アンジオテンシン II 受容体過剰発現マウスの食塩負荷による 糸球体増殖変化に対する サイアザイド類似薬インダパミドの効果

桑 哲雄^{1,2}, 上村和秀¹, 尾形曜子¹, 加藤こずえ¹, 篠 道弘²,
呉 俊模³, 野垣文昭³, 伊藤正樹⁴, 小野孝彦^{*1,3}

静岡県立大学薬学部分子病態学¹, 静岡県立静岡がんセンター薬剤部²,
市立島田市民病院腎臓内科³, 千葉科学大学薬学部生化学/応用遺伝子学⁴

Efficacy of Indapamide for Glomerular Hypertrophy due to Salt Loading in Mice with Angiotensin II Receptor Overexpression

Tetsuo Kume^{1,2}, Kazuhide Uemura¹, Yoko Ogata¹, Kozue Kato¹, Michihiro Shino²,
Chunmo Wu³, Fumiaki Nogaki³, Masaki Ito⁴ and Takahiko Ono^{*1,3}

*Division of Molecular Medicine, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences¹,
Department of Pharmacy, Shizuoka Cancer Center², Department of Nephrology,
Shimada Municipal Hospital³, Laboratory of Biochemistry and Molecular Genetics,
Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science⁴*

[Received September 29, 2009]
[Accepted March 29, 2010]

It is well known that salt excess accelerates organ injury when the renin-angiotensin system is activated. In the present study, we investigated the mechanisms by which salt excess causes glomerular injury using AT_{1A} receptor overexpression mice, and evaluated the preventive effect of indapamide, a thiazide-like diuretic. Young AT_{1A} receptor overexpression mice and C57BL/6 mice (wild type normal control) were salt-loaded from 8 to 14 weeks old using 1.5% NaCl in drinking water, and kidney specimens were collected. In the indapamide treatment group, 10 mg/kg body weight of indapamide was administered concomitantly in the drinking water, and the dose adjusted weekly according to body weight measurements.

Although neither strain of mice exhibited a significant increase in blood pressure after such salt loading during the specified period, increased urinary protein excretion was observed in the AT_{1A} receptor overexpression mice, and indapamide blocked this influence of salt loading. There was a slight increase in the number of glomerular cells due to salt loading in the wild type and a marked increase in the AT_{1A} receptor overexpression mice, which was suppressed by indapamide. Immunostaining of angiotensin II receptors revealed a strong reaction in the glomerular mesangial cells in the latter as opposed to a mild reaction in the former. Furthermore, salt loading induced an increase in collagen IV, a major component of the extracellular matrix (ECM), which was suppressed by indapamide. The present findings suggest that blood pressure and glomerular hypertrophy/ECM deposition are not necessarily connected in young AT_{1A} receptor overexpression mice, and that glomerular injury is accelerated by salt loading. Also indapamide appears to be a promising therapy in the case of a salt excess and an activated renin-angiotensin system.

Key words salt, renin-angiotensin system, inflammation, hypertrophy, collagen IV

緒 言

高血圧には、本態性高血圧と2次性高血圧があり、わが国で高血圧症と診断される約90%が本態性高血圧といわれている。血圧が高い状態のまま持続すると、心血管系に障害が生じ、動脈硬化を引き起こしたり狭心症や

心筋梗塞のような虚血性心疾患、脳卒中を発症するリスクが高まる。これまで本態性高血圧の成因には、遺伝的要因として renin-angiotensin (以下、RA と略す)系の遺伝子多型や腎臓からの食塩排泄障害などが挙げられ、さらに心理的ストレス、食塩の過剰摂取、肥満、運動不足、アルコール摂取過多などの環境因子が関わって発症すると考えられている¹⁾。1998年に報告された INTERSALT

* 静岡県島田市野田 1200 5 ; 1200 5, Noda, Shimada-shi, Shizuoka, 427 8502 Japan

研究をはじめとして、多くの観察研究や大規模介入試験によって食塩過剰摂取と血圧上昇の関連が指摘されてきた²⁾。厚生労働省発表の平成 18 年国民健康・栄養調査結果によると(厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室, 平成 18 年国民健康・栄養調査結果の概要, http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/04/h_0430-2.html), わが国で 20 歳以上の 1 日の平均食塩摂取量は 11.2 g(男性 12.2 g, 女性 10.5 g)で, 欧米やわが国のガイドラインによる減塩の目標値である 1 日 6 g 未満に比べると, まだかなり多いといえる³⁾。

