

ラット腎内におけるロイコトリエン (leukotriene) B₄ 産生能の局在と
腎臓管におけるロイコトリエンB₄ 受容体拮抗剤の効果

中 尾 彰 特

ラット腎内におけるロイコトリエン (leukotriene) B₄ 産生能の局在と腎障害における
ロイコトリエンB₄ 受容体拮抗剤の効果

中 尾 彰 秀

研究の背景

進行性腎障害の原因として1980年代よりBrennerらの唱えた糸球体過剰濾過説(hyperfiltration、のちに糸球体高血圧)(1)が有力であり、ラットを用いたremnant kidneyモデルや、実験腎炎モデルでも、アンギオテンシンIからアンギオテンシンIIへの変換を阻害し、アンギオテンシンIIの生理的、あるいは病態生理的作用をブロックする変換酵素阻害剤の効果がほぼ確立されている(2、3)。すなわち残存したネフロンが、病変のため廃絶したネフロンの機能を代償するため、アンギオテンシンIIの糸球体輸出細動脈を収縮させる作用によって糸球体内圧を上昇させ、過剰濾過を行い、ネフロンの減少にもかかわらず、ある程度までは糸球体濾過は正常に保たれるが、この糸球体内圧の上昇によって代償機能を果たしているネフロンまでもやがて機能が廃絶していく、という説である。ヒトの腎障害を対象とした長期間の試験でもその有効性は確認されつつあり、アンギオテンシン変換酵素阻害剤は、今や高血圧を伴う(あるいは伴わなくても)腎炎の治療の第一選択剤となりつつある(4、5)。しかし、remnant kidneyモデルで糸球体内圧を測定しつつ、長期間観察し、糸球体内圧が高値を示した糸球体が必ずしも硬化に陥ったわけではなく、肥大を呈した糸球体がのちに硬化に陥ることが多いという結果を示した報告(6)や、成長因子の遺伝子を組み込んだラットで、糸球体の肥大とともに硬化を示した報告(7)などもあり、アンギオテンシンIIの多様な生理的、病態生理的作用を考慮に入れると、アンギオテンシンIIの糸球体内圧の亢進作用のみが原因とは断定できない側面もある。一方、臨床的には増殖性腎炎に分類されるIgA腎症では、極めて最近、ステロイド療法が比較的短期の追跡ではあるが、奏功することが報告されている(8)。このステロイド療法は、ある程度腎機能が低下し、蛋白尿が増加してくる段階では無効のことが多いこともまた知られている(8、9)。このような場合、組織学的には細胞外基質の増加が明らかになり、間質の細胞浸潤や、線維化が認められることが多い。増殖を示さない腎炎である膜性腎症は、日本人では比較的前後が良いとされているが(10)、なかでも蛋白尿の多いもの、発見時腎機能が悪いもの、男性であること、間質病変がみられるもの、などは予後不良の因子とされている。この

ように、増殖性腎炎、非増殖性腎炎に限らず、間質の細胞浸潤、線維化は予後不良のしるしであることが多い(11、12)。また、間質にのみでなく糸球体にもマクロファージや好中球などの細胞浸潤がみられることが、実験的腎障害ではよく知られている(13)。ここで、アンギオテンシン変換酵素阻害剤が実験的腎障害の間質病変を軽減することや(14)、アンギオテンシンが腎へのマクロファージの浸潤に何らかの作用をしている報告(13)がなされている事を考えると、アンギオテンシンIIの作用の中で間質病変を惹起する、あるいは細胞浸潤を引き起こす作用も、腎障害の進展の一因である可能性が推定される。さらに、これらの細胞浸潤、間質病変を惹起しうる因子はアンギオテンシンIIと独立して、あるいは共同して、腎障害の進行に重要な役割を果たしている可能性も考えられる。これらの炎症性因子として、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (15)、platelet activating factor (PAF) (16)、osteopontin (17)、などが知られているが、中でも強力な炎症性メディエータで強い白血球走化作用を有しているロイコトリエンB₄ (以下LTB₄と略す) (18、19)に着目した。

研究目的

LTB₄は前述のように強力な炎症惹起作用があり、白血球、マクロファージ/モノサイトの走化性、活性化作用などを有している(18、19)。実験腎炎ではLTB₄の糸球体での産生増加(20)や尿中排泄の増加を示す報告(21)があり、腎障害との関連が強く示唆されてきた。その産生経路は、白血球系細胞に存在する5-lipoxygenaseとその活性化蛋白である5-lipoxygenase activating proteinの作用により(22、23)、アラキドン酸から5-HPETEを介してロイコトリエンA₄ (以下LTA₄と略す)が産生され、さらにLTA₄ 水解酵素 (LTA₄ hydrolase) (24) の最終的な作用によってLTB₄が産生される(図1)。従来、LTA₄ hydrolaseは血小板(25)、赤血球(26)に存在することが明らかにされていた。しかし、5-lipoxygenaseは白血球系細胞にのみ存在するとされており、白血球系細胞によって産生されたLTA₄を利用して、これら血小板、赤血球は自身の持つLTA₄ hydrolaseの作用によってLTB₄を産生しようと考えられており、

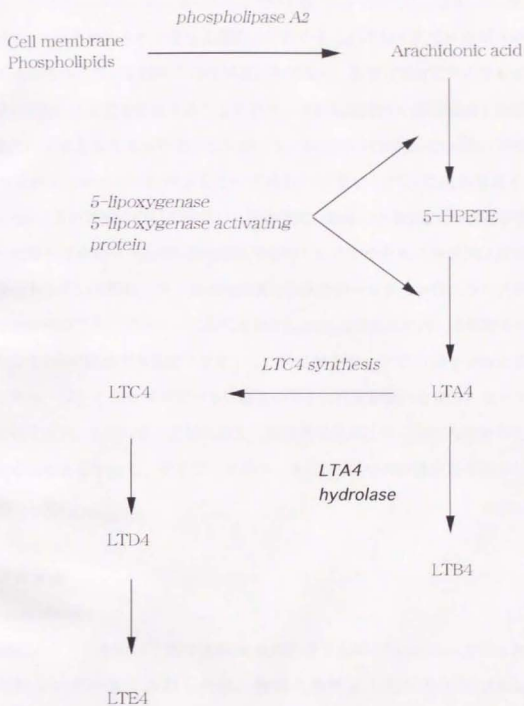


図1 脂質二重膜よりロイコトリエンの合成経路

LTA4のtranscellular metabolismと呼ばれている(25, 26)。腎ではLTA4 hydrolaseは糸球体メサングウム細胞に存在することが知られているが(27)、腎内のその他の組織についてはその存在が明らかでなく、尿細管間質に存在すれば、そこでのLTB4産生の可能性を示唆することになり、間質尿細管への細胞浸潤を惹起する一つの重要な因子として考えられる。したがって、LTA4 hydrolaseのmRNAの存在及び分布をネフロンに沿ってRT-PCRを用いて検討し、蛋白レベルで抗体を用いてwestern blotting、免疫組織化学法で検討し、酵素活性、組織の実際のLTB4含有量を測定した。さらに腎疾患病態モデルでLTB4の役割を明らかにするために自然発症高コレステロールラットを用いて検討した。自然発症高コレステロールラットは、コレステロールを食したマクロファージによって形成されたfoam cellの糸球体内への集簇を特徴とし、約半年から1年の経過で末期腎不全を示し、死に至るラットで、SDラットより分離された種である(28)。コレステロール(あるいはその代謝産物)を食したマクロファージが活性化され、LTB4産生能が亢進し、腎障害の進展に何らかの役割を果たしている可能性があると思定した。そこで、このラットにLTB4受容体拮抗剤を投与し、その効果を検討した。

