

学位論文題名

Left ventricular hypertrophy is associated with inflammation in sodium loaded subtotal nephrectomized rats

(食塩負荷-部分腎摘ラットモデルを用いた左室肥大と炎症に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 慢性腎不全に患者における左室肥大は心血管系死亡率における最大の risk factor である。左室肥大は多因子性であり、数種類の原因因子が traditional (高血圧、クレアチニン・無機リン等)および non-traditional risk factor (PTH、炎症等)として同定されてきた。これらの因子に加え、近年、血管内皮機能異常の関与が指摘され、新たな non-traditional risk factor として内因性の Nitric Oxide 合成酵素(NOS)阻害因子である Asymmetric dimethylarginine (ADMA)の蓄積が重要であることが報告されてきた。

一方、心腎障害を併発する病態モデルを用いて、PTH、ADMA、内皮障害、炎症と心腎障害との関連を検討した報告は少ない。そこで5/6腎摘による慢性腎不全モデルに0.3%食塩を负荷した高血圧を伴う腎障害モデルを作出し、左室肥大と traditional および non-traditional risk factor との関連、特に ADMA および炎症との関連について検討した。

【材料と方法】 6週齢の雄性 Wister ラットを用い、5/6腎摘を施行した(SNx)。Sham群は腎摘を行わず、切開のみを加えた。SNxラットの一部に術後1週目より0.3% NaClの自由飲水投与による食塩負荷を5週間行った(SNx+NaCl)。食塩負荷開始後、週1回、収縮期血圧(SBP)を測定した。食塩負荷5週目に麻酔下で全採血した後、腎および心組織を採取・固定した。また採取した血漿を用いて生化学検査、副甲状腺ホルモン(PTH)、IL-6、ADMA測定を行った。腎および心組織についてはHE染色とアザン染色標本を作製して病理組織検索を行った。

【結果】 Shamラットに比してSNxラットでは有意な左室肥大が、またクレアチニン、無機リン、ADMA および PTH の有意な上昇が認められた。さらにSNx+NaClラットではSNxラットに比して、すべてのパラメーターで有意な上昇が確認された。またSNx+NaClラットでは食塩負荷の期間に依存したSBPの上昇が観察された。IL-6についてはshamラットとSNxラットとの間で差が認められなかったが、SNx+NaClラットではSNxラットよりも有意な高値を示した。

腎の病理組織学的観察では、SNxラットに明確な糸球体硬化、尿細管拡張、尿円柱、尿細管間質の線維化等の病変が生じ、NaCl投与によりそれらは悪化した。一方、心臓に関してはいずれの投与群でも明確な病理学的変化は認められなかった。

SNxラットでは、尿細管間質への炎症性細胞の浸潤が観察され、SNx+NaClラットではそれが増悪する傾向が認められた。浸潤した炎症性細胞は、大部分がリンパ球、マクロファージ等の単核細胞であった。出現頻度は低いものの、好中球の浸潤も観察された。

多変量の相関解析の結果、左室肥大はPTH、クレアチニン、無機リン、SBP、ADMA、単核細胞浸潤およびIL-6との間に高い相関が認められた。

【考察】 5/6腎摘慢性腎不全モデルに0.3%食塩を负荷した高血圧および左室肥大を伴う

腎障害モデルを作出し、左室肥大と traditional および non-traditional cardiovascular risk factor の関連を検討した。その結果、腎障害モデルの左室肥大は、PTH、クレアチニン、無機リン、SBP、ADMA、単核細胞浸潤および IL-6 との間でそれぞれ高い相関が認められた。これまでに慢性腎不全患者で PTH、無機リン、クレアチニン上昇と心血管系異常の関連が報告されているが、本検討の結果はそれを裏付けるものと考えられた。

さらに本検討では左室肥大への炎症および ADMA の関与に着目した。炎症サイトカインである IL-6 は、単球やマクロファージ等の炎症性細胞だけでなく、腎尿細管上皮細胞でも産生されることが確認されている。さらに最近、尿細管上皮細胞での IL-6 産生が尿タンパクの上昇によって誘導される可能性が報告された。本検討で確認された有意な上昇を示した IL-6 の産生部位についてはまだ解明できていないが、2つの機序が想定された。一つは、SNx で観察され、食塩負荷で増悪した尿細管間質に浸潤した炎症性細胞の寄与であり、腎局所での炎症反応および IL-6 の上昇に寄与した可能性が考えられた。もう一つは、本検討でも尿タンパクの漏出が想定されたが、尿タンパクが刺激となり尿細管上皮細胞での IL-6 産生が亢進した可能性が考えられた。尿タンパクによる尿細管上皮の刺激は、ケモカイン産生も誘導することが報告されている。本検討でも尿細管上皮細胞によるケモカイン産生とそれによって誘導される間質領域への炎症性細胞浸潤が想定され、局所での炎症反応の増悪につながった可能性が考えられた。IL-6 の有意な上昇とその産生部位の特定に関しては、今後更なる検討が必要である。

