

助成番号 9929

糸球体腎炎におけるTGF- β 発現に及ぼすレニン系の影響

助成研究者：菱田 明 (浜松医科大学 医学部 第一内科)
 共同研究者：山本 龍夫 (浜松医科大学 医学部 第一内科)
 藤垣 嘉秀 (浜松医科大学 医学部 第一内科)
 池谷 直樹 (浜松医科大学 医学部 第一内科)
 宮地 武彦 (浜松医科大学 医学部 第一内科)
 鈴木 洋行 (浜松医科大学 医学部 第一内科)

【目的】慢性腎疾患における腎機能低下には過剰な細胞外基質の蓄積に起因する腎硬化性病変の進行が重要であり、その原因として transforming growth factor- β (TGF- β)、TGF- β レセプター(T β R)の関与が注目されている。本研究では、塩分摂取の多寡によって変化したレニン系が抗胸腺抗体 (anti-thymocyte serum ; ATS) 腎炎の進展やTGF- β 、T β Rの発現に及ぼす影響を検討した。

【方法】雄 Wistar ラットを、A群：正常塩分食(0.39% NaCl 食、飲用水は蒸留水)で飼育、B群：ATSを静注する7日前にフロセミド2mg/kgを腹腔内投与し、以後、低塩分食(0.03% NaCl 食、飲用水は蒸留水)で飼育、C群：ATSを静注する14日前と7日前に deoxycorticosterone acetate 10mg/kg を腹腔内投与し、高塩分食(正常塩分食、飲用水は1%食塩水)で飼育、に分け、ATSを静注し、その後も同様の塩分摂取下で飼育した。ATS静注前および静注後3、7、14、28日目に血圧測定、一日尿蛋白定量、PAS染色による腎組織病変の病理学的検討、単離糸球体の培養上清中の総TGF- β 1のELISAによる定量、単離糸球体から抽出した蛋白のウエスタンブロットによるtype I、II、III T β R蛋白の定量、RIAによる血漿レニン活性の定量、腎組織のレニンとtype I、II T β R蛋白の免疫組織染色、を行った。

【結果】平均動脈血圧は経過を通じ各群で有意な差はなかった。ATS静注後、A群とB群では、尿蛋白排泄および細胞外基質の増加を伴ったメサンギウム増殖病変はそれぞれ3および7日目をピークとして一過性に増加したが、それらの程度は正常塩分食摂取のA群に比して低塩分食摂取のB群で軽度であった。一方、高塩分食摂取のC群では尿蛋白排泄ならびに糸球体病変はともに高度でかつ遷延し、28日目でも軽減しなかった。糸球体のTGF- β 1産生はB群で有意に少なく、一方、糸球体のtype I、II、III T β R蛋白の発現はC群で著明に亢進していた。血漿レニン活性はA群に比してB群では有意に高く、C群では低値であった。傍糸球体装置の輸入細動脈に発現が認められる腎内のレニン蛋白はATS静注前では各群間で明らかな差はなく、また、ATS腎炎惹起7日後の腎内のレニン蛋白の発現はC群ではB群よりも少ない傾向がみられたが、ATS腎炎惹起前後での腎内のレニン蛋白の発現は、いずれの群においても有意な差は認められなかった。

【考察】塩分摂取の多寡は、循環血中のレニン活性や腎内のレニン発現とは別の機序を介してATS腎炎糸球体のTGF- β とT β Rの発現を変化させ、ATS腎炎の進展に影響を与える可能性が示唆された。

助成番号 9929

糸球体腎炎における TGF- β 発現に及ぼすレニン系の影響

助成研究者：菱田 明 (浜松医科大学 医学部 第一内科)
 共同研究者：山本 龍夫 (浜松医科大学 医学部 第一内科)
 藤垣 嘉秀 (浜松医科大学 医学部 第一内科)
 池谷 直樹 (浜松医科大学 医学部 第一内科)
 宮地 武彦 (浜松医科大学 医学部 第一内科)
 鈴木 洋行 (浜松医科大学 医学部 第一内科)

1. 研究目的

慢性糸球体腎炎の進行に及ぼす塩分摂取量の影響について、塩分の過剰摂取が高血圧をきたし、腎障害の進展に影響する可能性があることは以前より良く知られているが、血圧に影響しない程度の塩分摂取量の変化が腎障害の進行に及ぼす影響についてはほとんど知られていない。慢性進行性腎疾患における腎機能低下の原因としては、糸球体や尿細管間質への過剰な細胞外基質の蓄積に起因する腎硬化性病変の進展が深く関与しており、最近、そのような細胞外基質の病的蓄積には、様々な細胞で細胞外器質の産生増加と細胞増殖の抑制作用を有するサイトカインとして知られている transforming growth factor- β (TGF- β) の発現増強が深く関わっていることが明らかとなっている[1]。