研究方法

microdissection

雄性SDラットを用いて(5-7週齢)既報の方法でmicrodissectionを行った(29)。ベントバルビタールで麻酔した後、腹部大動脈より左腎を0.1% collagenase 含有microdissection溶液[137 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 5 mM ブドウ糖, 5 mM 乳糖, 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 0.1% 牛胎児血清(BSA), pH 7.4]で灌流し、安全カミソリを使用して薄切した腎スライスを同溶液中で37°C、30分間インキュベーションした後、実体顕微鏡下でmicrodissectionを行った。ネフロンは糸球体、近位曲尿細管、近位直尿細管、髓質ヘンレの太い上行脚、皮質へ

ンレーの太い上行脚、皮質結合尿管、皮質集合管、髄質外層集合尿管の8セグメントに分けた。糸球体は20個、尿管は2-3 mmを用いてRT-PCRを行った。サンプルはよくリンスし、500 μ lのチューブに移し、100 μ lの溶解液[4 M グアニジンチオシアネート, 25 mM クエン酸ナトリウム (pH 7), 0.5% サルコシル, 0.1 M 2-メルカプトエタノール]を加え、5 μ gのtRNAをキャリアとして加えた後、2倍量のエタノールと1/10量の3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.3)を加え、-20 $^{\circ}$ Cで沈殿させた。ペレットを70%エタノールでリンスした後乾燥させ、RT-PCRに供した。また、ラット肺及び腎臓の核酸は以下のよう調整した。前述の溶解液を用い組織をホモジネートし、等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (50：49：1、pH 7.6) 溶液で混和し、10,000 x g, 5分、室温で遠心し、上清を回収した。この上清にさらにフェノール、クロロホルム、イソアミルアルコールを加え、核酸を抽出する過程を数回繰り返し、最後にエタノール沈殿させた。サンプルは使用時、10,000 x g, 20分、4 $^{\circ}$ Cで遠心し、ペレットを70%エタノールでリンスした後、乾燥させRT-PCRに用いた。

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) およびRT-PCR産物のシーケンス

RTは最終的に10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ディチオスレイトール, 1 mM dNTP, 4 μ M ランダムヘキサマー, 2 ユニット/ μ l RNase 阻害剤, 1.25 units/ μ l AMV (逆転写酵素) の溶液で42 $^{\circ}$ C, 60分行った。1サンプルは二つに分け、一つはLTA4 hydrolase、残りは α - β -アクトチンのPCRに使用した。一部はAMVの代りに溶媒である0.01% グラチンでRTを行ったものを用いた。PCR primerとしてはLTA4 hydrolase ではラットメサンギウム細胞よりクローニングされたLTA4 hydrolase cDNA (27) の131塩基対から148塩基対に相当する5'-CAGTCACAGGAGGATAAT-3'をセンスに、346塩基対から363塩基対に相当する5'-GGAGTGAGCCACTGAAGG-3'をアンチセンスとした。 α - β -アクトチンでは2845塩基対から5'-TCCTAGCACCATGAAGATC-3'塩基対 (第5エクソン) をセンスに、

3140塩基対から3158塩基対に相当する5'-AAACGCAGCTCAGTAACAG-3' (第6エクソン) をアンチセンスとした (30)。これらのprimerはintronをまたがって配置され、PCR産物はmRNAより逆転写されたcDNAからのみ増幅されるようデザインされ、予想されたPCR産物のサイズはLTA4 hydrolaseでは233塩基対であり、 β -アクチンでは190塩基対であった。PCRは最終的に10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 200 nM 各センス、アンチセンス, 0.2 mM dNTPs, and 0.025 ユニット/ μ l Taq ポリメラーゼの溶液で行い、条件は、LTA4 hydrolaseでは94° C (30 秒), 59° C (20 秒), 72° C (10 秒) を40サイクル、 β -アクチンでは94° C (30 秒), 59° C (30 秒) 72° C (30 秒) を32サイクル行った。また、RT-PCR産物はシーケンサーによりPCRに用いたものと同様のprimerを使用して、直接シーケンスを行った。

Southern hybridization

8セグメントのPCR産物について Southern hybridization を行った (29)。それぞれのPCR産物 10 μ l をNuSieve 3:1 アガロースゲルで電気泳動した後、アルカリ化し、ナイロンメンブレンに 20 x SSC を用いてプロットした。hybridization用のオリゴヌクレオチドプローブはラットLTA4 hydrolase cDNAの200塩基から230塩基の相当する5'-TCAACGGACAAGAAGTCAAATACACTCTTG-3' を使い、DNA tailing kitによってDIGラベルした。hybridizationは65° C、12時間行った。その後メンブレンを 2 x SSC で室温で10分間、続いて0.1 x SSC で65° Cで30分間洗浄した。DIG蛍光検出キットを用いて説明書に従ってハイブリしたバンドを検出した。

Western blotting analysis

pentobarbitalの腹腔内投与によってラットを麻酔した後、腹部大動脈より脱血し、Hank's緩衝液 [138 mM NaCl, 4 mM NaHCO₃, 0.3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 5.0 mM KCl, 0.3 mM KH₂PO₄, 1.3 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂·6H₂O, 0.4 mM MgSO₄·7H₂O, pH 7.4] にて腎臓を灌流し、体内より取り出した。取り出した腎臓を、

皮質、髓質外層、髓質内層に分け、3倍容積の10 mM EDTA含有リン酸緩衝液中でホモジナイズし、4° Cで10,000 x g、15分間、遠心し、上清の蛋白を測定した後、実験を行うまで-20° Cに保存した。上清 100 µgを用いて10% SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後(31)、ニトロセルロースメンブレンにメタノール・グリシン溶液中で4° Cで終夜ブロットした。翌日メンブレンをTBS (0.15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) で5分間洗浄し、Block Aceで室温で30分間ブロッキングし、抗LTA4 hydrolase抗体 (IgGとして2 µg/ml, 10% Block Ace含有TBS) と室温で1時間インキュベーションした。TBST(0.15 M NaCl, 0.1% Tween, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)で5分間1回、TBSで5分間2回洗浄した後、二次抗体であるhorse radish peroxidaseラベルした抗ラビットIgGヤギ血清を5,000倍希釈で10% Block Ace含有TBS中で室温、1時間インキュベートした。同様に洗浄した後、過酸化水素水の存在下で3,3'-diaminobenzidineで発色させた(32)。

免疫組織化学

Hank's緩衝液で灌流した腎臓を取り出し、20%の中性ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した。ブロックから6 µmに薄切したラット腎臓標本はAPSコートしたスライドグラスに乗せ、キシレン、さらに順次70%、90%、100%のエタノールに浸し脱パラフィン、脱水を行った。最後に蒸留水で洗浄した。サンプルは続いてpH 6.0の10 mM クエン酸溶液中で5分間煮沸し、室温に戻した後、pH 7.6, 0.1% CaCl₂, 0.05 M Tris-HCl, 0.1% トリプシン溶液中で37° C 25分インキュベートした。リン酸緩衝液でよく洗浄し、1%正常ヤギ血清でサンプルを室温で30分ブロックした。リン酸緩衝液でよく洗浄したのち、抗LTA4 hydrolase抗体 (IgGとして濃度2 µg/ml) および対象として正常ラビットIgG 2 µg/mlで室温、30分インキュベートした。リン酸緩衝液で洗浄した後、二次抗体としてアビジン標識した抗ラビットIgGヤギ血清で30分、室温でインキュベートし、続いてアルカリフォスファターゼ標識したビオチンで室温、30分反応させた。再びリン酸緩衝液でよく洗浄し、NBT/BCIPを発色基質として発色させた。対象サンプル

