

食塩負荷による AKI 予防機序の解明 —(プロ)レニン受容体の関与について

加藤 明彦, 小野 雅史

浜松医科大学医学部附属病院血液浄化療法部

概要 (背景) (プロ)レニン受容体[(P)RR]はレニンとプロレニンに対する膜貫通型受容体であり、腎臓では局所のレニン・アンジオテンシン系(RAS)の活性化に関与している。しかし、(P)RR が虚血性急性腎障害(AKI)の進展に役割を果たしているかどうかは、明らかでない。

(方法) 雄性ラットに 45 分間の虚血傷害を与え、6、24、48 時間および 7 日後に、腎内(P)RR、レニン/プロレニン、アンジオテンシノーゲン(AGT)、AT₁ 受容体(AT₁R)、リン酸化 extracellular-signal-regulated protein kinase 1/2(ERK 1/2)とリン酸化 nuclear factor- κ B(NF- κ B) 蛋白の発現をウエスタンブロット法で評価した。また、腎内アンジオテンシン II (Ang II) 濃度を RIA 法で測定した。その後、虚血傷害の 7 日前から食塩水(1.0% NaCl)を経口投与させることによる腎保護効果と、腎内 RAS 構成要素やリン酸化 ERK 1/2、リン酸化 NF- κ B の変化との関連について検討した。さらに、AT₁R 拮抗薬(ARB)のオルメサルタン投与が、虚血によって誘導された AGT やリン酸化 ERK 1/2 などの(P)RR の下流シグナルに与える影響を評価した。

(結果) 虚血性 AKI モデルでは、再灌流の 24 時間後に腎内(P)RR 蛋白の発現が増加し、48 時間後に最大となった。コントロールモデルでは、主に接合尿細管と集合管で(P)RR が染色されたが、虚血性 AKI モデルでは障害された近位尿細管で免疫性が増加した。腎内 AGT と Ang II 濃度は再灌流の 24、48 時間後に有意に増加した。また、腎虚血再灌流後の早期(6 時間後)にリン酸化 ERK 1/2 とリン酸化 NF- κ B 蛋白が増加した。食塩水を前投与すると、48 時間後の血清クレアチニンの上昇を有意に抑制し(5.36 \pm 1.26 対 3.38 \pm 1.74 mg/dL, p <0.05)、腎内(P)RR、AGT、Ang II 濃度の増加も抑制した。また、食塩水投与は、虚血によって誘導されたリン酸化 ERK 1/2 とリン酸化 NF- κ B 蛋白の増加も有意に抑制した。一方、ARB(オルメサルタン 10 mg/kg/day)を虚血障害の 14 日前から投与したモデルでは、腎内 AGT は抑制されたが、(P)RR とリン酸化 ERK 1/2 は変化せず、腎障害の改善もみられなかった。

(結論) 虚血性 AKI モデルの腎内(P)RR 発現の増加は、リン酸化 ERK 1/2 とリン酸化 NF- κ B などの RAS 非依存性経路の活性化と関連している可能性が示唆された。

1. 背景

循環レニン・アンジオテンシン系(RAS)は、血圧や水分・Na のコントロールに重要な働きを担っている。一方、組織内 RAS は、循環 RAS とは独立した局所作用を持ち、腎臓内 RAS は細胞増殖、炎症、組織線維化などに関与することが知られている。これまでに、虚血性急性腎障害(AKI)ラットモデルで腎内レニン活性とアンジオテンシン II(Ang II)が増加することが報告されており、腎内 RAS は

AKI の発症に関与している可能性が示唆されている。

(プロ)レニン受容体[(P)RR]は、2002 年に Nguyen らによって同定された新しい RAS 構成要素であり、これまでに糸球体メサンギウム領域、腎動脈内皮下層、近位・遠位尿細管に局在することが報告されている。(P)PR は、レニン/プロレニンの受容体としてアンジオテンシノーゲン(AGT)を切断して RAS カスケードを促進させる働きに加え、RAS とは独立して extracellular-signal-regulated protein

kinase 1/2 (ERK 1/2)を活性化させ細胞内シグナルを誘導させる働きをもつ。さらに、Wnt 受容体と液胞型 H⁺ATP アーゼ (V-ATP アーゼ) 複合体とのアダプターとしての機能を有することが報告されている。(P)RRは、これまでに糖尿病性腎症や高血圧性腎障害の進展に関与することが示されているが、AKI の発症や進展に関与するかについては評価されていない。

Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) の AKI に対する臨床診療ガイドライン (2012 年) では、AKI ハイリスク患者に対する初期治療として等張性食塩水の投与が推奨されている。これまでに、虚血や腎毒性物質による AKI 動物モデルの検討で、AKI の発症前に食塩水を前投与すると虚血障害が軽減することが報告されている。しかし、食塩水の前投与が AKI に対して保護的に作用するメカニズムについては、十分解明されていない。

これらの背景から、今回、我々は、虚血性 AKI モデルにおける腎内(P)RR の役割を明らかにすることを目的とし、虚血再灌流後の腎臓内の(P)PR、レニン/プロレニン、AGT、AT₁R、Ang II などの RAS 構成要素と、RAS 非依存性細胞内シグナルであるリン酸化 ERK 1/2 およびリン酸化 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 蛋白の発現を評価した。さらに、食塩水を前投与した虚血性 AKI モデルにおいて、腎障害、腎内 RAS 構成要素、RAS 非依存性細胞内シグナルを評価し、虚血障害に及ぼす食塩水投与の影響について検討した。

2. 実験方法

<研究プロトコール>

雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット (8 週齢, 体重 250-300 g) を使用した。食餌と飲水は自由に摂取させた。ジエチルエーテルとペントバルビタール (50 mg/kg) で麻酔し、側腹切開で右腎を摘出した直後に左腎門部を血管クリップで 45 分間の血流遮断を行った後に開放し、虚血性 AKI モデルを作成した。再灌流から 6、24、48 時間後と 7 日後に断頭屠殺した (各群, n=8)。コントロールモデルとして、sham 手術モデル (sham) と右腎摘出のみ行ったモデル (Uni-Nx) を作成した。血液サンプルと腎組織を採取し、血清クレアチニン (Scr) と尿素窒素濃度 (BUN) を酵素分析法にて測定した。

<血漿レニン活性、血漿および腎内 Ang II の測定>

血漿レニン活性 (PRA) と血漿アンジオテンシン II 濃度 (Ang II) を 2 抗体ラジオイムノアッセイ (RIA) 法にて測定した。また、腎臓内の Ang II 濃度を RIA 法にて測定した。

<組織学的検査>

採取した腎組織をパラフィン包埋した後に 3 μ m にスライスし、PAS 染色を行った。光学顕微鏡 (400 倍) で髄質外層をランダムに選択し、各群 100 個ずつの尿細管を以下の障害度スコアに従って分類し、平均値をした; 0 点: 正常、1 点: 尿細管上皮細胞の腫大・空胞変性・壊死・剥離の領域が <25% 未満、2 点: 同様の領域が 25~50%、3 点: 同様の領域が 50~75%、同様の領域が 75% 以上。

<免疫組織化学法>

スライスした腎組織を 3% H₂O₂ で内在性ペルオキシダーゼを不活化した後に、3% ウシ血清アルブミンで非特異反応を阻害し、免疫組織化学法を行った。連続切片で、以下の抗体の染色性を評価した: ヤギ (P)RR 抗体 (Abcam, 東京, 日本)、ウサギ抗 aquaporin-2 (AQP2) 抗体 (Calbiochem, サンディエゴ, カリフォルニア)、ウサギ抗 calbindin D-28k 抗体 (EG-20, Sigma, セントルイス, ミズーリ)。

<ウエスタンブロット法>

各モデルの腎組織 (皮質・髄質外層) をホモジネートした後に、13,000 回転 (15 分) で遠心分離し、Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories, ハーキュリーズ, カリフォルニア) を用いて蛋白抽出した。総蛋白濃度は、ビスリンコニン酸蛋白定量 (BCA) 法にて測定した。各々、20 μ g ずつの蛋白をポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad Laboratories) で分離し、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Immobilion-P, Millipore, ベドフォード, マサチューセッツ) に転写した。その後、以下の一次抗体を使用し蛋白発現を評価した: ヤギ抗レニン受容体抗体 (1:400, R&D Systems, ミネアポリス, ミネソタ)、マウス抗レニン抗体 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, サンタクルズ, カリフォルニア)、ウサギ抗 AGT 抗体 (1:4000, Immuno-Biological Laboratories, 高崎, 日本)、ウサギ抗 AT₁R 抗体 (1:400, Santa Cruz Biotechnology)、ウサギ抗 phospho-ERK 1/2 (p44/42 MAPK) 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology, ダンバース, マサチューセッツ)、ウサギ抗 ERK 1/2 抗体 (1:2000, Cell Signaling Technology)、ウサギ抗 phospho-NF- κ B p65

(1:2000, Abcam)、ウサギ抗 NF- κ B p65 抗体 (1:2000, Abcam)。内部標準として、マウス抗 β -actin 抗体 (1:50000, Sigma-Aldrich Co., セントルイス, ミズーリ) を使用した。

