

多発性嚢胞腎におけるトルバプタンとサイアザイド系利尿薬の併用効果：嚢胞抑制と水利尿作用についての検討

著者	王 安邑
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18276号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00125921

博士論文

多発性嚢胞腎におけるトルバプタンと
サイアザイド系利尿薬の併用効果：
嚢胞抑制と水利尿作用についての検討

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻
内科病態学講座腎・高血圧・内分泌学分野

王 安邑

目次

目次.....	1
略語.....	3
博士論文の基礎となる論文	5
要約.....	6
研究背景.....	7
研究目的.....	8
研究方法.....	9
動物実験	9
定量的リアルタイム PCR.....	10
免疫染色分析.....	10
半定量的組織学的分析.....	11
統計分析	12
研究結果.....	13
トルバプタンによる尿排泄に対する HCTZ の効果.....	13
嚢胞サイズと細胞増殖.....	13
Aqp2 調節	14
糸球体濾過率および尿細管糸球体フィードバック.....	14
考察.....	16
尿量に関するメカニズム	17
Aqp2 を介した尿量緩和メカニズム.....	17
GFR を介した尿量緩和メカニズム.....	18
RAAS を介した尿量緩和メカニズム	19

研究限界	19
結論	20
文献	21
図 1 本研究の動物実験プロトコル	28
図 2 トルバプタンと HCTZ の尿量に対する効果	30
図 3 トルバプタンと HCTZ の嚢胞増殖、増大に対する効果	32
図 4 トルバプタンと HCTZ の線維化、虚血に対する効果	33
図 6 尿細管糸球体フィードバックに関連する遺伝子の mRNA 発現	35
図 7 HCTZ が PKD におけるトルバプタン誘導性の多尿を緩和するメカニズム	36
図 8 HCTZ と尿細管糸球体フィードバック	37
表 1 各グループの検査値	38
謝辞	39

略語

本文並び図表中に以下の略語を使用した。

略語	英語	日本語
ADPKD	Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease	常染色体優性多発性嚢胞腎
ANOVA	Analysis Of Variance	分散分析
AQP2	Aquaporin 2	アクアポリン 2
ARB	Angiotensin II Receptor Blocker	アンジオテンシン II 受容体拮抗薬
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate	環状アデノシン一リン酸
Ccnd1	Cyclin D1	サイクリン D1
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid	相補的デオキシリボ核酸
CMC	Carboxymethyl cellulose	カルボキシメチルセルロース
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinases	細胞外シグナル調節キナーゼ
ESRD	End Stage Renal Disease	末期腎不全
HCTZ	Hydrochlorothiazide	ヒドロクロロチアジド
Hif-1 α	Hypoxia Inducible Factor 1 α	低酸素誘導因子 1 α
Kim1	Kidney Injury Molecule-1	腎臓損傷分子 1
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid	メッセンジャーRNA
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin	哺乳類ラパマイシン標的タンパク質
NCC	Sodium Chloride Cotransporter	塩化ナトリウム共輸送体
NHE	Sodium-hydrogen Exchanger	ナトリウム水素交換輸送体
NOS1	Nitric Oxide Synthase 1	酸化窒素シンターゼ 1
PCR	Polymerase Chain Reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
pERK	Phosphorylated Extracellular Signal-regulated Kinases	リン酸化細胞外シグナル調節キナーゼ
PKD	Polycystic Kidney Disease	多発性嚢胞腎
PRA	Plasma Renin Activity	血漿レニン活性

Ptges2	Prostaglandin E Synthase-2	プロスタグランジン E2 合成酵素
QOL	Quality Of Life	クオリティ・オブ・ライフ (生活の質)
qRT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
RAAS	Renin-angiotensin-aldosterone System	レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系
Ren	Renin	レニン
Rplp2	Ribosomal Protein, Lp2	リボソームタンパク質 lp2
SEM	Standard Error Of Mean	標本平均の標準誤差
SMA	Alpha Smooth Muscle Actin	平滑筋アクチン α
Tol	Tolvaptan	トルバプタン

博士論文の基礎となる論文

本研究の研究成果は以下の公表論文として学術誌に投稿した。

Anyi Wang, Takuo Hirose, Yusuke Ohsaki, Chika Takahashi, Emiko Sato, Ikuko Oba-Yabana, Satoshi Kinugasa, Yoshikazu Muroya, Sadayoshi Ito, Takefumi Mori. Hydrochlorothiazide ameliorates polyuria caused by tolvaptan treatment of polycystic kidney disease in PCK rats. Clin Exp Nephrol. Received, Mar 16, 2018. (Manuscript #: CENE-D-18-00136)

要約

背景 トルバプタンはバソプレシン V2 受容体拮抗薬であり、多発性嚢胞腎

(PKD) の嚢胞増大抑制に用いられる。一方で、トルバプタンは水利尿作用により尿量を増加させ、患者の生活の質 (QOL) を低下させる。ヒドロクロロチアジド

(HCTZ) は腎性尿崩症で尿量を減少させることができ、トルバプタン誘発の多尿の軽減にも有効である可能性がある。本研究では、HCTZ とトルバプタンの併用効果を嚢胞腎モデルラット (PCK ラット) を用いて検討した。

方法 雄性 PCK ラットを正常飼料 (Cont)、トルバプタン投与、HCTZ 投与、およびトルバプタン+ HCTZ 投与の 4 つのグループに分け、8 週間飼育した。飼育第 1 週目より正常飼料もしくは 0.05%トルバプタン添加飼料を与え、飼育第 2 週目より溶媒または HCTZ (80 mg/kg bw) を 1 日 1 回経口投与した。週一回、代謝ケージで 24 時間尿を回収して尿量を測定した。8 週間の飼育後、血漿および尿の生化学的検査を行い、組織を組織学的および分子生物学的に解析した。

結果 トルバプタン投与群で 24 時間尿排泄量は有意に増加した。トルバプタン群と比べ、トルバプタンに HCTZ を追加した群では 3 週間経った後で尿量が有意に減少した。嚢胞サイズ、pERK タンパク質発現および Cyclin D1 mRNA 発現はトルバプタン群およびトルバプタン+ HCTZ 群の両方で有意に減少し、HCTZ の投与はトルバプタンの嚢胞抑制効果に影響しなかった。免疫組織染色の結果から尿細管細胞のアクアポリン 2 は、トルバプタン群で管腔側細胞膜から細胞内への再分布し、トルバプタン+ HCTZ 群ではその再分布が減弱していた。また、トルバプタン+ HCTZ 群では血漿レニン活性が有意に上昇し、クレアチニンクリアランスは低下した。

結論 PCK ラットにおいて、HCTZ はトルバプタンの嚢胞増大抑制効果に影響することなくトルバプタン由来の多尿を緩和することができた。HCTZ とトルバプタンの併用は PKD 患者のより良い治療と QOL の改善につながる可能性が示された。

キーワード : V2 受容体アンタゴニスト ; 抗利尿薬 ; 糸球体濾過率 ; 多尿症.

研究背景

多発性嚢胞腎（PKD）は、全世界でおよそ 1,250 万人が罹患する最も多い遺伝性腎疾患である[1]。PKD では両側腎臓に多数の嚢胞が進行性に発生、増大し、隣接する正常な尿細管を圧潰し、最終的に腎不全に繋がる変化をもたらすのが特徴的である。常染色体優性 PKD（ADPKD）は、PKD1 遺伝子（遺伝子座 16p13.3）または PKD2 遺伝子（遺伝子座 4q21）の変異により発症する常染色体優勢の遺伝病である[2、3]。ADPKD は末期腎不全（ESRD）の主要な遺伝的原因であり[4,5]、欧州および米国で腎代替療法を必要とする ESRD 患者の約 5~10%を占めている[6]。本邦では人口 10 万人対の有病率は 11.67 であり、これは日本人 8567 人に 1 例が ADPKD 患者であると言い換えられる[7]。トルバプタンが使用されるまで ADPKD に対し有効な治療法はなく、また、診断を受けていない ADPKD が多く存在すると想定されており、今後患者数が増加すると考えられている。

トルバプタンは選択的バソプレシン V2 受容体拮抗薬であり、細胞内アデニル酸シクラーゼの活性化を阻害して環状アデノシンーリン酸（cAMP）産生を抑制することにより嚢胞増大を抑制する。世界 15 カ国 1445 名の ADPKD 患者を対象に 3 年間にわたりトルバプタンもしくはプラセボを投与した国際共同試験（TEMPO 3 : 4 試験）[8]において、トルバプタンは腎保護効果を示し、腎容積増加および腎機能低下を有意に抑制した。また、この結果は、日本人患者のみのサブグループ解析においても確認された[9]。しかし、V2 受容体拮抗薬には水利尿作用により尿量を増加させるため、トルバプタンを用いた治療では副作用として多尿が問題となる。深刻な場合、1 日の尿量は 8~10 L に達し[10]、患者は頻回の排尿を余儀なくされ、生活の質（QOL）に大きな悪影響をもたらす。また、上部尿路の圧力の上昇と共に、尿路拡張、水腎症、最終的には腎機能の喪失のリスクも増加する。この多尿症から腎機能低下への変化は、尿崩症と心因性多飲症の患者で多く報告されている[11-14]。

サイアザイド系利尿薬の 1 つであるヒドロクロロチアジド（HCTZ）は、中枢性および腎性の尿崩症の治療薬で使われており、多尿と尿浸透圧の改善に有効的である[15-17]。トルバプタンで PKD を治療する際の多尿症は、腎性尿崩症と同じく、

V2 受容体が循環中のバソプレッシンに反応しないというメカニズムによる。従って、このトルバプタンによる多尿も HCTZ で治療できる可能性が示唆される。

動物実験モデルは疾患の発症や進行を解析するため、また、新規治療法をヒトに施す前に試すために用いられる実験系である。PKD の動物実験モデルの 1 つとして PCK ラットが存在する。PCK ラットは、クローズドコロニーの Sprague-Dawley の中に自然発症した嚢胞性腎臓疾患ラットから確立された系統である[18]。その特徴として、進行性の嚢胞形成、cAMP の腎内蓄積、アデニリルシクラーゼおよび ERK シグナルリングの異常な活性化など有している[19]。原因遺伝子は、ヒトの常染色体劣性多発性嚢胞腎症 (ARPKD) に関連する遺伝子 PKHD1 であるが、表現型はヒト ADPKD の臨床的および形態学的側面に類似している[19]。