RA 系は血圧制御に関わる昇圧ホルモン系である。RA 系の中で重要な生理活性物質である angiotensin (以下, A と略す)は血管収縮物質であるとともに, aldosterone の産生, 分泌を介して Na の貯留にかかわっている。A が作用する A 受容体は, AT₁ 受容体と AT₂ 受容体の 2 種に分類される。AT₁ 受容体は血管収縮, 細胞増殖, 心血管肥大, aldosterone 分泌を引き起こし, 他方, AT₂ 受容体は血管拡張, 細胞増殖抑制, 心血管肥大抑制に働くことが知られている。

腎臓において A は輸出細胞脈の受容体に作用し血管収縮によって糸球体内圧上昇をきたすが, 作用の持続上昇は糸球体肥大を促進し, 進行すると線硬化も加わり腎硬化症に至る。げっ歯類において AT₁ 受容体には, AT_{1A} および AT_{1B} の 2 つのアイソフォームが存在し, Oliver Smithies 教授の研究室などによって行われた遺伝子欠損マウスを用いた検討でその機能が明らかにされてきた⁴⁾。

今回の研究には, Smithies 教授らが作製した AT_{1A} 受容体過剰発現マウスを導入し交配・繁殖したものをを用いた。これは正常マウスの mRNA の 3' 非翻訳領域(3' untranslated region: 以下, 3' UTR と略す)にウシ成長ホルモン(Bovine growth hormone: 以下, bGH と略す)の 3' UTR の特定配列を導入した遺伝子改変マウスである。マウスにおいて mRNA の 3' UTR は AT_{1A} 受容体 mRNA の寿命を規定している。今回用いた遺伝子改変マウスにおいては, 3' UTR に bGH のラストエキソンのストップコドン以降の 101 base pair の配列および GRE という特定配列を導入することにより, AT_{1A} 受容体の mRNA の分解速度が減少して分解が遅延し, その結果 AT_{1A} 受容体の発現量が増加した状態となるようデザインされている。実際にこの AT_{1A} 受容体過剰発現マウスのヘテロ接合体では正常マウスと比較して, 心臓および腎臓における AT_{1A} 受容体の mRNA 発現量が約 1.8 倍であるという報告がなされている⁵⁾。

われわれはこれまで, ループ利尿薬であるフロセミド(furosemide)とサイアザイド類似利尿薬インダパミド(indapamide)の併用療法が, 尿細管の異なった部位で Na 再吸収を相加的に抑制して, 全身性の浮腫に対して有効であることを報告してきた⁶⁾。またアンジオテンシン受容体拮抗薬とサイアザイドとの合剤が, 近年わが国でも各

種臨床現場にもたらされていることと, わが国では食塩過剰摂取傾向であることを踏まえ, AT_{1A} 受容体過剰発現マウスにおける食塩摂取過多による組織障害と indapamide による抑制効果について検討した。

方 法

1. 実験動物

1) AT_{1A} 受容体過剰発現雄性マウスの導入

AT_{1A} 受容体過剰発現雄性マウスは Oliver Smithies 教授(Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of North Carolina at Chapel Hill)らの作製したものを導入し, 実験にはそのマウスを SPF 化し, 静岡県立大学動物実験センター遺伝子組換え動物実験室にて交配, 繁殖した雄性マウスを用いた。また, この AT_{1A} 受容体過剰発現マウスと比較検討するために wild type として C 57 BL/6 雄性マウス(日本クレア(株))を用いた。本動物実験は静岡県立大学動物実験センター運営委員会ならびに遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得たプロトコルに従って行った。