<食塩水の前投与>

虚血障害(または偽手術)を惹起させる 7 日前から食塩水 (1% NaCl) を自由に摂取させ、正常飲水群と同様に手術を施行し、同様の項目を評価した。虚血障害後は、食塩水の投与は中止した。

<オルメサルタンの前投与>

虚血障害(または偽手術)を惹起させる 14 日前からオルメサルタン(第一三共, 東京, 日本) 10 mg/kg/日を食餌内に混入し、自由に摂取させた。未投薬群と同様に手術を施行し、再灌流の 6、48 時間後に、腎障害の程度、腎内 (P)RR、AGT、リン酸化 ERK 1/2 蛋白を評価した。

<統計解析>

すべてのデータは、中央値 \pm 標準偏差(SD)で表示する。有意差は、スチューデント t 検定と分散分析 (ANOVA) を使用して検出した。p<0.05 を統計学的に有意差があると判定した。

3. 結果

<腎障害の評価>

虚血性 AKI モデルでは、虚血再灌流の 6 時間後に Scr 値が上昇し始め、48 時間後に最大となった。BUN も 48 時間後に最大に増加した。食塩水を前投与すると、48 時間後の Scr (5.36 \pm 1.26 vs. 3.38 \pm 1.74 mg/dL, p<0.05) と 24 時間後の BUN (97.4 \pm 33.9 vs. 59.9 \pm 23.6 mg/dL, p<0.05) の増加が有意に抑制された。また、尿細管障害も、食塩水投与モデルでは、24 時間後 (3.17 \pm 0.36 vs. 2.71 \pm 0.28, p<0.01)、48 時間後 (3.39 \pm 0.31 vs. 2.76 \pm 0.34, p<0.01) に有意に改善した。

<血漿レニン活性、血漿および腎内 Ang II の評価>

PRA は、虚血障害を加えても、コントロールと比較して、いずれの時間帯にも相違はみられなかった。食塩水を前投与すると、48 時間後に PRA の増加が有意に抑制された (p<0.05)。

血漿 Ang II 濃度も、虚血障害による変化は 7 日後までみられず、食塩水を投与しても有意な変化はみられなかった。一方、腎内 Ang II 濃度は、虚血障害を加えると再灌流の 24、48 時間後に有意に増加し、食塩水投与により 6、

24 時間後に有意に抑制された。

<虚血性 AKI モデルにおける (P)RR 蛋白発現の評価>

虚血性 AKI モデルでは、再灌流の 24 時間後に (P)RR 蛋白の発現が増加しはじめ、48 時間後に最大となり、その後 7 日後まで増加が持続した。食塩水を前投与すると、虚血によって誘導された (P)RR 蛋白の増加が有意に抑制された (Fig. 1)。

<(P)RR 免疫染色の評価>

連続切片で評価した (P)RR の免疫染色は、コントロールラットの腎臓では主に AQP-2 (集合管のマーカー) 陽性尿細管とカルビンジン D-28k (結合尿細管のマーカー) 陽性尿細管に一致して染色された。虚血性 AKI ラットの虚血腎では、障害を受けた近位尿細管と集合管を含む皮質・髓質外層領域で、再灌流の 48 時間後に (P)RR の染色性が増加し、結合尿細管においても部分的な増加がみられた。食塩水を前投与すると、虚血によって誘導された (P)RR の染色性が、再灌流 48 時間後に減弱した。

<レニン/プロレニン、AGT、AT₁R 蛋白の評価>

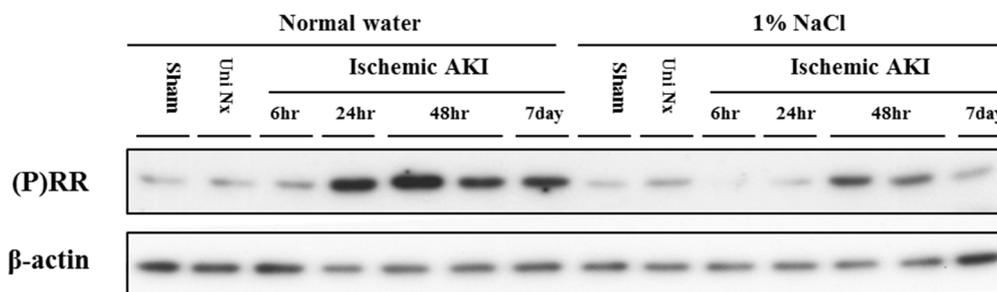
虚血性 AKI モデルでは、腎内 AGT 蛋白の発現は再灌流の 6 時間後から増加し、24 時間後に最大となった。食塩水を前投与すると、虚血によって誘導された AGT 蛋白の増加が抑制された。一方、腎内レニン/プロレニン蛋白と AT₁R 蛋白の発現は、虚血障害を加えても変化はみられず、食塩水投与モデルでも変化は観察されなかった (Fig. 2)。