研究目的

以上の背景より、本研究ではトルバプタンによる多尿が HCTZ により緩和できると仮説を立てた。本仮説を検証するため、PCK ラットを用いてトルバプタンによる水利尿作用に対するサイアザイド利尿薬の効果と尿排泄量で評価した。また、トルバプタンと HCTZ の併用の効果を組織学的および分子生物学的に解明するため、トルバプタンの嚢胞増大抑制効果に対する HCTZ の影響、HCTZ の抗利尿効果に対する制御機構の検討を行った。

研究方法

動物実験

動物実験は、国立大学法人東北大学により作成された「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程」および「実験動物の管理と使用に関する指針」に基づいて行った。また、本研究の動物実験計画は国立大学法人東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会の承認を得ている（許可番号：2015 医動-085、2016 医動-177）。

雄性 PCK ラット（ $n = 42$ 、5~7 週齢、Charles River Laboratories）を 4 つのグループに分け、8 週間飼育した（図 1）。トルバプタンの投与にはトルバプタン添加飼料（0.05% Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan）を用い、対照には標準タンパク質飼料を用いた。HCTZ（80 mg/kg /日; Sigma-Aldrich, St.Louis, CA）は CMC（カルボキシメチルセルロース）に溶解して経口投与し、対照には CMC を用いた。HCTZ 投与量は、人間での HCTZ 投与量[20]から、ラットとヒトの表面積対体積比の違いに基づいた薬物の毒性と効果の用量換算式[21][22]を用いて計算し、本実験の HCTZ 投与量を 80 mg/kg とした。グループの詳細は以下の通りである：

- I. Cont グループ（ $n = 10$ ）：
標準タンパク質飼料、CMC 経口投与。
- II. HCTZ グループ（ $n = 10$ ）：
標準タンパク質飼料、HCTZ（80 mg/kg /日）経口投与。
- III. Tol グループ（ $n = 10$ ）：
トルバプタン添加飼料（0.05%）、CMC 経口投与。
- IV. Tol + HCTZ グループ（ $n = 12$ ）：
トルバプタン添加飼料（0.05%）、HCTZ（80 mg/kg /日）経口投与。
ラットには飼料（処理および未処理）および水道水を自由に与え、温度（ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ）と湿度（ $55 \pm 10\%$ ）、明暗時間（12 時間サイクル）を一定とした環境で飼育した。実験期間中、週一回代謝ケージにて 24 時間尿収集して、24 時間の尿排出量を測定した。血圧は tail cuff 法で測定した。8 週間後、HCTZ の経口投与の翌日にラットを断頭にて屠殺し、頸動脈から血液を回収した。染色用の腎臓は秤量

後、直ぐに肝臓と一緒に 10%ホルマリン (Mildform、Wako Pure Chemical Industries、Osaka、Japan) にて固定し、その後パラフィンに包埋した。一方、遺伝子発現解析のための腎臓は冠状面で分割して弓状動脈を目印に目視にて皮質を髄質外層から単離し、髄質内層を切り放すことで髄質外層を単離し、直ちに液体窒素の中で急速凍結し、RNA 抽出を行うまで-80℃で保存した。

回収した血漿および尿の生化学検査は長浜ライフサイエンスラボラトリー (Nagahama、Japan) にて行われた。

定量的リアルタイム PCR

-80℃で保存された腎臓は Trizol (Invitrogen、Carlsbad、CA) を用いて total RNA を抽出した後、DNase I (Invitrogen) により混入したゲノム DNA を分解した。SuperScript III First-strand Synthesis SuperMix (Life Technologies、Carlsbad、CA、USA) を用いて cDNA を合成した後、SYBR Premix Ex Taq II 試薬 (TaKaRa、Shiga、Japan) と CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA) を用いて定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) を行った。

サイクリン D1 (Ccmd1)、神経型一酸化窒素合成酵素 (Nos1)、プロスタグランジン合成酵素 E2 (Ptges2)、レニン (Ren)、アクアポリン 2 (Aqp2)、およびリボソームタンパク質 lp2 (Rplp2) の遺伝子特異的プライマーは TaKaRa から購入した。目的遺伝子の mRNA 発現量はハウスキーピング遺伝子 Rplp2 の発現量を内標準として補正した。

免疫染色分析

免疫組織染色およびマッソン・トリクローム染色のために、パラフィン包埋腎組織からパラフィン切片 (厚さ 2.0 μm) を作製した。切片はキシレンで脱パラフィンした後、エタノールで親水処理した。10 mM クエン酸緩衝液 (pH = 6.0) で 5 分間マイクロウェーブにより抗原賦活化して Protein Block Serum-Free 試薬 (X0909、Dako、Glostrup、Denmark) でブロッキングした後、一次抗体を 4℃で一晩インキュベートした。一次抗体として、抗リン酸化細胞外シグナル調節キナ

ーゼ (pERK) 1/2 抗体 (1 : 300、M8159、Sigma-Aldrich) 、抗腎臓損傷分子 1 (Kim1) 抗体 (1 : 1250、AF3689、R&D Systems Minneapolis、MN) 抗 Aqp2 抗体 (1 : 3000、A7310、Sigma-Aldrich) 、抗低酸素誘導因子 1 α (Hif-1 α) 抗体 (1:100、M0851、Dako Denmark) と抗平滑筋アクチン α (SMA) 抗体 (1:800、NB100-105、Novus Biologicals) を使用した。0.03% tween-20 を含むリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した後、切片に Histofine Simple Stain MAX PO (Nichirei、Tokyo、Japan) または蛍光プローブで標識された二次抗体 (Alexa Fluor 488 もしくは Alexa Fluor 555、1 : 1000、Molecular probes、Eugene、OR) を滴下して 37°C で 30 分間インキュベートした。免疫染色は 3,3'-ジアミノベンジジン (DAB、Dojindo、Kumamoto、Japan) で可視化してヘマトキシリンで対比染色した。光学顕微鏡 (DMi8 ; Leica、Wetzlar、Germany) を用いてスライドを撮影、デジタル化した。蛍光染色を行った切片は、核を Hoechst 33342 (Molecular probes) で標識し、共焦点レーザー電子顕微鏡 (Leica TCS-SP8 ; Leica) で観察した。

半定量的組織学的分析

顕微鏡 (BZ-9000 All-in-one Fluorescence Microscope、Keyence Corporation) を使用して、全皮質、髄質および乳頭を含むマッソン・トリクローム染色切片 (2.0 μ m) 、pERK 染色切片の全スライドデジタル画像 (20 倍の倍率) を取得した。嚢胞サイズ、pERK 陽性領域の計算には ImageJ (Version 1.48v) を用い、全ての組織形態計測分析は、グループ割り当てにブラント的に行われた。嚢胞サイズは以下の計算式を用いて算出した[23,24] :

$$\text{嚢胞インデックス (\%)} = \text{全嚢胞面積} / \text{総組織面積} \times 100$$

PCK ラットモデルの嚢胞は、その大部分が腎髄質に存在しており、先行研究[25] と同様に嚢胞以外の残存髄質に対する pERK 陽性領域のパーセンテージを算出した :

$$\text{pERK 陽性領域 (\%)} = \text{髄質の pERK 染色陽性面積} / \text{総髄質面積} \times 100$$

統計分析

値は平均±標準誤差 (SEM) として示した。データは分散分析 (ANOVA) を行い、グループ間の比較には Tukey's HSD (honestly significant difference) test を用いた。p 値 0.05 未満を統計学的有意とした。

研究結果

トルバプタンによる尿排泄に対する HCTZ の効果

尿量はトルバプタン投与ラットで有意に増加した (図 2a)。Tol + HCTZ グループでは、HCTZ 投与 3 週間後から尿量が有意に減少した (第 4 週、Tol グループ vs Tol + HCTZ グループ ; $p = 0.044$ 、図 2a)。8 週間後の尿量は Cont グループで $16.5 \pm 0.8 \text{ mL}$ 、HCTZ グループで $18.6 \pm 1.3 \text{ mL}$ 、Tol グループで $48.2 \pm 2.6 \text{ mL}$ 、Tol + HCTZ グループで $32.2 \pm 3.0 \text{ mL}$ であった (図 2b)。

先行研究[24,26]と同様に、V2 受容体アンタゴニストであるトルバプタンは PKD の進行を阻害し、腎臓のクレアチニンクリアランスを改善した (表 1)。

Cont グループ ($1.39 \pm 0.5 \text{ mg/d}$) と Tol グループ ($1.95 \pm 0.2 \text{ mg/d}$) と比べ、HCTZ グループ ($0.76 \pm 0.3 \text{ mg/d}$) および Tol + HCTZ グループ ($0.77 \pm 0.3 \text{ mg/d}$) の尿中カルシウム排泄は有意に低下していた。一方、Tol + HCTZ グループにおける血漿レニン活性 (PRA) は、Cont グループ ($p = 0.046$) と Tol グループ ($p = 0.005$) と比べて上昇していた (表 1)。また、血圧 ($n=4$) は 8 週間の実験中グループ間に有意な差は認められず、これは PCK ラットと V2 受容体拮抗薬を用いた先行研究 [27][28]と一致していた。

嚢胞サイズと細胞増殖

嚢胞サイズは、Cont グループに比べ、Tol グループおよび Tol + HCTZ グループで有意に減少していた (図 3a、b)。pERK 発現は主に髄質で認められ (図 3c)、Kim-1 と pERK 抗体の二重染色ではほぼすべての Kim-1 陽性領域が pERK 陽性であった (図 3d)。Cont グループに比べ、Tol グループおよび Tol + HCTZ グループで pERK 陽性領域が有意に減少していた (図 3e)。嚢胞サイズおよび pERK 陽性領域の両者とも、Tol グループと Tol + HCTZ グループとの間に有意な差は認められなかった (図 3b、e)。SMA の染色では、陽性領域が嚢胞の周囲に観察され、嚢胞の大きさに一致し、同じ傾向を示した (図 4a)。

PCK ラットは、腎臓と肝臓での進行的嚢胞形成を特徴としている[18][19]。腎臓における SMA 染色は、陽性領域が嚢胞の周囲に観察され、嚢胞の大きさに一致していた (図 4a)。加えて、肝嚢胞における Tol の効果を評価するために低酸素マーカ