近年、腎においてアンジオテンシンⅡが TGF- β の発現を促進することや、アンジオテンシン変換酵素阻害薬の投与によって腎障害進行モデルで TGF- β の発現抑制とともに糸球体硬化性病変の改善を認めたとする報告など、レニン・アンジオテンシン系が腎での TGF- β の発現増加に関与することが示唆されている[2]。我々も最近、レニンの産生増加をきたす Bartter's-like syndrome の患者の傍糸球体装置にレニンと TGF- β 2 アイソフォームの発現増加を報告した[3]。しかしその一方で、deoxycorticosterone acetate (DOCA)-食塩高血圧ラットでは循環血中のレニン系が抑制されているにもかかわらず TGF- β の発現増加が認められており、レニン系と TGF- β との関係については不明な点が多い。腎疾患においてレニン系が TGF- β に及ぼす影響を明らかにすることは、腎疾患患者において、レニン系に影響することが明らかである塩分摂取量を定める上で必要な情報である。

本研究では塩分摂取量の多寡によって循環血中のレニンを抑制または亢進状態としたラットに抗胸腺抗体(anti-thymocyte serum; ATS)腎炎を惹起し、血漿レニン活性、腎内レニンの発現、腎組織病変、蛋白尿、腎での TGF- β と TGF- β レセプター(T β R)の発現の変化を調べ、塩分摂取量に起因したレニン系の変化が ATS 腎炎ラットの腎病変や腎内 TGF- β 、T β R の発現に与える影響を検討した。

2. 研究方法

ATS は Wistar ラットの胸腺細胞でヒツジを免疫して作成した。雄 Wistar ラットを用い以下の 5 群を作成した。A 群：正常塩分食(0.39% NaCl 食、飲用水は蒸留水)で飼育したラットに ATS を静注。B 群：ATS を静注する 7 日前にフロセミド 2mg/kg を腹腔内投与し、以後、低塩分食(0.03% NaCl 食、飲用水は蒸留水)で飼育したラットに ATS を静注し、その後も低塩分食で飼育。C 群：ATS を静注する 14 日と 7 日前に DOCA 10mg/kg を腹腔内投与し、高塩分食(正常塩分食、飲用水は 1% 食塩水)で飼育したラットに ATS を静注し、その後も高塩分食摂取で飼育。D 群：B 群と同様の低塩分食摂取ラットに正常ヒツジ血清を静注。E 群：C 群と同様の高塩分食摂取ラットに正常ヒツジ血清を静注。ATS 静注前および静注後 3、7、14、28 日目に血圧測定、採血、メタボリックケージによる 24 時間蓄尿を行った後にエーテル麻酔下で腎を PBS 灌流後に摘出した。各群において 1) 一日尿蛋白排泄量の定量、2) RIA による血漿レニン活性の定量、3) PAS 染色による腎組織病変の病理学的検討、4) シーピング法によって単離した糸球体を DMEM 培養液に 24 時間培養し、上清中の TGF- β 1 の ELISA による定量、5) 単離糸球体より RIPA バッファーで蛋白を抽出し、ウエスタンブロットによる type I(T β RI)、type II(T β R II)、type III(T β R III) T β R 蛋白の定量、6) 腎内のレニン、T β RI、T β R II 蛋白の免疫組織染色、を行った。

3. 研究結果

3.1 血圧の推移

各群ラットの平均血圧は ATS 腎炎惹起時ならびに惹起後 28 日まで有意な差は認めなかった。

3.2 尿蛋白排泄量

正常塩分食投与の ATS 腎炎ラット(A 群)では、尿蛋白は ATS 静注後、3 日目をピークに上昇し、以後漸減した。低塩分食投与の ATS 腎炎ラット(B 群)では、ATS 静注後の尿蛋白排泄は A 群と同様に 3 日目をピークとして一過性に上昇したが、その程度は A 群に比して有意に少なく、一方、高塩分食投与の ATS 腎炎ラット(C 群)の尿蛋白排泄は 28 日目でも高値のまま持続した。正常ヒツジ血清を低塩分食投与ラット(D 群)ならびに高塩分食投与ラット(E 群)に静注しても有意な尿蛋白排泄増加は認めなかった(Fig. 1)。

