

慢性腎臓病（CKD）の病態解明を目指して
—レニンアンギオテンシン系（RA）を中心に—元 東京女子医科大学東医療センター内科（指導：佐中 孜教授）
東京労災病院腎代謝内科ナイトウ タカシ
内藤 隆

（受理 平成24年2月27日）

Aiming to Elucidate the Clinical States of Chronic Kidney Disease

Takashi NAITOH

Former Affiliation; Department of Medicine, Tokyo Women's Medical University Medical Center East
Department of Kidney and Metabolism, Tokyo Rosai Hospital

Chronic kidney disease (CKD) not only may progress to end-stage kidney failure, CKD per se is an independent risk factor of cardiovascular events. The causes include disease-specific factors such as fluid retention, anemia, abnormal calcium-phosphorus metabolism, and enhanced renin-angiotensin (RA) system.

In particular, the upregulated RA system induces a wide range of effects via hemodynamic actions, such as glomerular hypertension leading to sclerosis, arteriolar vasoconstriction leading to tubulointerstitial fibrosis, salt retention leading to hypertension, and activation of aldosterone production, which promote renal impairment. The diverse non-hemodynamic actions and cascades of the RA system have been studied in detail, particularly after 1990, and studies have reported the complex interactions between the RA system and various mediators depending on the clinical state of CKD. Angiotensin II (Ang II) acts at two major receptors, angiotensin II type 1 receptor (AT₁R), and type 2 receptor (AT₂R). Classic Ang II effects are mediated through AT₁R. The role of AT₂R in organic injury is less defined than that of AT₁R. AT₂R counteracts the vasoconstrictor effects of AT₁R, and inhibits cellular proliferation. However, whether the actions mediated through AT₂R are always beneficial in vivo remains controversial.

Tubulointerstitial injury is a result of such interactions, and epithelial mesenchymal transition (EMT) has attracted attention as a mechanism causing the injury. We have also reported remarkable over-expressions of EMT-associated metalloproteinase (MMP) and its transcription modulating factor Ets-1 in renal tissues of a progressive renal disease model. Moreover, recent study has elucidated the cross-talk between the RA system and the Ets system. The RA-Ets association may be involved in the progression of CKD, and future studies are anticipated.

Key Words: chronic kidney disease, renin-angiotensin system, ets family, Angiotensin II type 1, 2 receptors

はじめに

2002年 National Kidney Foundation から慢性腎臓病 (chronic kidney disease : CKD) という概念が提唱された。蛋白尿などの尿異常, 画像診断, 血液, 病理所見で腎障害の存在, あるいは腎機能障害 (eGFR 60 未満) のいずれか一方または両者が3ヵ

月以上継続するというものである。現在本邦ではCKDの推計人口は1,300万人以上とされており¹⁾, 近年その存在が広く知られるに至った。何故CKDが今日これほど注目されるに至ったのか? それは将来透析等の腎代替療法が必要になるだけでなく, 内外の大規模コホート研究でCKDが心血管イベン

Estimated GFR	Death from Any Cause	Any Cardiovascular Event	Any Hospitalization
	adjusted hazard ratio (95 percent confidence interval)		
≥60 ml/min/1.73 m ² †	1.00	1.00	1.00
45–59 ml/min/1.73 m ²	1.2 (1.1–1.2)	1.4 (1.4–1.5)	1.1 (1.1–1.1)
30–44 ml/min/1.73 m ²	1.8 (1.7–1.9)	2.0 (1.9–2.1)	1.5 (1.5–1.5)
15–29 ml/min/1.73 m ²	3.2 (3.1–3.4)	2.8 (2.6–2.9)	2.1 (2.0–2.2)
<15 ml/min/1.73 m ²	5.9 (5.4–6.5)	3.4 (3.1–3.8)	3.1 (3.0–3.3)

* The analyses were adjusted for age, sex, income, education, use or nonuse of dialysis, and the presence or absence of prior coronary heart disease, prior chronic heart failure, prior ischemic stroke or transient ischemic attack, prior peripheral arterial disease, diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia, cancer, a serum albumin level of 3.5 g per deciliter or less, dementia, cirrhosis or chronic liver disease, chronic lung disease, documented proteinuria, and prior hospitalizations.