ーである Hif-1 α 染色を行った。嚢胞により毛細血管が圧迫され低酸素状態となるため、Hif-1 α 陽性領域は嚢胞の大きさに一致するが、Tol グループおよび Tol + HCTZ グループで改善を見られた (図 4b)。

続いて、qRT-PCR により pERK の下流である細胞増殖マーカー Ccnd1 に対するトルバプタン、HCTZ の効果を検討した。図 3f に示した通り、Ccnd1 mRNA 発現は、Tol グループおよび Tol + HCTZ グループの腎臓髄質において、Cont グループと比較して有意に低かった。また、Tol グループと Tol+HCTZ グループとの間に有意な差は認められなかった。

Aqp2 調節

トルバプタンは集合管細胞における Aqp2 の発現・局在の調節に関与している [29,30]。加えて、Aqp2 は集合管に存在する水チャネルであり、HCTZ の抗利尿作用にも寄与し得る。よって、本研究では Aqp2 の発現および細胞内局在に対する HCTZ の影響を検討した [31,32]。

Aqp2 mRNA 発現は、Tol グループおよび Tol + HCTZ グループの腎皮質において、Cont グループと比較して有意に減少した (図 5a)。Cont グループと HCTZ グループ、または Tol グループと Tol + HCTZ グループとの間に有意差は認められなかった。髄質での Aqp2 mRNA の発現はグループ間で有意差はなかったが (図 5b)、皮質と同じく集合管で管腔側の細胞膜から細胞内への Aqp2 の再分布が Tol グループにて観察された。この再分布は Tol + HCTZ グループでは一部緩和していた (図 5c、d)。

糸球体濾過率および尿細管糸球体フィードバック

腎機能の有意な改善の他に、糸球体濾過率 (GFR) に対する負の効果が Tol + HCTZ グループで観察された (表 1)。その原因を明らかにするため、尿細管糸球体フィードバック [33] に着目し、本フィードバックに関連する遺伝子 Nos1、Ptges2 および Ren mRNA 発現を検討した (図 6)。いずれの遺伝子も皮質では mRNA 発現に有意な変化が認められなかった (図 6a、c、e)。一方、髄質では Ren mRNA 発現が HCTZ グループと比較して Tol + HCTZ グループで低下し、

Nos1 と Ptges2 の mRNA 発現は Tol グループと Tol + HCTZ グループとも Cont グループに比べて低下していた (図 6b、d、f)。

考察

トルバプタンは ADPKD 患者の腎機能保護に有益な薬剤であるが、その水利尿作用により多尿をもたらす。HCTZ は、多尿を改善できる薬剤として尿崩症に用いられてきた。しかしながら、PKD における HCTZ とトルバプタンの併用療法は、これまで検討されていない。臨床では高血圧症の治療として、利尿薬である HCTZ がトルバプタンと併用されることもあるが[34]、本研究のように嚢胞腎の治療中での尿量改善についての検討は今までされていない。雄性 PCK ラットを用いた本研究の結果として、血圧は影響されないまま、嚢胞が集中する髄質での嚢胞サイズ、pERK 活性および細胞増殖が Tol 投与および Tol + HCTZ 投与の両グループで抑制され、かつ、Tol 投与に比べ Tol+HCTZ 投与したグループで尿量が抑制された。即ち、HCTZ は PKD に対するトルバプタンの有益な効果に影響せず、トルバプタンによる多尿を緩和することが可能であった。本研究で検討したメカニズムを図 7 にまとめた。

バソプレッシン V2 受容体とその下流である cAMP シグナル伝達系は、PKD の病因として重要な役割を果たしている[35]。このシグナル伝達系において、ERK 活性および細胞増殖の増加に伴う腎傷害および間質線維化は、嚢胞の増殖および増大に必要な因子である[37-39]。本研究ではすべての Kim-1 陽性領域が主に髄質特に嚢胞性細胞に形質転換または変換しようとしている管状上皮細胞において観察され、pERK 陽性であった。また、腎尿細管上皮細胞の不適切な増殖および分化は PKD の嚢胞形成に繋がる[40,41]。本研究において、pERK の下流かつ細胞周期の主要な調節因子であり細胞増殖マーカーとして用いられる Ccnd1 は、Tol グループおよび Tol + HCTZ グループの両腎臓において遺伝子発現が有意に低下していた。即ち、HCTZ はトルバプタンの cAMP/ERK/Ccnd1 経路を介した嚢胞サイズ抑制効果に影響していないことが明らかとなった。嚢胞形成による嚢胞周囲の圧迫と組織障害には炎症と線維化が関連しているが[40,41]、本実験の線維化マーカー SMA と低酸素マーカー Hif-1 α の染色結果 (図 4a, b) は、この先行研究に一致する結果である。

尿量に関するメカニズム

HCTZ は中枢性および腎性尿崩症において多尿を減少させるのに有効な薬物であり[15,17]、50年以上に渡り臨床に用いられている。しかしながら、HCTZ や他のサイアザイド系利尿薬の抗利尿効果のメカニズムは依然として不明なままである[15,16]。サイアザイドは遠位尿細管における塩化ナトリウム共輸送体 (NCC) を阻害し、腎臓のナトリウム再取り込みを減少させ、一時的な低ボリューム状態を全身に來たし、GFR 減少およびレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (RAAS) の活性化で、近位尿細管ナトリウムおよび水の再吸収を補償的に増加させ、抗利尿効果を引き起こすという機序が報告されてが[32]。しかしながら、このメカニズムだけでは完全に説明することは不可能である。

Aqp2 を介した尿量緩和メカニズム

リチウム誘発性尿崩症ラットを用いた先行研究では、HCTZ は腎臓の Aqp2 発現を一部有意に増加させることが報告されている[36]。また、Cesar らの単離したラット集合管を用いた検討[31]では、HCTZ が直接水の再吸収を増加させることが報告されている。即ち、サイアザイドは腎集合管主細胞のバソプレッシン/AQP2 系に直接作用して水の再吸収を増加させ、尿量を減らしている可能性が示唆される。よって、本研究では、HCTZ がトルバプタンによる Aqp2 調節にどのような影響を与えるかを遺伝子レベル、タンパク質発現レベルで検討した。定量的リアルタイム PCR から、トルバプタンを投与したグループ (Tol グループ、Tol+HCTZ グループ) の腎皮質における Aqp2 mRNA 発現は、トルバプタンを投与しなかったグループ (Cont グループ、HCTZ グループ) と比較して有意に減少していた。これは、他のバソプレッシン拮抗薬を用いたラット急性および慢性実験の結果と一致している[42,43]。しかし、腎髄質における Aqp2 mRNA 発現には変化は認められなかった。嚢胞における Aqp2 発現は非嚢胞性尿細管と比較して有意に低いことが報告されている[44]。本研究ではトルバプタンを投与したグループ (Tol グループ、Tol+HCTZ グループ) で髄質内で起こっている不適切な増殖および分化が抑制されており、トルバプタンを投与しないグループ (Cont グループ、HCTZ グループ) に比べ正常な尿細管細胞の割合が増加していると考えられる。したがって、トルバプ

タンで抑制される Aqp2 発現は、トルバプタンによる嚢胞増大抑制で正常細胞の割合が増加することによりマスクされている可能性がある。

また、バソプレッシン V2 受容体拮抗薬は cAMP 系や Wnt 系を介して Aqp2 リン酸化を抑制することにより Aqp2 の細胞膜への局在を抑制する[29]。本研究の免疫組織化学的検討から、腎臓の皮質および髄質集合管の両者において管腔側細胞膜から細胞内への Aqp2 の再分布が Tol グループで確認された (図 5d)。この細胞内への再分布は Tol+HCTZ グループで一部緩和しており、トルバプタンの多尿に対し HCTZ が有効である作用機序に Aqp2 の再分布が関与していると考えられる。

GFR を介した尿量緩和メカニズム

NCC ノックアウトマウスを用いた尿崩症モデルでの検討で HCTZ が NCC とは関係なしに尿量を有意に減少させることが報告され、そのメカニズムとして尿細管糸球体フィードバックによる GFR 減少が関わると、先行研究で提唱されている[46]。即ち、サイアザイド系利尿薬は炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase) に対して抑制効果があり[45]、HCTZ は腎臓の近位尿細管における炭酸脱水酵素を抑制することで H^+ 生成を減少させ、ナトリウム水素交換輸送体 (NHE) 活性を低下させ近位尿細管におけるナトリウムの再吸収を抑制している可能性がある。結果として、緻密斑へ流れていくナトリウム濃度が増加し、尿細管糸球体フィードバックが働いて GFR の低下をもたらす尿量を減らす[46] (図 8)。

HCTZ が炭酸脱水酵素を抑制することで尿量が減るという本仮説は、HCTZ の代わりに炭酸脱水酵素阻害剤であるアセタゾラミドを用いた検討により再現されている[47]。しかしながら、HCTZ の主たる効果は遠位尿細管における Na^+/Cl^- 共輸送体を阻害して Na^+ と Cl^- の再吸収を抑制することによる利尿作用であり、本仮説による抗利尿薬作用が尿量抑制にどの程度寄与しているか不明である。そこで私は尿細管糸球体フィードバックがどのような影響を受けているか調べるため、Ptges2 および Nos1 の遺伝子発現を検討した。Nos1 は腎臓において緻密斑に特異的に発現しており[46]、尿細管糸球体フィードバックおよびレニンシグナル伝達系において重要なタンパク質である[48,49]。Ptges2 はプロスタグランジン E2 合成と放出、緻密斑におけるレニン放出シグナル伝達系の重要な因子の一つである[50,51]。

本研究において、髄質の Nos1 と Ptges2 の遺伝子発現は有意に低下していた。バソプレシンが腎臓髄質の Nos1 遺伝子発現と関係することは摂水制限のラットでの実験で既に報告されており[52]、バソプレシンアンタゴニストで Nos1 発現が抑制された先行研究の結果[53]も本研究と一致する。しかしながら、Tol+HCTZ グループと Tol グループの両者とも皮質における Nos1、Ptges2 の遺伝子発現に有意な変化は認められなかった。加えて、Ren 発現も髄質において有意に低下していたが、皮質で有意差は認められなかった。また、Tol+HCTZ グループと Tol グループの間に Nos1、Ptges2 および Ren の遺伝子発現に有意な差は認められなかった。以上より、本研究では HCTZ が尿細管糸球体フィードバックを介して尿量を減らすという仮説に対するエビデンスは得られなかった。

