

原 著

腎間質線維芽細胞におけるレニン-アンギオテンシン系の局在と機能

菊田 知宏

Existence and Function of Renin-Angiotensin System in Renal Interstitial Fibroblast

Tomohiro Kikuta (Department of Nephrology, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Tubulointerstitial fibrosis (TIF) is considered a valid marker of progression of diabetic and non-diabetic nephropathy, that correlates negatively with creatinine clearance (CCr), and functional outcome. Since a number of clinical trials have revealed that angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi) slowed the rate of decline of renal function in proteinuric patients, it is suggested that ACEi can directly and/or indirectly affect TIF. Therefore, to test this hypothesis, we performed a prospective study for 3 years focusing on the effects of ACEi on functional outcome of patients with IgA nephropathy (IgAN) in relation to the degree of TIF. In the control group treated with amlodipine, the degree of TIF was negatively correlated with the reduction rate of CCr (dCCr), which was consistent with previous observation. By contrast, in the group treated with ACEi, the dCCr index was attenuated compared with the controls, and there was no correlation between the degree of TIF and the dCCr index. The latter suggested that ACEi had independent effects on renal fibrogenesis. Subsequently, we performed in vitro experiments to test whether angiotensin II (Ang II) and aldosterone (ALD) had direct profibrotic effects on cultured human renal fibroblasts. Human renal fibroblasts expressed Ang II type 1 receptor (AT1R) in vivo and in vitro. Ang II stimulated fibroblast proliferation, and type I collagen production of human renal fibroblasts via AT1R, especially in fibroblasts derived from a fibrosing kidney; this effect was partially mediated by secreted TGF- β . ALD could also promote proliferation of fibrosis-derived fibroblasts. In conclusion, ACEi can efficaciously retard the progression of IgAN with and without TIF equally, which is supposed to be partially due to its direct effects on renal fibrogenesis.

Keywords: angiotensin converting enzyme inhibitor, IgA nephropathy, proteinuria, fibrosis, fibroblast

J Saitama Med School 2005;32:13-21

(Received December 3, 2004)

緒 言

腎不全の進行による慢性透析患者は年々増加しているが、これまで有用な治療法が少なかった腎不全の進行抑制に対する近年のさまざまな研究により、いくつかの重要な点が明らかになりつつある。その一つは血圧のコントロールおよび一部の降圧薬の直接効果により、腎臓をはじめとした諸臓器の機能保護が図れるようになったことである¹⁾。こうした降圧薬のうちアンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬は、降圧以外の機序による腎保護効果が明らかになっており²⁾、降圧効果のもっとも強いカルシウム拮抗薬(CCB)と並びわが国でもっとも普及している降圧薬の1つとなっている³⁾。ACE阻害薬の臓器保護効果は腎臓だけでなく他の臓器

でも証明されている。1999年に発表された前向きの大規模臨床研究(STOP Hypertension-2研究)では、CCB、ACE阻害薬、および利尿薬・ β 遮断薬を用いて同等に降圧した3群を心血管イベントの相対リスクについて検討した場合、ACE阻害薬は他と比較して心筋梗塞、心不全の発症を有意に減少させる傾向があった⁴⁾。降圧によらない臓器保護の機序としては、循環血中のいわゆるレニン-アンギオテンシン(RA)系とは独立した心臓組織内部のRA系の存在と、その組織RA系の心肥大および心臓組織の再構築(リモデリング)への関与が想定された。実際、心臓間質の線維芽細胞にはアンギオテンシンII type I 受容体(AT1R)が存在し、アンギオテンシンII (Ang II)刺激により細胞増殖や細胞外基質合成が刺激されることや、アルドステロン(ALD)も鉱質コルチコイド受容体を介して同様の効果を示すことが確かめられている⁵⁻⁷⁾。このように心臓では組織

RA系の存在と機能に対する検討が進んでいるが、腎臓における組織RA系の検討は十分行われていない。

また腎不全の進行は糸球体機能の廃絶であるために、進行の機序に対する検討は糸球体から行われてきたが、近年ではある時期以降の腎不全の進行にはむしろ間質の線維化が中心的な役割を担っていると考えられている⁸⁾。しかしながら腎間質の線維化に対する知見は他の臓器に比べて十分でなく、線維化の主役である線維芽細胞の同定についても一定の合意が得られていないのが現状である⁹⁾。また臨床的に腎障害の進行に対して大きな影響を示すRA系と間質線維化の関連を検討した研究も少なく、今回腎生検で確定診断を行ったIgA腎症(IgAN)患者に対するACE阻害薬の効果が間質線維化とどのような連関を有しているかに関する前向き臨床研究を行った。さらにその結果に基づき培養ヒト線維芽細胞におけるRA系の存在と機能に関する検討を行った。

方 法

<臨床研究> 埼玉医科大学病院およびその関連施設において、本研究の内容を十分に説明したうえで同意が得られた日本人IgAN患者49人を対象とした。対象の条件は、当院で腎生検を行った18-65歳のIgAN患者でこれまで降圧療法の治療歴がないものとした。IgANの診断は、免疫蛍光染色でIgAの有意な沈着を認め、かつ、光学顕微鏡所見でメサンギウム増殖性糸球体腎炎に相当する像を呈している例のみとし、管外性増殖や壊死性病変を認めるものは除外した。さらに基礎疾患として糖尿病、高脂血症、肝臓疾患、全身性エリテマトーデス、紫斑病を有する症例は除外した。登録された患者をACE阻害薬投与群($n=26$, temocapril または trandolapril (1-2 mg/日))とCCB投与群($n=23$, amlodipine (2.5-5 mg/日))の2群に無作為に振り分けた。降圧薬の使用に関しては、外来での目標血圧を130/85 mmHgとし、必要に応じ $\alpha \cdot \beta$ 遮断剤 arotinolol (10-20 mg/日)、利尿薬 Trichlormethiazide (2-8 mg/日)を併用した。登録時に血圧が130/85 mmHg以下の症例については各々の最少量を投薬した。血圧および血清クレアチニン(Cr)値の測定、尿検査は少なくとも3年間毎月施行した。クレアチニンクリアランス(CCr)(2h法)は1年に1回以上測定し、3年間のCCrの変化の指標(dCCr index)は{(終了時のCCr値)-(登録時のCCr値)}/(登録時のCCr値)として計算した¹⁰⁾。