3.3 腎組織病変

正常塩分食摂取の ATS 腎炎ラット(A 群)では、ATS 静注 3 日目ではメサンギウム融解、糸球体係蹄の毛細血管瘤形成がみられ、その後 7~14 日目をピークとした一過性のメサンギウムの細胞増殖と基質増加が生じ、それらは 28 日目には軽減した。低塩分食摂取の

ATS 腎炎ラット(B 群)では、A 群に比してメサングウムの細胞増殖と基質増加が経過を通して軽度であり、一方、高塩分食摂取の ATS 腎炎ラット(C 群)ではメサングウムの細胞増殖と基質増加が強かつ遷延し、28 日目でも強く認められた(Fig. 2)。正常ヒツジ血清を静注した低塩分食摂取ラット(D 群)ならびに高塩分食摂取ラット(E 群)には明らかな腎組織病変は認められなかった。

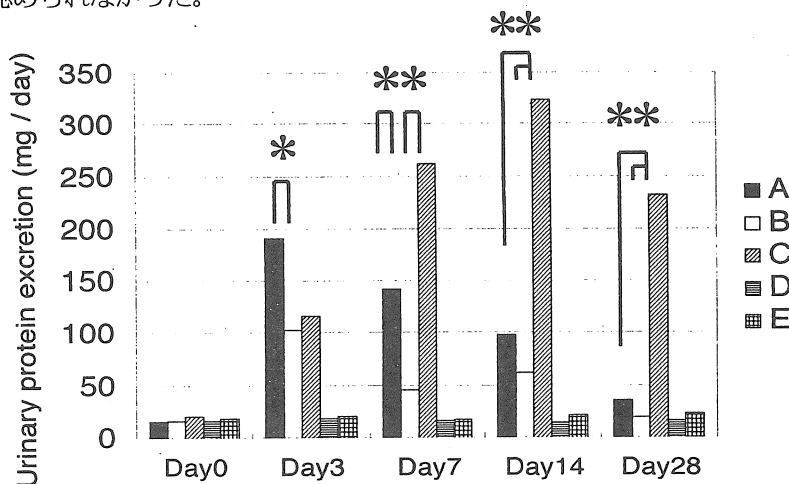


Fig. 1 Urinary protein excretion. Values are means \pm SE. * $p < 0.05$

3.4 単離糸球体培養液中の TGF- β 1

単離糸球体の 24 時間培養液中の総 TGF- β 1 量は、ATS 腎炎発症後、7 日目をピークに増加したが、低塩分食摂取の B 群では正常塩分食摂取の A 群や高塩分食摂取の C 群に比してその増加は有意に軽度であった (Fig. 3)。

3.5 糸球体の T β R I、T β R II、T β R III 蛋白

ATS 腎炎発症 7 日目における糸球体の T β R 蛋白の発現は、単離糸球体のウエスタンブロット(Fig. 4)、腎組織の免疫組織染色(Fig. 5)のいずれの検討においても、高塩分食摂取ラット(A 群)では T β R I、T β R II、T β R III の発現がすべて増加していた。

3.6 血漿レニン活性と腎内レニン蛋白の免疫組織染色所見

血漿レニン活性は、低塩分食摂取の B 群、D 群では正常塩分食摂取の A 群に比して有意に高く、高塩分食摂取の C 群、E 群では低値であった(Fig. 6)。腎内レニン蛋白は傍糸球体装置を構成する輸入細動脈に認められ、その発現は ATS 腎炎発症前(day 0)では塩分摂取の多寡による差は認めず、腎炎発症 7 日目では高塩分食摂取群(C 群)では低塩分食摂取群 (B 群)に比して低下していたが、各群とも腎炎発症前後での変化は有意ではなかった(Fig. 7)。

