biochem Biophys Res Commun* 441, 787-792.
22. Okamoto K, Yamamoto K, Morita N, Ohta Y (1985) Establishment and characteristics of rat with precocious and severe hypertension (M-SHRSP). *Acta Med Kinki Univ* 10, 73-95.
23. Kurtz TW, Griffin KA, Bidani AK, Davisson RL, Hall JE (2005) Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals. Part 2: Blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the subcommittee of professional and public education of the American Heart Association council on high blood pressure research. *Hypertension* 45, 299-310.
24. Morita N (1987) Hypertension and renin in spontaneously hypertensive rats (2). *Acta Med Kinki Univ* 12, 19-37.
25. Ohta Y, Morita N, Yamamoto K, Shiokawa H, Okamoto K (1987) Studies on plasma aldosterone in M-SHRSP and other SHR strains (1). *Acta Med Kinki Univ* 12, 67-84.
26. He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43, 67-93.
27. Matsushita K, et al. (2010) Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 375, 2073-2081.
28. Shokoji T, et al. (2005) Effects of a new calcium channel blocker, azelnidipine, on systemic hemodynamics and renal sympathetic nerve activity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 28, 1017-1023.
29. Fujimoto S, et al. (2009) Azelnidipine exerts renoprotective effects by improvement of renal microcirculation in angiotensin II infusion rats. *Nephrol Dial Transplant* 24, 3651-3658.
30. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15, 1101-1111.
31. Bahro M, Gertig G, Pfeifer U (1988) Short-term stimulation of cellular autophagy by furosemide in the thick ascending limb of Henle's loop in the rat kidney. *Cell Tissue Res* 253, 625-629.
32. Ding Y, et al. (2010) TGF- $\beta$ 1 protects against mesangial cell apoptosis via induction of autophagy. *J Biol Chem* 285, 37909-37919.
33. Park EY, et al. (2012) Proposed mechanism in the change of cellular composition in the outer medullary collecting duct during potassium homeostasis. *Histol Histopathol* 27, 1559-1577.
34. Cuervo AM, Hildebrand H, Bomhard EM, Dice JF (1999) Direct lysosomal uptake of alpha 2-microglobulin contributes to chemically induced nephropathy. *Kidney Int* 55, 529-545.
35. Franch HA, Sooparb S, Du J, Brown NS (2001) A mechanism regulating proteolysis of specific proteins during renal tubular cell growth. *J Biol Chem* 276, 19126-19131.
36. Cuervo AM, Dice JF (2000) Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic* 1, 570-583.
37. Nakamura T, et al. (2007) Azelnidipine reduces urinary protein excretion and urinary liver-type fatty acid binding protein in patients with hypertensive chronic kidney disease. *Am J Med Sci* 333, 321-326.
38. Yamagishi S, Inagaki Y, Nakamura K, Imaizumi T (2004) Azelnidipine, a newly developed long-acting calcium antagonist, inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 expression in endothelial cells through its anti-oxidative properties. *J Cardiovasc Pharmacol* 43, 724-730.
39. Massey AC, Kaushik S, Sovak G, Kiffin R, Cuervo AM (2006) Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5805-5810.
40. Takabatake Y, Kimura T, Takahashi A, Isaka Y (2014) Autophagy and the kidney: health and disease. *Nephrol Dial Transplant* 29, 1639-1647.
41. Kume S, Yamahara K, Yasuda M, Maegawa H, Koya D (2014) Autophagy: emerging therapeutic target for diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* See comment in PubMed Commons below 34, 9-16.