

代償性糸球体肥大における活性酸素種、一酸化窒素の動的変化の意義

大関 正仁

ネフロン数減少に伴う糸球体・腎肥大は糸球体硬化の前駆状態として認識されている。活性酸素種 (ROS) は細胞内シグナル伝達の一部を担い正常細胞機能の遂行に重要な役割を果たすと同時に障害因子として働くという両義的役割を担っている。一方、一酸化窒素 (NO) は内皮依存性の血管拡張反応のメディエーターである。ネフロン数減少後の代償性糸球体・腎肥大における ROS, NO の動的変化の意義とそのメカニズムについて検討を行った。Wistar ラットに片腎摘 (NX) モデルを作成し、一群に SOD mimetic である Tempol を投与した。ROS, NO 産生変化を共焦点レーザー顕微鏡を用い可視化検出した。NX 後12時間, 2, 7, 28日目に腎組織における ROS, NO の変化とそれに伴う組織変化を解析した。腎摘後, 腎重量/体重比は7日後より, 糸球体体積比は12時間後より増加傾向を示し7日目では有意に増加した。NX 群糸球体では7日目をピークとする ROS 産生増加が認められた。ROS 産生増加及び糸球体・腎肥大は Tempol で抑制された。糸球体では Akt, ERK の経時的な活性化を認めた。これらの変化は Tempol の投与にて抑制された。一方 NX 糸球体での NO 産生は12時間で最大となりその後基底値に復した。以上の結果から, 早期の糸球体肥大 (血管拡張反応) には一過性の NO 増加が関与し, ネフロン数減少後期の糸球体・腎肥大には ROS の関与が示唆された。

(平成18年10月19日受理)

Roles of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Compensatory Renal and Glomerular Hypertrophy After Uninephrectomy

Masahito OZEKI

It is well known that compensatory renal hypertrophy is induced after a reduction in the number of nephrons. Both reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) have been reported to be implicated in this process. However, the precise roles of ROS and NO in compensatory glomerular and renal hypertrophy remain to be elucidated. Therefore, to clarify the precise roles of ROS and NO in compensatory glomerular and renal hypertrophy after uninephrectomy, we examined the production of ROS and NO in the remaining kidney after uninephrectomy. Wistar rats were divided into three groups (a Sham-operation group (Sham), a Uninephrectomy group (1/2 NX) and a group treated with tempol (3 mol/l in drinking water) after uninephrectomy (1/2 NX + Tempol). Rats were sacrificed at 12 hours, 48 hours, 1 week,

and 4 weeks after uninephrectomy. At each time point we measured serum creatinine, urinary protein excretion and kidney weight. We also evaluated the production of ROS and NO by an *in situ* visualizing method using fluorescence that we developed recently. There were no significant changes in serum creatinine, urinary protein excretion and mean blood pressure. Glomerular volume significantly increased in the 1/2 NX group from 12 hours and peaked at seven days after uninephrectomy compared to the Sham group ($p < 0.05$). Renal ROS production in the 1/2 NX group was greatest on day 7. These increases in glomerular volume and ROS were diminished by tempol. On the other hand, NO production in glomeruli peaked at 12 hours, and then gradually decreased to the base level by day 7. Furthermore, phosphorylation of Akt and ERK was observed at four weeks, but this was inhibited by tempol. Taken together, we can conclude that the transient increase in NO after uninephrectomy may be related to early phase glomerular hypertrophy due to vasodilation and that glomerular and renal hypertrophy in the kidney after the early phase may be related to the increase in ROS. (Accepted on 19 October, 2006) *Kawasaki Medical Journal* 33(2): 125-136, 2007

Key Words ① Compensatory renal hypertrophy ② Uninephrectomy
③ Oxidative stress ④ Nitric oxide

はじめに

末期腎不全に陥り血液透析療法を余儀なくされる患者数は増加の一途をたどっている。原因疾患の第一位は糖尿病性腎症であり、慢性糸球体腎炎、腎硬化症がこれに次ぐ。各種成因により腎糸球体の構築変化が進行し糸球体硬化を呈すると腎不全に陥る。原因疾患は多彩であるが、ある時点より共通機序を介して糸球体硬化が進行することが明らかになっている。

Brennerらにより糸球体高血圧が共通機序の主体であることが明らかにされた¹⁾。正常動物の腎組織、ネフロン数を元来の5/6程度にまで高度に摘出(5/6腎摘出モデル)すると、残存腎組織および糸球体はいったんは肥大し腎機能を代償するものの、次第に糸球体硬化が出現しついに腎不全に陥る。残存糸球体内の血圧上昇(糸球体高血圧)が糸球体障害の主因であることも明らかにされた。一方、腎組織の喪失が1/2程度に止まった場合は、残存腎組織、糸球体は肥大し腎機能を代償する。この場合、長期間を経ても糸球体硬化を出現することはない。このように糸球体、腎肥大はネフロン数減少時