† This group served as the reference group.

Fig. 1 An independent, graded association was observed between reduced e-GFR and the risk of death, cardiovascular events²⁾

Adjusted hazard ratio for death from any cause, cardiovascular events among 1120295 ambulatory adults, according to the estimated GFR.

Copyright © 2004 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

トの独立した危険因子であることが明らかに証明されたからである (Fig. 1)²³⁾。最近 4,728 人を対象に国内で行われた臨床試験のサブ解析では数ある危険因子の中でも CKD が最も心血管イベントに関係する因子であるという報告がなされ⁴⁾、その疾患重要度はさらに増している。CKD では糖尿病や高血圧などの伝統的な心血管疾患危険因子に加え、レニンアンギオテンシン系 (renin angiotensin system : RA)、貧血、カルシウム-リン (Ca-P) 代謝異常、体液やナトリウム (Na) 貯留など疾患特有の危険因子が存在し、動脈硬化を加速する。本稿では、CKD の病態の中でも特に RA 系にスポットをあて、我々がやってきた基礎研究を交えて概説する。

1. CKD と RA 系

CKD における RA 系賦活化の共通機序として、腎荒廃による機能ネフロン減少に伴うものがある。これは各残存ネフロン内で RA 系を亢進させ、糸球体輸出細動脈収縮による糸球体濾過能 (SnGFR) 亢進や尿細管での Na 再吸収増加を起こすことで機能障害を代償しようとする血行力学的な合目的防御反応とも言える⁵⁾。しかし RA 系亢進が続けば、糸球体高血圧による硬化、細動脈収縮に伴う尿細管間質の線維化、塩分貯留による体液過剰や高血圧悪化、アルドステロン産生亢進による上記病態の助長が起こり、腎障害はさらに進展することになる。

CKD における RA 系亢進は、各疾患において、実

際は種々の因子と複雑に絡み合っている。近年の研究から、①肥満に伴い、脂肪細胞のアンギオテンシノーゲン産生が増加する。脂肪組織の RA 系亢進はさらにインスリン抵抗性を起こす、②交感神経活性化により、その β1 受容体を介し、レニン産生が増加する。逆に RA 系亢進は延髄血管運動中枢に働き交感神経系を賦活化する、など様々な機序が解明されてきた⁶⁷⁾。

2. RA 系の非血行力学的作用

1990 年以降、RA 系の研究はさらに発展し従来の血行力学的な作用に加え、Fig. 2 に示すような多彩な非血行力学的な作用が解明された⁶⁹⁾。①種々のサイトカイン、接着因子、成長因子を介した炎症進展や細胞増殖、②NADPH oxidase 活性の上昇に対する酸化ストレス増大、③plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 活性化などを介した凝固亢進や血管内皮細胞機能障害、④インスリンレセプター基質 1 (insulin receptor substance-1 : IRS-1) のチロシンリン酸化阻害によるインスリン抵抗性の増大、⑤transforming growth factor-β (TGF-β) を介した細胞外マトリックス (extra cellular matrix : ECM) 産生増大、⑥metalloproteinase (MMP) 活性化による血管内プラークの脆弱化等、組織 RA 系を介した全身臓器における悪影響が次々と証明された。

