

博士論文

腎虚血後間質線維化モデルについての検討

山野 水紀

## 目次

第1章 要旨	p 2
第2章 序文	p 4
第3章 方法	p 13
第4章 結果	p 23
第5章 考察	p 34
図表	p 46
謝辞	p 67
参考文献	p 68

## 第1章 要旨

従来、可逆的と考えられていた急性腎障害(acute kidney injury ; AKI)の罹患後に、慢性腎臓病(chronic kidney disease ; CKD)が発症・進展する病態が臨床的に問題であると認識されるようになり、その病態を解明すべく基礎研究が盛んに行われるようになった。

本研究では AKI から CKD への移行 (AKI-to-CKD) における動物モデルとして広く用いられている腎虚血後間質線維化モデルに対して、対側腎摘の有無による二つの AKI-to-CKD モデルを作成し、アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB ; AngiotensinII Receptor Blocker) による間質線維化軽減効果の有無を検討した。対側腎摘により虚血腎の線維化進行が軽減され、一方、ARB による抗線維化作用は対側腎摘を行わないモデルにおいてのみ認められた。対側腎摘を行わないモデルにおいては、ARB による TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1) , PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) , galectin-3 といった線維化促進因子の遺伝子発現抑制が確認できた。一方、対側腎摘を併用した場合、ARB による腎間質線維化抑制作用が認められず、ヒト臨床における

病態を再現していない可能性が示唆された。今後、AKI-to-CKDにおける新たな病態メカニズムを解明することを目的とする場合、本研究によって得られた知見に基づき、ヒト臨床に近いモデルを採用する必要があると考えられた。

## 第2章 序文

### 慢性腎臓病(chronic kidney disease ; CKD)の疫学

わが国の慢性維持透析患者数は2013年末には31万人を超えている。2005年頃まで年間約1万人ずつ増加していたものが近年増加数は5千人超と増加速度は緩徐傾向にあるものの、透析歴20年以上の患者数は2万4千人にのぼり増加傾向である<sup>1</sup>。その予備軍である慢性腎臓病(CKD)の有病率は増加しているとされ、わが国でのCKD患者数は約2000万人と推測されており、CKDステージ3~5(eGFR(estimated glomerular filtration rate)60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>未満)の患者数は1098万人と成人人口の10.64%と推察され、頻度が高い疾患である<sup>2</sup>。さらに、心血管疾患(虚血性心疾患、心不全、脳卒中、死亡)の発症リスクはCKDステージが高いほど上昇し<sup>3</sup>、CKDが総死亡および心血管疾患の独立した危険因子であると報告されており<sup>4</sup>、CKDの発症進展が生命予後に大きな影響を与えられている。CKDは、このような背景を受け、慢性に経過する腎疾患や腎臓の障害を慢性糸球体腎炎・糖尿病性腎症・慢性腎不全など

の従来の疾患分類とは別に、腎障害の存在と糸球体濾過値に基づいて末期腎不全や心血管疾患のリスクとして包括的に捉えようとする疾患概念である。CKDは① 蛋白尿などの尿異常，画像診断，血液，病理での腎障害の存在が明らか，② eGFR < 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup> 未満のいずれかまたは両方が慢性的に3か月以上持続するもの全てと定義される<sup>5</sup>。

#### AKIの疫学とCKD進展

従来，急性腎不全に対して使われてきた Acute Renal Failure (ARF) という用語に変わり，より早期の段階の腎障害を含めた AKI(Acute Kidney Injury)という用語の概念が2004年に初めて提唱された。その後 AKIの診断基準やステージ分類に関する議論がなされ，2012年までに国際基準である RIFLE 基準，AKIN 基準，KDIGO 基準の3つの AKI 診断基準と分類が提案されてきた(表 1a,b,c)。これらにより AKIの基準が統一され，AKIの頻度や予後，病態の解明を目的とした臨床研究が大きく進むことにな

った。AKIの発症頻度は様々だが、米国でのNIS（Nationwide Inpatient Sample）を2000~2009まで解析した研究では、透析を要するAKIは毎年10%ずつ増加していることが計算され、高齢ほどAKIの頻度が高いことから、今後ますます増加していくことが予想される<sup>6</sup>。またRIFLE分類が定義された2004~2012年までのMEDLINEとEMBASEを検索して行ったシステマティックレビューでは、市中発症を調べた7つの研究だけでのAKI発症頻度は8.3%である一方、院内発症だけを調べた52の研究での成人のAKI発症頻度は20.3%と報告されている<sup>7</sup>。さらに、AKIの長期予後に関するメタアナリシスでは、AKIが一過性であっても長期的にCKDおよびESRD（end stage renal disease）へ進展しやすく、そのハザード比はそれぞれ8.82, 3.10と高率である<sup>8</sup>。さらに、AKIとCKDは双方がお互いのリスクとなるだけでなく、生命予後も悪化させることが示唆されている<sup>9</sup>。このように近年、AKI後にCKDを発症するAKI to CKD continuumが臨床的に大きな問題となっており、早急な病態解明が求められている。

CKD の common pathway としての間質線維化と RAS (Renin-Angiotensin System)

CKD の進展には糸球体障害, 尿細管間質障害, 血管障害が関与するが, 1960 年代後

半の報告から始まった尿細管間質病変の進行程度が腎機能低下と相関するという最

終共通経路 (final common pathway) の概念が現在では広く受け入れられている。尿細

管間質病変は, 炎症, 線維化, 尿細管障害と尿細管周囲毛細血管網 (Peritubular

Capillary : PTC) の脱落によって特徴づけられ, 最終的には final common pathway を介

して末期腎不全に至ると考えられる。

間質線維化の過程において, 間質に存在する筋線維芽細胞が重要な働きをする。この

筋線維芽細胞は障害ストレスによって活性化型へと変化し,  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle

actin) の発現増加と同時に細胞外基質や様々なサイトカインの発現を増加させ, 間質

線維化を促進させる。この筋線維芽細胞の起源には不明な点も多く, 尿細管上皮細胞

(EMT ; Epithelial-mesenchymal transition) のほか, 血管内皮細胞 (Endo EMT) , 微



小血管周囲に存在する周皮細胞 (pericyte) , resident fibroblast, Bone marrow-derived fibrocyte/MSC (mesenchymal stem cell) など様々な報告が異なる起源を提唱している<sup>10</sup>。