RAAS を介した尿量緩和メカニズム

本研究では Tol + HCTZ グループでクレアチンクリアランスが低下し、PRA が上昇していた。よって、本研究で認められた利尿剤である HCTZ の抗利尿効果は前述の Aqp2 や GFR を介したメカニズムの他に、RAAS を介したメカニズムも関与している可能性がある。HCTZ に対する代償応答[54,55]としてアンジオテンシン II レベルが上昇し、近位尿細管のナトリウム - 水素交換体に作用して[56]ナトリウム再吸収を増加させる。また、RAAS が亢進した状況では尿細管糸球体フィードバックも亢進しており[57]、上記の尿細管糸球体フィードバック関連のメカニズムと合わせ、GFR の低下を来たして抗利尿効果を示す。

研究限界

本実験では腎臓髄質の Nos1 および Ptges2 の遺伝子発現は、Tol+HCTZ グループと Tol グループの間に有意な差が認められず、HCTZ による尿量減少に尿細管糸球体フィードバックの関与を示唆するエビデンスは得られなかった。尿細管糸球体フィードバックによる GFR 減少で尿量が減るかどうかを明らかにするには、微小灌流法で緻密斑での特異的变化を検証する等の更なる実験が必要である。

PCK ラットはヒト ADPKD の臨床的および形態学的側面に似た表現型を示し[19]、PKD 関連の研究に頻繁に用いられている。そして、この PCK ラットを含む

嚢胞性腎臓疾患モデル動物を用いた基礎研究により PKD の病態生理が解明されるに
したがって、バソプレシン V2 受容体、mTOR（哺乳類ラパマイシン標的タンパク
質）等、細胞内外の分子標的をターゲットにした新たな薬物療法が検討されている
[4]。しかし、PCK ラットの原因遺伝子は PKHD1 で常染色体劣性遺伝であり、ヒト
ADPKD の原因遺伝子 PKD1、PKD2 とは異なる。また、本研究では雄性 PCK ラッ
トのみを用いた。PCK ラットでは肝嚢胞形成に対する感受性に性差は認められない
が、腎嚢胞形成に対する感受性は雄性 PCK ラットで雌性 PCK ラットに比して高い
[19]。また、生存期間も雌性 PCK ラットの方が長いと報告されている[18]。従っ
て、トルバプタンや HCTZ の嚢胞抑制効果にも性差が影響する可能性が存在する。
PKD 治療に対するトルバプタンと HCTZ の併用療法の有用性を明らかにするには、
他の PKD モデル動物、もしくはヒトの ADPKD 患者を対象とした更なる検討が必要
である。

結論

本研究では、PCK ラットにおける PKD 治療薬としての HCTZ とトルバプタンの
併用効果を検証した。HCTZ はトルバプタンの嚢胞増大抑制効果に影響せず、水利
尿作用による尿量増加を緩和した。私の知る限り、PKD に対して HCTZ とトルバプ
タンの併用療法を検討した研究はこれが初めてである。ADPKD 患者における併用
療法の腎保護効果を明らかにするためにはさらなる研究が必要であるが、私の動物
実験の結果はトルバプタンの負の影響を最小限に抑えるための新しい選択肢の可能
性を示唆している。この新たな併用療法は、PKD 治療の改善と患者の生活の質の改
善につながるであろう。

文献

1. Chapman AB, Devuyst O, Eckardt KU, et al. Autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): executive summary from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int.* 2015;88(1):17-27.
2. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. *Cell.* 1994;77(6):881-94.
3. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, et al. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science.* 1996;272(5266):1339-42.
4. Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet.* 2007;369(9569):1287-301.
5. Collins AJ, Foley RN, Herzog C, et al. US Renal Data System 2012 Annual Data Report. *Am J Kidney Dis.* 2013;61(1 Suppl 1):A7, e1-476.
6. Martínez V, Comas J, Arcos E, et al. Renal replacement therapy in ADPKD patients: a 25-year survey based on the Catalan registry. *BMC Nephrol.* 2013;14:186.
7. Higashihara E, Nutahara K, Kojima M, et al. Prevalence and renal prognosis of diagnosed autosomal dominant polycystic kidney disease in Japan. *Nephron.* 1998;80(4):421-7.
8. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, et al. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 2012;367(25):2407-18.
9. Muto S, Kawano H, Higashihara E, et al. The effect of tolvaptan on autosomal dominant polycystic kidney disease patients: a subgroup

- analysis of the Japanese patient subset from TEMPO 3:4 trial. *Clin Exp Nephrol*. 2015;19(5):867-77.
10. Casteleijn NF, Messchendorp AL, Bae KT, et al. Polyuria due to vasopressin V2 receptor antagonism is not associated with increased ureter diameter in ADPKD patients. *Clin Exp Nephrol*. 2017;21(3):375-382.
 11. Hora M, Reischig T, Hes O, Ferda J, Klecka J. Urological complications of congenital nephrogenic diabetes insipidus--long-term follow-up of one patient. *Int Urol Nephrol*. 2006;38(3-4):531-2.
 12. Higuchi A, Kawamura T, Nakai H, Hasegawa Y. Infrequent voiding in nephrogenic diabetes insipidus as a cause of renal failure. *Pediatr Int*. 2002;44(5):540-2.
 13. Maroz N, Maroz U, Iqbal S, Aiyer R, Kambhampati G, Ejaz AA. Nonobstructive hydronephrosis due to social polydipsia: a case report. *J Med Case Rep*. 2012;6:376.
 14. Singh H, Linas SL. Compulsive water drinking in the setting of anticholinergic drug use: an unrecognized cause of chronic renal failure. *Am J Kidney Dis*. 1995;26(4):586-9.
 15. Crawford JD, Kennedy GC, Hill LE. Clinical results of treatment of diabetes insipidus with drugs of the chlorothiazide series. *N Engl J Med*. 1960;262:737-43.
 16. Al nofal A, Lteif A. Thiazide Diuretics in the Management of Young Children with Central Diabetes Insipidus. *J Pediatr*. 2015;167(3):658-61.
 17. Forrest JN, Cohen AD, Torretti J, Himmelhoch JM, Epstein FH. On the mechanism of lithium-induced diabetes insipidus in man and the rat. *J Clin Invest*. 1974;53(4):1115-23.

18. Katsuyama M, Masuyama T, Komura I, Hibino T, Takahashi H. Characterization of a novel polycystic kidney rat model with accompanying polycystic liver. *Exp Anim.* 2000;49(1):51-5.
19. Lager DJ, Qian Q, Bengal RJ, Ishibashi M, Torres VE. The pck rat: a new model that resembles human autosomal dominant polycystic kidney and liver disease. *Kidney Int.* 2001;59(1):126-36.
20. Salvetti A, Ghiadoni L. Thiazide diuretics in the treatment of hypertension: an update. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(4 Suppl 2):S25-9.
21. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm.* 2016;7(2):27-31.
22. Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother Rep.* 1966;50(4):219-44.
23. Yamamoto J, Nishio S, Hattanda F, et al. Branched-chain amino acids enhance cyst development in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 2017;92(2):377-387.
24. Gattone VH, Wang X, Harris PC, Torres VE. Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nat Med.* 2003;9(10):1323-6.
25. Seo MY, Yang J, Lee JY, et al. Renal Klotho expression in patients with acute kidney injury is associated with the severity of the injury. *Korean J Intern Med.* 2015;30(4):489-95.
26. Sabbatini M, Russo L, Cappellaio F, et al. Effects of combined administration of rapamycin, tolvaptan, and AEZ-131 on the progression of polycystic disease in PCK rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;306(10):F1243-50.

27. Hopp K, Wang X, Ye H, Irazabal MV, Harris PC, Torres VE. Effects of hydration in rats and mice with polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015;308(3):F261-6.
28. Wang X, Gattone V, Harris PC, Torres VE. Effectiveness of vasopressin V2 receptor antagonists OPC-31260 and OPC-41061 on polycystic kidney disease development in the PCK rat. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(4):846-51.
29. Ando F, Sohara E, Morimoto T, et al. Wnt5a induces renal AQP2 expression by activating calcineurin signalling pathway. *Nat Commun.* 2016;7:13636.
30. Whiting JL, Ogier L, Forbush KA, et al. AKAP220 manages apical actin networks that coordinate aquaporin-2 location and renal water reabsorption. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113(30):E4328-37.
31. César KR, Magaldi AJ. Thiazide induces water absorption in the inner medullary collecting duct of normal and Brattleboro rats. *Am J Physiol.* 1999;277(5 Pt 2):F756-60.
32. Earley LE, Orloff J. The Mechanism Of Antidiuresis Associated With The Administration Of Hydrochlorothiazide To Patients With Vasopressin-resistant Diabetes Insipidus. *J Clin Invest.* 1962;41(11):1988-97.
33. Peti-peterdi J, Harris RC. Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(7):1093-6.
34. Watanabe K, Dohi K, Sugimoto T, et al. Short-term effects of low-dose tolvaptan on hemodynamic parameters in patients with chronic heart failure. *J Cardiol.* 2012;60(6):462-9.
35. Torres VE, Harris PC. Strategies targeting cAMP signaling in the treatment of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(1):18-32.

36. Kim GH, Lee JW, Oh YK, et al. Antidiuretic effect of hydrochlorothiazide in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus is associated with upregulation of aquaporin-2, Na-Cl co-transporter, and epithelial sodium channel. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(11):2836-43.
37. Kaminagakura E, Werneck da cunha I, Soares FA, Nishimoto IN, Kowalski LP. CCND1 amplification and protein overexpression in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Head Neck.* 2011;33(10):1413-9.
38. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996;274(5293):1672-7.
39. Zhao J, Li L, Wei S, et al. Clinicopathological and prognostic role of cyclin D1 in esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Dis Esophagus.* 2012;25(6):520-6.
40. Wilson PD. Polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 2004;350(2):151-64.
41. Happé H, Peters DJ. Translational research in ADPKD: lessons from animal models. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(10):587-601.
42. Christensen BM, Marples D, Jensen UB, et al. Acute effects of vasopressin V2-receptor antagonist on kidney AQP2 expression and subcellular distribution. *Am J Physiol.* 1998;275(2 Pt 2):F285-97.
43. Xu DL, Martin PY, Ohara M, et al. Upregulation of aquaporin-2 water channel expression in chronic heart failure rat. *J Clin Invest.* 1997;99(7):1500-5.
44. Pavlov TS, Levchenko V, Ilatovskaya DV, Palygin O, Staruschenko A. Impaired epithelial Na⁺ channel activity contributes to cystogenesis and development of autosomal recessive polycystic kidney disease in PCK rats. *Pediatr Res.* 2015;77(1-1):64-9.