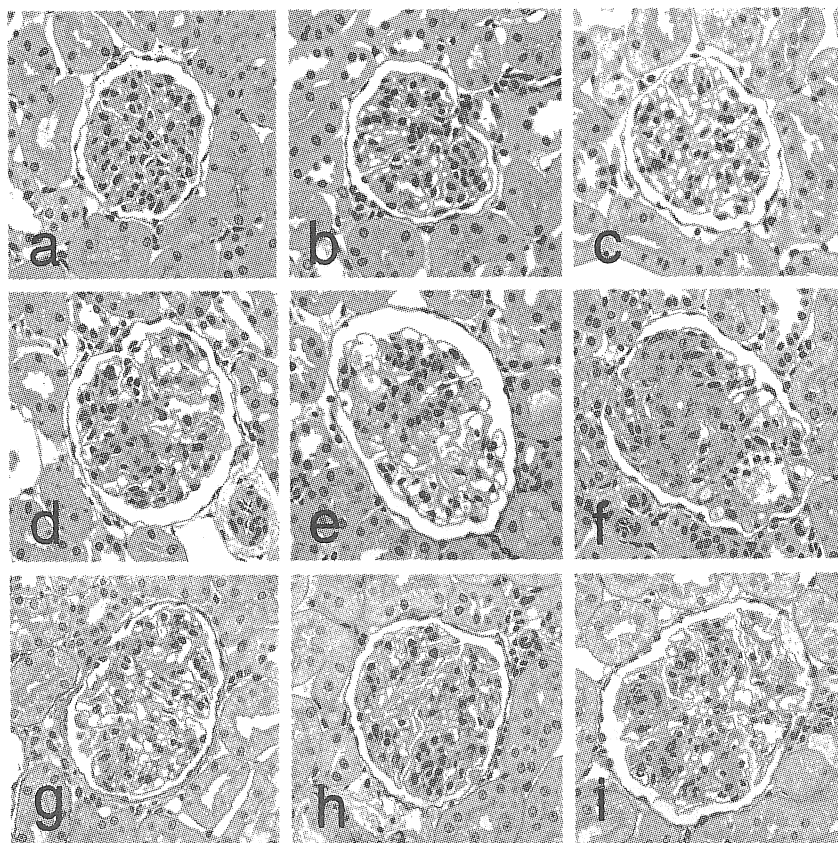


Fig. 2 Light micrographs of the kidneys of rats fed with normal salt (a, d, g), low salt (b, e, h), and high salt diet (c, f, i) before (a to c), and 7 (d to f) and 28 days (g to i) after ATS injection. The levels of proliferative glomerular lesions with mesangial matrix accumulation increased transiently 7 days after ATS injection in rats fed with normal and low salt diet, and were less severe in rats fed with low salt diet than those fed with normal salt diet. In contrast, the glomerular lesions were markedly severe and persisted in rats fed with high salt diet. (Periodic acid-Schiff stain, original magnification $\times 250$)

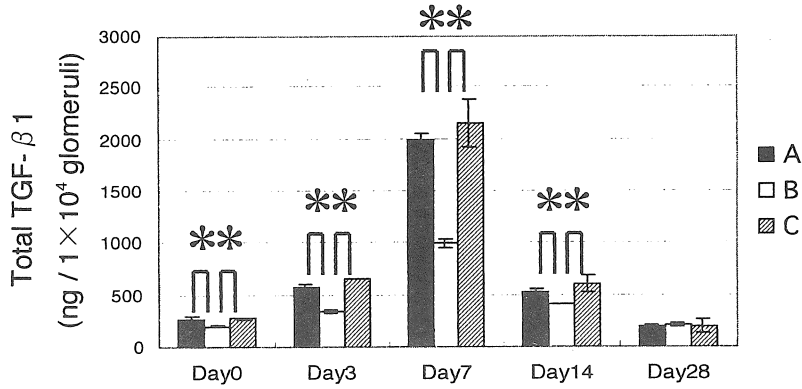


Fig. 3 The levels of total TGF-β1 in the culture media incubated with 1×10^4 glomeruli for 24 hr. Values are means \pm SE. * $p < 0.05$