はメチルグリーンで染色した。

LTA4 hydrolase 活性の測定

前節の方法で得られた40 μ lのホモジネート上清と10 μ lの0.1 M Tris-HCl (pH 7.6) 緩衝液を混ぜ合わせた後、数分37° Cでインキュベートした。エタノールに溶いた1 μ gのLTA4を基質として加え反応を開始し1分間インキュベートし、117 μ lの反応停止液[0.3 nmolのPGB2を内部標準として含有する0.1% 酢酸メタノール液]を加えた。-20° Cに20分以上保管した後、10,000 x gで遠心し、上清50 μ lを高速液体クロマトグラフィーに注入した。カラムはTSK-ODS80TMを使用し、溶媒はメタノール/水/酢酸がそれぞれ70/30/0.05容とした。流速は1 ml/分でカラム温度は35° Cに保ち、270 nmの波長のUVモニターでPGB2とLTB4を検出した(33)。PGB2とLTB4はそれぞれ約7分と11分の位置に流出し、LTB4の量はPGB2とLTB4の比として計算した。

LTB4含量の測定

LTB4の測定はカラムを用いて抽出したのち、酵素免疫測定法(enzyme immunoassay, ELA)で測定した。腎組織を皮質、髄質外層、髄質内層の三つに分けたのち、重量を測定し、抽出測定まで-20° Cに保存した。抽出は以下の方法で行った。9倍容の4° Cに冷却したエタノールで組織をホモジネートし、そのうち1 mlを1,000 x gで4° C、5分間遠心し、上清を9倍容の0.1規定酢酸で希釈した。Bond Elute C2 カラムを2 ml酢酸エチル、4 mlのメタノール、8 mlの水で順次処理し、上述の希釈したサンプルを流した。その後、カラムを6 mlの水、4 mlのエタノール、4 mlのヘキサンで処理し、最後にLTB4を1.5 mlの酢酸エチルで2回溶出した。溶出した酢酸エチルを窒素ガスで蒸発させ、ELAキット付属の緩衝液に溶解し、ELAを行った。

シーピング法で得られた糸球体(34)をHank's緩衝液に浮遊させ、いくつかのサンプルに分けた。300 x gで遠心し、上清を吸引し、30 μ Mのアラキドン酸と2.5 μ Mのイオノマイシンを含有した37° CのHank's緩衝液を加え、反応を開始した。サンプルは

37°Cで指示された時間インキュベートし、その間、糸球体が沈殿しないよう時々サンブルチューブを緩やかに振り回した。反応は、沸騰した湯にサンブルチューブを5分間浸けることで停止した。10,000 x gで遠心し、上清はLTB4の測定まで-20°Cに保存し、沈殿した糸球体は0.1規定の水酸化ナトリウムに溶解し、蛋白を測定した。5-lipoxygenase阻害剤、nordihydroguaiaretic acid (NDGA) とAA-861を用いた実験では、糸球体を前もってNDGA 4μM、またはAA-861を0.2 μM含有のHank's緩衝液で37°C5分間インキュベートし、さらに30 μMのアラキドン酸と2.5 μMのイオノマイシンを加えた後30分インキュベートした。尿細管と間質を用いた実験では、上述のようにして得られた髄質外層を3倍容のHank's緩衝液でホモジネートし、10,000 x gで遠心した上清サンプルとして用いた。アラキドン酸とイオノマイシンを最終的に30 μM、2.5 μMになるように加え、反応を開始し、反応の停止は糸球体の実験と同様に行った。上清の蛋白測定は後述の方法で行った。上清のLTB4含量の測定に際し、6倍容の0.3規定の酢酸でpHを3-4に調整し、抽出、測定を行った。³HラベルしたLTB4を用いての回収実験では組織で96.4 ± 0.4%、上清で82.9 ± 0.7%であった。

その他

蛋白の測定はBio-Rad社のProtein assay kitを用い、牛胎児アルブミンを基準とした。バリエーション分析を用いて統計処理を行い、p値が0.05以下を有意差とした。

結果

*LTA4 hydrolase*のRT-PCR、およびSouthern hybridization とRT-PCR産物の直接シーケンシングの結果

ラットメサンギウム細胞よりクローニングされたLTA4 hydrolase cDNA (27) より、PCRプライマーを設定した。これらのプライマーによる、予想されるPCR産物は233塩基対であった。ラットLTA4 hydrolase のgenomic DNAはクローニングされていないが、ヒトではcDNA、genomic DNAともにクローニングされ報告されている

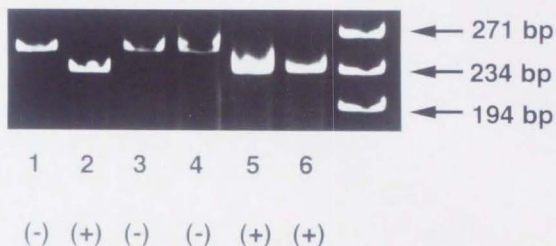


図2 ラット肺及び腎のPCR産物 核酸は論文中に記された方法でラット肺及び腎から採取し逆転写したものとししないものをPCRに供した。RT(-)が逆転写しないPCRでRT(+)が逆転写した後、PCRを行ったものである。レーン1、2は肺を3-6は腎からのPCR産物を示している。矢印はサイズマーカーを示す。



図3 microdissectionしたネフロンセグメントに沿ったLTA4 hydrolase mRNAの分布 (A) microdissectionしたネフロンセグメントを論文中に記したLTA4 hydrolase用のプライマーを用いてRT-PCRを行った結果を示している。(B) 同様に β -actin用のプライマーを用いたRT-PCRの結果を示している。略語は、gl:糸球体、PCT:近位曲尿細管、PST:近位直尿細管、mTAL:髄質ヘンレーの上向脚、cTAL:皮質ヘンレーの上向脚、DCT:遠位曲尿細管、CCD:皮質集合管、OMCD:髄質外層集合管を示す。矢印はサイズマーカーを示す。

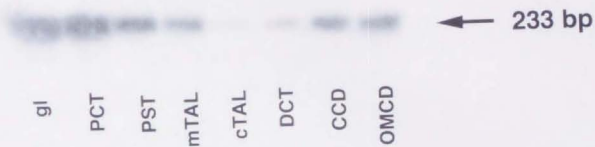


図4 RT-PCR産物のSouthern hybridization を示している。略語は図3と同様。

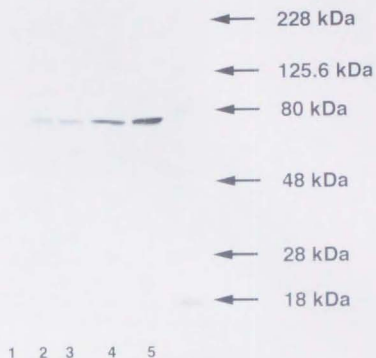
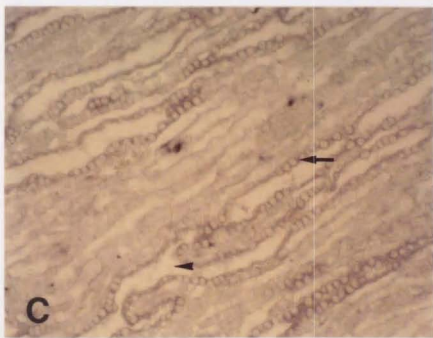
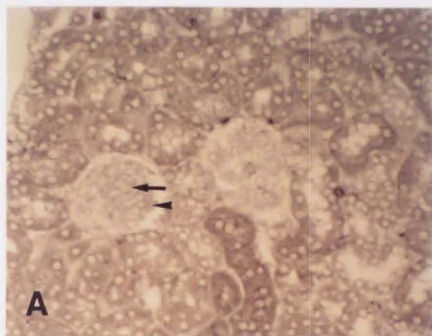