2) Genotype の決定

3 4 週齢のマウスの尾から DNA を抽出し, これを PCR 反応の template とした。PCR reaction mixture は 10 × Ex Taq Buffer (2.5 μl) (Takara), Takara Ex Taq DNA polymerase (0.25 μl) (Takara), dNTP Mixture (4 μl) (Takara), primers (各 0.1 μl), template (3 μl) を total volume 25 μl となるように調製した。forward primer としては, 共通のコーディング領域(CDS)を認識する 5'-AGT·ATT·TCC·TCC·AGC·TCC·TG-3' (1201 1220 の配列を認識)を用い, reverse primer としては wild type の配列を認識する 5'-AGC·AAA·CCG·TTT·TAA·ACC·CAC-3' (1594 1614 の配列を認識)と, 3' UTR に bGH を挿入した配列を認識する 5'-TTA·GGA·AAG·GAC·AGT·GGG·AG-3' (2398 2417 の配列を認識)を用いた。

PCR は GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)により, 98 °で 2 分間変性させ, 98 °を 30 秒, 58 °を 60 秒, 72 °を 90 秒のサイクルを 35 回行い, 72 °で 5 分間という条件下で行った。それにより wild type allele を増幅した 414 bp の断片と, mutant allele を増幅した 228 (+)bp の断片がそれぞれ得られた。PCR 反応後, ethidium bromide solution を加えた 2% アガロースゲルにて電気泳動を行った後, 365 nm の UV にて観察し genotype を決定した。

2. スタディ デザイン

雄性の AT_{1A} 受容体ホモ接合体過剰発現マウスおよび雄性の C 57 BL/6 マウスは標準的な飼料とともに, 8 週齢より自由飲水にて水道水, 1.5% 食塩水(NaCl), および 1.5% NaCl に 10 mg/kg indapamide を加えたものを各群 3 匹ずつに自由飲水にて与え, 静岡県立大学動物実験

センター遺伝子組換え動物実験室にて飼育した⁷⁾。マウスの血圧は非観血式自動血圧測定装置 BP 98 A (Softtron) を用いた tail-cuff 法にて非観血的に 2 週間の慣らし測定の後, 8 週齢から週 1 回測定した。13 週齢において, 静岡県立大学動物実験センター遺伝子組換え動物実験室内で代謝ケージを用い, 24 時間の総尿を採取した。14 週齢にて屠殺して腎組織を採取した。

尿中総蛋白量は各尿サンプルを 10 倍希釈し Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad) を用いた Bradford 法で測定した。これにはサンプル 10 μ l を well plate にアプライし, 染色液 200 μ l を加えた。60 min 以内に 595 nm で吸光度を測定した。Standard としてウシ血清アルブミン (Crystallized; Wako) を用いた。算出された値について, 1 日の尿量により尿蛋白 1 日排泄量を求めた。

3. 組織学的評価

ホルマリン固定したパラフィン包埋切片の脱パラフィンを行い, PAS 染色を行った。糸球体内総細胞数は 1 つのスライドに対し糸球体を無作為に 20 個選び, その糸球体面積, 糸球体内総細胞数をカウントし, 評価した。

酵素抗体免疫染色法には, 腎凍結切片をアセトンで固定し, 0.3% H_2O_2 で処理した後, 正常血清をマウントし 10 分間インキュベートした。正常血清を振り切り, 湿箱中で 1 次抗体として, 抗 AT_1 (N 10) 受容体抗体 sc-1173 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 human CTGF C-terminal peptide 抗体 (Techne), rabbit 由来抗 mouse collagen type IV 抗体 (LSL) あるいは rabbit 由来抗 Human Fibronectin 抗体 (DAKO) を 1 時間インキュベートした後, それぞれの 2 次抗体をマウントし 10 分間インキュベートし, VECTASTAIN ABC Reagent (Vector Laboratories) をマウントし 15 分間インキュベートした後, DAB で発色させた後染色を行い, 脱水, 封入した。

観察にはスライド 1 枚あたり無作為に 20 個の糸球体を選び, 撮影した画像を Photoshop 7.0 (Adobe) を用いて処理した後, Image J 1.41 (Wayne Rasband National Institutes of Health) を用いて糸球体面積における AT_1 受容