に際しての腎機能を代償するための適応的な組織変化であり、この適応機転の破綻が糸球体硬化であるとみなすことができる²⁾。

ネフロン数減少時の糸球体、腎肥大の機序を明らかにできれば、糸球体硬化のメカニズム解明にもつながることが期待できる。これまでに Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1), Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1), Growth hormone などのサイトカインや増殖因子またアンジオテニン II などの心血管ペプチドの関与が示されてきた^{3)~5)}。ネフロン数減少時の最も早い時期に生じるのは、腎内血管系における血行動態変化である。残存糸球体への血流量は数倍に増加(hyperperfusion)することが示されている。この血流増加によって糸球体内皮細胞から nitric oxide (NO) の産生が亢進され、NO 依存性に血管拡張反応の一種として糸球体肥大が生じることが報告されている⁶⁾。

一方、私どもはラット5/6腎摘出モデルにおいて糸球体内で活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)産生が亢進することを報告している⁷⁾。ROSは血管平滑筋細胞等において細胞増殖、肥大のメディエーターであることが示されている。ROSとNOは短時間で相互に反

応し、その作用を消去したり、peroxynitriteを形成しより強力な組織障害性ラジカルとして機能する^{8),9)}。したがって、ROS, NOの病態形成における役割を正しく把握するためには両者を同時に計測する必要がある。腎、糸球体肥大の分子機序を解明するためにラット片腎摘出モデルを用いてROS, NOの役割を検討した。

材料と方法

動物モデル

8週齢体重220~250g Wistar系雄性ラット(Charls River Japan)を用いた。以下の3群(各群n=8)に分け各々実験に供した。①Sham手術群(Control)。②片腎臓摘出群(1/2NX)。③片腎臓摘出+Tempol群(1/2NX+Tempol)。抗酸化薬であるTempol(Sigma Co)を片腎摘出術施行2日前より飲水中(3mmol/L)に加え投与を開始した。各群を片腎摘出術施行後、12時間、2日、1週、4週目で屠殺し検討を行った。片腎摘出群ではpentobarbital(50mg/kg body weight)腹腔内投与麻酔下に右側背部に小切開を加え、右腎動・静脈を結紮後、右腎臓を摘出した。その後、腹膜、皮膚の縫合を行い閉腹した。腎摘出を行わず、同様の処置を加えた群をSham手術群とした。各群においてtail-cuff plethysmography(Softron Co., Tokyo, Japan)での血圧測定、24時間蓄尿、体重測定を行った。尿蛋白排泄量をLowry法により定量した。その後、pentobarbital(50mg/kg body weight)腹腔内投与麻酔下に屠殺し採血及び、左腎を摘出した。摘出した腎臓の一部は4%パラホルムアルデヒドにて浸透固定を行い、パラフィン抱埋した。また、一部はmechanical graded sieving technique¹⁰⁾により糸球体の単離を行い、-80℃にて凍結保存した。すべての実験は、川崎医科大学動物実験委員会の承諾を受け、川崎医科大学の動物実験指針に基づき実施された。

組織学的検討

4µmのパラフィン抱埋切片を脱パラフィ

ン後にperiodic acid-Schiff染色(PAS染色)を行った。PAS染色組織標本を用いて、平均糸球体体積をmaximal planar area(MPA) methods¹¹⁾にて計測した。すなわち最大糸球体半径を計測し以下の式で糸球体体積を換算した。糸球体体積を換算した。糸球体体積=4/3π最大半径³。糸球体は血管極がスライスされているものを選択し、少なくとも1固体に対して20以上の糸球体を評価した。

腎組織内ROS, NOの検出

ROS, NOを組織において同時に可視化する方法(in situ detection method)を開発し報告している⁷⁾。本法を用いて腎組織におけるROS, NOの経時的变化を検討した。pentobarbital麻酔下ラットを正中にて開腹し、腹腔動脈にカテーテルを挿入し37℃ phosphate buffer saline(PBS)(flow rate, 5 ml/min)にて灌流を行った。その後、ROS指示薬であるdichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA:0.05mmol/L; Molecular Probes, Eugene, OR)、及びNO指示薬であるdiaminorhodamine-4MAM(0.01mmol/L; Daiichi pure Chemical Co., Tokyo), L-Arg(1mmol/L), CaCl₂(2mM)をPBSに添加し灌流を行った。次に4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行った。腎臓を摘出し1mmスライスの切片を作成しconfocal laser-scanning microscopy TCS-NT(Leica-Microsystems Co.)を用いてDCFH-DAの緑色蛍光をexcitation 560nm波長で励起しemission 575nm波長で検出した。またDAR-4MAMの赤色蛍光をexcitation 490nm波長で励起しemission 530nm波長で検出した。

単離糸球体におけるROS産生の検討

単離糸球体におけるROS産生を既報に従い検討した⁸⁾。前述したsieving methodで単離した糸球体を、ROS蛍光指示薬であるDihydroethidium(DHE)を含む(0.02mmol/L)PBS中でincubateし、confocal laser-scanning microscopy TCS-NT(Leica-Microsystems Co.)を用い蛍光をexcitation 560nm波長で励起、emission 575

nm 波長で検出し、定量的に評価した。さらに ROS 産生メカニズムとして NADH/NADPH oxidase 経路に注目し検討した¹²⁾。前述した単離糸球標品に NADH (0.1 mmol/L) あるいは、その inhibitor である diphenylene iodonium chloride (DPI; 0.1 mmol/L) を用い同様の方法で蛍光強度を測定した。