<リン酸化 ERK 1/2、NF- κ B の評価>

虚血性 AKI モデルにおける腎内リン酸化 ERK 1/2 蛋白の発現は、再灌流の 6 時間後から増加し、7 日後まで増加が持続した。総 ERK 1/2 蛋白の発現の変化は 7 日後までみられなかった。食塩水を前投与すると、虚血によって誘導されたリン酸化 ERK 1/2 蛋白の増加が著明に抑制された (Fig. 3)。連続切片で評価したリン酸化 ERK 1/2 の免疫染色は、再灌流の 6 時間後に、(P)RR と共局在することが観察された。食塩水を前投与すると、(P)RR 染色とともにリン酸化 ERK 1/2 の免疫染色性も減弱した。

さらに、虚血障害を加えた虚血腎のリン酸化 NF κ B 蛋白の発現も再灌流の 6~48 時間後に増加し、食塩水投与により、虚血によって誘導されたリン酸化 NF κ B 蛋白の増加が有意に抑制されたことを観察した (Fig. 4)。

A) 腎内 (P)RR



B) (P)RR/β-actin比

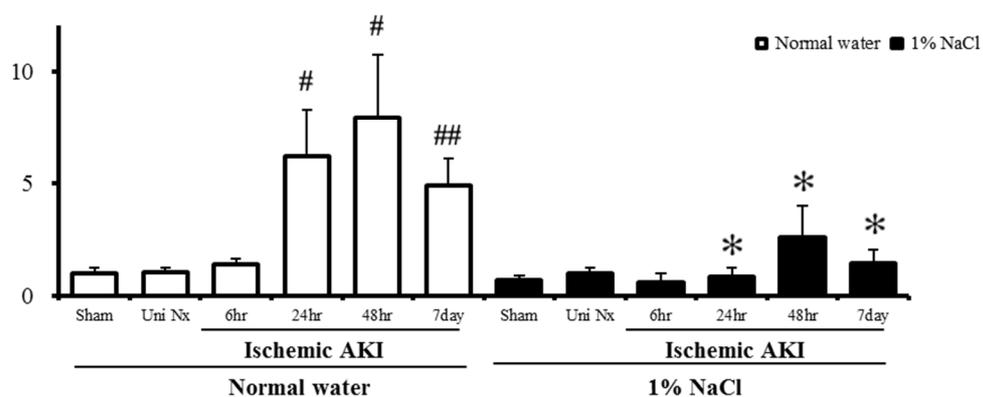


Fig. 1. 虚血・再灌流後の腎内プロレニン受容体 ((P)RR) の経時的発現

(P)RR: (pro)renin receptor, Uni Nx: uninephrectomized group, and AKI: acute kidney injury. * $p < 0.05$ vs. normal water group. # $p < 0.05$ vs. uninephrectomized group (normal water). ## $p < 0.01$ vs. uninephrectomized group (normal water).

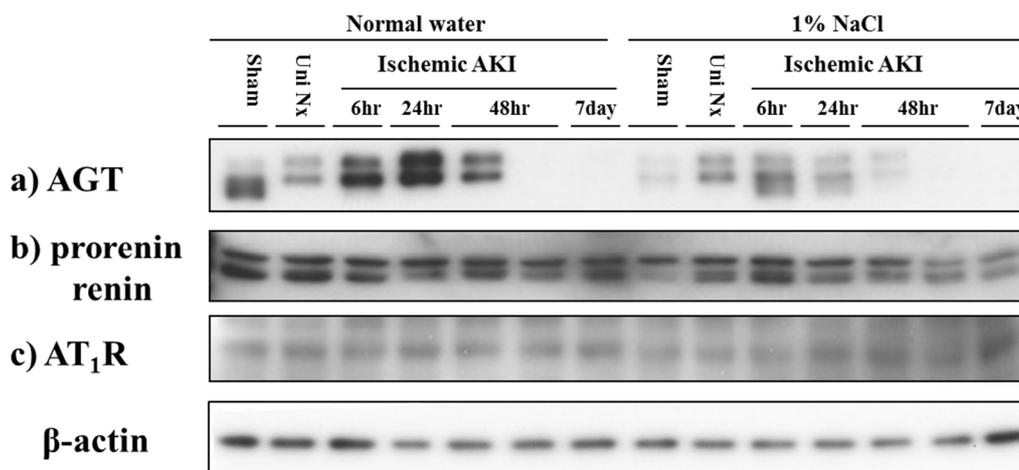
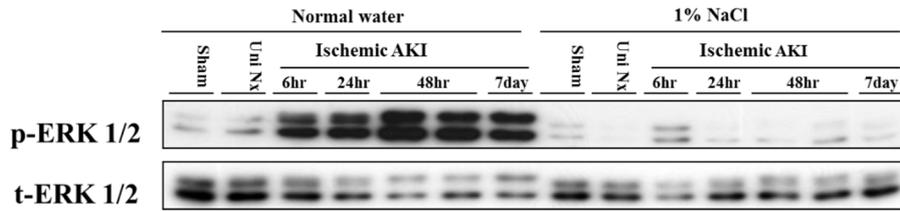