<免疫組織化学> 腎生検で得られた検体は4%パラホルムアルデヒドで固定後パラフィン包埋した。4 μ mに薄切後、脱パラフィン・親水処理を経てマッソントリクローム(MT)染色および免疫組織化学染色を施行した。抗原性の再賦活化法としてはproteinase K処理(10 mg/ml, 37°C, 15分間)およびマイクロウェーブ

照射(クエン酸塩バッファー, 10分 $\times$ 2回)を用いた。内因性ペルオキシダーゼ阻害のため、3% H_2O_2 を含むメタノールで5分間処理後、内因性のビオチンはBiotin Blocking System(DAKO Corp., Carpinteria, CA, U.S.A.)でマスクした。1%脱脂粉乳を含むリン酸緩衝液(PBS)で前処理(室温, 30分間)の後、一次抗体を含む同溶液を検体に滴下し4°Cで一晩静置した。用いた一次抗体と希釈倍率は以下の通りである。抗AT1RウサギポリクローナルIgG(1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.), 抗AT2RウサギポリクローナルIgG(1:100, Dr. Robert M. Careyより 供与, University of Virginia Health System, Charlottesville, VA, U.S.A.), 二次抗体としてはビオチン化した抗ウサギIgGヤギポリクローナルIgG(1:500, Santa Cruz Biotechnology)を、シグナルの可視化にはVectastain ABC Standard Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.)およびAEC Standard Kit(DAKO)を用いた。各反応段階での洗浄はPBSを用いて3分間 $\times$ 3回行った。

<腎線維化領域の計測> MT染色における線維化領域の評価は対物レンズ20倍率下で無作為に選択した視野において行った¹¹⁾。顕微鏡画像はCCDカメラ(HC-2500, Fuji Film Company, Tokyo)を用いてコンピュータに取り込み、画像処理ソフト(Mac SCOPE, Ver. 2.5 Mitani Corp. Fukui)を用いて定量化(TIF index)した。その際視野に含まれる糸球体および脈管系はサブトラクション処理した。

<培養細胞> 健常人の腎臓(Hk173)または、組織学的に間質線維化病変が認められた腎生検の検体(Hk188)から樹立されたヒト腎間質線維芽細胞はFrank Strutz博士(Department of Nephrology, Georg August University, Germany)より御供与頂いた¹²⁾。Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)に10% fetal calf serum(FCS), 100 U/ml ペニシリンおよび100 μ g/ml ストレプトマイシンを加えた培地を用いて5% CO_2 , 37°Cの条件で継代維持し、供与後3-10継代の細胞を実験に用いた。Hk173とHk188の表現型は明らかに異なることが報告されており、それぞれ正常の腎臓と線維化病変を伴う腎臓の特徴を反映していると考えられている¹²⁾。

<レセプターバインディングアッセイ> 24ウェルプレートに播種したサブコンフルエントのHk173とHk188を低血清培地(DMEM, 0.5% FCS, 100 U/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシン)で48時間培養後レセプターバインディングアッセイを行った。 10^{-10} Mの放射性同位元素標識Ang II ([¹²⁵I]-[Sar¹,Ile⁸] Ang II) および、競合実験には非標識のAng II, AT1R拮抗薬(CGP-48933, Novartis Pharma AGより 供与, Basel, Switzerland) またはAT2R拮抗薬(PD-123119, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A.)を 10^{-12} - 10^{-5} Mまで種々の濃度で用いた。4°C, 3時間培養の後、結合して

いないリガンドを除く為に各ウェルを氷冷したPBSで2回洗浄し、細胞を1M NaOH/0.1% Triton X-100で溶解した。放射活性はガンマカウンターで測定した。

<IP₃ アッセイ> 10 cmディッシュに播種したサブコンフルエントのHk173とHk188を低血清培地で48時間培養した後、 10^{-6} MのAng IIおよびAT1R拮抗薬(CGP-48933)を用いて各条件で30秒間刺激した。細胞は氷冷した20%過塩素酸1 mlを加えて回収し、20分間氷上に静置後、4°C, 2000 g, 15分間遠心した。上清をプラスチックチューブに移し、pH指示薬を含んだ1.5 M KOH/60 mM Hepes バッファーを滴下してpH 7.5に調整した。中和されたサンプルでd-myo-IP₃[3H] assay system(Biotrak, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, U.S.A.)を用いIP₃を計測した。

<細胞増殖試験> 24ウェルプレートに 10^4 cells/wellでHk173とHk188を播種し、すべての細胞が底面に接着した後(約6時間後)培養液を低血清培地に交換した。48時間後に以下の薬剤および中和抗体を結果に示す組み合わせで添加し24時間後に細胞を回収した。 10^{-8} - 10^{-5} MのAng II (Sigma-Aldrich), 10 nM-100 nMのALD(Sigma-Aldrich), AT1Rおよび鉍質コルチコイド受容体拮抗薬としてCGP-48933, spironolactone(SPL) (Sigma-Aldrich)さらに、線維芽細胞の増殖を刺激するサイトカインであるtransforming growth factor- β 1(TGF- β 1)の中和抗体(抗TGF- β 1抗体, 50 μ g/ml, Genzyme, Cambridge, MA, U.S.A.)を用いた。これらの薬剤や抗体を含まない低血清培地を対照群とした。細胞増殖は[3H]thymidineの取り込みを指標にしたDNA合成量によって評価した。上記薬剤、抗体添加20時間後(細胞の回収4時間前)に、5 mCi/mlの[3H]thymidineを培地に添加した。刺激終了時にトリプシンを用いて細胞を回収しPBSで2回洗浄後、溶解バッファーにて(10 mM Tris, pH 7.5, 125 mM NaCl, 0.1% Nonidet-P40, 1% SDS)細胞のホモジネートを得た。同検体をグラスファイバーフィルター(GF/C, Whatman International, Kent, UK)に吸収させ、20% trichloroacetic acid(TCA), 5% TCA, 80% エタノールで洗浄し、乾燥後、フィルターに残った放射活性をシンチレーションカウンター(Beckman Instruments, Palo Alto, CA, U.S.A.)で測定した。