RAS 阻害薬は臨床における腎保護効果が確認されており広く使用され、RAS の抑制は CKD 治療のゴールドスタンダードである。腎間質線維化における RAS の関与については、下記のようなメカニズムが提唱されている。様々なストレスによる尿細管内圧、組織内圧の上昇が引き金となって、腎組織の RAS 活性化と虚血が生じ血中 Ang (Angiotensin) II が増加もたらされる。血中 Ang II は多くが近位尿細管において AT1 (angiotensin type1) 受容体と結合することで細胞内へ取り込まれ<sup>11</sup>、TGF- $\beta$  の発現が亢進し collagen や fibronectin 等の細胞外基質が蓄積される。そして尿細管間質の線維化が虚血性変化と共に腎機能の低下を進行させる<sup>12</sup>。TGF- $\beta$  以外にも NF- $\kappa$  B (nuclear factor-kappa B) がアンギオテンシノーゲン遺伝子を直接の転写標的としており、腎内アンギオテンシノーゲン—Ang II —NF- $\kappa$  B 間の悪循環による線維化促進のメカニズムも報告されている<sup>13</sup>。そしてこの循環血中 Ang II の腎線維化への関わりについては、

ラットでの Ang II 持続静注モデルにおける検討により、傍髄質皮質および髄質部における線維化障害への関与は小さく、CKD における線維化の主座である皮質部における障害に寄与していることが示されている<sup>14</sup>。

また、RAS 阻害薬による腎保護効果は、種々の実験により血中 RAS に対する阻害効果とは独立した腎局所における RAS 阻害によるものと考えられている<sup>15,16,17,18,19,20</sup>。

全身において RAS は、下流に位置する Ang II 濃度が上昇すると、レニンといった上流の因子に負のフィードバックをかけることが知られているが、加齢や腎不全、高血圧などの病的な条件により、Ang 受容体の up-regulation を介して腎内 Ang II の蓄積が生じ、さらにそれにより近位尿細管におけるアンギオテンシノーゲンの産生増加などが生じ、腎内における RAS がさらに活性化されるといった悪循環が形成されている<sup>21, 22</sup>。そしてこの腎内 Ang II 濃度の上昇は AT1 受容体拮抗薬の投与により完全に抑制されるという実験結果が存在する<sup>23</sup>。

そのほか、RAS を抑制することにより、糸球体細動脈が拡張し尿細管周囲毛細血管の血流が増加することで、尿細管間質への酸素供給が増え低酸素が改善されること<sup>24</sup>、また RAS の活性化は酸化ストレスの原因のひとつであり、酸化ストレスによってもたらされる一酸化窒素の減少による血管収縮、尿細管輸送体への悪影響の改善効果も期待される<sup>25</sup>。

現在までに複数種類の AT1 受容体拮抗薬が存在しており、それぞれの薬剤について、様々な動物モデルを用いた間質線維化への効果の検討が多数なされている。片側虚血再灌流障害による腎虚血後間質線維化モデルを用いた報告としては、トロンボキサラン A2 受容体抑制作用も有する特徴を持つ losartan を投与した報告などがある。文献ごとに動物モデルの作成方法および薬剤の投与開始時期、投与量や期間などの条件が異なるが、eGFR などの腎機能、尿細管構造や間質線維化への影響について異なる結果が示されており<sup>26,27</sup>、losartan に対する腎虚血後間質線維化の反応については現時点で一定の見解が得られていない。

## AKI 後の間質線維化モデル

近年 AKI to CKD continuum の発症機序に関する基礎研究が数多く行われるようになったが、使用される動物モデルは報告により異なっている。シスプラチンなどの薬剤により誘導されているモデルも散見されるが、臨床的に腎性 AKI の原因として虚血による急性尿細管壊死がもっとも頻度が高いこともあり、腎虚血再灌流障害モデルが多く用いられている。腎虚血再灌流障害モデルにおいては、虚血を誘導する方法が様々であり、両側腎動脈クランプが最多、次いで片側のみのクランプが多く、また片側虚血再灌流障害に対側腎摘（あるいは部分切除）を追加したモデルも報告されている。加えて、片側腎虚血再灌流モデルを用いたものについては、対側の片腎摘を先行した pre-CKD における AKI 後の間質線維化に相当するモデルも存在する。

両側の腎虚血再灌流モデルは、腎動脈クランプ時間が短時間であると障害のばらつきが出やすく、一方で虚血時間を延長すると通常 3 日以内に死亡することが多く、

mortality の高さによる実験結果への影響が否定できない。また片側の腎虚血再灌流は mortality と障害の程度のバラつきを改善できる利点があり、Harris らが片側の腎虚血再灌流に対側腎摘を追加するモデルがもっとも臨床における AKI to CKD continuum に近いと主張している<sup>28</sup>。

本研究では AKI to CKD continuum を再現する最適なマウスモデルを検討することを目的として、片側腎虚血再灌流に対側腎摘を追加するモデルの評価を行った。臨床における病態の再現を確認する方法としては、CKD に効果的かつ広く使用される ARB に対する反応性を指標とした。使用する ARB としては、糖尿病性腎症動物モデル<sup>29</sup>や尿細管間質の線維化動物モデルである腎一側尿管結紮（unilateral ureteral obstruction ; UUO）モデル<sup>30</sup>といった慢性腎障害モデルでの腎保護効果が確認されており、血中半減期が長いという特徴を持つ AT1 受容体拮抗薬 telmisartan を選択した。