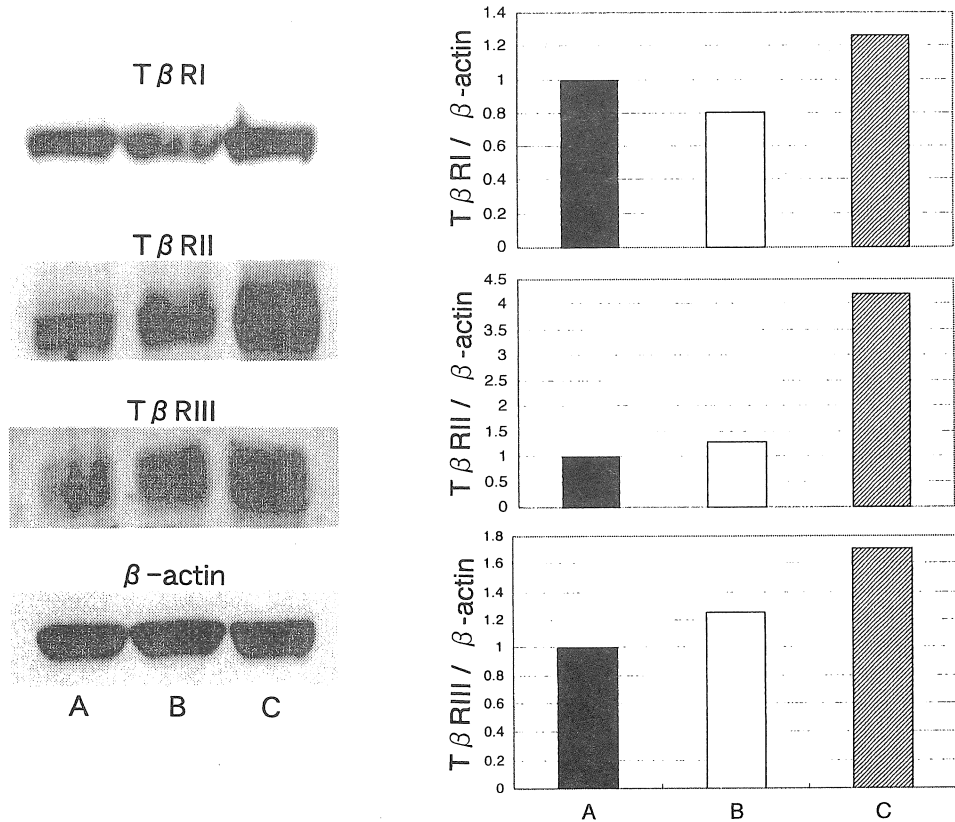


Fig. 4 Western blot analysis of TβRI, TβRII, and TβRIII in the glomeruli isolated from 7 days after ATS injection.