図5 抗LTA4 hydrolase抗体を用いたwestern blotting ラット腎のそれぞれの分画、糸球体、肺のホモジネートをSDS-PAGEで電気泳動し、nitrocellulose membraneにtransferした後、抗LTA4 hydrolaseで免疫染色した。レーン1は腎皮質、2は髄質外層、3は髄質内層、4は糸球体、5は肺を示す。



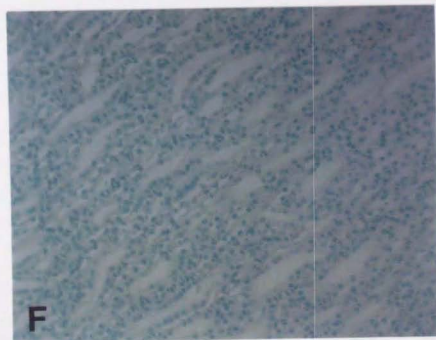
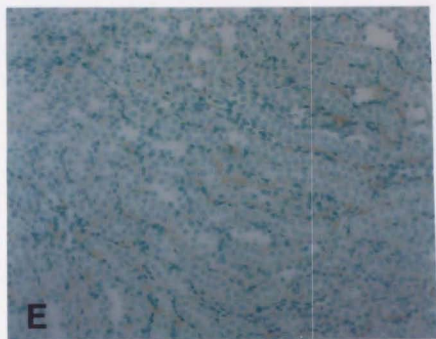
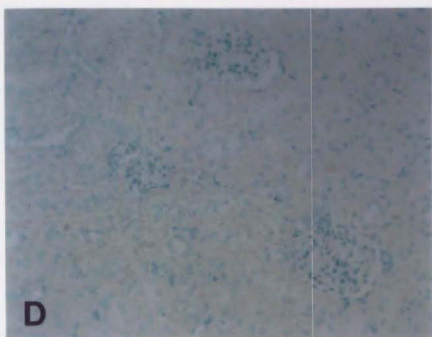


図6 ラット腎の免疫組織染色 (A) 糸球体および近位尿細管の免疫染色 (x 279)。メサングウム細胞 (矢印) と糸球体上皮 (矢頭) に免疫染色がみられる。(B) 髄質外層の免疫染色 (x 279)。近位直尿細管に免疫染色がみられる (矢印)。染色が弱く線状にみられるのは血管束を示している。(C) 髄質内層の免疫染色 (x 279)。髄質外層集合管 (矢印) には強い免疫染色がみられるが、他の尿細管、ヘンレーの細い下行脚には認められない。矢頭は髄質内層集合管の合流部を示す。(D) (E) (F) は抗LTA4 hydrolase 抗体のかわりに正常ウサギ IgG を用いた免疫染色で (D) は皮質 (E) は髄質外層 (F) は髄質内層を示す。

(35)。それによると、もしラットLTA4 hydrolaseにヒトのそれと同じ部位に同じサイズのイントロンがあれば、ラットgenomic DNAにも2ヶ所イントロンがあるはずで、genomic DNAから増幅されたPCR産物は、mRNAから増幅されたPCR産物に比較して、54塩基対と74塩基対のイントロンの計128塩基対分だけサイズが長くなるはずであった。図2に示すように、ラット肺と腎臓の核酸より、ランダムプライマーを用いてRTを行い、設定したPCRプライマーを用いてのPCR産物のサイズは予想された通り233塩基対であった(図2、レーン2、5、6)。逆転写酵素を入れない同様の反応では233塩基対よりサイズの大きいPCR産物が生成され、genomic DNAよりのPCR産物と思われた(図2、レーン1、3、4)。サイズは128塩基対長いというわけではなく、ヒトとラットではイントロンが異なると思われた。

mRNAからのPCR産物と思われる233塩基対のバンドは、microdissectionした全てのネフロンセグメントから増幅された(図3A)。また、図4に示すように、stringencyの高い条件でSouthern hybridizationを行い、この233塩基対のPCR産物がmRNA由来であることを確認した。さらに、PCRプライマーを用いて5'側と3'側より直接シーケンシングを行い、報告されているラットLTA4 hydrolase cDNAの131塩基対から363塩基対と同一であることを確認した。

LTA4 hydrolase の酵素蛋白のwestern blotting と免疫組織化学

affinity purify されたLTA4 hydrolaseの抗体(32)を用いたwestern blottingでは、図5に示すように、肺、シービングで得られた系球体、腎皮質、髄質外層、髄質内層の順に強い70 kDのバンドが認められた。今までの報告ではLTA4 hydrolaseの分子量は68~70kDとされているので(36)、今回のwestern blottingで認められた約70kDの蛋白はLTA4 hydrolaseであると思われた。western blottingに用いた抗体と同じ抗体を使用した免疫組織化学では、LTA4 hydrolaseの免疫活性は多くのネフロンセグメントに認められた。系球体ではメサンギウム細胞と上皮細胞に存在し(図6A)、近位尿管細管(図6A)、および、髄質外層では近位直尿管(図6B)に認められた。図6Cに

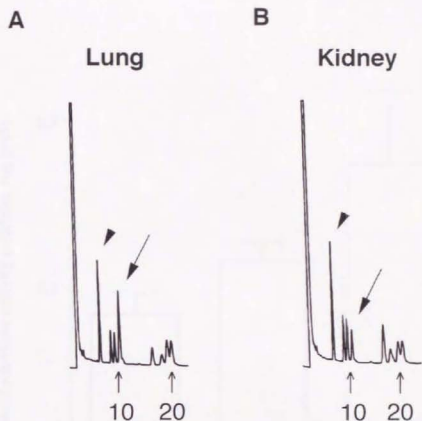


図7 LTA4 hydrolase の活性の測定 矢頭がPGB2で矢印が LTB4を示す。両面積の比でLTA4hydrolaseの活性を表した。Aは肺での、Bは腎臓での活性を示す。

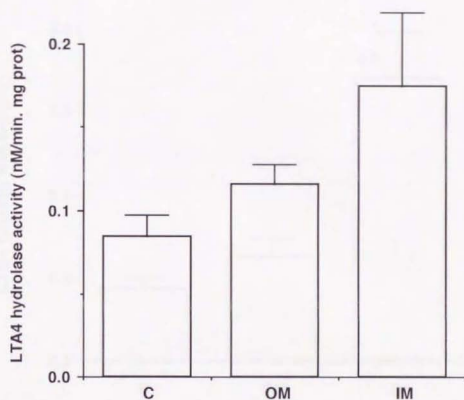


図8 ラット腎の皮質 (C)、髄質外層 (OM)、髄質内層 (IM) における LTA4 hydrolase 活性。それぞれの細胞質分画を論文中的の方法に述べたように調整し、酵素活性を測定した。

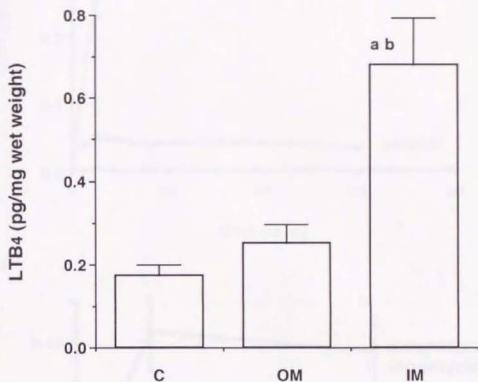


図9 ラット腎皮質 (C)、髄質外層 (OM)、髄質内層 (IM) におけるLTB4含有量。論文中の方法にてサンプルを調整し、LTB4含有量を測定した。a $p < 0.005$ 対皮質、b $p < 0.05$ 対髄質外層