45. Pickkers P, Garcha RS, Schachter M, Smits P, Hughes AD. Inhibition of carbonic anhydrase accounts for the direct vascular effects of hydrochlorothiazide. *Hypertension*. 1999;33(4):1043-8.
46. Sinke AP, Kortenoeven ML, De groot T, et al. Hydrochlorothiazide attenuates lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus independently of the sodium-chloride cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306(5):F525-33.
47. De groot T, Sinke AP, Kortenoeven ML, et al. Acetazolamide Attenuates Lithium-Induced Nephrogenic Diabetes Insipidus. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(7):2082-91.
48. Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, et al. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(24):11993-7.
49. Juncos LA, Garvin J, Carretero OA, Ito S. Flow modulates myogenic responses in isolated microperfused rabbit afferent arterioles via endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*. 1995;95(6):2741-8.
50. Lorenz JN, Weihprecht H, Schnermann J, Skøtt O, Briggs JP. Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport. *Am J Physiol*. 1991;260(4 Pt 2):F486-93.
51. Peti-peterdi J, Komlosi P, Fuson AL, et al. Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE2 release from macula densa cells. *J Clin Invest*. 2003;112(1):76-82.
52. Shin SJ, Lai FJ, Wen JD, et al. Increased nitric oxide synthase mRNA expression in the renal medulla of water-deprived rats. *Kidney Int*. 1999;56(6):2191-202.

53. Martin PY, Bianchi M, Roger F, Niksic L, Féraille E. Arginine vasopressin modulates expression of neuronal NOS in rat renal medulla. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;283(3):F559-68.
54. Ernsberger P, Koletsky RJ. Metabolic effects of antihypertensive agents: role of sympathoadrenal and renin-angiotensin systems. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2006;373(4):245-58.
55. Jessup JA, Brosnihan KB, Gallagher PE, Chappell MC, Ferrario CM. Differential effect of low dose thiazides on the Renin Angiotensin system in genetically hypertensive and normotensive rats. *J Am Soc Hypertens.* 2008;2(2):106-15.
56. Johnson JA, Gong Y, Bailey KR, et al. Hydrochlorothiazide and atenolol combination antihypertensive therapy: effects of drug initiation order. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;86(5):533-9.
57. Schnermann J. Micropuncture analysis of tubuloglomerular feedback regulation in transgenic mice. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(12):2614-9.

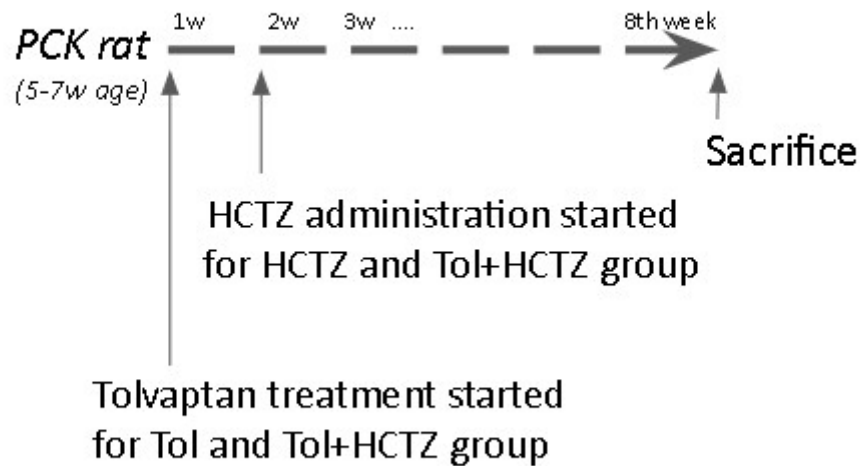
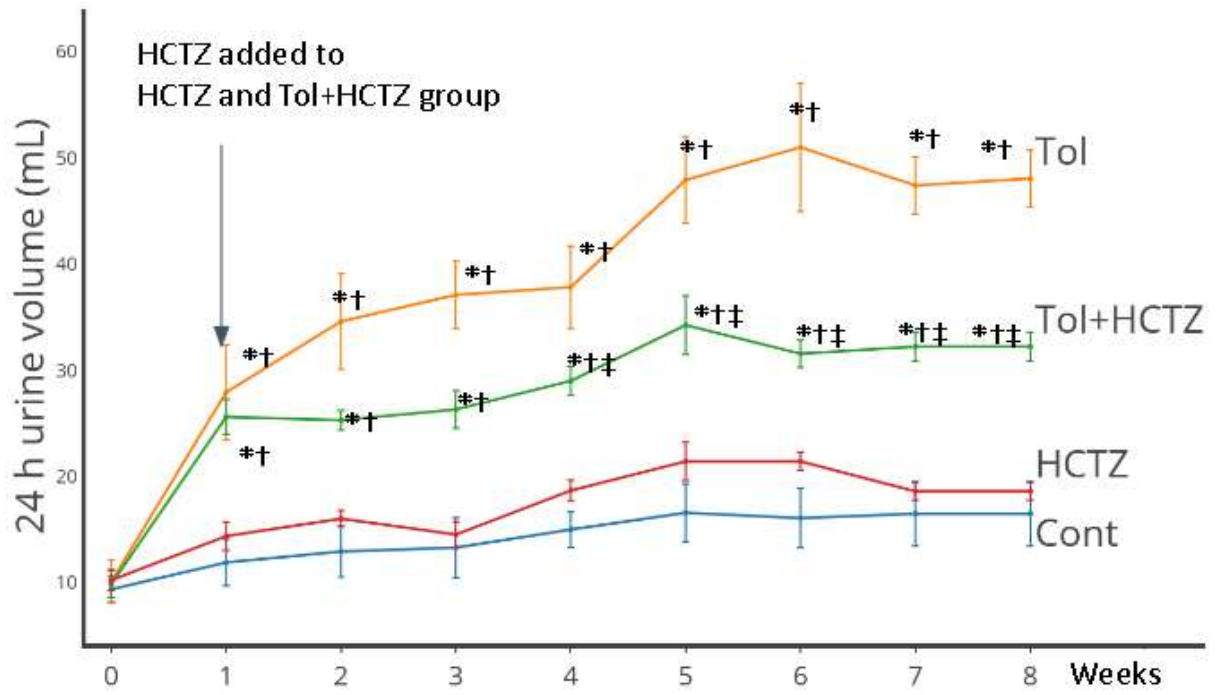


図 1 本研究の動物実験プロトコル

PCK ラットを以下の 4 グループに分けた。Cont グループ (n = 10) : 標準タンパク質飼料、vehicle 液経口投与。HCTZ グループ (n = 10) : 標準タンパク質飼料、HCTZ (80 mg/kg /日) 経口投与。Tol グループ (n = 10) : トルバプタン添加飼料 (0.05%)、vehicle 液経口投与。Tol + HCTZ グループ (n = 12) : トルバプタン添加飼料 (0.05%)、HCTZ (80 mg/kg /日) 経口投与。トルバプタン開始を第一週とし、HCTZ グループと Tol+HCTZ グループには第 2 週目から経口で HCTZ を投与した。週一回代謝ケージにて 24 時間尿収集して尿量を測定した。

a



b

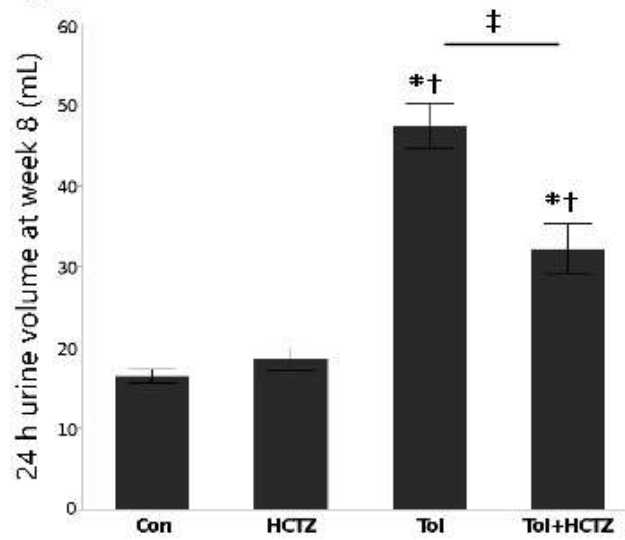


図 2 トルバプタンと HCTZ の尿量に対する効果

(a) 各週における 24 時間尿量の変化。* ; $P < 0.05$ vs Cont グループ、† ; $P < 0.05$ vs HTCZ グループ、‡ ; $P < 0.05$ vs Tol グループ、Tukey's HSD test。

(b) 屠殺直前 (第 8 週) の各グループの 24 時間尿量。* ; $P < 0.05$ vs Cont グループ、† ; $P < 0.05$ vs HTCZ グループ、‡ ; $P < 0.05$ Tol グループ vs Tol+HCTZ グループ、Tukey's HSD test。