Fig. 2. 虚血腎内におけるレニン・アンジオテンシン系の変化

AGT: angiotensinogen, AT₁R: angiotensin II receptor 1, Uni Nx: uninephrectomized group, and AKI: acute kidney injury.

A) 腎内phospho-ERK 1/2



B) p-ERK/t-ERK比

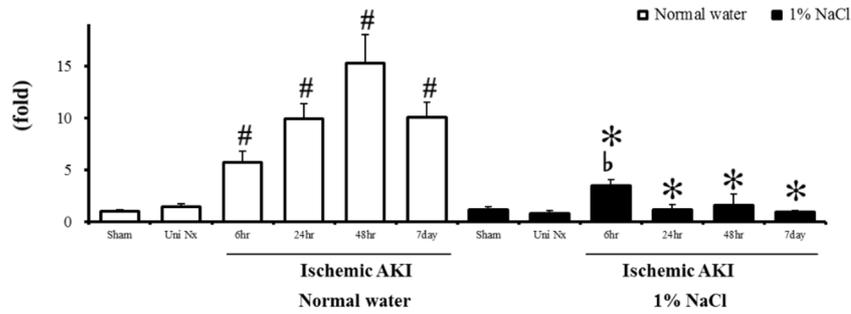
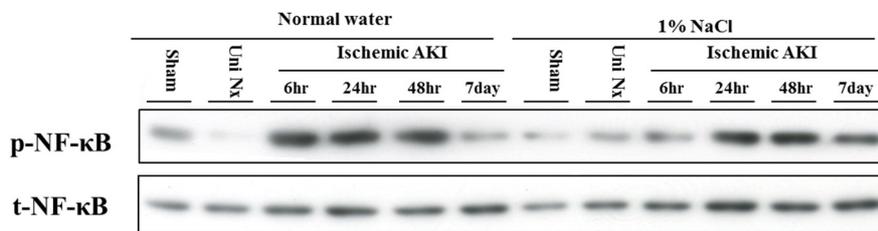


Fig. 3. 腎内 ERK1/2 亢進は生理食塩水負荷によって抑制される

ERK: extracellular signal-regulated protein kinase, Uni Nx: uninephrectomized group, and AKI: acute kidney injury.

* $p < 0.01$ vs. normal water group, # $p < 0.01$ vs. uninephrectomized group (normal water), ^b $p < 0.01$ vs. uninephrectomized group (1% NaCl).

A) 腎内phospho-NF-κB



B) p-NF-κB/t-NF-κB比

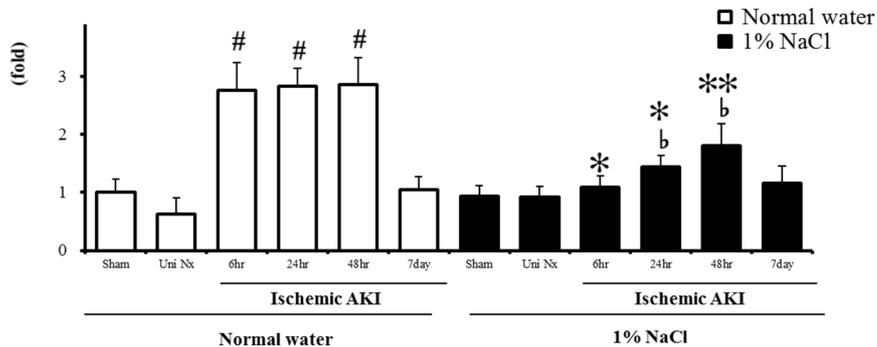


Fig. 4. 虚血後の腎内リン酸化 NF-κB 亢進は生理食塩水摂取で抑制される

NF-κB: nuclear factor-κB, Uni Nx: uninephrectomized group, and AKI: acute kidney injury. * $p < 0.01$ vs. normal water group,