血管内皮機能に重要な役割を果たす NO は、血管内皮細胞において Arginine から eNOS によって産生される。種々の疾患において NO の産生低下が起こることで、血管内皮機能障害が引き起こされることが知られている。NO 産生能の低下にはいくつかの要因が考えられるが、近年、Arginine の代謝産物、特にメチル化された Arginine を含む蛋白から生成される ADMA が生体内で eNOS を阻害することが知られるようになった。腎不全病態では血中 ADMA 濃度が上昇することが知られている。これは ADMA 代謝酵素の dimethylarginine dimethylaminohydrase (DDAH) が腎に多く分布し、腎機能が低下すると ADMA の代謝低下に伴い、体内での蓄積が増えるためと考えられている。腎不全ラットに DDAH の遺伝子導入を行い、DDAH を強制発現させると、ADMA 低下、高血圧の抑制、腎不全の進展が抑制されるという報告がある。本検討でも ADMA の有意な上昇が観察されており、内皮障害因子として作用し、左室肥大に寄与した可能性が推察された。さらに ADMA は活性酸素種(ROS)発生に関わる NAD(P)H oxidase を活性化することが報告されている。この NAD(P)H oxidase は ROS 発生を介して尿細管上皮細胞での IL-6 およびケモカイン産生に関与するという報告がある。本検討でも ADMA と尿細管間質への単核細胞浸潤に高い相関が見られることから、ADMA は内皮障害因子としてだけでなく、炎症性細胞浸潤および IL-6 産生に対しても重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

【結論】 部分腎摘ラットへの食塩負荷は左室肥大をもたらし、PTH、クレアチニン、無機リン、ADMA、IL-6 の上昇ならびに高血圧がそれぞれ左室肥大と高い相関を示した。それらのうちのどの要因が心血管系の病態進展に深く寄与するか、解明には更なる検討が必要であるが、本検討からは炎症および内皮機能障害が腎不全病態の初期の左室肥大形成に関与している可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 岩 永 敏 彦
副 査 准教授 篠 原 信 雄
副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

Left ventricular hypertrophy is associated with inflammation in sodium loaded subtotal nephrectomized rats

(食塩負荷-部分腎摘ラットモデルを用いた左室肥大と炎症に関する研究)

本研究において、5/6腎摘による慢性腎不全ラットモデルに0.3%食塩を負荷した高血圧を伴う腎障害モデルを作出し、左室肥大と traditional および non-traditional risk factor との関連、特に ADMA (asymmetric dimethylarginine) および炎症との関連について検討した。申請者は、本モデルを精査した所、血圧の上昇に加えて、左室肥大、PTH、クレアチニン、無機リン、ADMA、IL-6 の上昇を確認した。腎局所の病理組織学的観察では、部分腎摘ラットに明確な糸球体硬化、尿細管拡張、尿円柱、尿細管間質の線維化等の病変、尿細管間質への炎症性細胞の浸潤が観察され、食塩負荷によりそれらが増悪する傾向が認められた。また腎局所に浸潤した炎症性細胞は、大部分がリンパ球、マクロファージ等の単核細胞であった。一方、心臓に関してはいずれの投与群でも明確な病理学的変化は認められなかった。多変量の相関解析の結果、本腎障害モデルの左室肥大は、PTH、クレアチニン、無機リン、SBP、ADMA、単核細胞浸潤および IL-6 との間でそれぞれ高い相関が認められ、炎症および内皮機能障害が腎不全病態の初期の左室肥大形成に関与している可能性があることが示唆された。

学位論文発表後、主査(岩永敏彦)から食塩負荷-部分腎摘ラットモデルにおける腎局所浸潤細胞についての質問があり、リンパ球、マクロファージからなる単核細胞であると返答した。また本モデルにおいて、ROS の測定についての質問があり、現段階では解析は実施しておらず、今後検討したいとの回答があった。さらに、PTH 上昇所見から本モデルでの骨への影響についての質問があり、5週時での解剖所見では重篤な異常は認められないこと、本モデルは5週以降体重の減少および2ヶ月ほどで死亡することから、慎重な経過観察を行なう必要があるが、長期検討により骨への影響が確認される可能性があるとの返答があった。次いで副査の篠原信雄准教授から本モデルにおける腎臓摘出の方法についての質問があり、腎動静脈を一時的に結紮後、部分摘出を行い、その切除面に対して医療用接着剤を使用して被覆し、結紮を解いて出血のないことを確認したのち、残存腎を腹腔内に戻して縫合すると述べた。また Sham 群に食塩を負荷したコントロール群の設定について質問があり、本研究では、部分腎摘群に対する食塩負荷の効果を第一目的としてとらえたが、今後検討したいとの返答があった。また、心疾患の観察時期についての質問があり、本モデルは5週以降体重の減少および2ヶ月ほどで死亡することから、慎重な経過観察を

行なう必要があるが、長期検討により心組織への影響が確認される可能性があるとの返答があった。また抗 IL-6R 抗体などを用いた IL-6 シグナル阻害による臨床応用についての質問があり、現段階ではラットに対する抗 IL-6R 抗体は使用可能な状態にはないが、今後本モデルにおいて IL-6 を標的とすることで、新たな治療ターゲットとなり得る可能性があるとの回答した。また副査の西村孝司教授から、ADMA と炎症との因果関係についての質問があり、ADMA の上昇による NO の変動が血管機能障害を介して炎症を惹起すると返答した。また IL-6 の心肥大への関与についての質問があり、最近、IL-6 の infusion により心臓の肥大が生ずる報告があり、詳細な制御機構は明らかにされてはいないが、本モデルにおいても IL-6 の左室肥大への関与があると考えていると述べた。最後に聴講者から透析患者と IL-6 上昇の有無についての質問があり、これまで調べた限り、透析患者での IL-6 上昇に関する報告は見出してはいないと述べた。

この論文は、高血圧を伴う腎障害ラットモデルが新たに確立されたことだけでなく、本モデルを精査した結果、慢性腎障害における心臓左室肥大と炎症の関与を示した点で高く評価され、今後、腎不全病態下での心血管疾患の改善を目指した新規治療法の開発に寄与することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、これまでの研究活動における研鑽なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。