### 第3章 方法

#### 動物

8週齢、体重23～26gの野生型C57BL/6Jの雄のマウスを使用した。動物実験は全て、東京大学医学部・大学院医学系研究科の動物実験に関する倫理規定およびNIHガイドライン（U.S. Department of Health and Human Services Publish Health Services, National Institutes of Health, NIH Publication No.86-23,1985）に準拠した。マウスの飼育環境として12時間毎の明/暗室のサイクルで食事と水を自由に摂取できるようにした。

#### 実験プロトコール

実験1 Harrisらが提唱しているモデルに準拠し、片側腎虚血再灌流障害および対側片腎摘の有無により、二つの腎虚血後間質線維化モデルを作製した<sup>28</sup>。両群で1日目に左腎に虚血再灌流障害を行い、28日目に屠殺した（I群；n=4）。腎虚血再灌流については、虚血時間を26分とし中等度の障害を誘導した。一方の群には8日目に右

腎摘術をこれに追加して行い (I+N 群 ; n = 6) 二つのモデルを作成した。それぞれの群について、血清学的腎機能評価として BUN の経過、腎虚血後 28 日目における腎臓の萎縮の指標となる腎重量と、病理組織検査による間質線維化の領域の割合をそれぞれ測定し、これら項目の結果から腎虚血後の腎機能の評価した。なお、このプロトコールにおいて 90%以上の生存率が確保された。(図 1)

実験 2 次いで、実験 1 で用いた二つのモデルに対して 10 日目から telmisartan (Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd.より提供) による薬剤介入を行った。telmisartan の投与については 0.5% carboxyl methyl cellulose solution に溶解し、投与量は低用量 (3mg/kg daily by gavage, Low dose 群, I ; n = 6, I+N ; n = 7) と確実な降圧効果を示す容量として設定される用量である高用量 (10mg/kg daily by oral gavage, High dose 群, I ; n = 6, I+N ; n = 8) の 2 群とした。また vehicle 群には等量の 0.5% carboxyl methyl cellulose solution を同様に投与した (I ; n = 10, I+N ; n = 7)。(図 2)

Tail カフ法による血圧測定は 1 日目および 28 日目に行った。血液サンプルは、1, 2, 8, 9, 10, 12, 14, 21, 28 日目に採取した。28 日目に腎臓を採取し、被膜剥離後に腎湿重量を測定した。一部を病理組織標本用に緩衝ホルマリンにて固定し、別途に液体窒素による凍結後に $-80^{\circ}\text{C}$ 下にて保存した。このようにして得られた検体を用いて、telmisartan による作用の確認目的も含めた血圧の変化、血清学的腎機能評価として BUN および血清クレアチニン値（BUN が最大値となる時点および 28 日目）の経過、28 日目における腎臓の萎縮の指標として腎重量、および病理組織検査による間質線維化領域の割合をそれぞれ測定した。さらに、定量的リアルタイム PCR による線維化の指標および促進因子などである mRNA (TGF- $\beta$ 1, PAI-1,  $\alpha$ -SMA, galectin-3, NGAL) の発現量評価、蛋白質レベルでの線維化の指標として  $\alpha$ -SMA, galectin-3 に対する Western blot 解析を行った。腎虚血後 28 日目におけるこれらの腎機能の変化を様々な指標から評価し、同一モデル内での telmisartan 投与の有無や用量による反応の違いを検討した。



## 手術

1 日目に行った虚血再灌流障害は、既報の手順に則り<sup>31</sup>、左腎動脈を 26 分間クランプすることにより作成した。I+N 群に対し 8 日目に行った片腎摘は以下の方法で作成した。塩酸ケタミン 30mg/kg と塩酸キシラジン 8mg/kg を腹腔内投与し麻酔した。十分に麻酔が効いたことを確認したのちに、マウス背部傍正中を皮膚切開後に腎臓の直上にあたる筋層を切開した。腎臓を拳上し、腎動静脈を含む茎を結紮の上、右側の腎臓を摘出した。摘出後は筋層を縫合し、皮膚をクリップにて縫合し閉創した。Sham 群 (n = 8~10) については、左腎動脈クランプおよび右腎摘術ともに、皮膚切開に続き腎臓を体腔より拳上し、クランプおよび結紮を行わずに腎臓を体腔内に戻し、筋層・皮膚を閉創した。

tail カフ法による血圧測定

日中の時間帯にマウスを 37°C の加温器にて 20 分間保温した後に、非観血血圧測定装置 BP-98A を用いて、tail カフ法により収縮期血圧を測定した。測定時はモニター下でマウスが沈静化したことを確認し、加圧時および続く波形の立ち上がりが安定してから、測定された連続する 4~6 回の血圧値の平均値で算出した。

#### 血清学的検査

##### 血中尿素窒素 (BUN: Blood urea nitrogen)

市販キット (尿素窒素 B テスト ; Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) を使用した。プロトコールに従い、96-well プレートリーダー (SpectraMAX Plus ; Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA) を用いて吸光度 570nm で測定した。

##### 血清クレアチニン

既報での手法に準拠し<sup>32</sup>, HPLC (high-performing liquid chromatography) 法により測定した。移動相 (200 mM sodium acetate, pH 5.1) は測定前に作成しフィルター (0.2  $\mu$

m) 処理を行った。血清 (5  $\mu$ l) に HPLC grade acidified acetonitrile (Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan) を加え, vortex した後に遠心した (13,000 x g, 15 分間, 4°C)。上清を完全にチューブに取り, 真空乾燥した後に HPLC 移動相 (125  $\mu$ l) に速やかに再懸濁させた。サンプル (50  $\mu$ l) を 125 x 4.6mm の陰イオン交換カラム (Shodex IC YS-50 ; Showa Denko K.K., Tokyo, Japan) に注入し, 流速 1ml/min で無勾配 HPLC を行った。一測定につき, 吸光度 234nm における紫外吸光スペクトルをサンプル注入後 8 分間モニターし, クレアチニンの溶出時間は 6.0~6.8 分であった。解析ソフトは D-2000Elite (Hitachi High-Technologies Corp., Tokyo, Japan) を用いた。