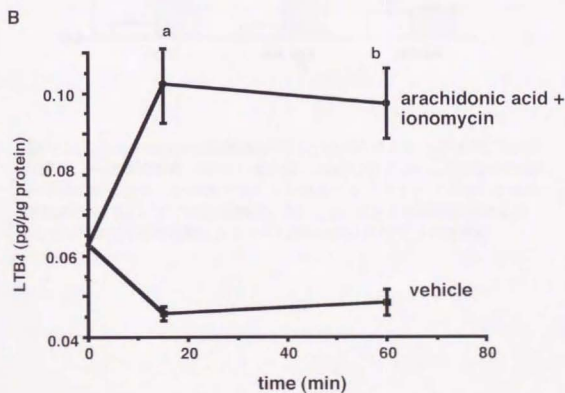
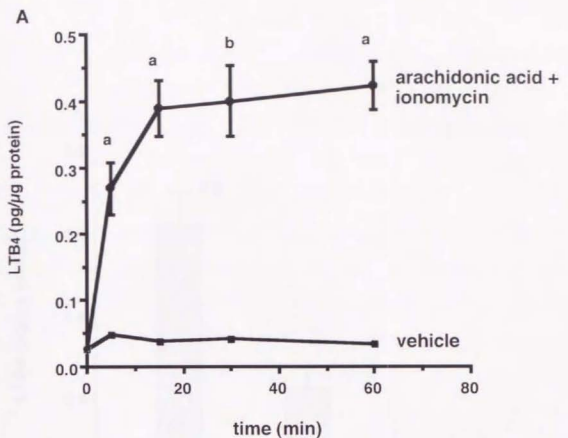


図10 糸球体および髄質外層ホモジネートによるLTB₄産生。アラキドン酸とイオノマイシンによって刺激し、示された時間に反応を停止した。(A) 糸球体は刺激時、非刺激時にもLTB₄を産生した。a $p < 0.002$ 対それぞれのタイムコントロール。b $p < 0.005$ 対30分のコントロール。(B) 髄質外層ホモジネートによるLTB₄産生。

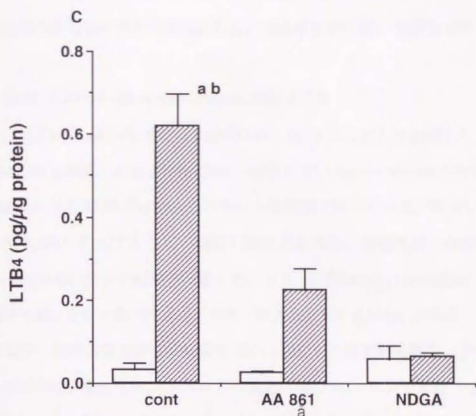


図10C 5-lipoxygenase阻害剤AA861とNDGAによる糸球体のLTB₄合成阻害。糸球体は溶媒 (cont) または、AA861(0.2 μ M)、NDGA(4 μ M)と10分間前処置し、その後アラキドン酸とイオノマイシン (▨) あるいは溶媒のみ (□) で30分間刺激した。a $p < 0.005$ 対非刺激時およびNDGA下存在での刺激時。b $p < 0.01$ 対AA861存在下での刺激時

示すように、LTA4 hydrolase免疫活性は、髄質内層集合管に強く認められているが、ヘンレーの細い下行脚には存在しないと思われた。しかし、存在してもヘンレーの細い下行脚の細胞質が非常に少ないため、染色が非常に弱い可能性は残っている。

組織のLTA4 hydrolaseの活性とLTB4含有量

LTA4 hydrolaseの活性は具体的には、図7のようにして測定した。矢印で示すようにPGB2の面積比と生成されたLTB4の面積比でLTA4 hydrolaseの活性を算出した。図7Aは肺の、図7Bは腎全体のホモジネートの活性を示している。腎のLTA4 hydrolase活性の分布は図8に示すように、髄質内層が最も高く、髄質外層、皮質の順であり、図5のwestern blottingの結果と一致した。また、LTB4の含有量は図9のように、髄質内層、髄質外層、皮質の順で、また、酵素活性の順とも一致した。さらに、糸球体(図10A)、および、糸球体を含まない髄質外層から調整した尿細管と間質(図10B)にも基礎値としてLTB4が検出され、アラキドン酸とイオノマイシンで刺激すると、時間依存性にLTB4産生は増加し、約15分でプラトーに達した。図10Cに示すように5-lipoxygenase選択的阻害薬であるNDGAおよびAA-861で処理しておくことこのLTB4産生は30分で非常に強く抑制された。

小括

用いたRT-PCRによりLTA4 hydrolase mRNAを検出することが可能であり(図2)、このRT-PCRを用いてmicrodissectionしたネフロンセグメントを検討した結果、皮質、髄質外層の全てのネフロンセグメントにLTA4 hydrolase mRNAが存在することが明らかになった(図3)。Southern blottingによって増幅されたPCR産物がLTA4 hydrolase mRNA由来であることが確認された(図4)。さらに、直接シーケンスすることによって塩基対が完全に同一であることが確認された。次いでLTA4 hydrolase 蛋白の存在を抗体を用いて検討した。この抗体はOhishiらによって作成され、遺伝子組み換えヒトLTA4 hydrolaseをもとに得られたもので、guinea pigでは70kDの単一のバ

ンドが得られている(32)。この抗体を用いたwestern blottingでは肺、糸球体、髄質外層、髄質内層に70kDのバンドが得られ、蛋白量としては、腎では髄質内層、髄質外層、皮質の順であった(図5)。さらにLTA4 hydrolaseの酵素活性とLTB4の基礎含有量を検討した結果、両者とも髄質内層で最も高く、次いで、髄質外層、皮質の順であり(図8、9)、western blottingの結果とも一致した。すなわち、LTA4 hydrolase蛋白量、酵素活性、酵素産物の多さの順がこの3分画で一致していることが示された。さらに、免疫組織化学で糸球体を始め、髄質内層以外の全てのネフロンセグメントにLTA4 hydrolaseの免疫活性が存在することが示された。髄質内層集合管には免疫活性が明瞭に示されたが、ヘンレーの細い下行脚には示されなかった。このネフロンセグメントのmicrodissectionを用いたRT-PCRは、microdissectionがこのセグメントでは技術的に困難なことや、集合管や血管組織の混入により、結果が正確に反映されない可能性を考え行わなかった。このセグメントにLTA4 hydrolaseが存在するかどうかを決定するためには、別の方法が必要であると考えられた。

LTA4 hydrolaseにはaminopeptidaseとしての活性があることが報告されており(37、38)、この実験で示された、糸球体を始め尿細管に存在する本酵素が本当にLTB4を産生しうるかどうかを、次いで検討した。図10A、Bに示されるように、糸球体および糸球体を含まない尿細管、間質でアラキドン酸とイオノマイシンで刺激することによって、時間依存性にLTB4産生が認められ、約15分でプラトーに達した。また、5-lipoxygenaseの選択的阻害薬である、NDGAやAA-861で処理するとLTB4産生は強く抑制された。これらの結果より、糸球体や髄質外層に存在するLTA4 hydrolaseは実際にLTB4産生能を有していることが明らかになった。したがって、他のネフロンセグメントも同様、刺激時にも、また、非刺激時にもLTB4を産生すると推測される。aminopeptidaseとしての作用をこれらのネフロンセグメントに存在するLTA4 hydrolaseが有しているかどうかについて、また、ヘンレーの細い下行脚ではLTA4 hydrolaseが存在しない理由については今後の検討を要する。