体, CTGF, Collagen IV, Fibronectin の陽性面積を測定し, 糸球体面積に対するそれぞれの陽性面積率を比較した。

4. 統計

測定値は Mean $\pm$ S.E.M. で示した。統計的な解析はまず Kruskal-Wallis test を行い, 引き続き Mann-Whitney test を実施した。p 値が 0.05 未満の場合を有意差があると判断した。

結 果

1. 交配個体の AT_{1A} 受容体過剰発現に関する遺伝子型判定

マウスの尾から抽出した DNA を template として, PCR 反応を行い, 得られた PCR 産物のアガロースゲル電気泳動の結果を図 1 に示した。今回の研究では, 200 bp と 300 bp の間のみバンドが得られたマウスを AT_{1A} 受容体過剰発現のホモ接合体として選択した。

2. 収縮期血圧の変化

8 週齢から 13 週齢まで測定した雄性マウスの収縮期血圧の変化を図 2 に示した。以前の検討では 28 30 週齢の雄性マウスに食塩負荷を行い血圧の有意な上昇を認めていたが⁸⁾, 今回の若齢マウスでは各群間に血圧の差は生じなかった。

3. 尿蛋白の変動

1 日の尿蛋白排泄量の結果を図 3 に示した。Wild type の食塩負荷群 (10.4 ± 0.5 mg/day) では wild type の非負荷群 (3.4 ± 0.2 mg/day) に対して 3.1 倍の有意な尿蛋白の増加がみられ, AT_{1A} 受容体ホモ接合型過剰発現マウスの食塩負荷群 (6.8 ± 1.9 mg/day) においても食塩非負荷群 (2.6 ± 0.3 mg/day) に対して 2.6 倍の有意な増加がみられた。また, indapamide 投与群 (2.4 ± 0.3 mL/day) ではホモ接合型, 食塩負荷群と比較して 64% の有意な減少がみられ, 食塩非負荷群と同様の basal level まで抑制され

図 1. AT_{1A} 受容体過剰発現マウスの交配個体の遺伝子型判定

414 bp のバンドは正常遺伝子を, 200 と 300 のマーカーの間の 228 + bp のバンドが組換え遺伝子を示す。A から D までは 228 + bp のバンド 1 本のみを認め, ホモ接合型と判定した。E は 414 bp のバンド 1 本のみを認め, wild type と判定した。F と H は 2 本のバンドを認め, ヘテロ接合型と判定した。G は 228 + bp に薄いバンド 1 本を認めたが, 判定保留としてこの個体は実験には用いなかった。

図2. 雄性マウスの収縮期血圧の変動

A は wild type の食塩非負荷と負荷群での収縮期血圧変動を示し、B は AT_{1A} 受容体過剰発現マウスの食塩非負荷と負荷群、および indapamide 投与群での収縮期血圧変動を示す。A 群と B 群のそれぞれのなかで食塩負荷による有意な変動は認めず、また A 群と B 群の間でも AT_{1A} 受容体過剰発現による影響を認めなかった。IND, indapamide.

た。一方、wild type の食塩負荷群と AT_{1A} 受容体ホモ接合型過剰発現マウスの食塩負荷群の間では、尿蛋白排泄量には統計学的に有意な違いを認めなかった。

4. 組織学的検討

糸球体内細胞数の変化を図4に示した。Wild type マウスでは、食塩負荷(30.8 ± 0.2 個)により非負荷(28.5 ± 0.3 個)に比べて1.1倍の軽度ではあるが有意な増加が観察された。一方、AT_{1A} 受容体ホモ接合型過剰発現マウスの食塩負荷群(44.3 ± 2.4 個)は非負荷群(29.4 ± 0.7 個)に比べて1.5倍に細胞数が有意に増加した。この増加に関して wild type 食塩負荷群(30.8 ± 0.2 個)と比べてホモ接

合型食塩負荷群(44.3 ± 2.4 個)では糸球体内の細胞数が、1.4倍の有意な細胞数増加を示した。さらにホモ接合型の indapamide 投与群(30.9 ± 1.4 個)では、食塩負荷群と比較して30%の有意な抑制がみられた。