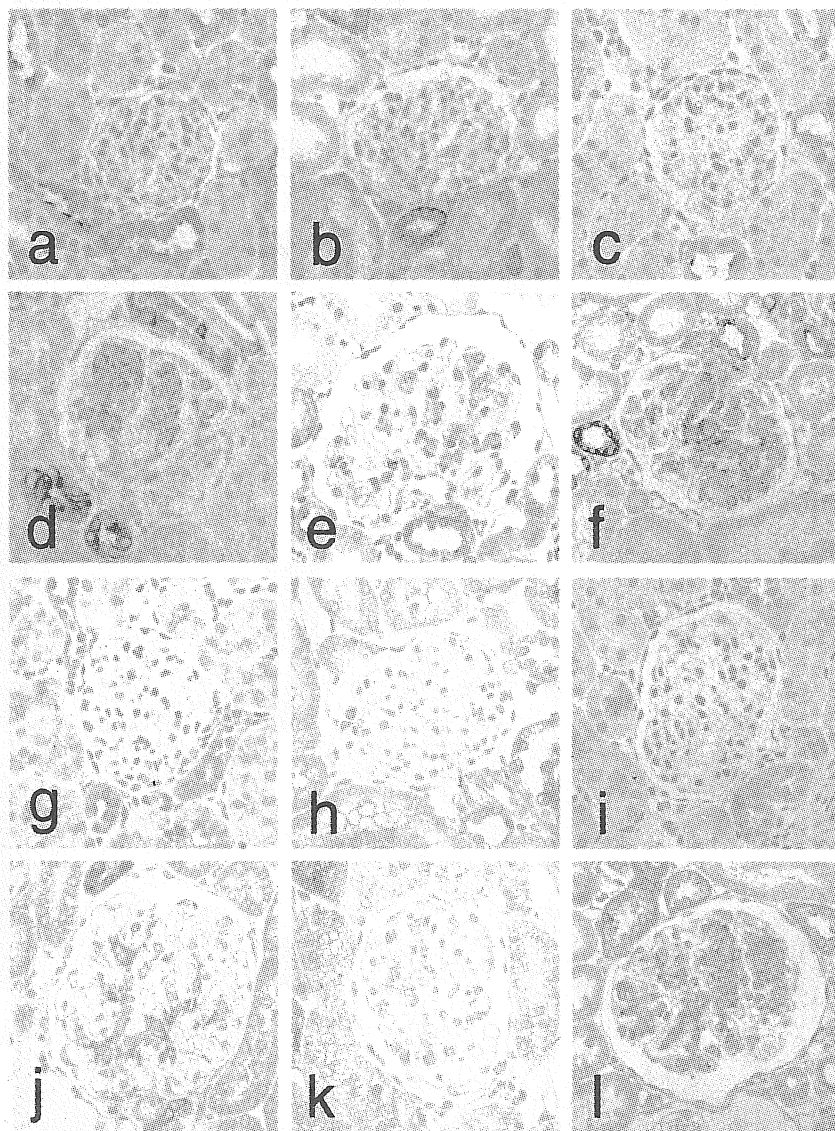


Fig. 5 Immunohistochemical demonstration of $T\beta R I$ (a to f) and $T\beta R II$ (g to l) in the kidneys of rats fed with normal salt (a, d, g, j), low salt (b, e, h, k), and high salt diet (c, f, i, l) before (a to c; g to i) and 7 days (d to f; j to l) after ATS injection. Remarkably strong expression of $T\beta R I$ and $T\beta R II$ was noted in the kidneys 7 days after ATS injection in rats fed with high salt diet, while their expression was scarce in animals fed with low salt diet. (original magnification x 250)

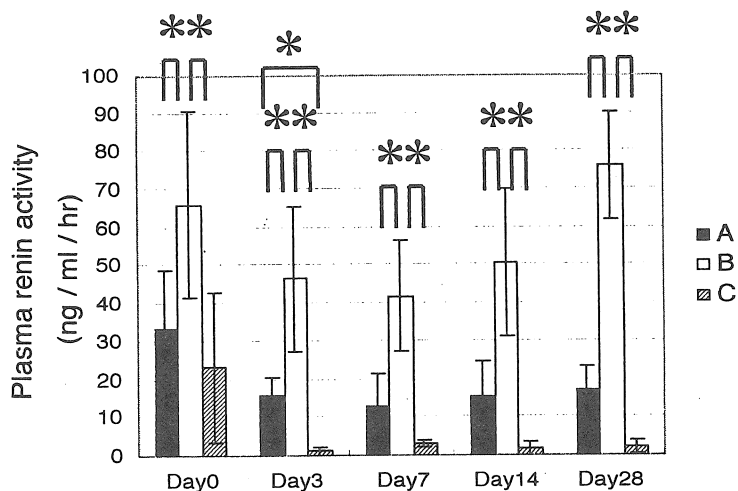


Fig. 6 Plasma renin activities before and after ATS injection. Values are means \pm SE. * $p < 0.05$

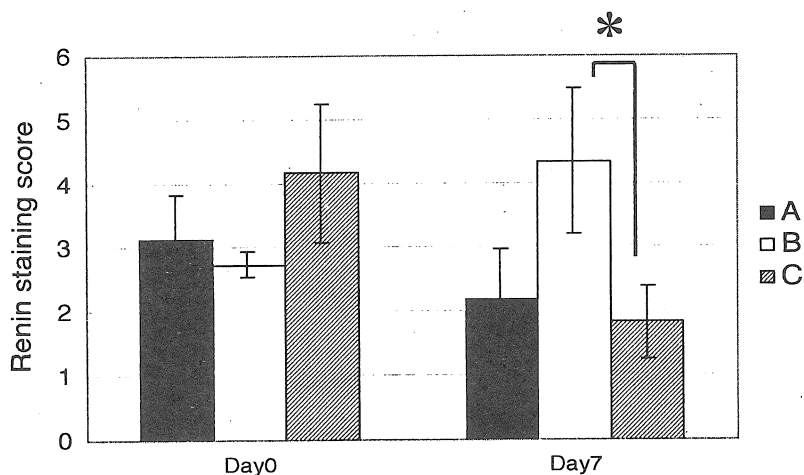


Fig.7 The levels of immunoreactivity for renin in the kidneys before and 7 days after ATS injection. Values are means \pm SE. * $p < 0.05$

4. 考察

近年、硬化性病変の基本病態である細胞外基質の病的蓄積には、硬化性病変局所での TGF- β の発現が深く関わっていることが明らかとなっており[1]、また、細胞の TGF- β に対する反応性は細胞に発現する各種の T β R の変化によって影響を受ける[4]。従来より我々はラットやヒトの各種腎炎における TGF- β と T β R の発現を検討し、過剰な細胞外基質の蓄積に起因する腎硬化性病変の進展には TGF- β 1、 β 2、 β 3 といったすべての TGF- β アイソフォームと T β R I、T β R II、T β R III の発現増強が関与すること[5、6]、