5-lipoxygenaseの産物であるleukotriensは病態生理的に重要な役割を果たしている

ことが知られている。腎疾患の分野では、免疫学的に障害を受けた糸球体がLTB₄を多量に産生することはよく知られている(20)。また、5-lipoxygenaseの阻害薬が動物モデルの実験的糸球体腎炎を改善することも報告されているが(39)、5-lipoxygenaseの阻害によってLTB₄のみならずLTC₄、LTD₄、LTE₄も阻害されるため(図1)LTB₄単独の作用は解明されない。また、尿管間質のLTB₄がどのような役割を病態生理的に、あるいは生理的に果たしているのかいまだ不明である。LTB₄は強力な化学走化性物質であることが知られおり、炎症と密接に関連している(18, 19)。多くの糸球体腎炎ではメサングウム細胞の増殖とともに糸球体への細胞浸潤が認められる。本実験で示されたように、糸球体でLTA₄ hydrolaseの蛋白量が多く認められることや、刺激時に多量のLTB₄を産生する能力があることなどから、これらの細胞浸潤におけるLTB₄の役割が強く示唆される。また、間質の好中球浸潤や線維化が糸球体疾患の病変の進展に病態的に重要であるという報告も従来よりなされており(40, 41)、糸球体での炎症性細胞の浸潤における役割と同様、間質においても何らかの役割を果たしている可能性が存在すると思われた。

次いで、免疫学的機序で招来される腎障害においてLTB₄産生が増加することは報告されているが(20)、非免疫学的機序でのLTB₄の役割はよく知られていない。そこで、成長するとともに蛋白尿が著明となり、高コレステロール血症、高血圧を示し、最終的には腎不全となる自然発症高コレステロールラット(28)を用いてLTB₄の役割を検討した。LTB₄の役割を検討するに当たって、経口投与可能なLTB₄受容体拮抗剤、ONO 4057を用いた(42)。ONO 4057は分子量471で室温で安定、胆汁排泄性であり、ヒト好中球へのLTB₄結合に対するIC₅₀は11.4 nMである。

研究方法

雄性自然発症高コレステロールラット(8週齢)を2群に分け、対照群(n=10)と実験群(n=7)とした。対照群は普通食を、実験群はLTB₄受容体拮抗剤(ONO 4057、5,000 ppm)(42)含有食をそれぞれ、18週間投与し、26週間後に屠殺し、腎機能、

腎組織を検討した。さらに、蛋白尿に対する影響を検討するため比較的短期間の別の観察を同週齢から開始し、2週後、4週後、6週後と検討した。

結果

表1に示すように平均血圧は両群とも 157 ± 6 mmHg (対照群)、 152 ± 5 mmHg (実験群)と著明な高血圧を示した。体重は対照群、 487 ± 11 g、実験群、 477 ± 15 g、血清コレステロールは対照群、 220 ± 13 mg/dl、実験群 198 ± 5 mg/dl、1日蛋白排泄量は対照群 275 ± 52 mg、実験群 223 ± 20 mgとそれぞれ実験群で低い傾向はあったが、両群間で有意差はなかった。1日蛋白排泄量に関しては表2に示すように、比較的短期間の実験(それぞれの群で $n=7$)では実験開始後2週間(10週齢)では対照群で 18 ± 4 mg/日、実験群で 10 ± 1 mg/日($p=0.11$)であり、4週間後(12週齢)では対照群、 53 ± 10 mg/日、実験群、 35 ± 6 mg/日($p=0.16$)であった。また、6週間後(14週齢)で対照群($n=5$)、 248 ± 26 mg/日、実験群で($n=7$) 151 ± 14 mg/日($p<0.005$)と実験群で有意に低値であった。したがって、短期的にはLTB4は蛋白尿の発現に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。18週間にわたる実験結果で両群間に蛋白尿に関して有意差が認められなかったのは対照群で腎機能低下のためである可能性が考えられた。血清クレアチニン、24時間クレアチンクリアランスはそれぞれ対照群、 1.4 ± 0.3 mg/dl、 1.1 ± 0.3 ml/min、実験群、 0.6 ± 0.1 mg/dl、 2.3 ± 0.4 ml/minといずれも実験群で腎機能の悪化はみられなかった(表1)。腎組織では図11に示すように対照群では、著明な尿管の拡張、無数の細胞浸潤がみられ、糸球体はほとんど硬化し、末期腎不全像を呈していたのに対し(図11A)、実験群では、尿管の拡張はほぼ無く、中等度の細胞浸潤のみで、糸球体もほぼ正常であった(図11B)。

小括

自然発症高コレステロールラットは高脂血症と腎障害を示すモデルで、特に雄性ラットは10週齢くらいからは多量の蛋白尿と、高コレステロール血症、高血圧を呈し、24

表1 26週齢の自然発症高コレステロール血症ラットの平均血圧 (mBP) 、体重 (BW) 、総コレステロール (TC) 、蛋白尿 (UP) 、血清クレアチニン (SCr) 、24時間クレアチニンクリアランス

群	mBP (mmHg)	BW (g)	TC (mg/dl)	UP (mg/day)	SCr (mg/dl)	CCr (ml/min)
対照群	157 ± 6	487 ± 11	220 ± 13	275 ± 52	1.4 ± 0.3	1.1 ± 0.3
実験群	152 ± 5	477 ± 15	198 ± 5	223 ± 20	0.6 ± 0.1	2.3 ± 0.4
	ns	ns	ns	ns	p < 0.03	p < 0.02

表2 自然発症高コレステロール血症ラットの蛋白尿の経時的変化 (mg/day)

群	10週齢	12週齢	14週齢
対照群	18 ± 4	53 ± 10	248 ± 26
実験群	10 ± 1	35 ± 6	151 ± 14
	ns	ns	p < 0.005

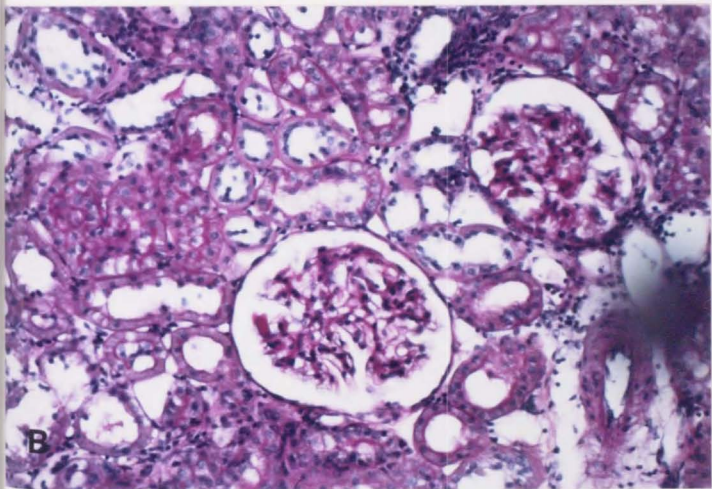
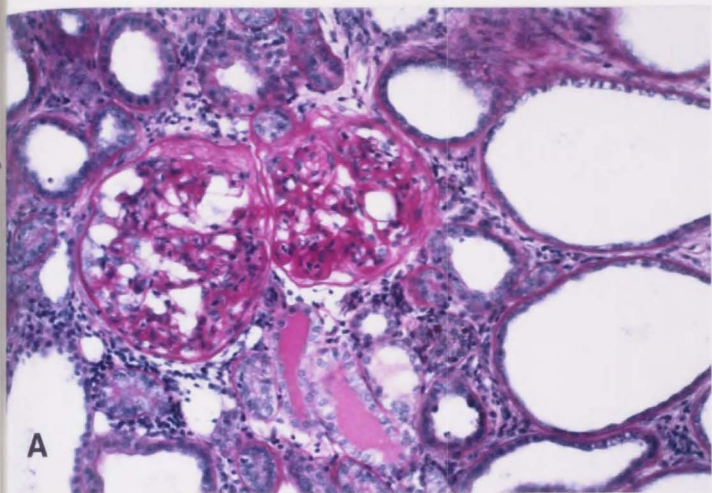