また最近の腎疾患に対する研究では、腎糸球体上皮細胞の制御を行っているスリット膜蛋白の機能を

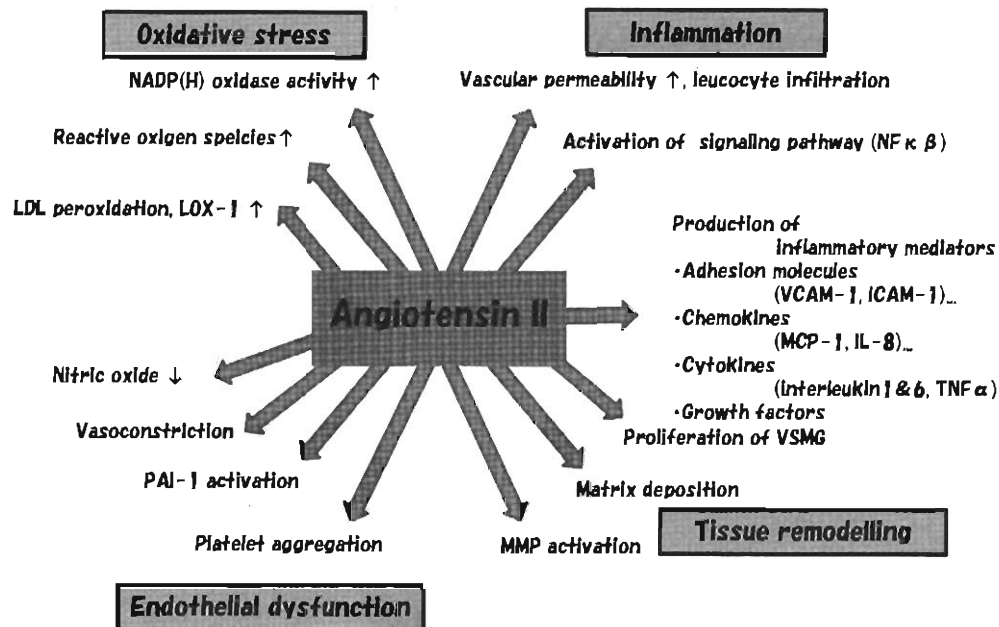


Fig. 2 Schematic illustration of important Effects of angiotensin II on mechanisms associated with atherosclerosis⁹⁾

RA系が阻害していることが明らかにされつつある。Angiotensin II (Ang II) は Nephron の減少や糸球体上皮細胞に存在する Caチャンネル transient receptor potential channel C6 (TRPC6) の機能障害を起こすことが報告されている^{10,11)}。

3. RA系と Ets ファミリーとの cross talking

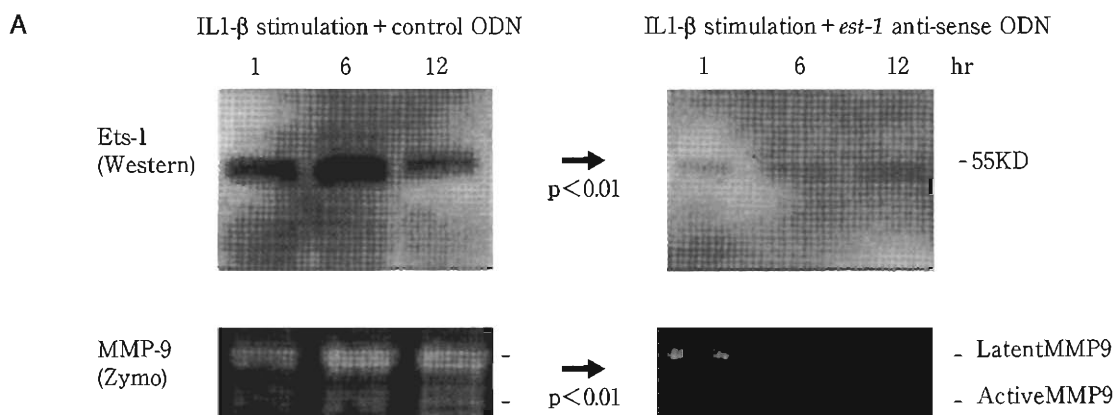
Ets ファミリーはトリ赤芽球症を引き起こすレトロウイルス E26 から発見された *v-ets* 癌遺伝子に相同性をもつ転写因子群であり、Ets という名称は E26 (E-twenty-six) に由来する。ETS 結合モチーフ (GGAA/T) に結合し、担当遺伝子の転写調節を行う。このファミリーは、種々の細胞に発現し、protease 遺伝子の転写活性化、腫瘍細胞の浸潤、リンパ球の成熟、血管新生の促進など、多彩な生物現象に関与している¹²⁾。腎領域においては、2000年に我々が進行性腎疾患モデルでその病態への関与を報告するまで、わずかな検討しか行われていなかった。我々はラット加速型馬杉腎炎モデルにおいて Ets-1 mRNA、蛋白の発現が疾患の進行と共に糸球体、間質領域の複数の細胞群で明らかに up-regulate し、MMP-9, 3 蛋白発現も Ets-1 蛋白と近似した領域で同時期に発現増加することを報告した¹³⁾。さらに培養腎間質細胞や近位尿細管上皮細胞において、IL-1β が誘導する MMP-9 発現に対する Ets-1 の関与を間接的に証明した¹⁴⁾ (Fig. 3)。