<I型コラーゲン(COL I) 産生量測定> Hk173とHk188を6ウェルプレートに 10^5 cells/wellで播種し、すべての細胞が底面に接着した後(約6時間後)培養液を低血清培地に交換した。48時間後に 10^{-8} - 10^{-5} MのAng II (Sigma-Aldrich), AT1R拮抗薬(CGP-48933)および抗TGF- β 1抗体(50 μ g/ml, Genzyme)を結果に示す通り添加し、さらに48時間培養した後培養上清を回収した。上清中のI型コラーゲン濃度はindirect enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)にて測定した¹³⁾。始めに蛋白吸着性の96ウェルプレート

を培養上清でコート(室温, 30分間)する。0.1% Tween20を含むPBSで洗浄後、ブロッキングバッファ(10%脱脂粉乳, 0.1% Tween20, 0.05% NaN₃を含むPBS)で室温, 30分間ウェル表面をブロッキングし、つづいて同ブロッキングバッファに希釈した抗I型コラーゲンウサギポリクローナルIgG(1:3000, Chemicon International, Temecula, CA, U.S.A.)と室温30分間反応させた。洗浄後同様に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体、および基質としてDisodium p-nitrophenyl phosphateを用いてプレートに吸着した培養上清中のI型コラーゲンを定量した。

<統計処理> 本文中で用いたデータは、平均値±標準誤差で表した。群間の比較にはAnalysis of variance (ANOVA)を用い、多重比較検定にはBonferroni/Dunnett's法を用いた。危険率5%未満を統計学的に有意とみなした。

結 果

<臨床研究> 本研究において対象となった症例の観察開始時および終了時(3年後)の検査値を(Table 1)に示す。開始時の年齢、収縮期および拡張期血圧、血清Cr値、一日尿中蛋白排泄量, CCr, TIF indexのどれも両群間に有意差を認めなかった。(Fig. 1a, b)はTIF indexの計測の具体例を示しており、(Fig. 1b)における緑の領域が間質線維化領域として計測されたことを示している。3年間の観察終了時、両群で収縮期・拡張期血圧とも開始時に比べ有意に低下しており、全例で目標血圧を達成した。終了時の血圧について両群間では有意差を認めなかった。併用したarotinolol, Trichlormethiazide投与量はACE阻害薬群で若干多い傾向にあったが統計学的な有意差は無かった。血清Cr値は観察期間中、両群とも上昇傾向にあり、終了時も両群間で有意差を認めなかった。一日尿中蛋白排泄量について、ACE阻害薬群では開始時に比べて終了時に有意な減少を認めたが、CCB群ではむしろ増加傾向にあった。しかし、両群間の比較では終了時も有意差を認めなかった。観察開始時および終了時のCCrから算出されたdCCr indexは両群において減少傾向に

Table 1. Demographic data *means $p < 0.05$ vs year 0

	ACEi group (n=26)		CCB group (n=23)	
	Year 0	Year 3	Year 0	Year 3
Age	35 ± 2		35 ± 3	
Gender (M/F)	8 / 18		12 / 11	
Systolic BP (mmHg)	143 ± 3	120 ± 2 *	140 ± 3	122 ± 2 *
Diastolic BP (mmHg)	87 ± 2	73 ± 2 *	83 ± 2	74 ± 2 *
Serum Creatinine (mg/dl)	1.07 ± 0.13	1.18 ± 0.26	1.02 ± 0.08	1.23 ± 0.42
Proteinuria (g/day)	1.09 ± 0.16	0.79 ± 0.36 *	1.10 ± 0.15	1.33 ± 0.62
CCr (ml/min)	92.8 ± 6.2	85.5 ± 5.5	90.8 ± 7.1	85.5 ± 7.4
TIF index	16.5 ± 1.7		14.0 ± 1.8	
dCCr index		-0.02 ± 0.02		-0.06 ± 0.03

あった。TIF indexと蛋白尿の間には弱い正の相関を認めた(Fig. 2a)。開始時のTIF indexとdCCr indexとの間にはCCB群で負の相関を認め、間質病変を伴う症例ほど腎機能予後が悪いとする従来の報告と一致する傾向を示した。一方、ACE阻害薬群では同様の傾向が認められず、明らかな間質病変を伴う症例においても、腎機能障害の進行程度は、間質病変を伴わない症例と同程度であった(Fig. 2b)。

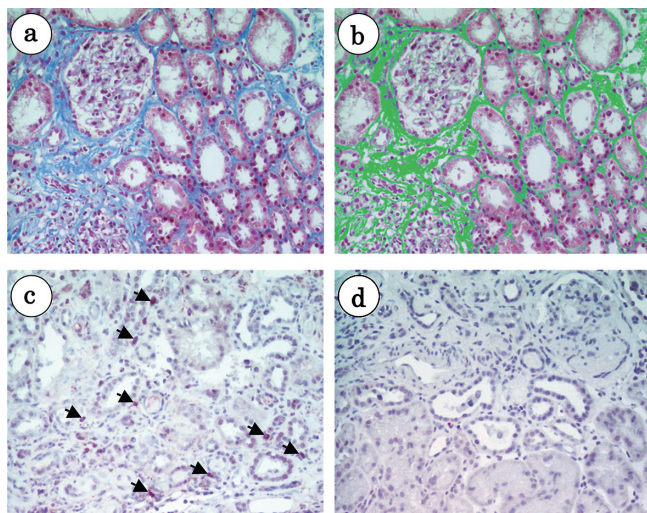


Fig. 1. Representative renal histopathology of IgAN with TIF. a. The area of TIF is shown in blue on the MT-stained section. (x 100, MT) b. Most of the blue area in Fig. 1a turns green, and the green area is quantitatively evaluated by an image analyzer. The TIF index is 11.4% in this case. (x 100, MT) c. Immunohistochemistry with anti-AT1R antibody revealed that not only glomerular, vascular and tubular cells, but also some of interstitial fibroblast-like cells are positive for AT1R (arrows) within the TIF of IgAN. (x 100, AEC) d. A negative control for immunohistochemistry. (x 100, AEC)