また、メサンギウム細胞増殖病変の進展には増殖性メサンギウム細胞での $T\beta R II$ の特異的な発現低下が関与することを報告してきた[6]。

今回我々は、血圧に変化をきたさないレベルで塩分摂取を制限あるいは負荷した Wistar ラットに ATS 腎炎を惹起させ、糸球体病変や尿蛋白、糸球体での $TGF-\beta$ と $T\beta R$ の発現を検討したところ、低塩分食摂取ラットでは腎炎惹起後の糸球体病変の程度や尿蛋白排泄量は軽く、またその増加は一過性で、糸球体の $TGF-\beta 1$ の発現も軽度であるのに対し、高塩分食摂取ラットでは糸球体病変や尿蛋白排泄量は高度で遷延し、糸球体の $T\beta R I$ 、 $T\beta R II$ 、 $T\beta R III$ の発現はいずれも著しく増強していた。すなわち、低塩分摂取では ATS 腎炎糸球体の $TGF-\beta$ の発現が低減するのに対し、ATS 腎炎が遷延する高塩分摂取では糸球体の $TGF-\beta$ の発現増強の程度は正常塩分摂取と明らかな差はないが、各種の進行性腎炎で糸球体硬化や間質線維化、線維細胞性半月体形成が進む病変局所にみられる所見と同様に $T\beta R I$ 、 $T\beta R II$ 、 $T\beta R III$ の著しい発現増強が観察され、高塩分摂取下における ATS 腎炎の遷延化における $T\beta R$ 発現の重要性が示唆された。

塩分摂取の多寡がいかなる機序で $TGF-\beta$ や $T\beta R$ の発現に関与しているかは現在のところは明らかではない。塩分の過剰摂取は食塩感受性の個体において高血圧を惹起し、高血圧は腎や心、血管系に硬化性病変を引き起こすとは良く知られている。高血圧が硬化性病変を惹起する機序としては、高血圧に起因した組織の機械的伸展といった血行動態的なストレスが $TGF-\beta$ の発現増強を来して硬化性病変の進行させる可能性が示唆されており、また、動脈硬化病変部での $T\beta R II$ の発現の変化に起因する $TGF-\beta$ への反応性の変化も報告されている[7]。最近、アンジオテンシン II は血管作動性作用の他にも様々な細胞生物学的活性を有することが明らかとなっており、硬化性病変の進行には病変局所でのアンジオテンシン II による $TGF-\beta$ の発現誘導の関与が報告されている[8]。食塩感受性の個体では、循環血中のレニン・アンジオテンシン系は塩分負荷によって抑制されるが、硬化性病変を含めた心、血管系や腎臓の臓器障害は塩分負荷によって増悪され、一方、そのような障害は循環血中のレニンを高めるように働くアンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬によって軽減することより、心、血管系病変の進行に関与するアンジオテンシン II の組織局所における発現は、古典的な循環血中のレニン系とは独立して制御されている可能性が示唆されている[9]。腎硬化との関連では、5/6 腎摘モデルで血行動態的な刺激で障害を受けた糸球体内皮細胞がアンジオテシノーゲンを発現し、糸球体内でのアンジオテンシン II 産生が高まることによって $TGF-\beta$ の発現が促され、糸球体硬化が進むという機序が提唱されており[8]、さらに最近、塩分負荷が心、大動脈、腎においてアンジオテシノーゲン、アンジオテシンタイプ I レセプター、フィブロネクチンの発現を促すことも報告されている[10]。今回の検討でも、糸球体病変の程度や糸球体の $TGF-\beta$ 、 $T\beta R$ の発現レベルは循環血中のレニン活性と正相関は認められず、塩分摂取の多寡は循環血中のレニンレベルとは無関係の機序を介して腎内 $TGF-\beta$ 、 $T\beta R$ の

発現を制御している可能性が考えられる。また、傍糸球体装置のレニン蛋白は腎炎発症前後で有意な変化はなく、さらに高塩分食摂取ラットの ATS 腎炎糸球体では低塩分食摂取ラットよりも腎内レニン蛋白は低下していた。これららの所見は、もしも塩分摂取の多寡が腎局所でのアンジオテンシンⅡの発現の変化を介して腎内 TGF- β 、T β R の発現を制御しているとすれば、腎内のアンジオテンシンⅡの発現にはアンジオテンシノーゲン、アンジオテンシンタイプⅠレセプター、アンジオテンシン変換酵素などのレニン以外の因子の発現がより重要であることを示唆するものかもしれない。