尿中への NO 代謝産物排泄量の測定

各群での NO 代謝産物 (nitrate and nitrite, NOx) の 24 時間尿中排泄量を Nitric Oxide Assay kit (The BIOMOL Nitric Oxide Assay kit) を用いて測定した。

Western blot 解析

細胞増殖、肥大に関連する細胞内シグナル伝達経路を解析した。各種細胞種において細胞増殖に主として関与することが示されている mitogen activated protein kinase (MAPK) である extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 のリン酸化と蛋白合成と関与する Akt リン酸化を Western 解析で検討した¹³⁾。既報¹⁰⁾に従い単離糸球体を溶解した後、蛋白を可溶化し Lowry 法で蛋白定量を行い各サンプル 100 μ g を SDS-polyacryl amid gels (10–15%, ATTO Co., Japan) で展開した。polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA) にトランスファーした後に、0.5% Tween-20, 5% skim milk を含む PBS 溶液で室温 1 時間でブロッキングを行った。rabbit anti-phosphorilated ERK 1/2 polyclonal antibody X 1000 (1 mg/ml; Cell Signaling Technology Inc.) rabbit anti-phosphorilated Akt polyclonal antibody X 1000 (1 mg/mL; Cell Signaling Technology Inc.) で室温で 2 時間反応させた。0.5% Tween-20-PBS で洗浄後、二次抗体 (horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG X 500; Santa Cruz Biotechnology) を反応させた。その後、Enhanced chemiluminescence method (ECL plus; Amersham Biosciences, NJ) にて検出を行った。検出されたバンドを NIH image analysis soft-

ware v 1.61 を用い定量的に解析した。

統計解析

すべての結果は、平均値 \pm 標準誤差で表した。統計処理は、Statview SE (Abacus Concept, Inc, Berkely, CA, USA) を用いた。各群間の比較は、Fisher's 多重比較法にて行い、0.05 以下の危険率をもって有意差ありとした。

結 果

体重、腎重量、血圧、尿蛋白排泄量、腎機能

表 1 に各群の体重、腎重量、血圧、尿蛋白排泄量、腎機能の変化を示した。腎重量/体重比は 2 日目よりコントロールに比較し片腎摘出群 (1/2 NX 群, 1/2 NX + Tempol 群) では有意な増加を示した。4 週目では Tempol 投与により有意に腎重量/体重比の増加が抑制された。平均血圧は 1/2 NX + Tempol 群で低下傾向を認めたが、有意なものではなかった。尿蛋白排泄量 (mg/day) は片腎摘出群 (1/2 NX 群, 1/2 NX + Tempol 群) で 2 日目に一過性の有意な増加を認めた。クレアチニンクリアランス (Ccr; ml/min) は片腎摘出群 (1/2 NX 群, 1/2 NX + Tempol 群) で Control 群に比較し全測定時点で低下していたが、腎機能低下は進行性ではなかった。

腎組織変化

片腎摘出後、コントロールに比較し 12 時間の時点から若干の糸球体径の増大 (glomerular hypertrophy) を認めた (図 1A)。その後も経時的に糸球体肥大はより顕著になった。明らかな糸球体構成細胞の増殖や細胞外基質の増生は認めなかった。Tempol 投与によりこの経時的な糸球体肥大は明らかに抑制された (図 1B)。各群での経時的な糸球体体積増加率の測定結果を図 2 に示す。片腎摘後、1 週目から糸球体体積の有意な増大を認めたが、Tempol 投与により糸球体体積増加は抑制された。

表1. 体重, 腎重量/体重, 血圧, 尿蛋白排泄量, 腎機能の変化

	Body weight (g)	Kidney weight /BW × 1000	平均血圧 (mmHg)	Proteinuria (mg/24hr)	Ccr (ml/min)
12hr Control	231 ± 1.4	4.7 ± 0.18	73.5 ± 3.5	2.2 ± 0.3	3.9 ± 0.1
1/2NX	232 ± 2.8	5.1 ± 0.17	74.2 ± 4.8	29.4 ± 7.1 ^a	1.8 ± 0.2 ^a
1/2NX+ Tempol	222 ± 5.7	4.8 ± 0.17	78.0 ± 3.5	31.3 ± 5.4 ^a	1.6 ± 0.2 ^a
2 day Control	310 ± 7.0	4.5 ± 0.33	77.5 ± 7.5	2.2 ± 0.5	2.8 ± 0.2
1/2NX	290 ± 4.0	5.3 ± 0.21 ^a	78.0 ± 2.4	13.3 ± 1.5 ^a	1.4 ± 0.2 ^a
1/2NX+ Tempol	291 ± 23.2	5.1 ± 0.15 ^a	73.5 ± 1.1	11.0 ± 3.7 ^a	1.5 ± 0.2 ^a
1W Control	348 ± 8.5	4.9 ± 0.35	74.5 ± 5.5	2.3 ± 0.3	2.9 ± 0.1
1/2NX	308 ± 6.2	6.0 ± 0.19 ^a	79.2 ± 1.9	1.7 ± 0.4	1.7 ± 0.4 ^a
1/2NX+ Tempol	311 ± 8.5	5.8 ± 0.10 ^a	71.2 ± 2.6	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.2 ^a
4W Control	373 ± 24.9	3.5 ± 0.45	91.5 ± 9.5	2.2 ± 0.3	2.9 ± 0.3
1/2NX	375 ± 12.9	5.2 ± 0.18 ^{a, b}	96.0 ± 3.2	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.2 ^{a, b}
1/2NX+ Tempol	355 ± 12.9	4.5 ± 0.13 ^a	93.0 ± 2.4	2.2 ± 0.2	2.2 ± 0.4 ^a