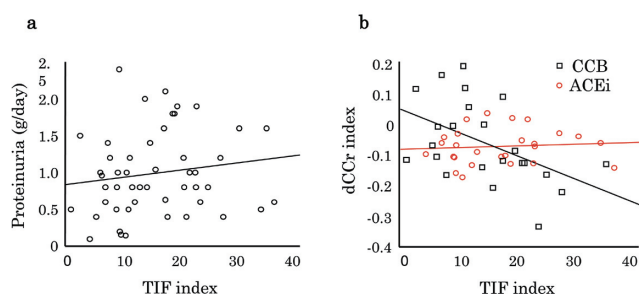


Fig. 2. Clinical and pathological correlations. a. In both groups at baseline, TIF index shows a weak, positive correlation with urinary protein excretion. b. At the end of 3-year follow-up, in the CCB group, TIF index was found to be positively correlated with dCCr index. By contrast, in the ACE inhibitor group, there is no correlation between TIF index and dCCr index.

<Hk173 とHk188 における機能的なAng II 受容体発現の検討> ヒト腎生検標本の免疫組織学的検討では線維化病変にAT1R陽性の間質細胞が認められた(Fig. 1c, d)。つぎに、本研究に用いたヒト腎間質線維芽細胞における機能的なAT1RおよびAT2Rの発現を検討した。Hk173, Hk188はともに放射性同位元素標識のAng IIを結合した。細胞に結合する標識Ang IIは非標識Ang IIおよびAT1R拮抗薬(CGP-48933)により濃度依存性に置換されたが、AT2R拮抗薬(PD-123319)は同様の効果を示さなかった(Fig. 3)。さらに、Ang IIがAT1Rに結合後セカンドメッセンジャーとして産生されるイノシトール3リン酸(IP₃)を測定した結果、いずれの細胞株でもAng II刺激によりIP₃が増加し、CGP-48933処理によりIP₃の増加が抑制されることが確認された(Fig. 4)。以上よりHk173とHk188は、Ang IIの結合によって少なくともIP₃産生を刺激しうるAT1Rを発現していることが確認された。

<Ang II が細胞増殖に及ぼす影響> 10^{-6} M, 10^{-5} MのAng II刺激はいずれの細胞株においても有意に[3H]thymidineの取り込み量を増加させたが、この作用はAT1R拮抗薬(CGP-48933)投与で完全に、抗TGF- β 1抗体の添加で一部抑制された(Fig. 5)。抗AT2R拮抗薬(PD-123177)投与ではAng II単独投与と有意差がないこと(データ不提示)、CGP-48933あるいは抗TGF- β 1抗体単独投与では[3H]thymidineの取り込み量に変化がないことも確認した(Fig. 5)。

<Ang II がCOL I 産生に及ぼす影響> 10^{-6} MのAng II 48時間刺激後、培養上清中のCOL I可溶性分画濃度はHk188で有意に増加したがHk173では同様の変化を認めなかった(Fig. 6)。Hk188におけるAng IIのCOL I

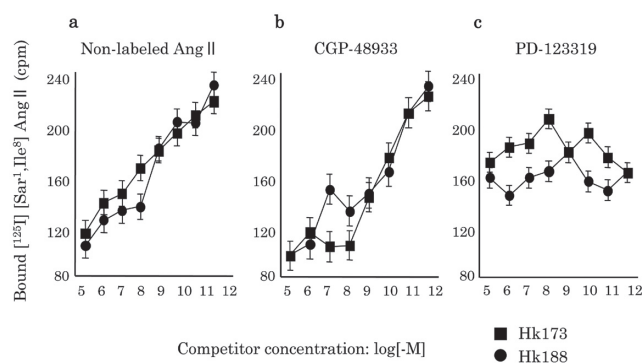


Fig. 3. Human renal fibroblasts possess Ang II type 1 receptors. Renal fibroblasts Hk173, derived from a normal kidney and Hk188, derived from a fibrosing kidney possess AT1R binding sites. Displacement of [125I]-[Sar1, Ile8]Ang II binding from renal fibroblasts. Competition of the binding of [125I]-[Sar1, Ile8]Ang II by increasing concentration of unlabeled Ang II (a), CGP48933(b) or PD123319(c). Data represent the mean of 3 independent experiments.

産生増加作用は、CGP-48933で完全に、抗TGF- β 1抗体で一部抑制された(Fig. 6). CGP-48933あるいは抗TGF- β 1抗体単独投与ではCOL I 産生に変化がないことも確認した(Fig. 6).

<ALDが細胞増殖に及ぼす影響> ALDは濃度依存性にHk188の[3H]thymidine取り込み量を増加させた(Fig. 7). Hk173も同様の傾向を示したがALD 100 nMに至るまで有意な増加とはいえなかった. Hk188におけるALDの作用は10 μ MのSPL投与により完全に抑制された(Fig. 7). この結果はALDによる[3H]thymidine取り込み量増加作用が鉱質コルチコイド受容体を介していることを示唆する. 一方, ALDはHk173, Hk188いずれのCOL I 産生量も変化させなかった(データ不提示).

