

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670434

研究課題名(和文)系球体血行動態調節機構の加齢性変化：腎臓の老化における病態生理的意義

研究課題名(英文) Aging-related alterations in the control of glomerular hemodynamics: pathophysiological significance in the aging kidney.

研究代表者

有馬 秀二 (ARIMA, Shuji)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：60323010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：系球体単離灌流実験では、系球体血行動態調節機構に及ぼす加齢の影響を検討したが、有意な成果は得られなかった。また、系球体血行動態調節機構の分子生物学的機序を明らかにする目的で、輸出入細動脈の血管平滑筋細胞と血管内皮細胞の培養系確立を目指したが、確立するに至らなかった。腎内小胞体ストレスに関する検討では、悪性腎硬化症の腎臓では酸化ストレスを含む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、腎障害に寄与している可能性を示唆する成果が得られた。また、降圧薬治療による腎障害の抑制にはマクロオートファジーやシャペロン介在性オートファジーの活性化が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using malignant hypertension model rats (M-SHRSP) we found that activations of endoplasmic reticulum stress (ERS) and apoptotic pathway but not autophagy are involved in the pathophysiology of hypertensive renal damage. We also found that antihypertensive therapy improve renal damage by downregulating ERS pathway, though it upregulates autophagy pathways. These findings raise a possibility that ERS and autophagy could be a new therapeutic target for hypertensive renal disease, especially malignant nephrosclerosis. On the other hand, we could not obtain any successful results in the series of physiological study. We found neither age-related alterations in the control of glomerular hemodynamics nor in the vascular reactivity of renal arterioles. In addition, we could not establish a culture system of vascular smooth muscle cells and endothelial cells of renal arterioles to study their detail cellular mechanisms.

研究分野：医歯薬学 腎臓内科学

キーワード：輸出入細動脈 腎硬化症 酸化ストレス オートファジー 加齢

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) の発症および進行には多くの因子が関与するが、加齢は不可避な危険因子であり、超高齢社会であるわが国では加齢による「腎臓の老化」に関しても十分に考慮される必要がある。加齢による腎臓の形態的变化には腎萎縮・糸球体硬化などがあり、加齢による腎機能の低下には自動調節 (autoregulation) の障害を伴う腎血流量の減少が深く関与している。腎血流量の自動調節には内因性腎血管抵抗調節機構、特に尿細管糸球体フィードバック (TGF) と筋原反応を介する糸球体血行動態の調節が重要であるが、加齢に伴い自動調節が障害される機序は全く不明である。さらに、糸球体高血圧を含む糸球体血行動態の異常は糸球体硬化など形態的異常の原因にもなり (Hill GS et al. *Kidney Int* 63:1027, 2003)、「腎臓の老化」が加速される。

近年、人口の高齢化とともに腎臓の老化が問題となっており、実際、わが国を含む多くの先進国で慢性腎不全の原因疾患として加齢性腎障害 (腎硬化症) が増加しつつある。しかしながら、腎硬化症の成因に重要な細小動脈硬化に関して形態学的な検討は十分なされていないものの、硬化に陥った細動脈の機能に関する生理学的な検討は不十分である。各種腎疾患の病態には糸球体血行動態の異常が深く関与することから、腎硬化症に関しても糸球体血行動態の加齢性変化とその機序を明らかにすることは極めて重要と考えられるが、未だ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

腎疾患の病態・進行には糸球体高血圧および糸球体過剰濾過などの糸球体血行動態異常が重要な役割を演じている。本研究ではこれまでに我々が解明してきた糸球体血行動態調節機構が加齢によりどのように変化するかを解明する。さらにその病態生理的意義・機序、特に加齢関連分子との関連を明らかにすることで「腎臓の老化機序」およびその治療に関する新知見を得たいと考えている。具体的には、**1**・皮質部輸入細動脈の筋原反応と TGF の加齢性変化およびその機序を検討する。**2**・輸出入細動脈の血管抵抗制御機構の加齢性変化を機序を含めて詳細に検討する。

また、糸球体血行動態調節機構の細胞内調節機序を詳細に検討するために、我々は分子生物学的実験手法の導入を試みている。具体的には、ラットやウサギから輸出入細動脈を単離し、既報 (Chaudhari A et al. *Am J Physiol* 256:F266, 1989 / Dubey RK et al. *Circ Res* 71:1143, 1992) の方法を用いて内皮細胞と血管平滑筋細胞の培養細胞を確立しようと努めている。この培養実験系を確立することで、生理実験で得られた結果に分子生物学的実証を付け加えることや、分子レベルで得られている情報を我々の生理実験系

に feedback することが可能となり、分子に基づいた糸球体血行動態調節機構の解析を可能にし、独創的な研究分野を確立したいと考えている。

さらに、組織学的に機序を明らかにする目的で、加齢による腎内酸化ストレス・小胞体ストレスの発生を部位・時期・治療効果などを含めて詳細に検討し、病態との関与を検討する。