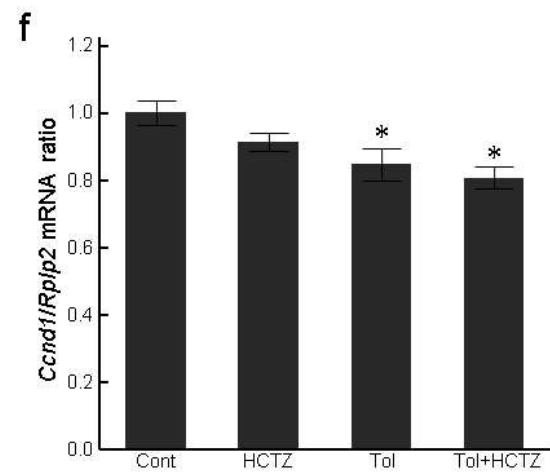
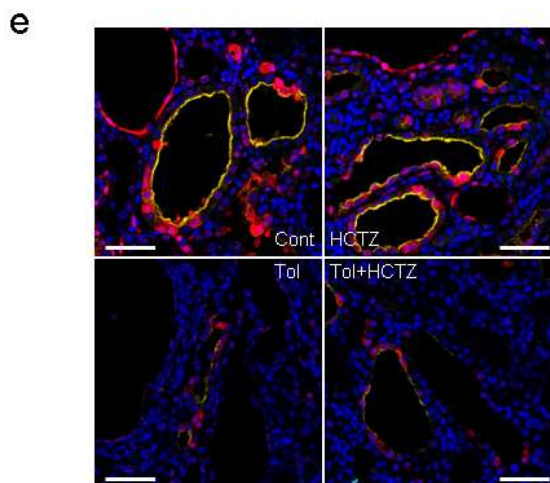
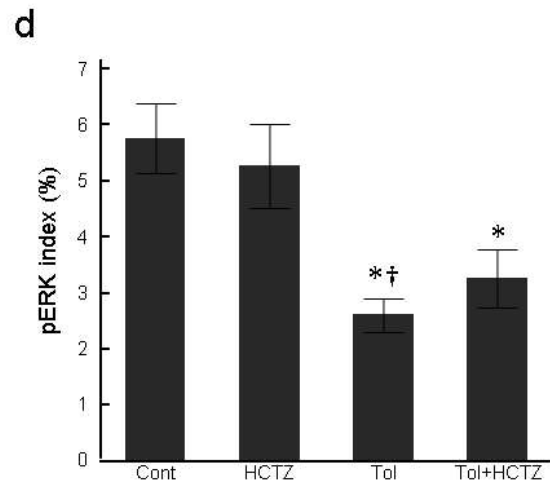
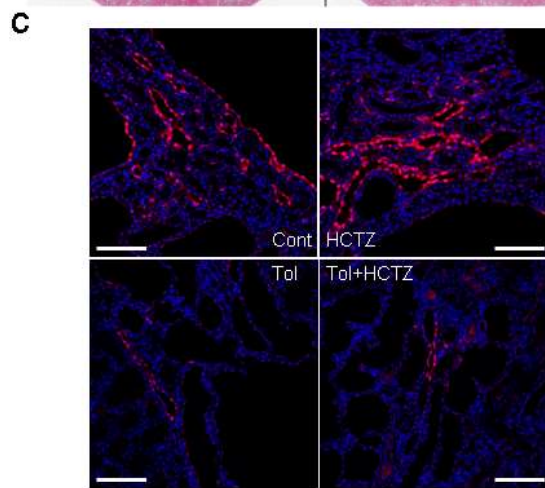
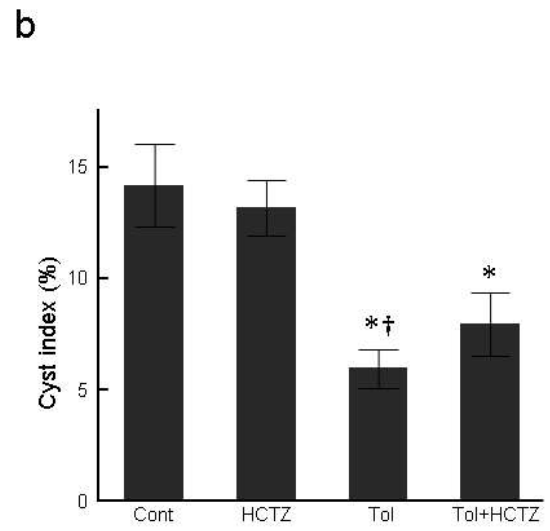
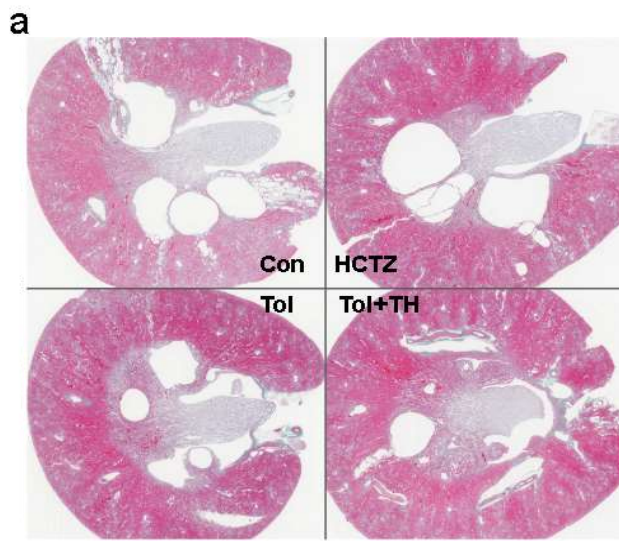


図 3 トルバプタンと HCTZ の嚢胞増殖、増大に対する効果

(a) 各グループの代表的なマッソン・トリクローム染色像。(b) 嚢胞インデックスの比較。(嚢胞インデックス、%) = (全嚢胞面積/総組織面積) × 100。* ; P < 0.05 vs Cont グループ、† ; P < 0.05 vs HCTZ グループ、Tukey's HSD test。

(c) 各グループの代表的な pERK 蛍光染色像。Bar = 100 μm。(d) pERK 陽性領域の比較。(pERK 陽性領域、%) = (髄質のポジティブ染色面積/総髄質面積) × 100。* ; P < 0.05 vs Cont グループ、† ; P < 0.05 vs HCTZ グループ、Tukey's HSD test。(e) 腎臓損傷分子 1 (Kim-1) および pERK の二重染色像。ほぼすべての Kim-1 陽性領域は pERK 陽性であった。Bar = 100 μm。(f) 嚢胞が主に位置する腎髄質におけるサイクリン D1 (Ccnd1) 遺伝子発現の比較。* ; P < 0.05 vs Cont グループ、Tukey's HSD test。

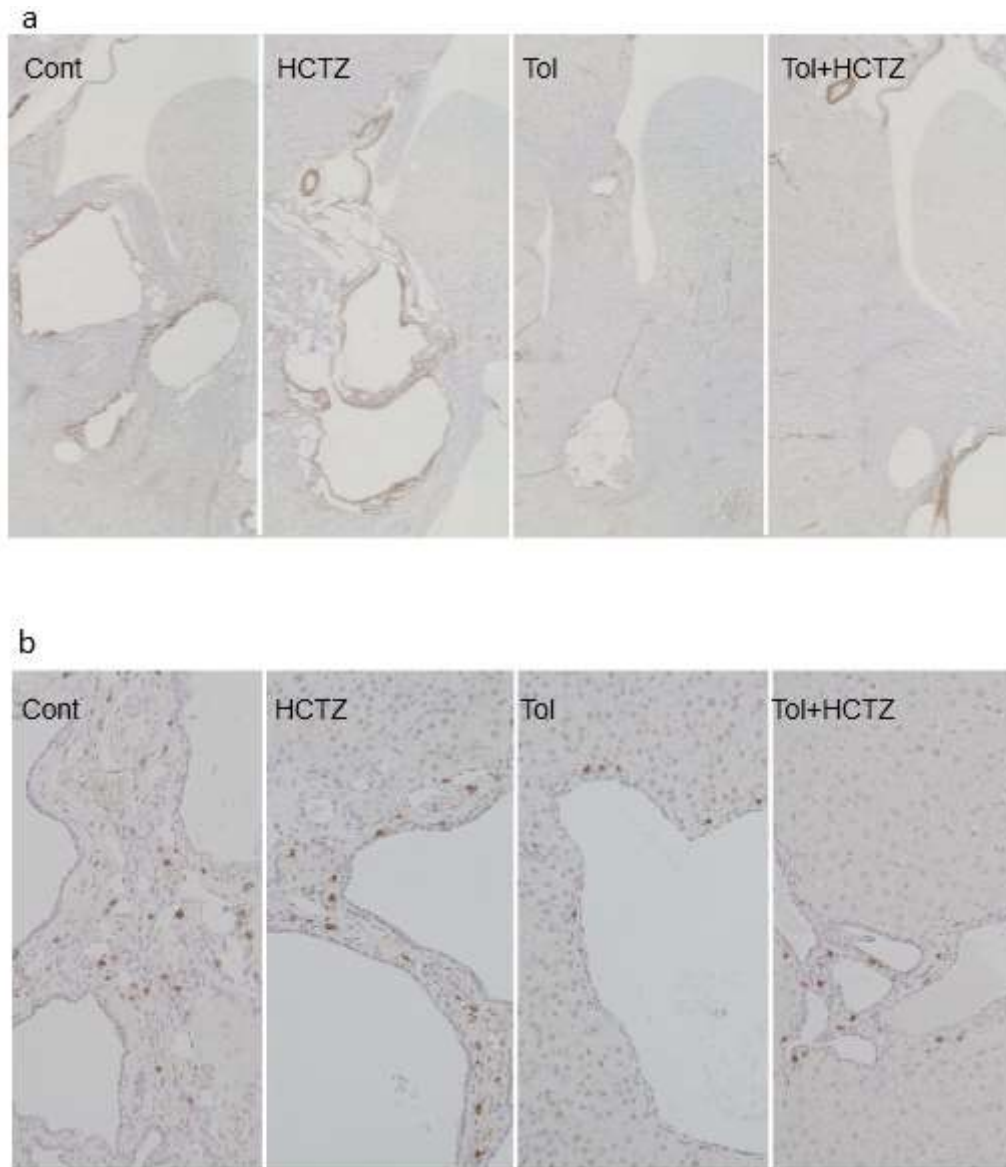


図4 トルバプタンとHCTZの線維化、虚血に対する効果

線維化マーカーである平滑筋アクチン α (α SMA) と低酸素マーカーである低酸素誘導因子 1 α (HIF-1 α) の染色 (10x 倍率)。(a) 各グループ腎臓における代表的な α SMA 染色像。(b) 各グループの肝臓における代表的な HIF-1 α 染色像。