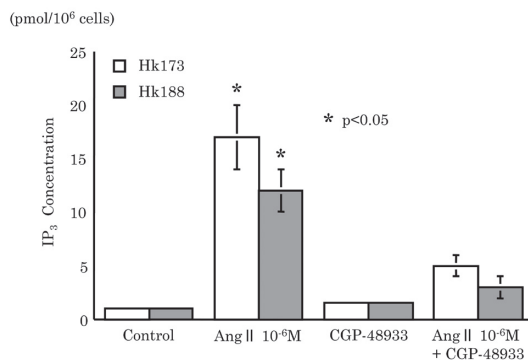


Fig. 4. Stimulation of renal fibroblasts with Ang II evokes IP₃ response. Ang II at 10⁻⁶ M induced significant IP₃ responses in both Hk173 and Hk188, and these responses were abolished by pre-treatment with CGP48933. Data represent the mean of 3 independent experiments.

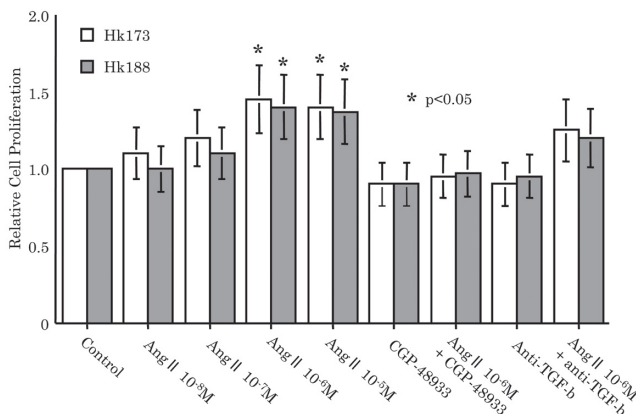


Fig. 5. Mitogenic effects of Ang II on renal fibroblasts. Ang II at 10⁻⁶ and 10⁻⁵ M significantly increased [3H]thymidine incorporation into both Hk173 and Hk188 cells; this was blocked by CGP48933 and partially attenuated by a neutralizing anti-TGF- β antibody. Data represent the mean of 3 independent experiments.

考 察

本研究においては、まず間質線維化病変を伴うIgAN症例において、ACE阻害薬がCCBに比較して腎機能障害の進行を抑制しうる可能性が示された. また培養細胞を用いた検討で、Ang IIがAT1Rを介して腎間質線維芽細胞の増殖と細胞外基質の産生を亢進すること、さらにALDも鉱質コルチコイド受容体を介して同細胞の細胞増殖を刺激することが明らかになった. また、間質の線維化病変はあらゆる腎疾患に続発して生じる変化であり、本研究で取り上げた作用機序は、他の腎疾患においても起こりうる可能性は十分にあると考えている.

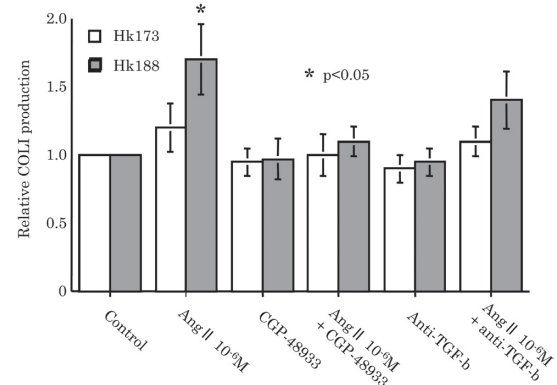


Fig. 6. Effects of Ang II on COL I production in renal fibroblasts. Ang II at 10⁻⁶ M significantly enhanced COL I production in Hk188, but not in Hk173 cells. This enhancement was blocked by CGP48933 and partially attenuated by a neutralizing anti-TGF- β antibody. Data represent the mean of 3 independent experiments.

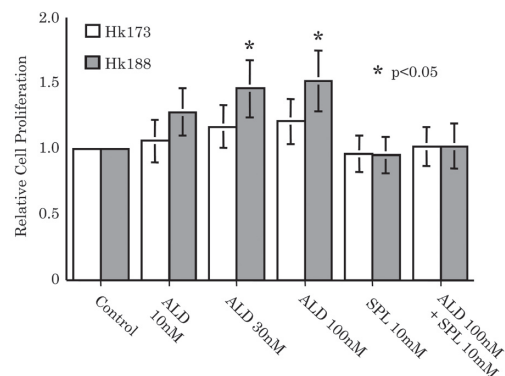


Fig. 7. Mitogenic effects of ALD on renal fibroblasts. ALD at 30 and 100 nM dose-dependently increased [3H]thymidine incorporation into Hk188, but not into Hk173 cells. This mitogenic effect was blocked by SPL. Data represent the mean of 3 independent experiments.

本研究においてもACE阻害薬は予想されたとおり蛋白尿減少効果を示したが、TIF indexを考慮しない場合、観察終了時のCCr, dCCrともにACE阻害薬群、CCB群の間に有意差を認めなかった。蛋白尿はそれ単独でも腎機能の増悪因子であるとする考えがある¹⁴⁾。その理由として、糸球体から濾過された蛋白が近位尿細管上皮細胞(PTEC)で再吸収される際、過剰な蛋白負荷がPTECを活性化し種々の局所血管収縮物質(Ang II, endothelin)や炎症性細胞浸潤を誘導する物質(monocyte chemotactic protein-1, osteopontin)、さらにTGF- β 1のような線維化促進因子を放出する可能性が指摘されている^{15,16)}。しかしながら、抗スリット膜抗体を用いて大量の蛋白尿を惹起したモデル動物では、6ヶ月の観察期間中に間質の線維化を生じなかったとする報告もあり¹⁷⁾、尿中蛋白の総量だけでなく、腎炎の活動性など蛋白尿を生じる原因となっている疾患背景が重要とも考えられる。実際、ACE阻害薬が蛋白尿を減らすことで腎臓を保護すると報告したAIPRIとREIN study^{18,19)}では、本研究に比べ多量の蛋白尿を呈する症例数が多く、蛋白尿減少効果がより大きく結果に影響した可能性がある。このため本研究におけるACE阻害薬の腎保護効果の機序の一つとして蛋白尿の減少も考慮する必要がある。