MMP は血管新生 (angiogenesis) に必須の物質で

あるが、その一方動脈硬化病変ではプラークの脆弱性や炎症性サイトカインの誘導に関与する。腎疾患においては、糸球体および尿細管間質領域の ECM の remodelling に関与するとされてきたが、長くその役割は不透明であった。しかし、近年の研究からサイトカインによって発現誘導された MMP-2, 9 による尿細管基底膜の破壊が EMT (epithelial mesenchymal transition) を促進し、尿細管間質線維化の進展に関与することが解明された¹⁵⁾。もしそれが事実ならば、MMP の上流に位置する Ets-1 も EMT や血管病変に何らかの関与をしている可能性がある。

さらに最近 RA系が Ets-1 発現を誘導するという注目すべき研究報告が種々の分野で報告されている^{16,17)}。Zhan らは *in vivo* において Ang II 持続投与によって起こる動脈壁の肥厚、血管周囲の線維化、心筋肥厚が Ets-1 ノックアウトマウスで顕著に抑制されることを報告した¹⁶⁾。この研究では Ang II の下流に位置するメディエーターのうち PAI-1, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), cyclin-dependent kinase inhibitor *p21^{CIP}* は Ets-1 に依存していることも証明された。また培養メサンギウム細胞において、Ang II が Ets-1 を誘導すること、Ang II が誘導する fibronectin 産生に Ets-1 が必要であることが報告されている¹⁷⁾。将来 RA系-Ets 連関が血管病変や CKD 進行期に関する病態において、さらにクローズアップされる日が来るのかもしれない。

NRK49F renal fibroblasts



NRK52E Tubular epithelial cells

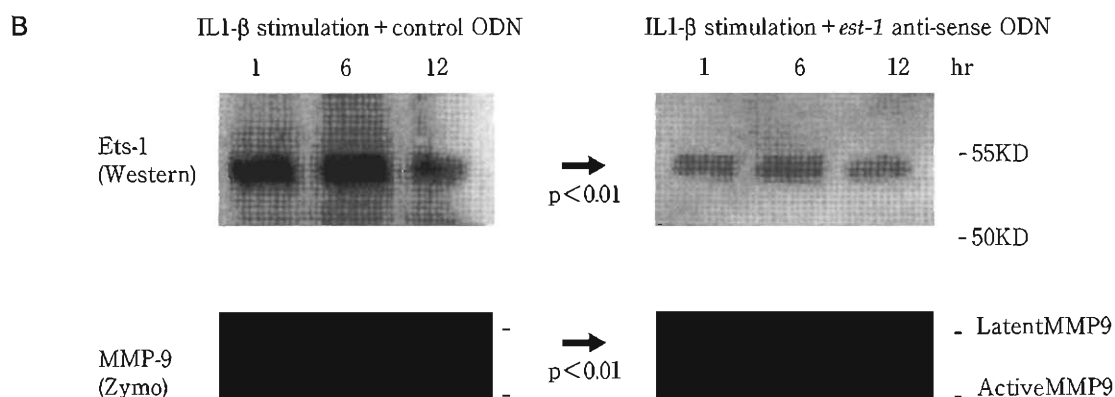


Fig. 3 Expression of matrix metallo-proteinase-9 associated with *ets-1* proto-oncogene in rat renal cell lines¹⁴⁾