## 組織評価

虚血再灌流後 28 日で採取した腎臓を 10%緩衝ホルマリンで固定し, パラフィン包埋された腎組織切片 (2  $\mu$  m) を Masson's trichrome (MT) 染色を行った。既報の方法に

従い、皮質部における間質線維化を computer-aided evaluation program (AIS version 4.0 ; Fuji PhotoFilm Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて定量的に評価した<sup>33</sup>。

定量的リアルタイム PCR (polymerase chain reaction)

凍結保存した腎組織標本から Trizol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) を用いて total RNA を回収した。抽出した RNA を DNase I (DNase-free ; Ambion Inc, Austin, TX) を用いて処理し、 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ; Applied Biosystems, Carlsbad, CA) を使用して cDNA を得た。18s ribosomal RNA, TGF- $\beta$ 1, PAI-1 については, TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) および ViiA7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を使用して発現を定量化した。

TaqMan プローブ/プライマーは 18s ribosomal RNA (Assay ID ; Hs99999901\_s1) , TGF- $\beta$ 1 (Assay ID ; Mm00441724\_m1) , PAI-1 (Assay ID ; Mm00435860\_m1) を用い、PCR の反応条件は Fast モードで行い、50°Cを 2 分、95°Cを 20 秒、続いて 95°Cで 1 秒、

60°Cで20秒を40サイクルとした。 $\alpha$ -SMA, galectin-3, NGAL (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin) についてはFast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) および ViiA7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を使用して発現を定量化した。プライマーの配列は,  $\alpha$ -SMA (forward:5'-GTCCCAGACATCAGGGAGTA A-3' ; reverse:5'-TCGGATACTTCAGCGTCAGGA-3') , galectin-3 (forward:5'-CCCTT TGAGAGTGGCAAACCA-3' ; reverse:5'-GTAGGTGAGCATCGTTGACCG-3') , NGAL (forward:5'-AACATTTGTTCCAAGCTCCAGGGC-3' ; reverse:5'-CAAAGCGGGTGAA ACGTTCCTTCA-3') であり, PCR の反応条件はFast モードで行い, 95°Cを20秒, 続いて95°Cで1秒, 60°C (NGAL のみ 58°C) で20秒を40サイクルとした。相対的な遺伝子発現の結果は18s ribosomal RNA にて補正して算出した。

Western blot 解析

凍結保存した腎組織標本を protease inhibitor [ 組成 ; phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (174 µg/ml) (Sigma-Aldrich) , aprotinin (6µg/ml) (Sigma-Aldrich) , leupeptin (10µg/ml) (Sigma-Aldrich) ] を含む radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer [ 組成 ; 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5% sodium deoxycholate, 1% Igepal CA-630 (Sigma Chemical Co.), 9.1 mmol/l dibasic sodium phosphate, 1.7 mmol/l monobasic sodium phosphate, 150 mmol/l NaCl pH7.4 ] とともに氷上でホモジナイズした。遠心を行い上清採取により得た蛋白溶液を Lowry 法による蛋白測定 (NanoDrop 2000c, Thermo scientific,USA) を行い, 20µg 群の蛋白質を含有する検体を調整し, 10% gradient の sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel を使用して電気泳動した。gel から polyvinylidene di-fluoride membrane (Amersham Biosciences Corp,Uppsala, Sweden) への転写した後, TBS-T で溶解した 10%スキムミルクにて室温で 60 分ブロッキングした。一次抗体に抗  $\alpha$ -SMA 抗体 (1A4 ; Sigma-Aldrich Corp,1:1000 希釈) , 抗 galectin-3 抗体 (A3A12,Thermo scientific,1:1000 希釈) をそれぞれ 4°C で一晩反応させた。化学

反応法 (chemiluminescent signal) には ECL plus (Amersham Biosciences Corp.) を用いて CCD camera system (LAS-4000 Mini ; Fuji Photo Film Co.Ltd, Tokyo,Japan) でバンドを検出した。その後, membrane を stripping buffer とともに 50°C で 30 分間反応させたのちに, 抗  $\alpha$ -tubulin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz,CA) で再度 Western Blot 解析を行った。検出バンドは解析ソフトを用いたデンシトメトリー法により  $\alpha$ -tubulin で補正し定量化を行った (Multi Gauge, ver.3.1 ; Fuji Photo Film Co. Ltd.)

## 統計

得られたデータは JMP Pro11 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて統計解析を行い, 結果はすべて平均値  $\pm$  標準偏差で記載した。多群間の比較には分散分析 (ANOVA) を用いた。多重比較 (post-hoc test) においては Tukey-Kramer test により解析した。  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 第4章 結果

### 実験 1

#### 腎重量

慢性腎障害における間質線維化の指標として、28 日目における体重補正した左腎重量

( $\text{g/g} \cdot \text{BW (bodyweight) (\%)}$ ) を図 3 に示した。I 群の虚血側である左腎の体重あたり

の重量は Sham と比較し 46.2% と著明に減少した [Sham  $0.63 \pm 0.20\%$  (n=6), I  $0.29 \pm$

$0.048\%$  (n=4),  $p < 0.01$ ]。一方、I+N 群は左腎重量に Sham との有意差を認めなかった

[Sham  $0.63 \pm 0.20\%$  (n=6), I+N  $0.65 \pm 0.025\%$  (n=6),  $p = 0.25$ ]。I+N 群の左腎の萎縮は I