5. 免疫組織化学的所見

抗 AT₁ 受容体染色の結果を図5に示した。遺伝子型別に比較すると食塩負荷をしない wild type マウス($17.4 \pm 1.0\%$)に対して AT_{1A} 受容体ホモ接合型過剰発現マウス($34.1 \pm 1.3\%$)では2.2倍の有意な陽性面積率(総糸球体面積比)の増加が観察された。Wild type における食塩負荷($14.83 \pm 1.51\%$)やホモ接合型における食塩負荷($37.1 \pm$

図3. 尿中蛋白排泄量の食塩負荷と indapamide 投与による変動

Wild type マウスの食塩負荷群では非負荷群に対して有意な尿蛋白の増加がみられ, AT_{1A} 受容体ホモ接合型過剰発現マウスの食塩負荷群においても食塩非負荷群に対して2.6倍の有意な増加がみられた。また, indapamide 投与によってホモ接合型, 食塩負荷群と比較して64%の有意な減少がみられ, 食塩非負荷群と同様の basal level まで抑制された。IND, indapamide; * $p < 0.05$ vs. wild water; $p < 0.05$ vs. homo water; and # $p < 0.05$ vs. homo NaCl.

1.8%), さらにホモ接合型 indapamide 投与群($37.1 \pm 3.4\%$)ではそれぞれの系統の非負荷群と比べて有意な変化は認められなかった。

線維化にかかわるサイトカインである CTGF の免疫染色により, wild type マウスでは食塩負荷群($16.0 \pm 1.0\%$)では非負荷群($12.2 \pm 0.3\%$)に比べて1.3倍の有意な増加が観察された。一方, AT_{1A} 受容体ホモ接合型過剰発現マウスの食塩負荷群($20.4 \pm 2.3\%$)は非負荷群($13.1 \pm 1.6\%$)に比べて1.6倍の有意な陽性面積の増加が観察された。そしてこのホモ接合型の食塩負荷群において, 有意ではないものの indapamide 投与によって陽性面積が減少する傾向がみられた($16.2 \pm 2.6\%$) (図6)。

細胞外基質成分の1種である collagen IV の蓄積に関して免疫染色による陽性染色領域を画像解析したところ, wild type マウスでは食塩負荷($18.5 \pm 0.5\%$)により非負荷($14.0 \pm 0.5\%$)に比べて1.3倍の軽度ではあるが有意な増加が観察された。一方, AT_{1A} 受容体ホモ接合型過剰発現マウスの食塩負荷群($22.5 \pm 1.3\%$)は非負荷群($14.1 \pm 0.2\%$)に比べて1.6倍に有意に染色領域面積が増加した。さらにホモ接合型食塩負荷群に indapamide を投与することによって, 37%の有意な染色領域面積の抑制がみられ($14.1 \pm 0.4\%$), control レベルに戻った(図7A)。

別の細胞外基質成分である fibronectin の蓄積に関して同様に評価したところ, wild type マウスでは食塩負荷($20.1 \pm 0.9\%$)により非負荷($17.3 \pm 1.5\%$)に比べて1.2倍の軽度ではあるが有意な増加が観察された。一方, ホモ接合型 AT_{1A} 受容体過剰発現マウスの食塩負荷群($22.3 \pm$

2.0%)は非負荷群($18.2 \pm 1.5\%$)に比べて染色領域の増加傾向はあったものの, 個体間のばらつきの大きさから有意ではなかった。同様に indapamide 投与($16.5 \pm 4.5\%$)によって食塩負荷群と比較して抑制傾向があったが有意ではなかった(図7B)。

考 察

以前, われわれの研究室で行った雄性ホモ接合型 AT_{1A} 受容体過剰発現マウスに食塩負荷をした観察結果では wild type との間に, 軽度であるが有意な収縮期血圧の上昇がみられた。その際用いたマウスの週齢は, 食塩負荷の開始時において28-30週齢であった⁹⁾。今回の研究において, 雄性ホモ接合型 AT_{1A} 受容体過剰発現マウスと, 雄性 wild type マウスとの間に収縮期血圧の有意な差は観察されなかったが, 今回の研究に用いたマウスの週齢は若齢であって, そのことが血圧変動に影響を及ぼした可能性が考えられる。尿蛋白は wild type, AT_{1A} 受容体ホモ接合型過剰発現マウスとも, 食塩摂取により有意な増加がみられた。さらに indapamide 投与によって減少がみられ, basal level まで抑制されたことから, 食塩負荷が糸球体障害を惹起し, indapamide により抑制されたことが示唆された。