The effect of *ets-1* antisense oligonucleotide (ODN) on IL-1 β (10 ng/ml)-induced MMP-9 activity compared with control ODN.

A: In NRK-49F cells.

B: In NRK-52E cells. Shown are sequential changes in expression of Ets-1 protein, and gelatinolytic activity of MMP-9. The latent and active forms of MMPs were distinguished by molecular weight.

Ets-1: Western blot, MMP-9: Gelatin Zymography

4. RA系最近の話題

Fig. 4 に示すとおり、近年 RA 系のカスケードは詳細に解明されてきた。組織 RA 系活性化が各疾患で重要なウエイトを占めるのは周知のとおりである。最近の重要なトピックスを簡単に下記に示す。

①アンギオテンシタイプ2受容体 (AT₂R) を介する作用として、腎尿路系発生に関与する¹⁸⁾他に血管拡張作用、細胞増殖抑制、Na 利尿等の臓器保護作用がある。②2002年に発見された(プロ)レニン受容体は腎、血管など全身臓器に分布する。プロレニン

は(プロ)レニン受容体と結合すると、その立体構造が変化し、酵素活性中心が露出することにより、レニンと同等の酵素活性を獲得する。③アンギオテンシン変換酵素 (ACE) 以外の Ang II 産生を起こす酵素の中で主に肥満細胞で産生されるキマーゼが重要である。病的な状態で産生が増加し、特に心血管系組織では ACE 以上の関与も指摘されている。④上記に示した臓器障害を起こす ACE/Ang II/アンギオテンシタイプ1受容体 (AT₁R) 軸とは拮抗的に働き、血管拡張等臓器保護的に働く ACE2/

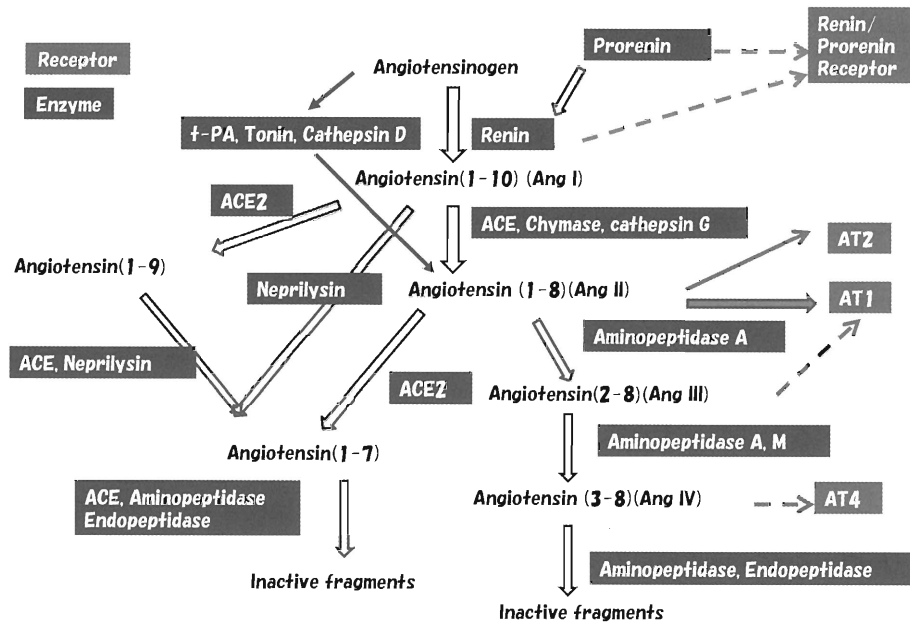


Fig. 4 Simplified overview of the proteins, peptides, enzymes, and receptors of the renin-angiotensin system⁹⁾