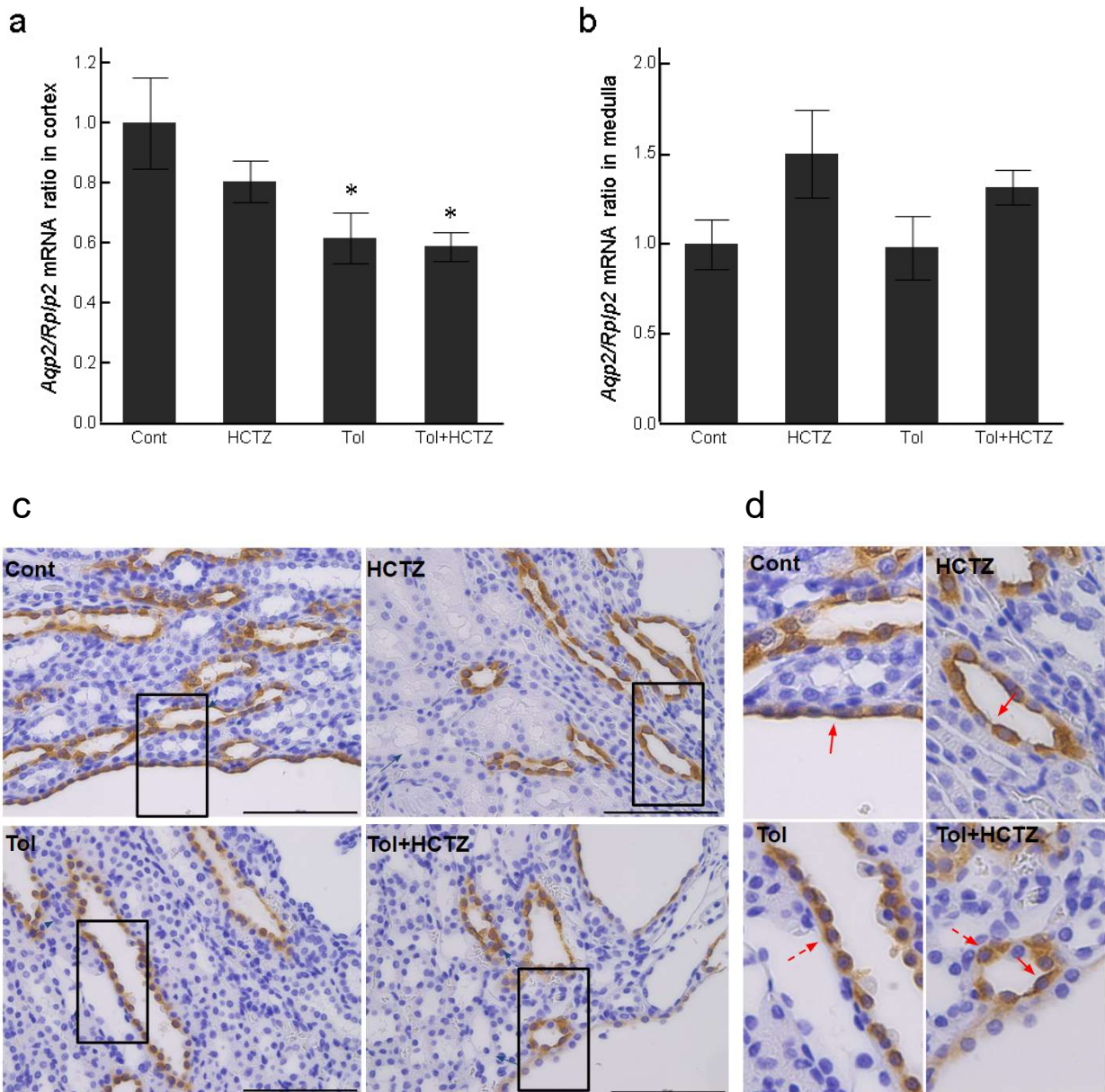


図5 トルバプタンとHCTZのAqp2に対する効果

(a、b) 腎皮質 (a) と髄質 (b) における Aqp2 遺伝子発現。* ; $P < 0.05$ vs Cont グループ、Tukey's HSD test。 (c) 各グループにおける代表的な Aqp2 染色像。 (d) Aqp2 染色の拡大像。Cont グループ、HCTZ グループにおいて Aqp2 は管腔側細胞膜に多く発現していたが (実線矢印)、Tol グループでは管腔側細胞膜から細胞質へ Aqp2 は再分布していた (破線矢印)。この再分布は Tol+HCTZ グループでは一部緩和していた (実線矢印)。Bar = 100 μ m。

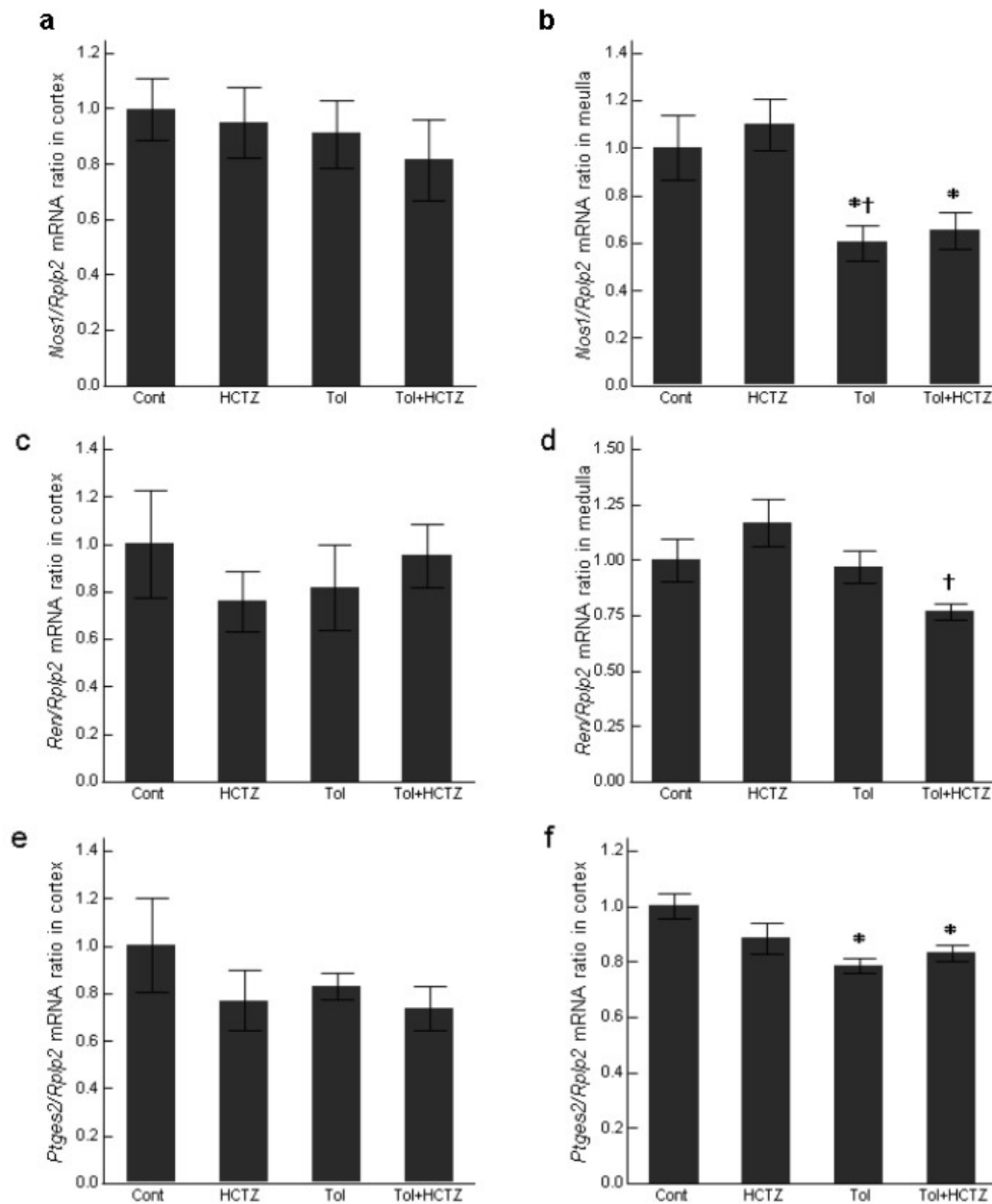


図 6 尿細管糸球体フィードバックに関連する遺伝子の mRNA 発現

(a, b) 腎皮質 (a) と髄質 (b) における Nos1 遺伝子発現。* ; $P < 0.05$ vs Cont グループ、Tukey's HSD test。 (c, d) 腎皮質 (c) と髄質 (d) における Ren 遺伝子発現。† ; $P < 0.05$ vs HCTZ グループ、Tukey's HSD test。 (e, f) 腎皮質 (e) と髄質 (f) における Ptges2 遺伝子発現。* ; $P < 0.05$ vs Cont グループ、Tukey's HSD test。