dCCr indexとTIF indexの相関を示したFig. 2bにおいて、TIF index 20付近でACE阻害薬群とCCB群の回帰直線は交わる。TIF index 20未満の殆ど間質線維化病変を伴わない症例では、CCB群のdCCrはほぼ0であり、ACE阻害薬群のdCCrはおよそ-0.1であった。IgANは進行性の腎機能障害が全例に生じるわけではなく、一般に数十年の期間を経て末期腎不全にいたるサブグループが存在する²⁰⁾。すなわちTIF index 20未満の群は元来3年間ではほとんど進行しないこのサブグループに属する患者群だった可能性が高い。これに対してTIF index 20以上の明らかな間質線維化病変を伴う症例では、CCB群において観察期間中に有意なCCrの減少を認めた。一方、ACE阻害薬群では同様の変化は認められず、この患者群においてはACE阻害薬が腎機能低下を抑制したと考えられる。

IgAN症例の免疫染色では尿細管上皮および間質の細胞がAT1Rを発現しており、一方、AT2Rの染色は比較的弱かった。これらの成績はOkadaらがマウスモデルで検討した発現分布に合致していた²¹⁾。本臨床研究においてACE阻害薬は比較的高度の間質線維化病変が存在する患者群に対して効果をもつことが示唆されたが、その機序に対する考察を深めるため、腎障害進展において大きな役割を果たす腎間質の細胞に注目した。間質線維化病変は、間質の炎症細胞浸潤にはじまり、線維芽細胞の浸潤・増殖と細胞外基質の蓄積からなり^{8,15,22)}、いずれにもAng IIが関係していることが近年報告されている²³⁻²⁵⁾。間質病変のイニシエーショ

ンと考えられている尿細管周囲の細胞浸潤に關与するAng IIの作用について、抗基底膜抗体腎炎モデルを用いて壊死性糸球体腎炎後に惹起される急性間質性腎炎にACE阻害薬、AT1R拮抗薬およびAT2R拮抗薬を投与した研究がある²⁶⁾。それによれば、間質への細胞浸潤はAT1R拮抗薬投与によって有意に抑制されたが、ACE阻害薬は無効であった。またこの抗炎症効果はAT2R拮抗薬の同時投与によって消失した。AT1R拮抗薬の効果は単にAng IIのAT1Rを介した作用を遮断することではなく、ARB投与によってネガティブフィードバックより産生亢進したAng IIがAT2Rを介して作用する結果と考えられた。

本臨床研究においてTIF indexは線維化病変の指標であり、実際にACE阻害薬が効果を示している事からも、その作用点が炎症細胞浸潤過程の修飾であるとは考えにくく、それに続く線維芽細胞の増殖と基質産生の過程に注目した。本研究に用いた培養細胞は長期継代維持された不死化細胞株であるが、正常および間質線維化病変を伴った腎臓から別々に樹立された株を用いることで、間質線維化病変成立過程における線維芽細胞の質的变化にも考慮した実験系の採用を試みた。先に示したとおり、IgAN症例の免疫染色結果(Fig. 1c)と同様、使用した培養細胞株も機能しうるAT1Rを発現していた(Fig. 3, 4)。また、同受容体を介したAng II刺激はHk173とHk188において細胞増殖を(Fig. 5)、Hk188においてCOL I産生を惹起したが(Fig. 6)、その作用の一部はAng IIによるTGF- β 1分泌を介していることが示唆された。線維化病変を持つ腎臓から得られた腎線維芽細胞が健常な腎臓から得られたものに比べ、例えばIL-1受容体の親和性やIL-6, 8の産生量の増加、IL-1 β 反応性の増殖能の獲得、細胞外基質の産生亢進などを認め、より線維化を促進する様な表現型を示すことに関しては複数の報告がある²⁷⁻³⁰⁾。本研究により新たにRA系に対しても感受性が亢進していることが明らかになったが、どのような機序で二つの細胞で違いが生じたのかは不明であり、今後の検討課題であると考えた。

Ang IIは多様な細胞内シグナル伝達を介してTGF- β 1をはじめとする様々なサイトカインの発現を調節していると考えられている。またTGF- β 1は多くの器官で、線維芽細胞の増殖と細胞外基質産生に重要な役目を果たしていることが知られており、Ang IIが腎でTGF- β 1発現を刺激することが報告されている³¹⁾。腎垂全摘モデルでは、腎内RA系とTGF- β 1発現が増強しており^{32,33)}、ACEを抑制することでTGF- β 1発現が減少し間質線維化病変を抑制するとの報告がある^{34,35)}。同様のことは糖尿病性腎症³⁶⁾、マウス片側尿細管結紮モデル³⁷⁾、蛋白過剰負荷モデル^{31,38)}でも生じていると考えられる。ACE阻害薬はまたAng II濃度を低くすることによって、副腎からの

ALD分泌を抑制するが、同時にキニン分解も抑制するためブラジキニン(BK)濃度が高まる。近年心臓線維芽細胞で示されているように、本研究においてもALDはHk188の増殖を刺激することが明らかとなった(Fig. 7)。加えて、動物モデルでの検討ではあるが、BK B2受容体刺激はplasminogen activatorの活性とmetalloproteinase-2の増加を通じて細胞外基質の分解を促進し間質線維化病変を縮小すると報告されている³⁹⁾。