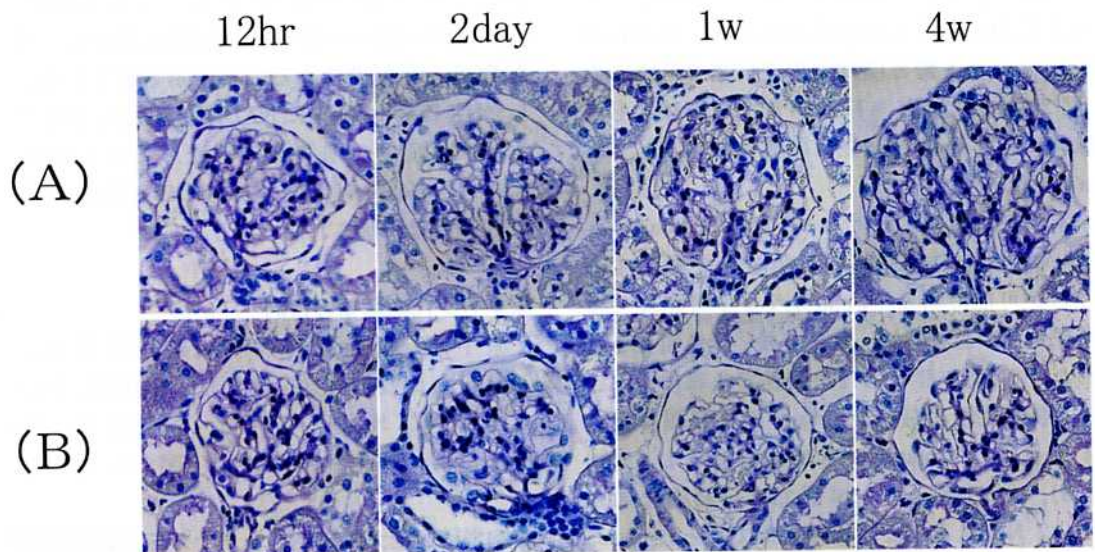
^aP<0.05 for vs Control within the same time group^bP<0.05 for vs 1/2 NX + Tempol within the same time group

図1. 腎組織変化

片腎摘出後の経時的な腎組織像の変化を示す。NX群(A)では経時的な糸球体肥大を認めるが、NX + Tempol群(B)では糸球体径の増大を認めない。PAS染色組織像 400倍

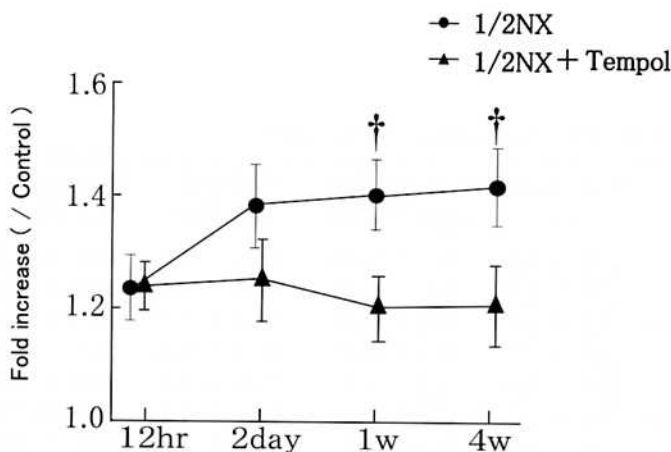


図2. 片腎摘後の糸球体体積の変化
片腎摘出後の経時的な糸球体体積増加率の変化を示す。コントロール群糸球体における平均糸球体体積との比で表示している。

腎組織内 ROS, NO 産生

Control ラット腎組織では、ROS 産生を示す DCFH-DA の緑色蛍光はごくわずかに尿細管上皮等に認めただけであった。1/2 NX 群では、12時間後より糸球体で ROS 産生増加を認めた。ROS 産生は経時的に増大傾向を示し、1 週目で最大の蛍光強度を認めた。4 週目には Control ラット腎とほぼ同程度にまで低下した (図 3 A)。1/2 NX + Tempol 群では腎摘後も糸球体における ROS 産生は抑制されていた (data not shown)。

本法では組織における NO 存在量 (bioavailable NO) を DAR-4M の赤色蛍光で検出することが可能である。Control ラット腎組織では糸球体及び血管壁に一致して強い赤色蛍光を認めた。1/2 NX 群では12時間目で糸球体における NO 産生量は最大となりその後減弱を認め 4 週目では Control レベルまで低下した (図 3 B)。1/2 NX + Tempol 群では全経過を通して 1/2 NX 群とほぼ同様の結果であった (data not shown)。