群と比較し有意に抑制された [ $p < 0.01$ ]。また、I 群の非虚血側である右腎重量は Sham

と比較し統計的有意差はないものの増加傾向であり、代償性肥大の傾向を認めた

[Sham  $0.63 \pm 0.20\%$  (n=6), I  $0.70 \pm 0.020\%$  (n=4),  $p = 0.072$ ]。

#### 血清学的検査



## BUN の経過

I 群, I+N 群の BUN の推移をそれぞれ図 4 に示す。

I 群の BUN は虚血再灌流後にもピークはないが経過中に緩徐に上昇し, 28 日目において有意な軽度の上昇を認めた。[1 日目  $21.7 \pm 1.4$  mg/dl, 28 日目  $26.8 \pm 1.6$  mg/dl,  $p < 0.01$ ]。I+N 群における BUN は対側片腎摘 48 時間後である 10 日目にピークとなった[1 日目  $22.1 \pm 1.8$  mg/dl, peak; 10 日目  $104.8 \pm 16.2$  mg/dl, 28 日目  $34.9 \pm 5.2$  mg/dl]。28 日目における BUN は I+N 群が I 群に比し明らかに高値であった[ $p < 0.01$ ]。

## 病理組織

28 日目の左腎の組織所見では, 両群ともに糸球体変化は明らかでなく, 被膜下に虚脱糸球体を一部認めるのみであった。MT 染色において, I 群では I+N 群と比較し, より広範囲に青く染まる線維化した領域を間質に認めた (図 5a)。この線維化領域を定

量したところ、I+N 群では I 群よりも間質の線維化領域が有意に軽減していた[I 7.6±3.1% (n=4), I+N 3.5±0.8% (n=6),  $p < 0.05$ ] (図 5b)。

実験 1 では下記の結果が得られた。

- ・ I 群では虚血側の腎重量において sham の 50% 以下まで萎縮を認めた。一方で、I+N 群においては、腎萎縮の程度が Sham と有意差を認めないまでに軽減された。

- ・ 組織学的評価においても、I+N 群では I 群よりも間質の線維化領域が有意に軽減していた。

- ・ AKI 後の間質線維化モデルとして、非虚血側の片腎摘の有無による二つのモデルを作製し、非虚血側の腎摘により AKI 後の間質線維化が軽減されることが確認された。

- ・ 本実験では Harris らが提唱した二つのモデルに準拠して作成し、BUN の経過や腎萎縮の程度において既報と同様の結果が得られており、薬剤介入に先立ち、適切にマウスモデルを作成し得たことが確認された。

実験2 telmisartanを用いた治療群として3群を設定し(vehicle;v, Low dose;L (3 mg/kg daily), High dose ; H (10 mg/kg daily)) , 二つの異なる動物モデルに対する治療介入を行った。以下, I群 (I v, I L, I H) , I+N群 (I+N v, I+N L, I+N H) と略記する。

#### 血圧の経過

28日目における収縮期血圧を図6に示す。I v群, I+N v群いずれもShamと比較し収縮期血圧に統計的に有意な差は認めなかった[Sham  $103.4 \pm 4.2$  mmHg (n=7), I v群  $112.6 \pm 9.0$  mmHg (n=10),  $p=0.15$  (vs Sham), I+N v群  $100.8 \pm 7.1$  mmHg (n=7),  $p=0.49$  (vs Sham)]。I H群でのみtelmisartan投与によりvehicle群と比較して有意に血圧の低下を認めた[I L群  $99.3 \pm 10$  mmHg (n=6),  $p=0.40$  (vs I v群), I H群  $96.0 \pm 6.3$  mmHg (n=6),  $p=0.02$  (vs I v群)], [I+N L群  $104 \pm 7.7$  mmHg (n=7),  $p=0.56$  (vs I+N v群), I+N H群  $98.2 \pm 2.9$  mmHg (n=8),  $p=0.17$  (vs I+N v群)]。

## 腎重量

慢性腎障害における間質線維化の指標として、28日目の体重補正した左腎重量 ( $\text{g/g} \cdot \text{BW} (\%)$ ) を図7に示した。IH群において虚血側である左腎の体重あたりの重量はIv群の131.5%に相当し、I群において高用量のtelmisartan投与により腎萎縮が軽減された ( $p < 0.01$ )。IL群およびI+N L群、I+N H群においてはvehicle群と比較して左腎重量に有意な差を認めなかった。[Iv群  $0.45 \pm 0.064 \text{ g/g} \cdot \text{BW} (\%)$  ( $n=10$ ), IL群  $0.41 \pm 0.086 \text{ g/g} \cdot \text{BW} (\%)$  ( $n=6$ ),  $p=0.48$  (vs Iv群), IH群  $0.59 \pm 0.018 \text{ g/g} \cdot \text{BW} (\%)$  ( $n=6$ ),  $p < 0.01$  (vs Iv群)], [I+N v群  $0.67 \pm 0.08 \text{ g/g} \cdot \text{BW} (\%)$  ( $n=7$ ), I+N L群  $0.67 \pm 0.086 \text{ g/g} \cdot \text{BW} (\%)$  ( $n=7$ ),  $p=0.96$  (vs I+N v群), I+N H群  $0.72 \pm 0.055 \text{ g/g} \cdot \text{BW} (\%)$  ( $n=8$ ),  $p=0.32$  (vs I+N v群)]

また、IH群において、代償性肥大の指標となる非虚血側である右腎重量は、左腎における萎縮の軽減を反映して、Iv群と比較して有意に減少していた[Iv群  $0.74 \pm 0.045$

g/g・BW (%) (n=10), I L 群  $0.75 \pm 0.028$  g/g・BW (%) (n=6),  $p=0.63$  (vs I v 群), I H 群  $0.60 \pm 0.052$  g/g・BW (%) (n=6),  $p<0.01$  (vs I v 群)]。