本稿の結論を述べる前に、本研究におけるいくつかの問題点を明らかにしておきたい。まず臨床研究の結果であるが、対象であるIgANはいわゆる慢性腎炎の代表的な疾患である。本研究では全例腎生検で確定診断をした患者を対象としたが、この49例の母集団がIgANの本当の母集団を表しているのかどうかは確定できない。観察終了時に再度腎生検を行い、病理組織を得た上で糸球体病変、間質病変を評価してその変化と生理学的腎機能の変化との関連を示すデータをもってはじめて、治療効果を論ずることができるのであるが、腎生検の施行に同意を得ることは比較的困難である。今回対象とした患者でも初回生検時には再度の生検に同意していても、実際に自覚症状のないまま年数が経つと拒絶される例がほとんどであった。この結果本臨床研究では腎機能の変化が糸球体病変に比べて間質病変と関連が強い印象を受けるが、実際には糸球体病変と間質病変はお互いに関係しながら双方が徐々に進行していくものである。これは研究開始時に生理機能検査と病理検査で評価していたものが、終了時には生理機能検査とその推移で評価せざるを得なかった。またIgANに代表される慢性腎炎は、経過の長い疾患であるために、腎生検以前の治療を含む経過が予後にとっては重要な意味を持つ。しかしながら腎生検の適応や行う時期は主治医の主観によって大きく変化するため、本来は以前の治療についても考慮に入れた上で群分けをする必要がある。また、日本人に限っても、angiotensinogen、ACEの遺伝子多型とIgANの腎予後、もしくはACE阻害薬等による治療への感受性との相関があるとする報告もあり⁴⁰⁻⁴³⁾、TIF indexとは独立して本症例のdCCrに影響を及ぼした可能性も否定できない。しかし腎生検の症例数自体が多くないために、本研究の無作為化過程に問題が残されていることも本研究の欠点の1つである。

また、培養細胞系においてもALDの作用に関する知見は近年になって飛躍的に解析が進み、本来のゲノム作用に加え遺伝子の転写活性を介さない非ゲノム作用が注目されている⁴⁴⁾。今回得られた結果はこのいずれによるものかという検討を行わなければ線維芽細胞におけるRA系の機能と影響に対して確信を持って述べるのは難しいと考えている。

結 論

1. IgAN49症例を対象にした臨床研究で、間質線維化病変を伴う症例については、ACE阻害薬がCCBと比較して腎機能障害の進行を効果的に抑制しうることを示した。
2. ACE阻害薬が効果を示した理由として、ALD、Ang IIによる線維芽細胞の増殖と、Ang IIによるCOL I産生を抑制したことが示唆される。
3. 間質線維化病変から樹立された線維芽細胞はRA系に対する感受性が亢進している。
4. ACE阻害薬およびAT1R拮抗薬は広く臨床で利用されている薬剤であり、EBMに基づいた慢性進行性腎疾患に対する進行抑制薬であるが、その機序はいまだ明らかではない。本研究はその機序の一端に言及した。

謝 辞

本研究にあたり、御指導、御協力を頂きました埼玉医科大学腎臓内科学教室 鈴木洋通教授、岡田浩一助教授ならびに教室員各位に深く感謝致します。なお、本研究の一部は第33回、34回米国腎臓学会(Toronto 2000, San Francisco 2001)において発表した。

引用文献

- 1) Suzuki H, Saruta T. An overview of blood pressure regulation associated with the kidney. *Contrib Nephrol* 2004;143:1-15.
- 2) Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, et al. Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334:939-45.
- 3) Ogihara T, Hiwada K, Morimoto S, Matsuoka H, Matsumoto M, Takishita S, et al. Guidelines for treatment of hypertension in the elderly--2002 revised version. *Hypertens Res* 2003;26:1-36.
- 4) Hansson L, Lindholm LH, Ekblom T, Dahlof B, Lanke J, Schersten B, et al. Randomised trial of old and new antihypertensive drugs in elderly patients: cardiovascular mortality and morbidity the Swedish Trial in Old Patients with Hypertension-2 study. *Lancet* 1999;354:1751-6.
- 5) Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 1992;120:893-901.
- 6) McEwan PE, Gray GA, Sherry L, Webb DJ, Kenyon CJ. Differential effects of angiotensin II