図11 (A) 対照群の腎組織 著明な尿細管の拡張、無数の細胞浸潤、ほとんど硬化した糸球体を示す。(B) 実験群の腎組織像 尿細管の拡張はほとんどなく、中等度の細胞浸潤を示すのみで、糸球体もほぼ正常である。

週齢を過ぎるころには末期腎不全に至る、SDラットから分離された種である(28)。
高脂血症性腎障害では、組織に沈着したコレステロールを食食したマクロファージが泡沫細胞となって腎組織へ浸潤していることがよく知られているが(43)、マクロファージ/モノサイトにはLTB₄産生に必要な、二つの酵素、5-lipoxygenaseとLTA₄hydrolaseが存在する(44)。コレステロールを食食し、活性化したマクロファージがLTB₄を産生し、さらに、その化学走化性により、好中球、マクロファージの浸潤が増長され、腎障害を悪化させる可能性がある。これらの悪循環を阻止することで、腎障害の進行を防止できる可能性を想定し、このラットを用いて18週間の実験を行った。26週齢のラットでは、LTB₄受容体拮抗剤投与群は対照群と同程度の高血圧にもかかわらず、進行性腎機能低下がみられず、組織学的にも悪化が認められなかった。これらのことから、LTB₄は非免疫学的機序での腎機能低下、腎組織障害の進展に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

まとめ

ラット腎には糸球体のみならず、少なくともヘンレーの下行脚以外のほとんどの尿細管にもLTA₄hydrolaseのmRNAが存在することをRT-PCR、Southern hybridization、直接シーケンスによって証明した。蛋白レベルでもwestern blotting、免疫組織化学によってその局在を証明した。また、腎組織でLTA₄hydrolaseの酵素活性、LTB₄含有量を測定し、その活性と含有量が関連していることが明らかになった。さらに、糸球体および尿細管間質には刺激に応じてLTB₄産生能があることが明らかになった。

これらの腎におけるLTB₄が、腎障害の進行に関与している可能性を想定して、自然発症高コレステロール血症ラットにLTB₄受容体拮抗剤を投与し、検討したところ受容体拮抗剤投与群で腎機能低下、腎組織障害のいずれも悪化がみられず、また、両群ともに著明な高血圧がみられたことから少なくとも、この腎保護作用は血行動態の変化を介してもたらされたものではなく、LTB₄の化学走化性による細胞浸潤や、あるいはマクロファージ/モノサイトや白血球の活性化を阻止して、もたらされた可能性が考えられた。

LTB₄のもつ腎障害の進行に関する詳細な作用機序、およびLTB₄産生の開始のシグナル、正確な部位については今後解明されるべき問題ではあるが、腎組織には尿細管を含めて、LTB₄を豊富に産生する能力があり、刺激に応じて産生されたLTB₄は、腎障害の進行に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

文献

- 1 Brenner BM. Meyer TW. Hostetter TH. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N Engl J Med.* 307:652-9, 1982.
- 2 Dworkin LD. Benstein JA. Parker M. Tolbert E. Feiner HD. Calcium antagonists and converting enzyme inhibitors reduce renal injury by different mechanisms. *Kidney Int.* 43:808-14, 1993.
- 3 Zoja C. Abbate M. Corna D. Capitanio M. Donadelli R. Bruzzi I. Oldroyd S. Benigni A. Remuzzi G. Pharmacologic control of angiotensin II ameliorates renal disease while reducing renal TGF- β in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis.* 31:453-63, 1998.
- 4 Savage S. Schrier RW. Progressive renal insufficiency: the role of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Advance Intern Med.* 37:85-101, 1992.
- 5 Tarif N. Bakris GL. Angiotensin II receptor blockade and progression of nondiabetic-mediated renal disease. *Kidney Int - Supple.* 63:S67-70, 1997.

- 6 Yoshida Y, Fogo A, Shiraga H, Glick AD, Ichikawa I. Serial micropuncture analysis of single nephron function in subtotal renal ablation. *Kidney Int.* 33:855-67, 1988.
- 7 Doi T, Striker LJ, Quaife C, Conti FG, Palmiter R, Behringer R, Brinster R, Striker GE. Progressive glomerulosclerosis develops in transgenic mice chronically expressing growth hormone and growth hormone releasing factor but not in those expressing insulinlike growth factor-1. *Am J Pathol.* 131:398-403, 1988.
- 8 Kobayashi Y, Hiki Y, Kokubo T, Horii A, Tateno S. Steroid therapy during the early stage of progressive IgA nephropathy. A 10-year follow-up study. *Nephron* 72:237-42, 1996.
- 9 Mustonen J, Pasternack A, Rantala I. The nephrotic syndrome in IgA glomerulonephritis: response to corticosteroid therapy. *Clinical Nephrol.* 20:172-6, 1983.
- 10 Kida H, Asamoto T, Yokoyama H, Tomosugi N, Hattori N. Long-term prognosis of membranous nephropathy. *Clinical Nephrol.* 25:64-9, 1986.
- 11 Schieppati A, Mosconi L, Perna A, Mecca G, Bertani T, Garattini S, Remuzzi G. Prognosis of untreated patients with idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 329:85-9, 1993.

- 12 Pei Y, Cattran D, Greenwood C. Predicting chronic renal insufficiency in idiopathic membranous glomerulonephritis. *Kidney Int.* 42:960-6, 1992.
- 13 Wu LL, Yang N, Roe CJ, Cooper ME, Gilbert RE, Atkins RC, Lan HY. Macrophage and myofibroblast proliferation in remnant kidney: role of angiotensin II. *Kidney Int - Suppl.* 63:S221-5, 1997.
- 14 Diamond JR, Anderson S. Irreversible tubulointerstitial damage associated with chronic aminocucleoside nephrosis. *Am J Pathol.* 137:1323-1332, 1990.
- 15 Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Lorenzo O, Plaza JJ, Egido J. Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis. *J Immunol.* 161:430-9, 1998.
- 16 Erger RA, Casale TB. Eosinophil migration in response to three molecular species of platelet activating factor. *Inflammation Res.* 45:265-7, 1996.
- 17 Lan HY, Yu XQ, Yang N, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Pichler R, Johnson RJ, Atkins RC. De novo glomerular osteopontin expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 53:136-45, 1998.
- 18 Samuelsson B. Leukotriene: Mediators of immediate hypersensitivity