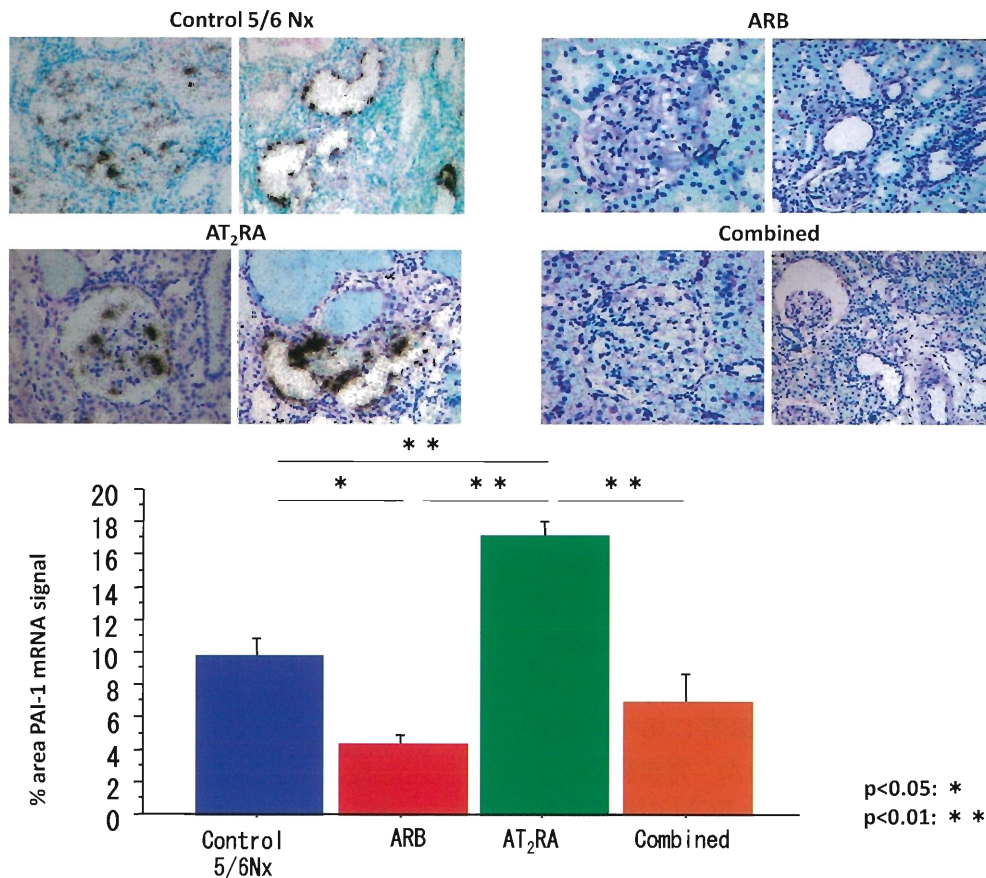


Fig. 5 PAI-1 mRNA at 12 wk after 5/6 Nx²⁴⁾

Expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) mRNA in situ hybridization in kidney cortex was quantitatively analyzed by SCION Image Software and expressed as % area occupied by PAI-1 mRNA signal.