糸球体における AT_1 受容体発現を免疫染色により観察したところ, ホモ接合型と wild type との間に有意な染色の増加が観察された。また wild type において食塩負荷により AT_1 受容体発現はやや低下傾向にあった

図4．系球体内細胞数の食塩負荷と indapamide 投与による変動

Wild type マウスの食塩負荷群(B)では非負荷群(A)に対して軽度ではあるが有意な系球体内細胞数の増加がみられた．AT_{1A} 受容体ホモ接合型過剰発現マウスの食塩負荷群(D)においても非負荷群(C)に対して増加がみられた．この増加に関して wild type 食塩負荷群に対してホモ接合型食塩負荷群では系球体内細胞数増加が著明であった．またホモ接合型の食塩負荷に対して indapamide 投与(E)により抑制がみられた．F に変動をグラフで示す．IND, indapamide ; * $p < 0.05$ vs. wild water ; $p < 0.05$ vs. homo water ; # $p < 0.05$ vs. homo NaCl ; and $p < 0.05$: vs. wild NaCl

が、ホモ接合型においては食塩負荷による変動は認められなかった．次に食塩負荷による系球体肥大について検討を行ったが、食塩負荷を行うことにより、ホモ接合型、wild type ともに系球体の肥大、細胞増殖がPAS染色の所見から観察された．また、ホモ接合型、wild type における食塩負荷の系球体細胞数に対する影響を比較すると、系球体の細胞数の増加はホモ接合型マウスにおいて増加が顕著であった．さらにホモ接合型に食塩負荷と

同時に indapamide を投与したところ、食塩負荷群に比べて basal level まで有意に細胞増殖が抑制された．このことから、indapamide が食塩負荷による細胞増殖に対して抑制的に作用することが考えられた．今回の検討において食塩負荷の影響はAT_{1A} 受容体過剰発現マウスのみならず wild type マウスでも認められた．この変化は予備実験で行った系球体細胞増殖の評価に関してAT_{1A} 受容体過剰発現マウスにおいて顕著であったため、仮説と

図5．糸球体におけるAT₁受容体発現の評価

総糸球体面積に対する染色陽性面積率(%)は、遺伝子型間ではwild typeマウス(A)に対してAT_{1A}受容体ホモ接合型過剰発現マウス(C)では顕著な陽性面積率の増加が観察された。食塩負荷(Cはwild type, Dはホモ接合型)やindapamide投与(E)による変化は認めなかった。IND, indapamide; and *p < 0.05 vs. wild type, water.

してヒトにおける食塩摂取過多による影響の違いはAT_{1A}受容体発現量の多寡が関与する可能性を抱くに至った。そこで本実験ではindapamideの効果を食塩負荷のAT_{1A}受容体過剰発現マウスにて行ったが, wild typeにおいても軽度AT_{1A}受容体は発現しているので, 食塩過剰摂取における組織障害のindapamideによる抑制効果はwild typeでも期待できると考えられた。

細胞外基質増加に関して, 今回, 線維化を惹起するサイトカインであるCTGFと, 基質成分のcollagenおよ

びfibronectin染色を行い, 食塩負荷によるCTGFとcollagenの有意な増加と, indapamideによる抑制を認めた。AngiotensinはNF- κ Bを介して, サイトカイン発現などの炎症性の反応をもたらすことが報告されている⁹⁾。またangiotensinによって惹起されたaldosterone分泌は, さらにNADH/NADPHオキシダーゼを活性化し酸化ストレスを引き起こし, 活性酸素はまた細胞の増殖や細胞外基質の構成を変化させる¹⁰⁾。腎障害時にレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系が, 細胞外基

図6. 糸球体におけるCTGF発現の食塩負荷とindapamide投与による変動
Wild typeマウスの食塩負荷群(B)では非負荷群(A)に対して染色陽性面積の有意な増加がみられた。AT_{1A}受容体ホモ接合型過剰発現マウスの食塩負荷群(B)においては非負荷群(A)に比べて顕著な染色陽性面積の増加がみられた。そしてホモ接合型においてindapamide投与(E)によって食塩負荷群と比較して減少する傾向がみられた。Fに変動をグラフで示す。IND, indapamide; and *p < 0.05 vs. wild water; and p < 0.05 : vs. homo water.