## 血清学的検査

### BUN

I 群, I+N 群の BUN の推移をそれぞれ図 8 に示す。

I 群の 2 日目 (虚血再灌流 24 時間後) の BUN は 3 群間での有意差は認めなかった[I v 群  $27.3 \pm 4.9$  mg/dl (n=10), I L 群  $30.5 \pm 2.1$  mg/dl (n=6),  $p=0.45$  (vs I v 群), I H 群  $26.0 \pm 9.7$  mg/dl (n=6),  $p=0.80$  (vs I v 群)]。28 日目において, I L 群, I H 群共に telmisartan 投与により BUN 値は変化しなかった[I v 群  $26.2 \pm 2.9$  mg/dl (n=10), I L 群  $25.7 \pm 3.0$  mg/dl (n=6),  $p=0.80$  (vs I v 群), I H 群  $27.0 \pm 4.9$  mg/dl (n=6),  $p=0.77$  (vs I v 群)]。

I+N 群では 10 日目 (対側片腎摘 48 時間後) に BUN のピークを認め, この値に 3 群間での有意差は認めず, 薬剤介入開始時点における障害の程度は同等であったと考え

られる[I+N v 群  $85.7 \pm 13$  mg/dl (n=7), I+N L 群  $85.1 \pm 8.7$  mg/dl (n=7),  $p=0.94$  (vs I+N v 群), I+N H 群  $90.3 \pm 11$  mg/dl (n=8),  $p=0.61$  (vs I+N v 群)]。28 日目において, I+N L 群, I+N H 群共に telmisartan 投与により BUN 値は変化しなかった[I+N v 群  $46.0 \pm 7.7$  mg/dl (n=7), I+N L 群  $48.1 \pm 5.1$  mg/dl (n=7),  $p=0.66$  (vs I+N v 群), I+N H 群  $34.8 \pm 9.8$  mg/dl (n=8),  $p=0.10$  (vs I+N v 群)]。

このように I 群, I+N 群ともに, telmisartan の用量によらず, BUN の改善効果は認めなかった。

#### 血清クレアチニン

それぞれのモデルについて BUN 値がピークとなる時点 (I 群 ; 2 日目, I+N 群 10 日目) および 28 日目の 2 点において測定した。

I 群では, 2 日目における I 群間内での血清クレアチニン値に有意差は認めなかった[I v 群  $0.17 \pm 0.054$  mg/dl (n=10), I L 群  $0.18 \pm 0.052$  mg/dl (n=6),  $p=0.69$  (vs I v 群), I H

群  $0.20 \pm 0.040$  mg/dl (n=6),  $p=0.48$  (vs I v 群)]. 28 日目においては, BUN 値では変化を認めなかったが, IH 群において I v 群と比較して有意に低下した[I v 群  $0.16 \pm 0.014$  mg/dl (n=10), IL 群  $0.15 \pm 0.012$  mg/dl (n=6),  $p=0.41$  (vs I v 群), IH 群  $0.14 \pm 0.012$  mg/dl (n=6),  $p<0.05$  (vs I v 群)]. (図 9)

I+N 群では, BUN 値がピークとなる 10 日目 (薬剤介入開始時) における I+N 群間内での血清クレアチニン値に有意差は認めなかった[I+N v 群  $0.55 \pm 0.27$  mg/dl (n=7), I+N L 群  $0.50 \pm 0.058$  mg/dl (n=7),  $p=0.67$  (vs I+N v 群), I+N H 群  $0.50 \pm 0.11$  mg/dl (n=8),  $p=0.91$  (vs I+N v 群)]. 28 日目においては, BUN 値では変化を認めなかったが, I+N H 群において I+N v 群と比較して有意に低下した[I+N v 群  $0.27 \pm 0.23$  mg/dl (n=7), I+N L 群  $0.24 \pm 0.024$  mg/dl (n=7),  $p=0.32$  (vs I+N v 群), I+N H 群  $0.20 \pm 0.028$  mg/dl (n=8),  $p<0.01$  (vs I+N v 群)]. (図 10)

病理組織

28 日目における左腎の病理組織 MT 染色 (図 10a) および間質の線維化領域を定量化した結果を示す (図 10b)。組織所見では, IH 群では telmisartan 投与により Iv 群と比較して間質線維化が有意に軽減していた [fibrotic area in MT Iv 群  $17.5 \pm 2.7\%$  (n=10), IL 群  $16.9 \pm 2.4\%$  (n=6),  $p=0.78$  (vs Iv 群), IH 群  $11.1 \pm 2.6\%$  (n=6),  $p<0.01$  (vs Iv 群)]。I+N 群では間質線維化に群間での有意な差は認めなかった [fibrotic area in MT I+N v 群  $9.9 \pm 2.4\%$  (n=7), I+N L 群  $10.0 \pm 1.3\%$  (n=7),  $p=0.90$  (vs I+N v 群), I+N H 群  $8.4 \pm 1.5\%$  (n=8),  $p=0.31$  (vs I+N v 群)]。

#### 定量的リアルタイム PCR

28 日目に採取した腎組織を用いて腎障害・間質線維化に関連する分子の遺伝子発現を評価した。I 群においては High dose 群でのみ,  $\alpha$ -SMA, PAI-1, TGF- $\beta$ 1, galectin-3, NGAL のすべてで mRNA の発現が, vehicle 群と比較して有意に低下していた [IH 群 (n=7), すべて  $p<0.01$  (vs vehicle(n=10))]



I+N 群においては、いずれの用量でも  $\alpha$ -SMA, PAI-1, TGF- $\beta$ 1, galectin-3, NGAL の mRNA 発現量に有意な差は認められなかった。(図 11a~e)

#### Western blot 解析

定量的リアルタイム PCR で telmisartan 投与により遺伝子発現量に有意な差を認めた I 群における  $\alpha$ -SMA および galectin-3 の蛋白量を Western Blot により解析した(図 12a,b)。