Angiotensin-(1-7)/Mas 受容体軸が 2000 年に発見され、注目されている⁹⁾。

5. AT₂ 受容体を介する RA 系作用の解明

Ang II の臓器障害は主に AT₁R を介するものであって AT₂R を介する作用は全般的に臓器保護的であると言われている¹⁹⁾。しかし、この結論づけには根強い反論も以前から存在している。循環器領域では、AT₂R が心筋肥大に関与する転写因子 PLZF (promyelocytic zinc finger protein) を誘導すること等が報告されている²⁰⁾。また AT₂R 遺伝子多型 (A, G allele) が心筋肥大や冠動脈疾患に関与することが指摘されている²¹⁾。代謝領域では AT₂R も AT₁R と共に Ang II による脂質合成、耐糖能悪化を担うことが示唆されている。腎領域においては主に 5/6 腎摘や尿管結紮片腎モデル (UUO) を用いた実験が行われ²²⁾、AT₂R を介する腎保護作用の是非は大きな争点となってきた。相反する研究結果として AT₂R は NF- κ B や RANTES など転写因子、サイトカインの誘導を介して AT₁R と共に腎疾患進行に関わるというものがある²³⁾。

我々は 5/6 腎摘モデルにおける AT₂R を介する腎保護作用についてさらに検証する意味で実験を行った²⁴⁾。本研究では SD ラットに 5/6 腎摘を施行後、糸球体硬化が進行した 8 週の時点で開放腎生検を行った。糸球体硬化を各糸球体で 5 等分 (0 : no lesion, 1+ : sclerosis of <25%, 2+ : 25–50%, 3+ : 50–75%, 4+ : >75%) した平均を糸球体硬化指数 (sclerosis index : SI) として計算した。

その上で SI, 蛋白尿, 血圧, 血清 Creatinine の 4 つを指標とし、均等に 4 群 (①無治療 (CONT) 群, ②ARB ロサルタン 80mg/L in 蒸留水投与 (ARB) 群, ③AT₂R 拮抗剤 PD12319 15mg/kg/day 皮下ポンプ (AT₂RA) 群, ④ARB + AT₂R 併用 (Combined) 群) に分割し、以後 4 週間各治療を行い 12 週目に評価した。ARB 群に比し AT₂RA 群では蛋白尿減少や降圧効果はなく、組織学的に SI が明らかに増悪していた。また Combined 群では ARB 群に比べ組織学的に両薬の相乗効果を認めなかった。腎組織での分子レベルの解析では、凝固亢進や ECM の集積を起こす PAI-1 の発現は CONT 群に比し ARB 群で発現が有意に抑制されたが、AT₂RA 群ではむしろ増加、Combined 群はその中間であった (Fig. 5)。これらの結果から正味でみれば、AT₂R に関わる腎保護作用は明らかであり、かつ ARB の作用の一部は AT₂R を介した作用であることが推測された。また以前

より Ang II が AT₁R を介して直接的、間接的に PAI-1 発現を増強することは証明されてきたが、本研究により AT₂R を介する独立したメカニズムで PAI-1 発現を抑制している可能性が示唆された。

in vitro において、AT₂R は対象とした細胞の種類によって heterogeneous な作用を持つことが報告されている。今後各組織において、臨床応用が期待されている選択的 AT₂R agonist (compound21) を用いた詳細な分析が必要と思われる。

おわりに

CKD を起こす疾患は多種多様であり、病態は異なる。しかし、その進行に対する共通の機序として RA 系の関与が解明されてきた。今後、Ets ファミリーなど諸因子との連関も含めた研究のさらなる発展に期待したい。