糸球体内 ROS 産生変化の検討

糸球体における ROS 産生変化をより定量的に解析するために単離糸球体を用いて検討した。DHE を用いると ROS の中でも主として

O_2^- 産生を検出することが可能である。単離糸球体では2日目より ROS 産生は増加し、1 週目に最大産生を認めた (図 4)。1/2 NX + Tempol 群では ROS 産生は全経過で有意に抑制された。次に 1/2 NX 群糸球体における ROS 産生経路の解析を行った。NADH/NADPH oxidase が各種疾患糸球体において主要な ROS 産生経路であることが示されている。1/2 NX 群の糸球体に NADH を添加したところ、ROS 産生の増強を認めた。また NADH/NADPH oxidase 阻害薬である DPI 添加により ROS 産生は抑制された (図 5)。

尿中 NO 代謝産物の検討

尿中 NOx 排泄量は片腎摘後12時間目に Control と比較し有意に増加し、2 日目においても有意に増加していた。1 週間目には Control 群レベルまで減少した (図 6)。

細胞増殖、肥大の細胞内シグナル伝達経路の解析

各種細胞種において細胞増殖・肥大との関連が示されている MAPK のひとつ ERK のリン酸化及び蛋白合成と関与する Akt リン酸化を Western 解析で検討した。片腎摘出後、12時間後より ERK のリン酸化亢進を認め、4 週目で

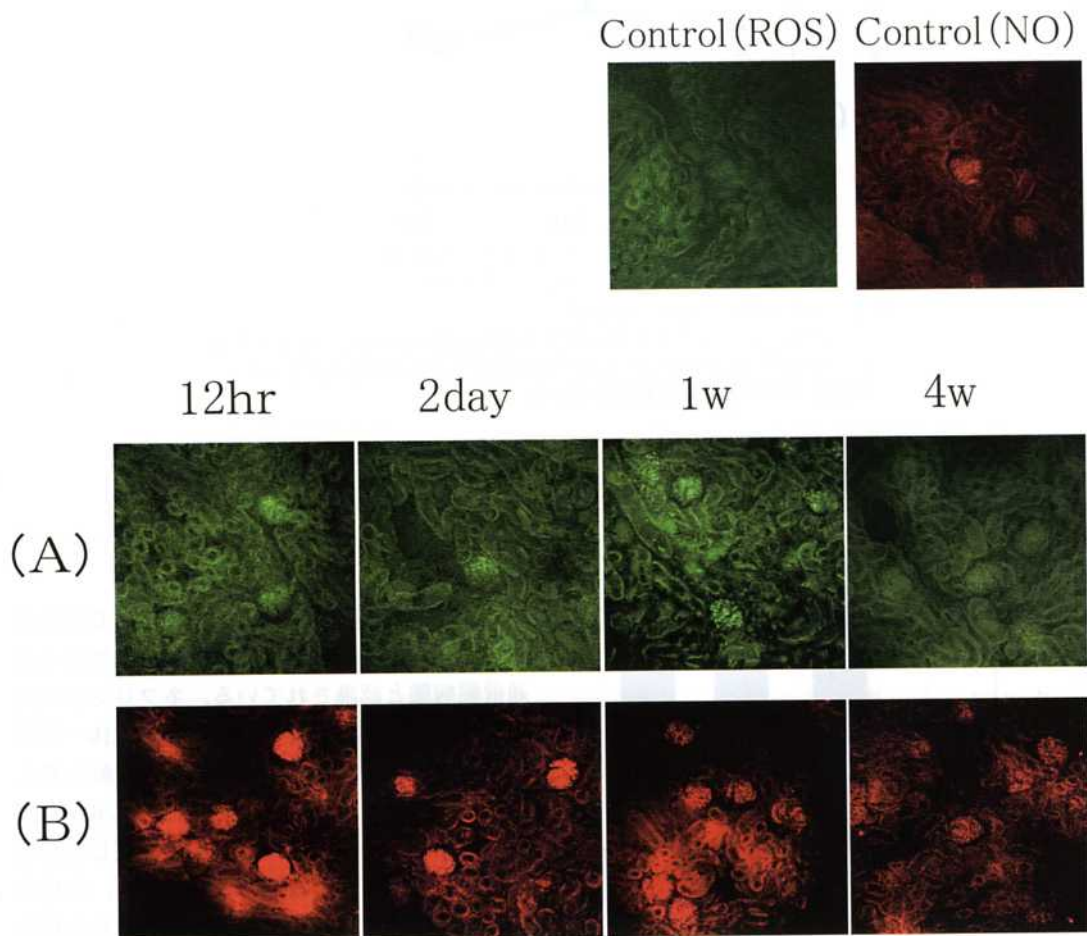


図3. 片腎摘出後の腎組織における活性酸素種 (ROS) と一酸化窒素 (NO) の変化

共焦点レーザー顕微鏡を用いてROS, NOを可視化した。コントロール群糸球体 (Control) では、糸球体内にほとんどROS産生 (緑色蛍光) を認めないが、糸球体に一致してNO (赤色蛍光) を認める。NX群では腎摘後、12時間で赤色蛍光の増大 (NO量の増大) を認め、4週目にはコントロール群と同程度に復した (B)。腎摘後1週目に緑色蛍光の増大 (ROS産生増大) を認めている。4週目にはROS産生もコントロールレベルまで回復している (A)。