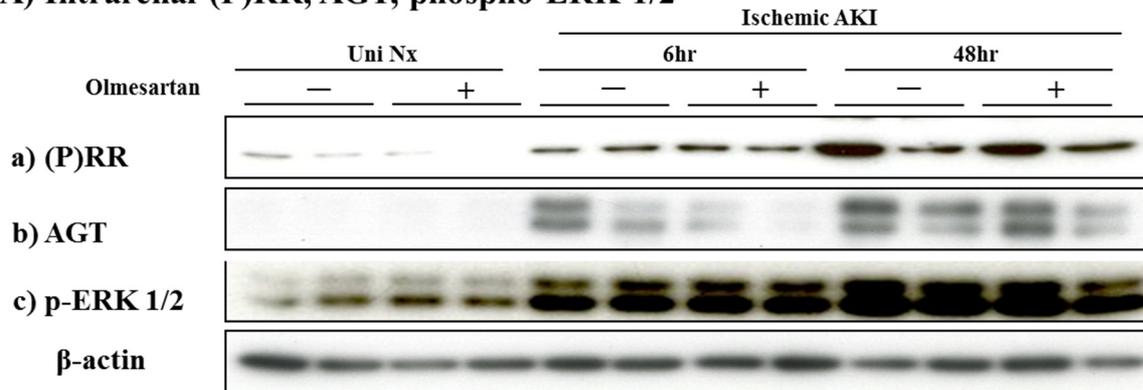
** $p < 0.05$ vs. normal water group, # $p < 0.01$ vs. uninephrectomized group (normal water), ^b $p < 0.05$ vs. uninephrectomized group (1% NaCl).

<虚血性AKIモデルに対するARB投与の影響>

ここまでの結果から、虚血性 AKI モデルでは、腎内 (P)RR 発現が亢進し、下流の RAS 構成要素 (AGT, Ang II) と RAS 非依存性細胞内シグナル (ERK1/2, NF-κB) を介して、AKI の発症・進展に関与している可能性が示唆された。次に、これらの経路のうち、どちらの作用がより優位であるかを評価するために、AKI の発症前に ARB (オルメサルタン) を前投与し RAS 経路を阻害させたモデルを作成し、腎障害、腎内 (P)RR、RAS 構成要素 (AGT)、リン酸化 ERK1/2 蛋白の発現を評価した。

オルメサルタンを前投与した虚血性 AKI モデルは、再灌流の 6、48 時間後に、血漿レニン活性と血漿 Ang II 濃度が有意に増加したが、Scr と BUN の変化はみられず、尿細管障害スコアも 6 時間後にのみ ARB 投与群で有意に低下したが、48 時間後には差はみられなかった。また、ARB 前投与 AKI モデルでは、虚血によって誘導された腎内 AGT 蛋白の発現は 6、48 時間後に有意に減少された。しかし、腎内 (P)RR 蛋白とリン酸化 ERK 1/2 蛋白の発現は、48 時間後まで変化はみられなかった (Fig. 5)。