- on cardiac cell proliferation and intramyocardial perivascular fibrosis in vivo. *Circulation* 1998;98:2765-73.
- 7) Young M, Head G, Funder J. Determinants of cardiac fibrosis in experimental hypermineralocorticoid states. *Am J Physiol* 1995;269:E657-62.
 - 8) Okada H, Strutz F, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG. Possible mechanisms of renal fibrosis. *Contrib Nephrol* 1996;118:147-54.
 - 9) Okada H, Ban S, Nagao S, Takahashi H, Suzuki H, Neilson EG. Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: An immunohistochemical observation. *Kidney Int* 2000;58:587-97.
 - 10) Kanno Y, Suzuki H, Okada H, Takenaka T, Saruta T. Calcium channel blockers versus ACE inhibitors as antihypertensives in polycystic kidney disease. *QJM* 1996;89:65-70.
 - 11) Inoue T, Okada H, Kobayashi T, Watanabe Y, Kanno Y, Kopp JB, et al. Hepatocyte growth factor counteracts transforming growth factor- β 1 via attenuation of connective tissue growth factor induction and prevents renal fibrogenesis in 5/6 nephrectomized mice. *FASEB J* 2003;17:268-70.
 - 12) Mueller GA, Frank J, Rodemann HP, Engler-Blum G. Human renal fibroblast cell lines (tFKIF and tNKF) are new tools to investigate pathophysiologic mechanisms of renal interstitial fibrosis. *Exp Nephrol* 1995;3:127-33.
 - 13) Inoue T, Okada H, Kobayashi T, Watanabe Y, Kikuta T, Kanno Y, et al. TGF- β 1 and HGF coordinately facilitate collagen turnover in subepithelial mesenchyme. *Biochem Biophys Res Comm* 2002;297:255-60.
 - 14) Remuzzi G, Ruggenenti P, Perico N. Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition. *Ann Intern Med* 2002;136:604-15.
 - 15) Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 1998;339:1448-56.
 - 16) Abbate M, Zoja C, Corna D, Capitanio M, Bertani T, Remuzzi G. In progressive nephropathies, overload of tubular cells with filtered proteins translates glomerular permeability dysfunction into cellular signals of interstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1213-24.
 - 17) Kikuchi H, Kawachi H, Ito Y, Matsui K, Nosaka H, Saito A, et al. Severe proteinuria, sustained for 6 months, induces tubular epithelial cell injury and cell infiltration in rats but not progressive interstitial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:799-810.
 - 18) The GISEN Group. Randomized placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. *Lancet* 1997;349:1857-63.
 - 19) Maschio G, Alberti D, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, Ponticelli C, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and kidney protection: the AIPRI trial. The ACE Inhibition in Progressive Renal Insufficiency (AIPRI) Study Group. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33 Suppl 1:S16-20;discussion S41-3.
 - 20) D'Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy: role of clinical and histological prognostic factors. *Am J Kidney Dis* 2000;36:227-37.
 - 21) Okada H, Inoue T, Kanno Y, Kobayashi T, Watanabe Y, Kopp JB, et al. Interstitial fibroblast-like cells express renin-angiotensin system components in a fibrosing murine kidney. *Am J Pathol* 2002;160:765-72.
 - 22) Eddy A. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 2000;15:290-301.
 - 23) Cao Z, Cooper ME. Role of angiotensin II in tubulointerstitial injury. *Semin Nephrol* 2001;6:554-62.
 - 24) Jover B, Demeilliers B. Angiotensin II type 1 receptor antagonist versus angiotensin I-converting enzyme inhibitor in experimental renal diseases. *Fundam Clin Pharmacol* 2000;14:541-8.
 - 25) Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 1997;52:1497-510.
 - 26) Okada H, Watanabe Y, Inoue T, Kobayashi T, Kikuta T, Kanno Y, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates renal fibrogenesis in an immune-mediated nephritic kidney through counter-activation of angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:403-8.
 - 27) Lonnemann G, Engler-Blum G, Mueller GA, Koch KM, Dinarello CA. Cytokines in human renal interstitial fibrosis. II. Intrinsic interleukin (IL)-1 synthesis and IL-1-dependent production of IL-6 and IL-8 by cultured kidney fibroblasts. *Kidney Int* 1995;47:845-54.
 - 28) Lonnemann G, Shapiro L, Engler-Blum G, Mueller GA, Koch KM, Dinarello CA. Cytokines in human renal interstitial fibrosis. I. Interleukin-1 is a paracrine growth factor for cultured fibrosis-derived kidney fibroblasts. *Kidney Int* 1995;47:837-44.
 - 29) Mueller GA, Rodemann HP. Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: I. Immunophenotyping of cultured tubular epithelial

- cells and fibroblasts derived from kidneys with histologically proven interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 1991;17:680-3.
- 30) Rodemann HP, Mueller GA. Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 1991;17:684-6.
- 31) Border WA, Noble NA. Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 1998;31:181-8.
- 32) Eddy AA, Giachelli CM. Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. *Kidney Int* 1995;47:1546-57.
- 33) Wu LL, Cox A, Roe CJ, Dziadek M, Cooper ME, Gilbert RE. Transforming growth factor b1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: Role of the renin-angiotensin system. *Kidney Int* 1997;51:1555-67.
- 34) Gilbert R, Wu L, Kelly D, Cox A, Wilkinson-Berka J, Johnston C, et al. Pathological expression of renin and angiotensin II in the renal tubule after subtotal nephrectomy. *Am J Pathol* 1999;155:429-40.
- 35) Cao Z, Cooper ME, Wu LL, Cox AJ, Jandeleit-Dahm K, Kelly DJ, et al. Blockade of the renin-angiotensin and endothelin systems on progressive renal injury. *Hypertension* 2000;36:561-8.
- 36) Gilbert RE, Cox A, Wu LL, Allen TJ, Hulthen L, Jerums G, et al. Expression of transforming growth factor-b1 and type IV collagen in the renal tubulointerstitium in experimental diabetes. *Diabetes* 1998;47:414-22.
- 37) Kaneto H, Morrissey J, Klahr S. Increased expression of TGF-beta-1 messenger RNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation. *Kidney Int* 1993;44:313-21.
- 38) Largo R, Gomez-Garre D, Soto K, Marron B, Blanco J, Gazapo RM, et al. Angiotensin-converting enzyme is upregulated in the proximal tubules of rats with intense proteinuria. *Hypertension* 1999;33:732-9.
- 39) Schanstra JP, Neau E, Drogoz P, Gomez MAA, Novoa JML, Calise D, et al. In vivo bradykinin B2 receptor activation reduces renal fibrosis. *J Clin Invest* 2002;110:371-9.
- 40) Nakanishi K, Sako M, Yata N, Aoyagi N, Nozu K, Tanaka R, et al. A-20C angiotensinogen gene polymorphism and proteinuria in childhood IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol* 2004;19:144-7.
- 41) Goto S, Narita I, Saito N, Watanabe Y, Yamazaki H, Sakatsume M, et al. A(-20)C polymorphism of the angiotensinogen gene and progression of IgA nephropathy. *Kidney Int* 2002;62:980-5.
- 42) Maruyama K, Yoshida M, Nishio H, Shirakawa T, Kawamura T, Tanaka R, et al. Polymorphisms of renin-angiotensin system genes in childhood IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol* 2001;16:350-5.
- 43) Narita I, Goto S, Saito N, Song J, Omori K, Kondo D, et al. Angiotensinogen gene variation and renoprotective efficacy of renin-angiotensin system blockade in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2003;64:1050-8.
- 44) Sato A, Liu JP, Funder JW. Aldosterone rapidly represses protein kinase C activity in neonatal rat cardiomyocytes in vitro. *Endocrinology* 1997;138:3410-6.