I H 群においては mRNA 発現量と同様に、I v 群と比較して  $\alpha$ -SMA および galectin-3 の蛋白発現量が抑制されていた[ $\alpha$ -SMA ; I L 群 (n=6), p=0.32 (vs I v 群), I H 群 (n=6), p<0.05 (vs I v 群)], [galectin-3 ; I L 群 (n=6), p=0.13 (vs I v 群), I H 群 (n=6), p<0.05 (vs I v 群)]。

実験 2 では、実験 1 で作成したモデルに telmisartan を投与し、下記の結果を得た。

・片側腎虚血再灌流障害のみである I 群において、高用量の telmisartan 投与により、腎萎縮の程度、組織における間質線維化を軽減し得た。

・さらに同高用量 telmisartan 投与群において、 $\alpha$ -SMA、PAI-1、TGF- $\beta$ 1 といった線維化に関わる mRNA のほか、galectin-3、NGAL の mRNA 発現量が低下し、 $\alpha$ -SMA および galectin-3 については、蛋白レベルにおいても発現が低下していることが確認された。

・一方、非虚血側の腎摘を行った I+N 群においては、高用量の telmisartan 投与によって、血清クレアチニン値の改善を認めるのみであった。

## 第5章 考察

AKI 罹患後の CKD の発症・進展が臨床的には数多く観察されているが、その病態メカニズムは十分に明らかにされているとは言い難い。これまでの基礎研究では、虚血による低酸素<sup>34</sup>やミトコンドリアの機能不全による尿細管の機能不全および細胞死<sup>35</sup>、好中球やマクロファージ浸潤による炎症<sup>36</sup>などにより、PTC の脱落<sup>37</sup>および活性化した pericyte の血管内皮細胞からの遊離がもたらされること<sup>38</sup>などがそのメカニズムとして挙げられている。

臨床疫学的な知見により AKI から CKD が発症・進展するとされており、その病態メカニズムを基礎研究によって明らかにするためには、最適な動物モデルの確立が必要不可欠である。上述した病態メカニズムは主に腎虚血再灌流障害後に進展する間質線維化を評価しているが、その動物モデルの詳細は様々であり、どのモデルがもっともヒト臨床に近いかどうかは未だ検証されていない。本研究では、異なる二つの腎虚血

後間質線維化モデルを作製し、ARB に対する反応性を指標に clinical relevance を評価した。

第一に、片側腎虚血再灌流障害に非虚血側の腎摘出を行ったモデルでは、腎虚血後の線維化のみならず、血清学的評価および腎萎縮に関しても腎障害の程度が軽減された。

いずれのモデルでも CKD の common pathway の主座となる尿細管間質障害である間質線維化を主とした慢性腎障害を呈した。さらに AKI を惹起する手法も広く使用されて

いる腎虚血再灌流障害モデルを採用したにも関わらず、慢性期において腎サイズや組織線維化、血清学的項目など様々な観点から評価した腎機能において、片側腎虚血再

灌流障害に非虚血側の腎摘の有無により異なる経過を辿った。次に、telmisartan によ

り腎虚血後間質線維化の軽減効果に差が見られた。すなわち、非虚血側の腎摘出を行

わなかったモデルでのみ線維化を含む腎障害の軽減効果を認めるという telmisartan に

対する反応性の違いを二つのモデル間で認めた。このような知見はすでに報告されて

いる AKI-to-CKD の病態メカニズムがどのような動物モデルで評価されたかを再検証

する必要があること, 今後の新たな基礎研究においても動物モデルの clinical relevance をあらかじめ評価する必要があることを示唆している。

AKI から CKD 進展の最適な動物モデル像を今回作成した二つのモデルの違いから考察する。本研究で用いた動物モデルは, 片側腎虚血再灌流障害に非虚血側の腎摘の有無を加えることにより作成した二つのモデルであるが, 片側の虚血再灌流障害モデルにおいて, 非虚血側の腎臓の存在が post-AKI fibrosis を増強することは「Renal Counterbalance」として古くから知られている<sup>39</sup>。このメカニズムは完全には明らかにされていないが, この現象に関する様々な経路や因子が報告されており, これまでに, 非虚血側を腎摘出することによって虚血側の腎臓において, 皮質内での Endothelin-1 上昇の抑制<sup>40</sup>, 低酸素による増殖因子(HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ) や VEGF (vascular endothelial growth factor) , PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) )の発現の増加抑制, G2/M arrest および JNK signal を介した線維形成

性サイトカイン産生の抑制<sup>41</sup>, low PTEN による尿細管上皮細胞における degeneration 促進<sup>42</sup> がもたらされることなどが挙げられている。一方ここ数年で, AKI から CKD への進展において, マウスを用いた動物実験で Wnt1 などの Wnt 関連因子や Notch, Hh (Hedgehog) など腎発生を司る液性因子が微小血管周囲に存在する pericyte の形質転換を誘導すると報告され, 障害尿細管上皮細胞から分泌される液性因子が線維化促進因子として作用するとして注目されている<sup>43,44</sup>。このような非虚血側の腎臓が存在することで線維化が促進されるという病態は興味深い, ヒト臨床においては虚血側の対側腎が摘出されるというこのような病態が存在する可能性が低いと思われ, ヒトにおける AKI-to-CKD の病態メカニズムの解明に際して最適なモデルとは言い難い。

一方, 本研究によって, ヒト臨床におけるモデルにより近いと思われる非虚血側の腎摘を行わない片側腎虚血再灌流障害モデルを用いて, ARB により腎虚血後間質線維化が軽減されることが示され, AKI to CKD continuum の発症機序における上述以外のメカニズムとして, RAS が関与している可能性が示唆された。

telmisartan 投与により腎虚血後の線維化が軽減したメカニズムについて考察する。本研究では腎組織での  $\alpha$ -SMA の発現低下と共に、TGF- $\beta$ 1, PAI-1, galectin-3 の発現低下を認めており、既報による知見から AKI から CKD への進展にはこれら 3 因子が関与する以下のような pathway が関わっていると考察される。まず、TGF- $\beta$  は EMT を誘導する諸因子の中で最も重要な役割を担っており、そのシグナルは Smad2/3 経路と Smad 非依存性の Ras/Rho/mitogen-activated protein キナーゼ経路を介して伝達される<sup>45</sup>。