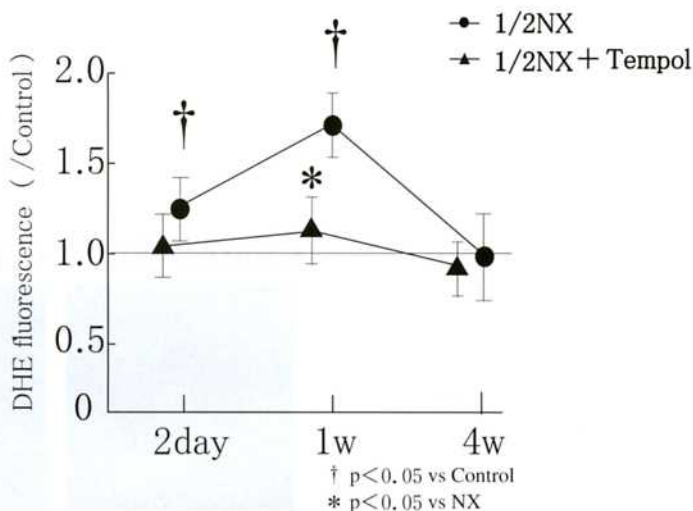


図4. 単離糸球体における ROS 産生

片腎摘出後、2日目より ROS 産生の増大を認め、1週目に最大となった。4週目にはコントロールレベルに復している。Tempol 投与により、全経過で ROS 産生は抑制されている。

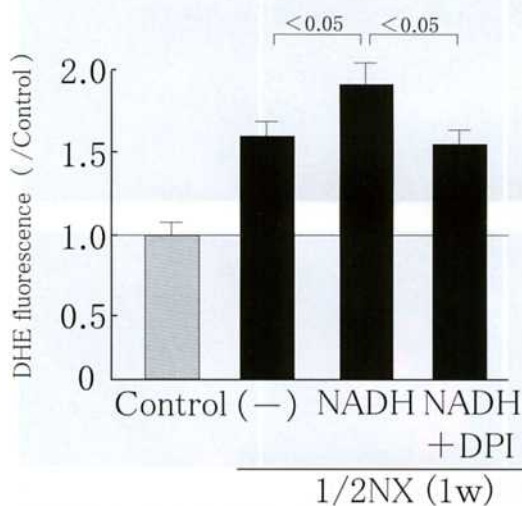


図5. 単離糸球体を用いた ROS 産生経路の解析

片腎摘出後、1週目の腎臓より糸球体を単離し解析に用いた。NADH 添加により ROS 産生は増強し、DPI により抑制された。

最大のリン酸化を認めた (図 7A)。Akt は 1 週目、4 週目において強いリン酸化亢進を認めた (図 8A)。ERK、Akt リン酸化はともに Tempol により抑制された (図 7B、8B)。

考 察

機能ネフロン数の減少とその後に生じる糸球体・腎肥大は、最終的な腎不全へと進展する共通前駆病態と認識されている。ネフロン数の減少が一定程度にとどまる場合は、糸球体・腎肥大は喪失した腎機能を代償する適応機転と考えられる。ネフロン数の減少が高度 (5/6 程度以上) になると、糸球体・腎肥大に後続して糸球体硬化と進行性の腎組織障害が生じる。糸球体硬化・進行性腎障害は適応機転の破綻した状態とみなしえよう。従って糸球体・腎肥大のメカニズムを解明することは、進行性腎障害の治療法を開発する上で必須と考えられる。

機能ネフロン数の減少後に直ちに生じる最も著しい変化は、残存糸球体への血流変化である。残存糸球体には hyperperfusion と glomerular hypertension が生じる。本研究により、これらの血流変化に付随して、糸球体で NO と ROS の動的な変化が生じていることが明らかになった。腎摘出後 12 時間～2 日という早期から糸球体径の増大 (glomerular hypertension) が生じて