質の産生を惹起するサイトカインであるTGF β やCTGF系を亢進させることも近年明らかになっている¹¹⁾。

今回の検討においてホモ接合型, wild typeに食塩負荷を行うことでCTGFとcollagenの産生・蓄積が増加していることから食塩負荷が細胞外基質の増加につながる可能性が示唆された。ごく最近, 食塩負荷がRhoファミリーのRac1の活性化を引き起こし鉍質コルチコイ

ド受容体の活性化を介して腎障害が引き起こされるメカニズムがShibataらによって明らかにされた¹²⁾。この報告は食塩の過剰摂取の害を直接的に解明したものとして注目される。サイアザイド系利尿薬はbenzothiadiazine誘導体で, 遠位尿細管におけるNa⁺-Cl⁻共輸送体を阻害することによりNa⁺の尿中への排泄を増加させることが知られている。indapamideは同様の作用機序を持つがbenzothiadiazine誘導体ではないので, サイアザイド系類

図7．系球体における細胞外基質成分の食塩負荷と indapamide 投与による変動
A に collagen IV 蓄積面積率の解析結果を，B に fibronectin 蓄積面積率の解析結果を示す．IND，indapamide；* $p < 0.05$: vs. wild water； $p < 0.05$ vs. homo water；and # $p < 0.05$ vs. homo NaCl.

似利尿薬と呼ばれている．サイアザイド系利尿薬 trichlormethiazide は尿中 Na^+ 排泄が投与後 12 時間を経過すると治療前よりも低下するのに対し，indapamide は作用が緩徐で長時間持続しリバウンドがみられないことが報告されている¹³⁾．また indapamide はプロスタサイクリン産生により血管拡張作用を有する特徴が知られている¹⁴⁾．そこで過剰に摂取された食塩は indapamide の投与により，持続的に排泄され鉱質コルチコイド受容体の活性化を回避し，食塩過剰摂取の弊害を防ぐことが期待される．

長期の治療効果に関する PROGRESS 試験では，脳梗塞や一過性脳虚血発作の既往がある患者に対してアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬単独よりも indapamide との併用群の方が，大きい降圧効果と有意な脳卒中その他の血管系発作発症の抑制効果があったことが報告されている¹⁵⁾．さらに 2 型糖尿病患者における ADVANCE 試験では，ACE 阻害薬と indapamide の組み合わせ治療は心臓血管系死亡率を低下させるとともに，微量および顕性蛋白尿を減少させて腎症の進展を抑制することが示された¹⁶⁾．興味深いことにこの臨床試験では，これらの

効果は治療前の収縮期圧が 140 mmHg よりも低い患者群と 140 mmHg よりも高い患者群の間で同等の追加治療効果があり、ベースラインの血圧値によらないことが示されている¹⁷⁾。これに関連して、今回の研究では若齢マウスに対する食塩負荷によって血圧値は上昇を認めなかったものの、腎糸球体障害と蛋白尿の増加を認め、また indapamide によって抑制効果が認められた。今後、直接的な血圧上昇を伴わない段階での食塩過剰摂取と臓器障害の関連、ならびにそれに対する薬物療法の臨床的評価も検討を進める必要性が考えられた。今回のわれわれの検討では、食塩負荷による糸球体障害に対して RA 系の亢進が加わることでより障害が加速されることを示している。この食塩過剰摂取による障害の対策として、RA 系の抑制、アルドステロン拮抗薬を用いた抑制、そして利尿降圧薬による治療の三者が考えられるが、indapamide を用いた今回の検討結果から、利尿降圧薬の有望性も示唆された。

結論として、食塩負荷によって、糸球体細胞増殖、細胞外基質産生が引き起こされ、それが AT₁ 受容体を介する angiotensin 刺激によってさらに悪化することが考えられた。Indapamide の投与によって、これらの障害を抑制することが期待できると考えられた。