謝 辞

今まで長い間ご指導、ご鞭撻をいただきました佐中孜先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Imai E, Horio M, Iseki K et al: Prevalence of chronic kidney disease (CKD) in the Japanese general population predicted by the MDRD equation modified by a Japanese coefficient. *Clin Exp Nephrol* **11**: 156–163, 2007
- 2) Go AS, Chertow GM, Fan D et al: Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* **351**: 1296–1305, 2004
- 3) Ninomiya T, Kiyohara Y, Kubo M et al: Chronic kidney disease and cardiovascular disease in a general Japanese population: The Hisayama Study. *Kidney Int* **68**: 228–236, 2005
- 4) 林 晃一, 脇野 修, 徳山博文: CASE-J の成果 腎疾患に関する知見 CKD を中心に. *日臨* **66** (特別): 84–88, 2008
- 5) Brenner BM, Lawler EV, Mackenzie HS: The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. *Kidney Int* **49**: 1774–1777, 1996
- 6) Lu H, Boustany-Kari CM, Daugherty A et al: Angiotensin II increases adipose Angiotensinogen expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**: E1280–E1287, 2007
- 7) Yvan-Charvet L, Quignard-Boulangé A: Role of adipose tissue renin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. *Kidney Int* **79**: 162–168, 2011
- 8) Fogo AB: Progression and potential regression of glomerulo-sclerosis. *Kidney Int* **59**: 804–819, 2001
- 9) Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP et al: Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet* **369**: 1208–1219, 2007
- 10) Miceli I, Burt D, Tarabra E et al: Stretch reduces nephrin expression via an angiotensin II-AT (1)-

- dependent mechanism in human podocytes: effect of rosiglitazone. *Am J Physiol Renal Physiol* **298**: F381–F390, 2010
- 11) **Nijenhuis T, Sloan AJ, Hoenderop JG et al**: Angiotensin II contributes to podocyte injury by increasing TRPC6 expression via an NFAT-mediated positive feedback signaling pathway. *Am J Pathol* **179**: 1719–1732, 2011
 - 12) **Dittmer J**: The biology of the *Ets1* proto-oncogene. *Mol Cancer* **2**: 29, 2003
 - 13) **Naito T, Razzaque MS, Nazneen A et al**: Renal expression of the *Ets-1* proto-oncogene during progression of rat crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* **11**: 2243–2255, 2000
 - 14) **Naito T, Tanihata Y, Nishimura H et al**: Expression of matrix metalloproteinase-9 associated with *ets-1* proto-oncogene in rat tubulo-interstitial cells. *Nephrol Dial Transplant* **20**: 2333–2348, 2005
 - 15) **Tan TK, Zheng G, Hsu TT et al**: Macrophage matrix metalloproteinase-9 mediates epithelial-mesenchymal transition in vitro in murine renal tubular cells. *Am J Pathol* **176**: 1256–1270, 2010
 - 16) **Zhan Y, Brown C, Maynard E et al**: *Ets-1* is a critical regulator of Ang II-mediated vascular inflammation and remodeling. *J Clin Invest* **115**: 2508–2516, 2005
 - 17) **Pearse DD, Tian RX, Nigro J et al**: Angiotensin II increases the expression of the transcription factor *ETS-1* in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **294**: F1094–F1100, 2008
 - 18) **Nishimura H, Yerkes E, Hochenfellner K et al**: Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men. *Mol Cell* **3**: 1–10, 1999
 - 19) **Akishita M, Iwai M, Wu L et al**: Inhibitory effect of angiotensin II type 2 receptor on coronary arterial remodeling after aortic banding in mice. *Circulation* **102**: 1684–1689, 2000
 - 20) **Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ et al**: A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J* **22**: 6471–6482, 2003
 - 21) **Balmforth AJ**: Angiotensin II type 2 receptor gene polymorphisms in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **11**: 79–85, 2010
 - 22) **Benndorf RA, Krebs C, Hirsch-Hoffmann B et al**: Angiotensin II type 2 receptor deficiency aggravates renal injury and reduces survival in chronic kidney disease in mice. *Kidney Int* **75**: 1039–1049, 2009
 - 23) **Cao Z, Bonnet F, Candido R et al**: Angiotensin type 2 receptor antagonism confers renal protection in a rat model of progressive renal injury. *J Am Soc Nephrol* **13**: 1773–1787, 2002
 - 24) **Naito T, Ma LJ, Yang H et al**: Angiotensin type 2 receptor actions contribute to angiotensin type 1 receptor blocker effects on kidney fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **298**: F683–F691, 2010