A) Intrarenal (P)RR, AGT, phospho-ERK 1/2



B) AGT/β-actin比

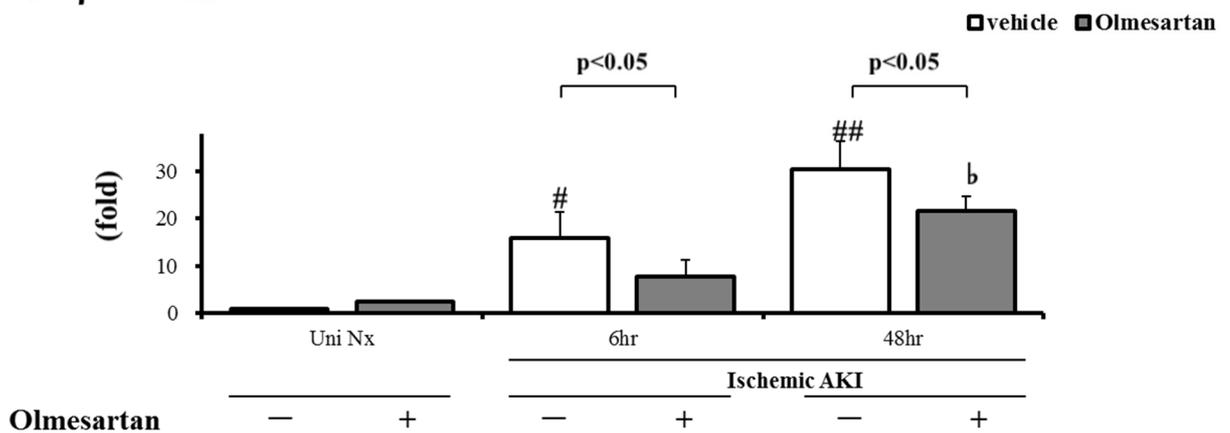


Fig.5. オルメサルタン投与による腎内アンジオテンシノーゲン発現の変化

(P)RR: (pro)renin receptor, AGT: angiotensinogen, ERK: extracellular signal-regulated protein kinase, Uni Nx: uninephrectomized group, and AKI: acute kidney injury. [#]p<0.05 vs. uninephrectomized group (normal water), ^{##}p<0.01 vs. uninephrectomized group (normal water), ^bp<0.01 vs. uninephrectomized group (1% NaCl).

4. 考 察

今回、我々は、腎臓に虚血再灌流障害を惹起させると、24時間から7日後にかけて腎臓内の(P)RR 蛋白の発現が増加することを初めて示した。(P)RR は、コントロールモデルでは主に集合管と結合尿細管で染色されたが、虚血性 AKI モデルでは障害を受けた近位尿細管を含む皮質・髄質外層部で免疫染色性が増加した。また、虚血障害は、腎内 RAS 構成要素 (AGT, Ang II) を活性化させた。これらの結果から、虚血性 AKI モデルでは、腎内(P)PR が増加し、下流の RAS カスケードを活性化させることが示唆された。

また、虚血性 AKI モデルの虚血腎において、ERK 1/2 と NF- κ B のリン酸化が誘導されることを示した。これまでに、糖尿病性腎症モデルや高血圧性腎症モデルにおいて、ERK 1/2 シグナルが、RAS とは独立して腎障害の進展に関連することが示されている。しかし、AKI において、腎内 (P)RR 発現の増加と ERK1/2 活性化との関連性はこれまでに知られていない。今回、虚血障害後の ERK 1/2 と NF- κ B のリン酸化は、腎内(P)RR の発現が増加する前の再灌流 6 時間後という早期にみられることを観察した。最近、高濃度ブドウ糖を加えたラットメサングウム培養細胞の検討で、ERK1/2 と NF- κ B の活性が(P)RR の転写を直接刺激することが報告された。また、ナトリウムを欠乏させた近位尿細管培養細胞の検討でも、NF- κ B が(P)RR のプロモーターであることが報告された。これらの報告から、AKI 発症の早期には、ERK 1/2 と NF- κ B が活性化することによって、腎内(P)RR の転写が刺激され、RAS カスケードが活性化される可能性も示唆される。一方、今回、ERK 1/2 と NF- κ B のリン酸化は、腎虚血の 7 日目まで増加が持続することが観察された。そのため、虚血性 AKI の急性期と尿細管細胞の回復期では、これらの転写因子の役割が異なる可能性も考えられ、今後更なる研究が必要である。

古くから、動物実験で食塩水を投与すると、急性腎障害が保護されることが報告されている。これらの検討では、腎内レニンの減少が関与する可能性が示唆されているが、腎保護の詳細なメカニズムについては十分に解明されていない。一方、腎内(P)RR の発現は、ナトリウム摂取量によって変化することが報告されている。正常ラットに低ナトリウム食を 1 週間摂取させると、糸球体、近位・遠位尿細管、集合管における(P)RR の免疫染色性が増加する。また、

in vitro の検討でも、近位尿細管培養細胞をナトリウム欠乏状態にさせると、NF- κ B などの(P)RR プロモーターが亢進し、cGMP-プロテインキナーゼ G シグナル伝達経路を介して、(P)RR 発現が増加することが示されている。今回、我々は、食塩水を前投与させた AKI モデルでは、再灌流の 24 時間後に、虚血によって誘導された(P)RR 蛋白の発現が減少し、それは腎内 AGT, Ang II 濃度の挙動と一致してすることを示した。これらの観察から、腎内(P)RR 蛋白は、塩分負荷によって発現が変化し、食塩水投与による腎保護作用にも関与する可能性が示唆される。