謝辞 今回実験に使用するマウスを提供していただいた米国 North Carolina 大学 Hyung Suk Kim 教授、Nobuyo Maeda 教授、Oliver Smithies 教授に深く御礼申し上げます。本研究は科研費(#19590152 および #21590172)の助成を受けたものである。

引用文献

- 1) 高田正信, “わかりやすい内科学 第3版”, 井村裕夫編, 文光堂, 東京, 2008, pp. 269 277.
- 2) Intersalt Cooperative Research Group. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion, *BMJ*, **297**, 319 328 (1988).
- 3) 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会, “高血圧治療ガイドライン 2009”, ライフサイエンス出版, 東京, 2009, pp. 31 36.
- 4) M. Ito, M.I. Oliverio, P.J. Mannon, C.F. Best, N. Maeda, O. Smithies, T.M. Coffman, Regulation of blood pressure by the type 1 A angiotensin II receptor gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3521 3525 (1995).
- 5) M. Kakoki, Y.S. Tsai, H.S. Kim, S. Hatada, D.J. Ciavatta, N. Takahashi, L.W. Arnold, N. Maeda, O. Smithies, Altering the expression in mice of genes by modifying their 3' regions, *Dev. Cell*, **6**, 597 606 (2004).
- 6) M. Tanaka, E. Oida, K. Nomura, F. Nogaki, A. Fukatsu, K. Uemura, M. Yashiro, T. Kimura, E. Muso, T. Ono, The Na⁺-excreting efficacy of indapamide in combination with furosemide in massive edema, *Clin. Exp. Nephrol.*, **9**, 122 126 (2005).
- 7) K. Et-Taouil, P. Schiavi, B.I. Lévy, G.E. Plante, Sodium intake, large artery stiffness, and proteoglycans in the spontaneously hypertensive rat, *Hypertension*, **38**, 1172 1176 (2001).
- 8) 大塚秀隆, 上村和秀, 北村久代, 吉川俊博, 大門貴志, 山田浩, 伊藤正樹, 小野孝彦, アンジオテンシン II 受容体過剰発現マウスの食塩負荷血圧変動と性差・組織障害, *Pharma. Medica.*, **27**, 160 162 (2009).
- 9) K. Sekiguchi, X. Li, M. Coker, M. Flesch, P.M. Barger, N. Sivasubramanian, D.L. Mann, Cross-regulation between the renin-angiotensin system and inflammatory mediators in cardiac hypertrophy and failure, *Cardiovasc Res.*, **63**, 433 442 (2004).
- 10) A. Nishiyama, Y. Abe, Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: renoprotective effects of aldosterone blockade, *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, 9 16 (2006).
- 11) G. Wolf, Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway, *Kidney Int.*, **70**, 1914 1919 (2006).
- 12) S. Shibata, M. Nagase, S. Yoshida, W. Kawarazaki, H. Kurihara, H. Tanaka, J. Miyoshi, Y. Takai, T. Fujita, Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease, *Nat. Med.*, **14**, 1370 1376 (2008).
- 13) 中島光好, 橋本久邦, 大口貞雄, 小黒捷義, 野末佳春, 降圧剤 Indapamide の臨床薬理学的検討 - 連続投与による Trichlormethiazide との比較 -, *臨床薬理*, **13**, 383 392 (1982).
- 14) Y. Uehara, H. Shirahase, T. Nagata, T. Ishimitsu, S. Morishita, S. Osumi, H. Matsuoka, T. Sugimoto, Radical scavengers of indapamide in prostacyclin synthesis in rat smooth muscle cell, *Hypertension*, **15**, 216 224 (1990).
- 15) PROGRESS Collaborative Group, Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack, *Lancet*, **358**, 1033 1041 (2001).
- 16) ADVANCE Collaborative Group. Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (the ADVANCE trial): a randomised controlled trial, *Lancet*, **370**, 829 840 (2007).
- 17) B. Waeber, A. de la Sierra, L. M. Ruilope, The ADVANCE trial: clarifying the role of perindopril/indapamide fixed-dose combination in the reduction of cardiovascular and renal events in patients with diabetes mellitus, *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, **9**, 283 291 (2009).