

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

| | |
|---------|--|
| 氏名 | 山崎 美穂子 |
| 学位 | 博士 (医学) |
| 学位記番号 | 新大院博 (医) 第740号 |
| 学位授与の日付 | 平成29年3月23日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 博士論文名 | Possible role for glomerular-derived angiotensinogen in nephrotic syndrome. (ネフローゼ症候群における糸球体由来アンジオテンシノーゲンの役割) |
| 論文審査委員 | 主査 教授 味岡 洋一 副査 准教授 矢尾板 永信 副査 教授 成田 一衛 |

博士論文の要旨

【背景と目的】

タンパク病の発症機序の解明は、腎臓病学の最も重要な課題の一つである。

レニン・アンジオテンシン系 (RAS) 阻害薬は糸球体傷害とタンパク尿を減少させることから、アンジオテンシン II (Ang II) が糸球体病変に関与していると考えられている。局所の RAS は生体各所の機能維持において重要な役割を果たすことが報告されているが、糸球体局所における機能、病態調節における役割については十分に検討されていない。申請者らはネフローゼ症候群モデルのラット糸球体における RAS 分子の発現動態と、Ang II 受容体拮抗薬 (ARB) の影響について解析した。

【方法】

RAS 分子の発現動態を2つのネフローゼ症候群モデルで解析した。①抗ネフリン抗体誘導腎症モデル：雌性 Wistar ラットに 10.0 mg/head を尾静脈から投与し、1時間、5日後の腎を摘出した。②puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症モデル：雌性 Wistar ラットに 100 mg/kg B.W. を尾静脈から投与し、1時間、10日後の腎を摘出した。単離糸球体より RNA を抽出し、Real-Time RT-PCR 法により糸球体に発現する RAS 分子 (angiotensinogen (AGT)、renin、angiotensin-converting enzyme (ACE)、angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)、angiotensin II type 1 receptor (AT1R)、angiotensin II type 2 receptor (AT2R)、nepilysin) 並びにスリット膜関連分子 (nephrin) の mRNA 発現を、免疫蛍光法と Western blot 法で蛋白発現を解析した。PAN 腎症モデルにおいて ARB (イルベサルタン) が AGT 発現に与える影響を、RT-PCR 法と免疫蛍光法で解析した。

【結果】

分化型培養糸球体上皮細胞において、RAS 分子の mRNA 発現が確認された。

抗ネフリン抗体誘導腎症、PAN 腎症両モデルで、薬剤投与後1時間で AGT 発現は正常値の50倍以上と著明に増加した。Ang II 受容体も同様に増加したが、AT1R は投与後1時間では著変なくタンパク尿のピーク時に2倍に増加したのに対し、AT2R は投与後1時間で10倍程度に増加した。これに対して、renin、ACE、ACE2、nepilysin は減少した。RAS 分子の増減は両モデルで共通していた。Western blot 法でも、腎症モ

デルで AGT の増加が確認された。免疫蛍光法では、正常糸球体で AGT は不連続に染色されたが、腎症モデルでは糸球体毛細血管壁に連続性したパターンを示し、発現の増加を認めた。二重染色法では、投与後 10 日目の PAN 腎症モデルで、AGT とポドサイトマーカである synaptopodin の局在は一致した。また、タンパク尿ピーク時の尿細管上皮細胞表面で AGT 発現の増強が確認された。正常ラットの肝臓でも免疫蛍光法で AGT 発現が確認された。腎症モデルの肝では明らかな AGT 増加は確認できなかった。

ARB 投与を行った腎症モデルでは、AGT 発現の増加は抑制された。

【考察】

ARB が降圧効果により腎障害とタンパク尿を抑制することは知られている。一方で、ARB が糸球体内圧抑制とは非依存的にタンパク尿を抑制し、Ang II が糸球体上皮細胞のバリア機能へ直接的な影響を及ぼすことが報告されている。糸球体局所と循環する AGT のどちらが糸球体上皮細胞に作用するかは十分に解析されていない。申請者らは 2 つの腎症モデルを用い、傷害を惹起した直後からタンパク尿が最大となる期間において、AGT 発現が増加することを示した。いずれのモデルでも AT1R も増加していた。一方で renin、ACE、ACE2、nepilysin らの酵素群は減少しており、AGT の急激な増加を抑制する方向に作用している可能性がある。局所 RAS の活性は多くの酵素群によって制御されるが、基質である AGT の量によっても規定され、糸球体上皮細胞由来 AGT 産生増加が糸球体上皮細胞傷害と関与する可能性を示した。

一方で、腎症惹起直後から両モデルで AT2R の mRNA 増加を認めた。申請者らのグループは、AT2R を介する Ang II の作用が、AT1R を介した場合とは反対の作用を示すことを報告している。このことから、AT1R を介した Ang II の作用を抑制することにより AT2R は腎保護作用を示すと考えられる。Ang II が腎を傷害する機序は十分に解明されていないが、細胞が Ang II による刺激を受けると Ca イオンチャネルが活性化され、Ca イオン流入が増加することで RAS のポジティブフィードバックループが増強されると報告されている。ARB は、このポジティブフィードバックループを遮断することで局所の AGT 増加を抑制し、糸球体を保護すると考えられた。

【結論】

糸球体機能障害において局所 RAS の亢進が関与していること、ARB は局所 Ang II 作用を活性化させるポジティブフィードバックループを抑制することにより、スリット膜傷害を改善させると考えられた。

審査結果の要旨

レニン・アンジオテンシン系 (RAS) 阻害薬は糸球体傷害とタンパク尿を減少させることから、アンジオテンシン II (Ang II) が糸球体病変に関与していると考えられている。申請者はネフローゼ症候群モデルのラット糸球体における RAS 分子の発現動態と、Ang II 受容体拮抗薬 (ARB) の影響について検討した。

RAS 分子 (angiotensinogen (AGT)、renin、ACE、ACE2、AT1R、AT2R、nepilysin) 並びにスリット膜関連分子 (ネフリン) の腎糸球体における発現動態を①抗ネフリン抗体誘導腎症モデル、② puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症モデルの 2 つのネフローゼ症候群モデルで解析した。

mRNA 発現を検討した結果、両モデルにおいて薬剤投与後 1 時間で AGT は正常値の 50 倍以上と著明に増加し、Ang II 受容体も増加した。これに対して renin、ACE、ACE2、nepilysin は減少した。RAS 分子の増減は両モデルで共通していた。Western blot 法、免疫蛍光法でも、腎症モデル糸球体で AGT 発現の増加を認めた。糸球体構成細胞マーカーに対する抗体を用いた二重染色法での検討で、PAN 腎症モデルの AGT は主に糸球体上皮細胞に発現していることを確認した。ARB 投与を行った腎症モデルでは、AGT 発現の増加は

抑制された。局所RASの活性は基質であるAGTの量によって規定され、糸球体上皮細胞由来AGT産生増加が糸球体上皮細胞傷害に関与する可能性を示し、ARBは局所Ang II作用を活性化させるポジティブフィードバックループを抑制することにより、スリット膜傷害を改善させると考えられた。

以上、糸球体機能障害において局所RASの亢進が関与していることをはじめて報告した点に、学位論文の価値があると判断した。