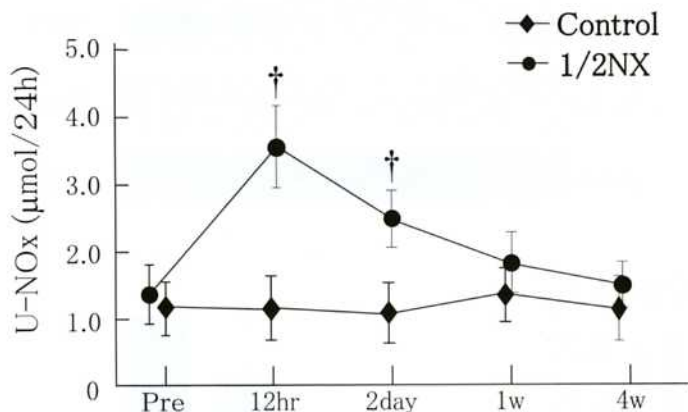


図6. 尿中NOx排泄量の経時の変化

腎摘出後、12時間目に尿中NOx排泄量は最大となり、1週目にはコントロールレベルにまで減少した。

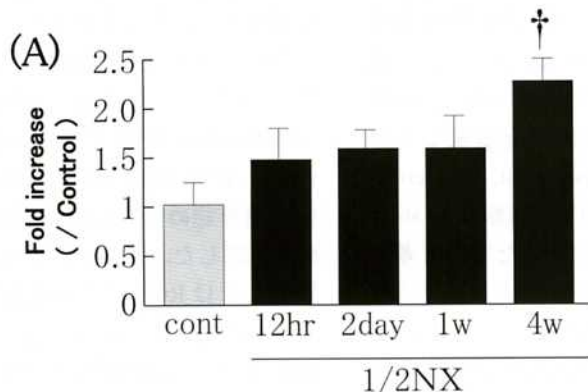
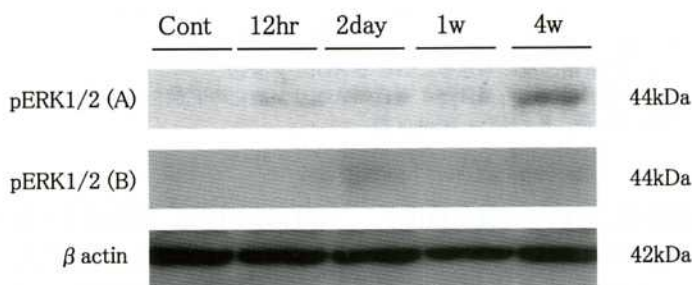


図7. 片腎摘出後の糸球体におけるERKリン酸化

片腎摘出後、12時間後よりERK1/2の軽度のリン酸化を認め、4週目には有意にリン酸化の増大を認めた。

A: NX群, B: NX + Tempol群

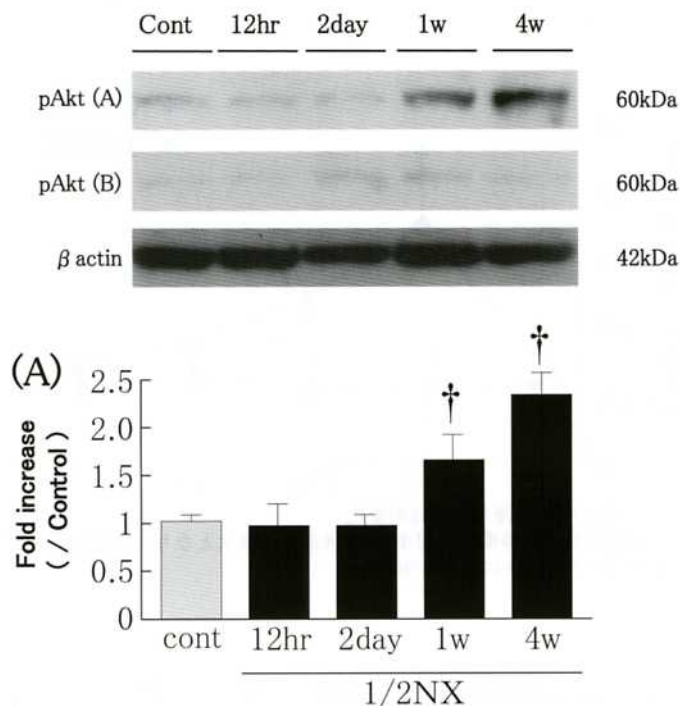


図8. 片腎摘出後の糸球体におけるAktリン酸化
片腎摘出後、1週目と4週目にAktリン酸化の亢進を認めた。
A: NX群, B: NX + Tempol群

いる。この間に一致して、組織で可視化検出されるNO (bioavailable NO), 尿中NOx排泄量の増加を認めた。一般に血管内皮細胞ではshear stress増大に対応してNO産生が亢進することが知られている。腎摘出2日目には一過性に尿蛋白排泄量の増大を認めており、一過性のglomerular hypertensionの出現を示唆している。残存糸球体へのhyperperfusion, glomerular hypertensionにより糸球体内皮細胞からshear stress依存性にNO産生が亢進したものと考えられる。この間には細胞増殖や肥大に関与するMAPKやAkt経路の活性化を認めていない。2日までの早期の糸球体肥大は血管拡張反応としての糸球体径の増大とみなすことができよう。

1週～4週間にかけて糸球体・腎肥大は継続する。糸球体内では1週目をピークとしてROS産生亢進が認められた。抗酸化作用を有するTempol投与によりROS産生はほぼ完全

に抑制された。同時にこの間の糸球体・腎肥大反応も抑制された。このことは、1週目以降に生じる糸球体・腎肥大反応にはROS産生亢進が関与していることを示している。

細胞増殖や肥大に関与するMAPKやAkt経路の活性化には細胞内の酸化・還元状態(redox status)が関与していることが示されている。1～4週にかけてERK, Aktのリン酸化亢進を認めた。Tempol投与はこれらの活性化を抑制した。従って、1週目以降の糸球体・腎肥大にはROS産生の亢進とERK, Aktリン酸化が関与していると考えられた。さらにROS産生には糸球体でのNADH/NADPH oxidase活性化が関与していることも示された。

私どもは進行性腎障害モデルであるラット5/6腎摘出モデルにおいて糸球体内でROS産生が持続的に亢進することを報告している⁷⁾。またラット糖尿病モデルにおいても糸球体内でのROS産生亢進と鏡像的なNO低下を報告して