これまでに、AKI に対して ARB の有益性を示した報告が複数存在している一方、否定的な意見も多く、結論は出ていない。今回、虚血性 AKI では、腎内(P)RR の発現が増加し、下流の RAS 構成要素と RAS 非依存性細胞内シグナルを介して、AKI の発症・進展に関与している可能性を示した。しかし、これらの経路のうち、どちらの作用がより主体的に機能しているかは特定できていなかったため、AKI 発症前にオルメサルタンを前投与し RAS 経路を阻害させたモデルにおいて、腎障害、腎内(P)RR、RAS 構成要素、リン酸化 ERK1/2 の発現を評価した。オルメサルタンを前投与した虚血性 AKI モデルでは、虚血によって誘導された腎内 AGT の増加は抑制されたが、腎内(P)RR とリン酸化 ERK 1/2 には変化を及ぼさず、また腎障害は改善させなかった。これらの結果から、虚血性 AKI の進展には、ERK 1/2 などの非 RAS 依存性経路の活性化がより重要である可能性が示唆された。

虚血性 AKI における腎内(P)RR の役割は、(P)RR ノックアウトマウスや(P)RR 阻害薬を用いた検討が必要である。しかし、(P)RR をノックアウトすると、重度の腎低形成異常が引き起こされ、死亡に至る。また、現在、(P)RR 特異的阻害薬は臨床応用されておらず、直接的レニン阻害薬も(P)RR 阻害効果は持たない。

5. 結 論

今回、我々は、虚血性 AKI モデルでの虚血腎では、近位尿細管、結合尿細管、集合管で(P)RR が増加し、それは腎内 AGT, Ang II 濃度の増加と ERK 1/2、NF- κ B のリン酸化を伴うことを示した。また、食塩水を前投与した AKI モデルでは、腎内(P)RR 発現が減少し、虚血によって誘

導された腎内 RAS 活性、ERK 1/2、NF- κ B も減少することを示した。しかし、オルメサルタンを投与しても、腎内 AGT 蛋白の発現の亢進は抑制されたものの、腎内(P)RR の発現と ERK 1/2 のリン酸化の変化はみられず、腎障害の改善も観察されなかった。これらの結果から、虚血再灌流障

害によって増加した腎内(P)RR は、主に ERK 1/2 シグナルなどの非 RAS 依存性経路の活性化を介して、AKI の進展に関与する可能性が示唆された。そのため、組織特異的な ERK や NF- κ B の抑制薬は、虚血性 AKI の腎障害に対する治療標的となる可能性がある。

Elucidation of Mechanism of AKI Prevention by Salt Loading - Participation of (Pro)Renin Receptor

Akihiko Kato, Masafumi Ono

Blood Purification Unit, Hamamatsu University School of Medicine

Summary

(Background) (Pro)renin receptor [(P)RR], a trans-membrane receptor for renin and prorenin, is involved in the local activation of renin-angiotensin system (RAS) in the kidney. However, it remains to be determined whether (P)RR plays a role in the development of ischemic acute kidney injury (AKI).

(Methods) We examined the abundance of (P)RR, renin/prorenin, angiotensinogen (AGT), AT₁ receptor (AT₁R), phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK 1/2) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) by Western blots at 6, 24 and 48 h, and at 7 days after 45-min ischemic injury in rats. Intrarenal angiotensin II (Ang II) levels were determined by radioimmunoassay. We then tested whether the beneficial effects of oral loading of saline solution (1.0% NaCl) for 7 days prior to ischemic injury were associated with changes in RAS components and ERK 1/2 and NF- κ B phosphorylation in the kidney. We also examined the effect of AT₁R blocker (~~ARB~~), olmesartan, on ischemia-induced changes of (P)RR downstream such as AGT and phosphorylation of ERK 1/2.

(Results) Renal ischemia increased the abundance of (P)RR protein at 24 h, and peaked at 48 h. (P)RR was mainly stained in the connecting tubules and collecting ducts in control rats, while ischemia increased its immunointensity in the damaged proximal tubules. Renal ischemia increased phosphorylation of ERK 1/2 and NF- κ B proteins as early as at 6 h. There was a significant increase in AGT and Ang II levels at 24 and 48 h. Prior saline loading prevented the increase in serum creatinine at 48 h (5.36 ± 1.26 vs. 3.38 ± 1.74 mg/dL, $p < 0.05$), and suppressed the increases in renal (P)RR, AGT and Ang II contents. Saline drinking also significantly blocked the ischemia-induced increases in phosphorylation of ERK 1/2 and NF- κ B. In contrast, although treatment with olmesartan (10 mg/kg/day) for 14 d suppressed an increase of intrarenal **AGT**, olmesartan did not alleviate ischemic AKI, along with no change of (P)RR and phosphorylated ERK 1/2.

(Conclusions) These findings suggest that increased (P)RR is associated with activation of RAS-independent downstream such as ERK 1/2 and NF- κ B phosphorylation in the ischemic kidney.