本研究の目的は、上記の包括的実験系を確立して実施することで、腎微小循環 (糸球体血行動態) 調節機構の加齢性変化を解明するとともに、その生理的・病態生理的意義、特に腎臓の老化機序への関与を明らかにして治療 (アンチエイジング) に役立つ新知見を得ることである。

### 3. 研究の方法

まず糸球体単離灌流実験が容易なウサギを用いて皮質部の糸球体血行動態調節機構が加齢に伴い変化するか否かを検討することにした。老齢 (4 年齢以後) オスウサギの腎皮質表層部から輸出入細動脈を摘出して主に下記の実験を行う。これまで我々が 1 年齢前後のオスウサギで得ている実験結果と比較し、差異が認められた項目に関してはその機序を検討することにした。特に、筋原反応・TGF 反応とその制御機構が加齢に伴い変化するか? 内因性の NO・PG などによる輸出入細動脈収縮反応の制御機構が加齢に伴い変化するか? 輸出入細動脈収縮機序における L 型・T 型 Ca チャネルの関与が加齢に伴い変化するか?、などに重点をおいて検討することにした。

「腎臓の老化機序」に特に重要と思われる結果が得られた場合には、ヒト老化症候群モデルの *Klotho* マウスでも同様に認められるかを検討することにした。病態生理的に意義があると考えられる加齢性変化が認められた場合には、それらの機序を特異的に抑制または改善する方法を検索することで、腎臓のアンチエイジングにつながる研究を行うこととした。

特異的方法を明らかにできない場合には、tempol・4-PBA などを用いて酸化ストレス・小胞体ストレスを抑制することで病態に関与する異常が改善するか否かを検討することにした。

腎細動脈の内皮細胞と血管平滑筋細胞の培養方法はすでに報告されているが、いずれもメッシュを用いた sieving 法にて細動脈を単離しており、純度に若干の問題がある (小葉間動脈の混入など)。一方、我々はウサギや種々のモデルラットから輸入・輸出細動脈のみを顕微鏡下に直接単離することが可能であるので、純度に関して問題はない。単離した細動脈を既報の条件を用いて primary culture を行い、正常および各種病態下での血管内皮の細胞内伝達機構の性差・血管平滑筋の細胞内  $Ca^{2+}$  シグナル伝達機構・ $Ca^{2+}$  チャ

ネルの性差に重点を置いて継代5代以内で実験を行うこととした。

小胞体ストレス・酸化ストレスに関する検討では、腎硬化症モデルや悪性腎硬化症モデルを用いて腎内小胞体ストレス・酸化ストレスの発症を部位・時期などを含めて詳細に検討する。さらにその発現機序と発現を抑制・改善する方法を検討する。小胞体ストレスは直接測定することが困難であるため（小胞体ストレスを除去するために誘導される）小胞体シャペロンを検討して間接的に評価する。さらに、近年、様々な疾患でオートファジーの関与が明らかにされているが、加齢や高血圧で惹起される腎硬化症とオートファジーの関連を検討した報告はない。本研究では悪性高血圧モデルラットを用いて、悪性腎硬化症とオートファジー、特にマクロオートファジーとシャペロン介在性オートファジーの関与について検討した。

#### 4. 研究成果

##### <系球体単離灌流実験>

輸入細動脈と輸出細動脈のいずれにおいても血管反応性・血管内皮機能に加齢の影響を認めなかった。その理由の1つとして、我々がこれまで実験に用いてきた非高齢ウサギに比して、実験結果にバラつきが大きかったことが挙げられる。加齢により、個体差が大きくなることが判明したので、今後、この点に関する改善が必要と考えている。また、加齢により血管内皮機能が低下することから、少なくとも内因性 NO・PG による制御機構は減弱していると予想していたが、有意な結果を得ることはできなかった。その理由として実際に加齢が輸出入細動脈の血管内皮機能および血管反応性に影響を与えないのか、それとも酸化ストレスなどを含めた血管環境の違いを実験系に取り入れる必要があったのかは不明であり、解明が必要と考えている。Ca 拮抗薬による輸入細動脈の拡張は高齢ウサギでも通常通り認められ、L 型 Ca チャンネルの機能に加齢性変化はないと考えられた。

今回、ウサギでの実験で成果が得られなかったため、Klotho マウスを用いた実験を開始することはなかったが、今後、このマウスを用いて腎臓の老化機序、特に系球体血行動態の老化機序を検討する予定である。

腎臓の濃縮機能には皮質以上に髄質血流が重要であるが、我々は加齢とともに傍髄質の血流が低下すること、さらにその機序にトロンボキサン A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) が関与することを明らかにした。TXA<sub>2</sub> には直接的な血管収縮作用とスーパーオキシドの産生亢進を介した血流低下作用があるため、髄質に血液を供給する Descending Vasa Recta を収縮させる可能性などが考えられる。Descending Vasa Recta の収縮は、腎間質圧の低下から Na 利尿の減弱、ひいては高齢者に多い食塩