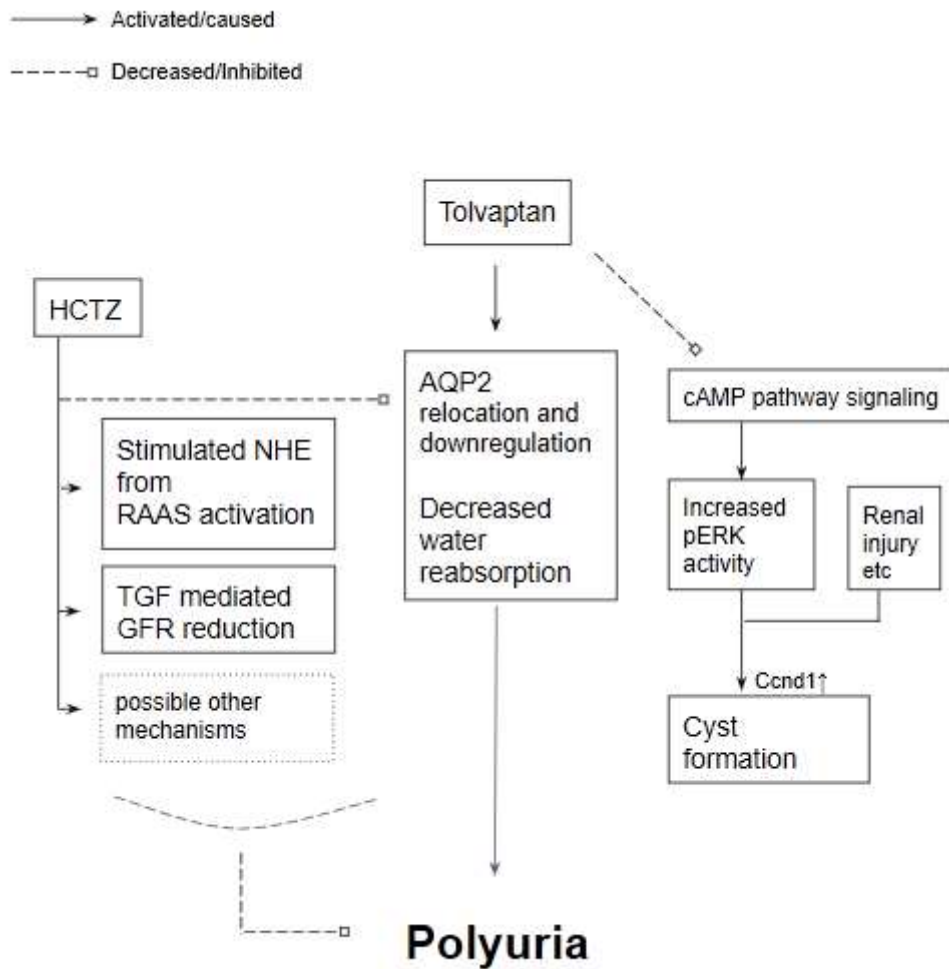


図 7 HCTZ が PKD におけるトルバプタン誘導性の多尿を緩和するメカニズム

PKD においてトルバプタンは cAMP シグナル伝達系を抑制することにより嚢胞の増殖および増大を抑制している。一方で、水利尿作用により尿量を増加させている。HCTZ は、Aqp2 の細胞膜への再分布、RAAS 活性化に伴う水再吸収の増加、GFR 低下による尿排泄減少などにより、トルバプタンによる多尿を緩和する。

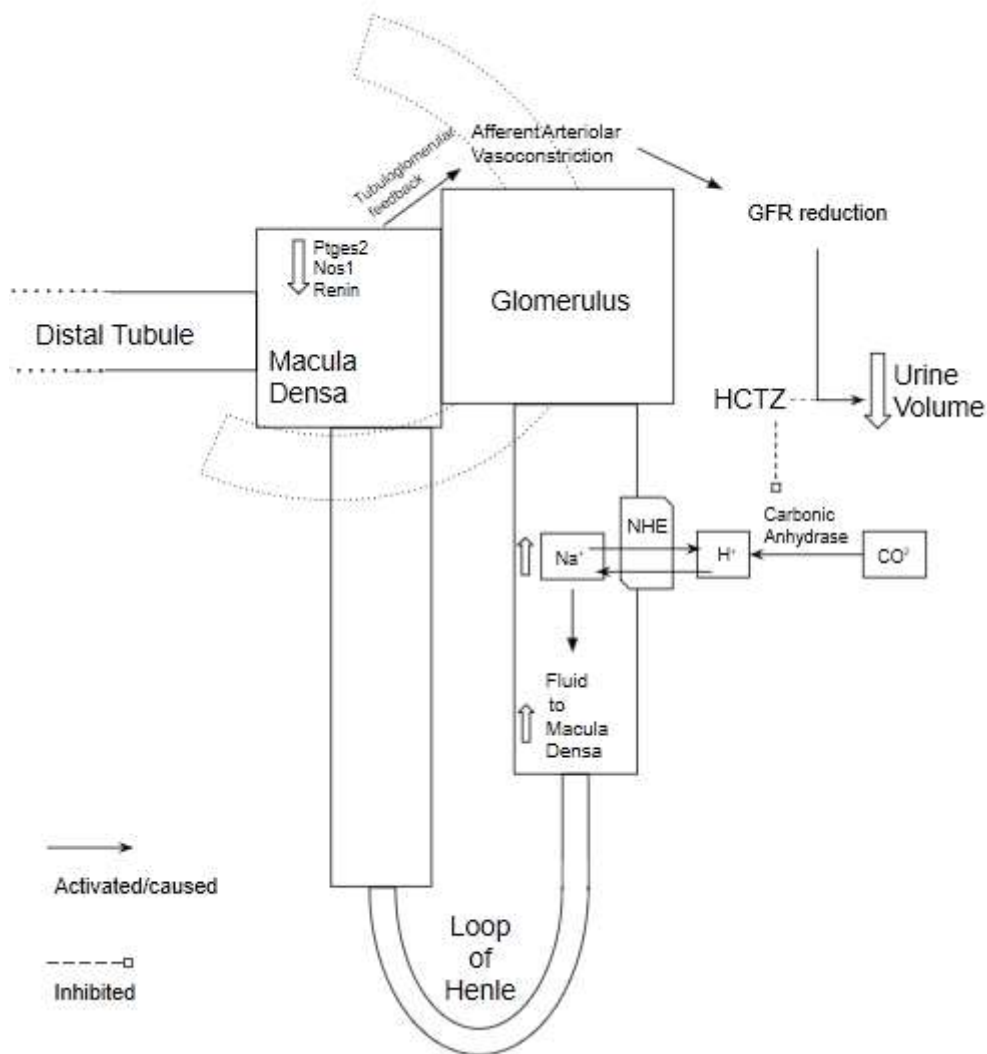


図 8 HCTZ と尿細管糸球体フィードバック

先行研究で提唱されているメカニズムの一つとして、HCTZ は近位尿細管において炭酸脱水酵素（carbonic anhydrase）を抑制することにより、H⁺生成減少、Na⁺/H⁺交換輸送体（NHE）活性低下、近位尿細管におけるナトリウム再吸収抑制を介し、緻密斑を通過する尿中のナトリウム濃度を増加させる。その結果、尿細管糸球体フィードバックが働き、糸球体濾過率（GFR）が低下して尿量が減る。

表 1 各グループの検査値

	Cont	HCTZ	Tol	Tol+HCTZ
n	10	10	10	12
Urine sodium (mEq/L)	66.40±5.4	72.10±3.9	26.11±1.7 (*,†)	38.08±2.6 (*,†)
Urine potassium (mEq/L)	228.80±6.3	222.10±13.5	86.29±3.2 (*,†)	130.61±12.7 (*,†,‡)
Urine chloride (mEq/L)	80.5±6.3	93±5.5	28.33±1.2 (*,†)	42.75±3.6 (*,†)
Urine calcium (mg/dL)	8.34±0.5	4.24±0.3	4.06±0.2 (*,†)	2.63±0.3 (*,†,‡)
Urine creatinine (mg/dl)	85.04±2.7	76.88±3.6	30.69±1.6 (*,†)	48.41±5.4 (*,†,‡)
Total sodium excretion (mEq/d)	1.10±5.4	1.37±3.9	1.24±1.7	1.16±2.6
Total potassium excretion (mEq/d)	3.75±6.3	4.05±13.5	4.09±3.2	3.81±12.7
Total chloride excretion (mEq/d)	1.33±6.3	1.76±5.5	1.35±1.2	1.27±3.6
Total calcium excretion (mg/d)	1.39±0.5	0.76±0.3 (*)	1.95±0.2 (*,†)	0.77±0.3 (*,‡)
Creatinine clearance (ml/min)	2.69±0.15	3.13±0.11	3.44±0.19 (*,†)	2.91±0.11 (*,‡)
Plasma Ca (mg/dL) (b)	8.48±0.18	8.7±0.07	7.88±0.21	8.61±0.16
Plasma Na (mg/dL)	148.83±0.75	148.17±0.7	145.75±2.75	147.38±0.63
Plasma K (mg/dL)	8.42±0.21	7.53±0.27	8.65±0.59	8.39±0.24
Plasma Cl (mg/dL)	94.17±0.31	93.33±0.49	91.5±1.85	93.5±0.5
Plasma Creatinine (mg/dL)	0.32±0.02	0.32±0.02	0.31±0.02	0.28±0.02
PRA (ng/mL/t)	3.53±0.65	3.53±0.67	1.68±0.34	4.38±0.96 (*,‡)
Body weight (g)	468.25±5.6	461.58±5.1	464.46±6.1	466.55±4.8
Systolic Blood Pressure (mmHg, §)	108.75±2.45	101.3±3.77	98.25±2.23	109.03±3.78

平均±標準誤差 (SEM)。

* ; P <0.05 vs Cont グループ、Tukey's HSD test。

† ; P <0.05 vs HCTZ グループ、Tukey's HSD test。

‡ ; P <0.05 vs Tol グループ、Tukey's HSD test。

§ ; 各グループでの n=4。

謝辞

本研究の遂行および博士論文の作成に当たり、親身に御指導御鞭撻を賜りました東北大学大学院医学系研究科医科学専攻内科病態学講座腎・高血圧・内分泌学分野教授 伊藤 貞嘉先生に謹んで感謝申し上げます。

本研究の全ての面において、終始多大なる御指導を賜りました東北医科薬科大学医学部内科学第三（腎臓内分泌内科）教授 森 建文先生に心より感謝申し上げます。

本稿を御査読賜りました東北大学大学院医学系研究科・医学部医科学専攻病理病態学講座病理診断学分野教授 笹野 公伸先生、同医学系研究科・医学部保健学専攻基礎検査医科学講座内分泌応用医科学分野教授 高橋 和広先生、東北大学病院医科診療部門特殊診療施設メディカル IT センター講師 井上 隆輔先生、同大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センター分子病態治療学分野准教授 段 孝先生に深く感謝申し上げます。

本研究に際し、終始有益な御助言御協力を賜りました東北大学大学院薬学研究科臨床各学分野助教 佐藤 恵美子先生、同医学系研究科統合腎不全医療寄附講座助教 大崎 雄介先生、東北医科薬科大学医学部内科学第三（腎臓内分泌内科） 廣瀬 卓男先生に心より感謝申し上げます。

本研究の継続に当たり、実験サンプルの作製、実験機器の利用にて御協力を賜りました東北大学加齢医学研究所共通機器管理室、東北大学病院共同実験室、東北大学病院病理部のスタッフの皆様に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行に当たり、トルバブタンを提供し頂いた大塚製薬株式会社に深く感謝いたします。

最後に、貴重な御助言、御協力を頂きました、東北大学大学院医学系研究科腎・高血圧・内分泌学分野、東北大学病院血液浄化療法部の教職員並びに大学院生の皆様に厚く御礼申し上げます。