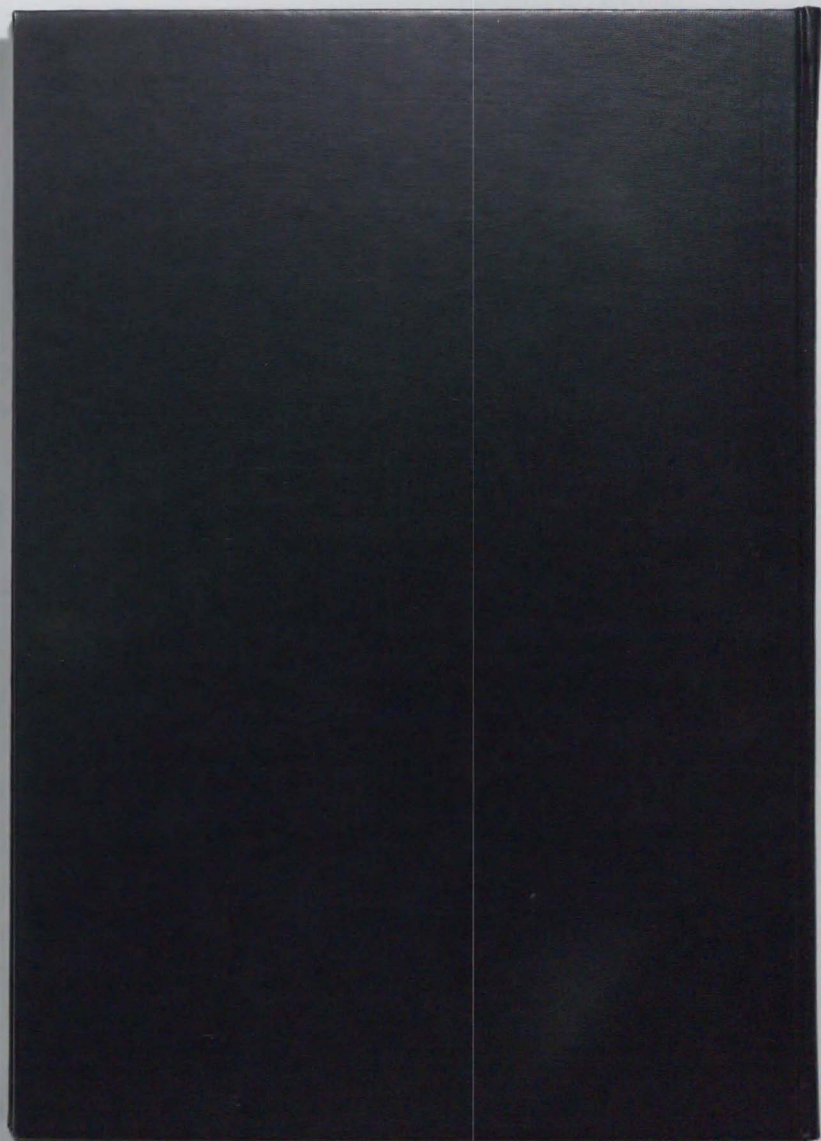
reaction s and inflammation. *Science* 220: 568-575, 1983.

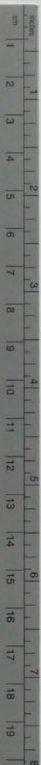
- 19 Henderson WRJ. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med.* 121: 684-697, 1994.
- 20 Fauler J. Wierneyer A. Marx KH. Kuhn K. Koch KM. Frolich JC. LTB4 in nephrotoxic serum nephritis in rats. *Kidney Int.* 36: 46-50, 1989.
- 21 Lianos EA. Noble B. Glomerular leukotriene synthesis in Heimann nephritis. *Kidney Int.* 36:998-1002, 1989.
- 22 Samuelsson B. Dahlen S-E. Lindgern JA. Leukotrienes and lipoxins: Structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 237: 1171-1176, 1987.
- 23 Epstein FH. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. *New Engl J Med.* 323: 645-655, 1990.
- 24 Fruteau de Lacos B. Braquet P. Borgeat P. Characteristics of leukotriene (LT) and hydroxy eicosatetraenoic acid (HETE) synthesis in human leukocytes in vitro; effect of arachidonic acid concentration. *Prostaglandins Leukotrienes Med.* 13:47-52, 1984.
- 25 Marcus A. Broekman M. Safler ML. Formation of leukotrienes and other hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 109: 130-137, 1982.

- 26 Fitzpatrick F, Liggett W, McGee J. Metabolism of leukotriene A4 by human erythrocytes. *J Biol Chem.* 259: 11403-11407, 1984.
- 27 Makita N, Funk CD, Imai E, Hoover RL, Badr KF. Molecular cloning and functional expression of rat leukotriene A4 hydrolase using the polymerase chain reaction. *FEBS Lett.* 299: 273-277, 1992 .
- 28 Imai Y, Matsumura H, Miyajima H, Oka K. Serum and tissue lipids and glomerulonephritis in the spontaneously hypercholesterolemic (SHC) rat, with a note on gonadectomy. *Atherosclerosis* 27:165-178, 1977.
- 29 Asano K, Taniguchi S, Nakao A, Watanabe T, Kurokawa K. Distribution of platelet activating factor receptor mRNA along the rat nephron segments. *Biochem Biophys Res Commun.* 225: 352-357, 1996.
- 30 Iida K, Taniguchi S, Kurokawa K. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA expression along rat nephron segments. *Biochem Biophys Res.* 194: 659-664, 1993.
- 31 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- 32 Ohishi N, Minami M, Kobayashi J, Seyama Y, Hata J, Yotsumoto H, Takaku F, Shimizu T. Immunological quantitation and immunohistochemical localization of leukotriene A4 hydrolase in guinea pig tissues. *J Biol Chem.* 265: 7520-7525, 1990.

- 33 Ohishi N, Izumi T, Seyama Y, Shimizu T. Purification and characterization of human lung leukotriene A4 hydrolase. *Methods Enzymol.* 187: 286-295, 1990.
- 34 Nosaka K, Nishi T, Imaki H, Suzuki K, Kuwata S, Noiri E, Aizawa C, Kurokawa K. Permeable type I collagen membrane promotes glomerular epithelial cell growth in culture. *Kidney Int.* 43: 470-478, 1993.
- 35 Mancini JA, Evans JF. Cloning and characterization of the human leukotriene A4 hydrolase gene. *Eur J Biochem.* 231: 65-71, 1995.
- 36 Evans JF, Dupuis P, Ford-Hutchinson AW. Purification and characterization of leukotriene A4 hydrolase from rat neutrophils. *Biochim Biophys Acta.* 840: 43-50, 1985.
- 37 Izumi T, Minami M, Ohishi N, Bitoh H, Shimizu T. Site-directed mutagenesis of leukotriene A4 hydrolase: distinction of leukotriene A4 hydrolase and aminopeptidase activities. *J Lipid Mediat.* 6: 53-58, 1993.
- 38 Orning L, Gierse JK, Fitzpatrick FA. The bifunctional enzyme leukotriene-A4 hydrolase is an arginine aminopeptidase of high efficiency and specificity. *J Biol Chem.* 269: 11269-11273, 1994.
- 39 Albrightson CR, Short B, Dytko G, Zabko-Potapovich B, Brickson B, Adams JL, Griswold DE. Selective inhibition of 5-lipoxygenase attenuates

- glomerulonephritis in the rat. *Kidney Int.* 45: 1301-1310, 1994.
- 40 Lan HY, Paterson DJ, Atkins RC. Initiation and evolution of interstitial leukocytic infiltration in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 40: 425-433, 1991.
- 41 Bohle A, Wehrmann M, Bogenschultz O, Vogel W, Schmitt H, Muller CA, MuMuller GA. The long term prognosis of the primary glomerulonephritides. A morphologic and clinical analysis of 1747 cases. *Pathol Res Pract.* 188:908-924, 1992.
- 42 Kishikawa K, Tateishi N, Maruyama T, Seo R, Toda M, Miyamoto T, ONO 4057, a novel, orally active leukotriene B4 antagonist: effects on LTB4-induced neutrophil function. *Prostaglandins* 44: 261-75, 1992.
- 43 Schlondorff D. Cellular mechanisms of lipid injury in the glomerulus. *Am J Kidney Dis.* 22:72-82, 1993.
- 44 Peters-Golden M. Cell biology of the 5-lipoxygenase pathway. *Am J Respiratory Critic Care Med.* 157(6 Pt 2):S227-31, 1998.





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue

Cyan

Green

Yellow

Red

Magenta

White

3/Color

Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A

—

2

62

4

15

⑤

M

88

69

16

1

1

and

★

→

B

1

1

1

1