感受性高血圧の発症につながる、現在、その病態生理学的意義の詳細について検討を進めている。

##### <血管分子生物学的実験>

系球体血行動態調節機構の分子生物学的機序を明らかにする目的で、輸出入細動脈の血管平滑筋細胞と血管内皮細胞の培養系確立を目指しているが、本研究の中では確立するには至らなかった。輸入細動脈および輸出細動脈の単離に関して全く問題なく実施可能であるが、既報の方法では血管平滑筋細胞と内皮細胞の分離に成功しなためである。今後、他の血管部位で用いられている手法や新しく独創的な手法を導入することで、培養系の確立を目指すことにしている。

##### <小胞体ストレスに関する実験>

悪性高血圧症・悪性腎硬化症の動物モデルである malignant stroke-prone spontaneously hypertensive rats (M-SHRSP)では、正常モデルに比して腎皮質および髄質で PERK や IRE1 $\alpha$  (小胞体ストレス pathway) の蛋白発現が増加するとともに皮質における小胞体シャペロン(ORP 150, GRP78)の発現量が増加していた。髄質においても ORP 150 は著明に増加していた。酸化ストレスに関しては、M-SHRSP の皮質で 4HNE, HO-1 の発現量が増加していたが、NOX4 の発現が低下していた。以上より、悪性腎硬化症では小胞体シャペロンや NOX4 など小胞体ストレス・酸化ストレスに関与する因子の産生/除去のバランスが臓器障害の程度に重要と考えられた。

次に、M-SHRSP を用いて高血圧性腎障害とオートファジー、特にストレスとの関与が強いとされるマクロオートファジーとシャペロン介在性オートファジーの関連を検討した。まず悪性高血圧レベルにまで血圧が上昇した 13 週齢の M-SHRSP の腎臓では、マクロオートファジーの過程でオートファゴソームに局在する LC3B-II の蛋白発現量が減少していた。シャペロン介在性オートファジーで基質のリソソームへの取り込み不可欠な蛋白である LAMP2a や HSC70 の発現も減少していた。以上の結果より、悪性高血圧における腎障害の機序には、オートファジーの減弱が関与していると考えられた。酸化ストレスとオートファジーの異常は高血圧発症前の幼若期(5, 8 週)ですでに認められ、血圧上昇の結果ではなく、悪性腎硬化症の病態に関与すると考えられた。一方、高齢期(20 週)になると、オートファジー関連蛋白の発現部位に変化が認められ、高血圧性腎硬化症と加齢による腎硬化症の病態の差異を説明できる可能性があり、さらなる検討が必要と考えられた。

降圧薬治療により、腎機能障害と組織傷害が軽減するとともに髄質における LC3B-II と LAMP2a の蛋白発現量が増加し、皮質における HSC70 の蛋白発現量が軽度減少した。シ

ャペロン介在性オートファジーでは 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が、降圧薬治療により集合管における HSC70 と LAMP2a の共発現増加が蛍光二重染色で確認された。以上の結果より、降圧薬治療による腎障害の進行抑制機序にはマクロオートファジーやシャペロン介在性オートファジーの活性化が関与する可能性が考えられた。

さらに、これらの効果が降圧薬によって異なっていた (ARB>Ca 拮抗薬>ヒドララジン) ことから、レニン・アンジオテンシン系および交感神経系の関与を詳細に検討したところ、アルドステロンの関与が特に強いことが判明した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

1. 高見勝弘、中谷嘉寿、高橋実代、山本祥代、清水和幸、古林法大、中野志仁、松岡稔明、谷山佳弘、有馬秀二：悪性高血圧状態の腎小胞体ストレスおよびアグリファジーについての検討．第 39 回日本高血圧学会総会 (2016 年 10 月 2 日 宮城県仙台市 仙台国際センター)

2. 高見勝弘、中谷嘉寿、井上裕紀、大西佐代子、中野志仁、松岡稔明、兵頭俊武、谷山佳弘、有馬秀二：悪性高血圧状態の腎小胞体ストレスおよびオートファジーについての検討．第 58 回日本腎臓学会学術総会 (2015 年 6 月 6 日 愛知県名古屋市 名古屋国際会議場)

3. Takami M, Nakatani Y, Arima S: Involvement of endoplasmic reticulum stress and autophagy in hypertensive kidney disease. American Society of Nephrology KIDney Week 2014 (2014 年 11 月 14 日 米国フィラデルフィア)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.kindai.ac.jp/jinzou/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

有馬 秀二 (ARIMA, Shuji)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：60323010

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし

(4) 研究協力者：なし