いる⁸⁾。これらのモデルでは同時に糸球体内での核酸、蛋白、脂質成分の酸化修飾産物の蓄積を認めており、持続的な酸化ストレスの亢進とそれに付随するNO低下は組織障害に関与していると考えている。今回検討した片腎摘出モデルでは、ROS産生は一過性であり、ネフロン数減少後の代償的な糸球体・腎肥大に関与しており、組織障害因子ではなく適応機転の一端を担っていることが判明した。

ROSあるいはNOは血流変化に対応して糸球体を含めた腎内血管系の構築変化に積極的に関与していることが明らかになった。5/6腎摘出時のように血流変化が一定程度を凌駕し、かつ長時間継続すると、過剰なROS産生の亢進は組織障害を惹起すると考えられる¹⁴⁾。今後、各種腎疾患におけるROS、NOの動的変化とその異常、さらにメカニズムを詳細に解明することにより、腎疾患進行を阻止しうる新規治療法の開発に取り組みたいと考えている。

ま と め

今回、片腎摘出モデルラットを用いて代償性

糸球体肥大におけるROS、NOの動的変化とその役割を検討した。片腎摘出後早期よりNOの産生亢進が見られ、細胞増殖シグナルを介さない糸球体体積の増加を認めた。このことから片腎後早期に生じる糸球体肥大は血行動態変化により生じたNO産生亢進からの血管拡張反応によるものと推測された。

片腎摘出後後期はさらに糸球体肥大が進行し、それに伴い一過性のROS産生亢進を認め、細胞増殖・肥大に関連する細胞内シグナルの活性化増強を認める。また、片腎摘出後後半の糸球体肥大は抗酸化剤であるTempolにより抑制され、同時に細胞内シグナルの活性化も抑制した。このことから片腎摘出後後半の糸球体肥大にはROSを介した糸球体蛋白合成の関与が考えられた。ROS、NOは代償機転である腎・糸球体肥大に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

文 献

- 1) Brenner BM, Lawler EV, Mackenzie HS : The hyperfiltration theory : A paradigm shift in nephrology. *Kidney Int* 49 : 1774-1777, 1996
- 2) Kashihara N, Sugiyama H, Makino H : Implication of apoptosis in progression of renal diseases. *Contrib Nephrol* 139 : 156-172, 2003
- 3) Chen JK, Chen J, Neilson EG, Harris RC : Role of Mammalian Target of Rapamycin Signaling in Compensatory Renal Hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 16 : 1413-1420, 2005
- 4) Valentin JP, Sechi AJ, Griffin CA, Humphreys MH, Schamblan M : The Renin-Angiotensin System and Compensatory Renal Hypertrophy in the Rat. *American Journal of Hypertension* 10 : 397-402, 1997
- 5) Satoh M, Kashihara N, Yamasaki Y, Maruyama K, Okamoto K, Maeshima Y, Sugiyama H, Sugaya T, Murakami K, Makino H : Renal interstitial fibrosis is reduced in angiotensin II type I receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* 12 : 317-325, 2001
- 6) Sigmon DH, Gonzales-Feldman E, Cavasin MA, Potter DL, Beierwaltes WH : Role of Nitric Oxide in Renal Hemodynamic Response to Unilateral Nephrectomy. *J Am Soc Nephrol* 15 : 1413-1420, 2004
- 7) 藤本壮八, 佐藤稔, 荒川さやか, 春名克祐, 大関正仁, 小林伸哉, 堀家英之, 福島達夫, 佐々木環, 柏原直樹 : 進行性腎障害におけるアンギオテンシンIIと活性酸素の関与. 腎とフリーラジカル 第7集, 73-77, 2004

- 8) Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, Komai N, Sasaki T, Tsujioka K, Makino H, Kashihara N : NAD (P) H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288 : F1144 – F1152, 2005
- 9) Kashihara N, Komai N, Morita Y, Tomita N : Molecular biology in regulation of kidney function : Nitric oxide. *Nippon Rinsho*, 64 : 213 – 216, 2006
- 10) Sugiyama H, Kashihara N, Maeshima Y, Okamoto K, Kanao K, Sekikawa T, Makino H : Regulation of survival and death of mesangial cells by extracellular matrix. *Kidney Int* 54 : 1188 – 1196, 1998
- 11) Pagtalunan ME, Drachman JA, Meyer ETW : Methods for estimating the volume of individual glomeruli. *Kidney international* 57 : 2644 – 2649, 2000
- 12) Haruna Y, Morita Y, Komai N, Yada T, Sakuta T, Tomita N, Fox DA, Kashihara N : Endothelial dysfunction in rat adjuvant-induced arthritis : vascular superoxideproduction by NAD (P) H oxidase and uncoupled endothelial nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum*, 54 : 1847 – 1855, 2006
- 13) Nishiyama A, Yoshizumi M, Hitomi H, Kagami S, Kondo S, Miyatake A, Fukunaga M, Tamaki T, Kiyomoto K, Kohno M, Shokoji T, Kimura S, Abe Y : The SOD mimetic tempol ameliorates glomerular injury and reduces mitogen-activated protein kinase activity in dahl salt-sensitive rats. *J Am Soc Nephrol* 15 : 306 – 315, 2004
- 14) 柏原直樹, 藤本壮八 : 尿細管間質障害と酸化ストレス. *医学の歩み*. 212 : 679 – 682, 2005