5. 今後の課題

今回観察された食塩摂取の多寡がいかなる機序によって糸球体の TGF- β 、T β R の発現を変化させるかを明らかにするためには、腎内レニンの発現をより定量的な方法で検討すると共に、塩分摂取が腎局所におけるレニン以外のレニン・アンジオテンシン系の因子の発現に与える影響や、TGF- β の細胞内情報伝達に關与する各種の Smad の変化を検討する必要がある。

6. 文献

1. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *Engl J Med* 331:1286-1292, 1994
2. Border WA, Noble NA. Interactions of transforming growth factor- β and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 31: 181-188, 1998
3. Yamamoto T, Takahashi T, Yonemura K, Matsui K, Nagase M, Hishida A. Increased transforming growth factor- β 2 expression in the glomerular arteriole of the juxtaglomerular apparatus in a Bartter's like syndrome. *Human Pathol* 30: 992-995, 1999
4. Sanker S, Mahooti-Brooke N, Bensen L, McCarthy TL, Centrella M, Madri JA. Modulation of transforming growth factor β receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J Clin Invest* 97: 1436-1446, 1996
5. Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LA, Border WA. Expression of transforming growth factor- β isoforms in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 49: 461-469, 1996
6. Yamamoto T, Watanabe T, Ikegaya N, Fujigaki Y, Matsui K, Masaoka H, Nagase M, Hishida A. Expression of types I, II, and III transforming growth factor- β receptors in human glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 9: 2253-2261, 1998
7. McCaffrey TA, Consigli S, Du B, Falcone DJ, Sanborn TA, Spokojny AM, Bush

- Jr HL. Decreased type II / type I TGF- β receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 96: 2667-2675, 1995
8. Lee LK, Meyer TW, Pollock AS, Lovett DH. Endothelial cell injury initiates glomerular sclerosis in the rat remnant kidney. *J Clin Invest* 96: 953-964, 1995
 9. Lee MA, Böhm M, Paul M, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: their role in cardiovascular disease. *Circulation* 87 (Suppl IV): IV7-IV13, 1993
 10. Tamura K, Chiba E, Yokoyama N, Sumida Y, Yabana M, Tamura N, Takasaki I, Takagi N, Ishii M, Horiuchi M, Umemura S. Renin-angiotensin system and fibronectin gene expression in Dahl Iwai salt-sensitive and salt-resistant rats. *J Hypertens* 17: 81-89, 1999

Effects of renin system on expression of TGF- β in glomerulonephritis

Akira Hishida, Tatsuo Yamamoto, Yoshihide Fujigaki, Naoki Ikegaya, Takehiko Miyaji, Hiroyuki Suzuki

First Department of Medicine, Hamamatsu University School of Medicine

Summary

Increased expression of TGF- β and TGF- β receptors (T β R) has been shown to be involved in deterioration of renal function resulted from pathologic matrix accumulation in glomerulonephritis. This study was conducted to explore the effects of renin system on expression of TGF- β and T β R in anti-thymocyte serum (ATS) nephritis. In order to modulate renin expression, rats were fed with low salt diet (chow containing 0.03% NaCl; LS), normal salt diet (chow containing regular 0.39% NaCl; NS), or high salt diet (normal salt diet and 1% NaCl as drinking water; HS). Two mg/kg of furosemide also was injected in LS 7 days before ATS injection and 10 mg/kg of deoxycorticosterone acetate in HS 14 and 7 days before ATS injection. We studied the levels of proteinuria, renal lesions, plasma renin activity, and renal expression of immunodetectable TGF- β 1, types I, II, and III T β R, and renin using ELISA, Western blot analysis in isolated glomeruli, and immunohistochemical staining in kidney tissues. The mean arterial blood pressure levels did not differ significantly among the groups. The levels of proteinuria and proliferative glomerular lesions with mesangial matrix accumulation increased transiently after ATS injection in both LS and NS, and were less severe in LS than NS. In contrast, they were markedly severe and persisted in HS. The glomerular TGF- β 1 expression was significantly low in LS, whereas glomerular expression of the three T β R increased markedly in HS. Plasma renin activity was significantly higher in LS and lower in HS than NS. Renin expression in the juxtaglomerular apparatus (JGA) did not significantly differ among the groups before ATS injection. Although renin expression in the JGA was less in HS than LS 7 days after ATS injection, no significant difference was noted before and after ATS injection in each group. These data suggest that modulated expression of TGF- β 1 and the three T β R induced by HS and LS, respectively, plays an important role in progression and amelioration of ATS nephritis. Although the precise mechanism of modulation of renal TGF- β 1 and T β R expression by high or low salt intake is unknown at present, it seems to be independent of renin expression.