UUO モデルでは、結紮側腎における組織中の Ang II 含量の増加、さらに AT1 受容体の発現および Ang II への親和性の増加が確認されており<sup>46,47</sup>、このラットやマウスを用いた検討では、アンジオテンシン受容体拮抗薬が腎組織中アンジオテンシン II の減少および TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA, I 型コラーゲンの発現を抑制し、間質線維化進展を抑制することが報告されている<sup>48</sup>。また、PAI-1 については、培養線維芽細胞においてアルドステロンが PAI-1 の発現を増強するとされ、さらに TGF- $\beta$  とアルドステロンそれぞれ

れによる PAI-1 発現増強作用は相互に影響し、間質の線維化を加速度的に促進している可能性が考えられている<sup>49</sup>。本研究においてもこれらと同様の機序が関与していると考えられる。一方、galectin-3 は Framingham Offspring Cohort において心不全の発症や mortality に関連することが近年に示され臨床的に注目されている。腎臓領域においても血中 galectin-3 値が eGFR や rapid eGFR decline, new-onset CKD と相関することが示され<sup>50</sup>、CKD の発症・進展に関与しうる因子として注目されている。galectin-3 は、 $\beta$ -ガラクトシドに親和性を持つ糖認識ドメインを 1 つ以上有するガレクチンファミリーの 1 つであり、組織に普遍的に発現分布する。そして、アポトーシスなどの細胞周期の制御や細胞接着の他、炎症性サイトカインや酸化ストレスの亢進、血管障害を引き起こすとされる終末糖化産物 (advanced glycation endproducts ; AGEs) の受容体としての機能などを持つ。腎臓の線維化に関しては、UUO モデルでマクロファージからの galectin-3 放出が myofibroblast から procollagen への活性化をもたらし<sup>51</sup>、虚血再灌流障害モデルの比較的早期においてケモカイン・炎症性サイトカイン・ROS (reactive



oxygen species) 産生に関与しているとされる<sup>52</sup>。今回作成した二つの片側腎虚血後の線維化モデルでは、両モデルにおいて galectin-3 の発現量が上昇しており、また線維化が軽減される対側片腎摘を加えたモデルではその発現量が抑制されている。このことから、UUO モデルと同様に、腎虚血後の線維化においても galectin-3 が線維化の促進に関与している可能性が新たに示唆された。また、本研究で認めた telmisartan による線維化抑制効果と galectin-3 の関連については、ラットにおける血管線維化において、アルドステロンが galectin-3 の産生を亢進させ、さらに galectin-3 がアルドステロンにより惹起される線維化をミネラルコルチコイド受容体活性依存性に調節するとの既報があり<sup>53</sup> (参考資料) , 本研究においても telmisartan 投与によりアルドステロンが低下したことで, galectin-3 の発現が低下し抗線維化作用がもたらされた可能性がある。

また、非虚血側の腎摘を行うことで障害側への腎血流（Renal Blood Flow ; RBF）が上昇することは明らかであり、それによってもたらされる虚血側における低酸素の軽減が post-AKI fibrosis の改善に寄与している可能性は高いと言える。そのほか、虚血後の腎障害と RBF の関連性に関する知見として、片腎摘後における腎サイズに関する報告があり、これによると代償性肥大は、腎摘を行うことによる RBF の大きな上昇に伴う残存腎臓へのアミノ酸輸送の上昇によって、PTEN 非依存性に PI3K/mTORC2/S6K1 シグナルが活性化され、蛋白合成が増加することを介してもたらされること、また体重当たりの腎重量については、PTEN および EGFR（Epidermal Growth Factor Receptor）依存性に PI3K/mTORC2/AKT シグナルにより調節されることが報告されている<sup>54</sup>。一方、AT1 受容体拮抗薬は輸出細動脈を拡張し、糸球体濾過圧を低下させることで腎保護作用を発揮するが、そのみならず、腎臓の血管拡張により RBF 自体を上昇させ、腎虚血や低酸素の改善をもたらすことが示されている<sup>55</sup>。これらより、本研究で認めた片側腎虚血再灌流障害モデルにおける telmisartan による post-AKI

fibrosis の軽減効果は、AT1 受容体拮抗薬により非虚血側の腎摘を行った際に生じるような RBF の上昇が虚血側腎に生じたことで、虚血側腎において、組織の虚血や低酸素の軽減による抗線維化作用および前述したような RBF 上昇にもとづく腎肥大による腎萎縮の軽減効果がもたらされた可能性が考えられる。そのほかに、組織への細胞浸潤に関して、高塩分負荷した腎虚血再灌流後の片側腎摘モデル(ラット)において、AT1 受容体拮抗剤である losartan 投与によりアンギオテンシン II 活性が低下し、局所の Th-17 cell などの T リンパ球細胞数が減少し、間質線維化が軽減したとの報告がある<sup>56</sup>。本研究で用いた AT1 受容体拮抗剤は telmisartan ではあるが、これと同様に虚血側腎において浸潤細胞の減少がもたらされ、虚血後間質線維化の抑制に寄与した可能性がある。これらを明らかにするために、本研究で用いた動物モデルにおいて、telmisartan 投与による低酸素やアミノ酸輸送および組織細胞浸潤への作用についての評価が今後追加実験として検討される。

以上から、マウスにおける腎虚血後間質線維化のメカニズムにおいて、線維化における pathway として広く知られている TGF- $\beta$ 1, PAI-1 を介した系に加え、RAS が関与している可能性が示された。さらに本研究で、galectin-3 が腎虚血後間質線維化において促進的に作用している可能性が新たに示唆された。これは galectin-3 がアルドステロンにより惹起される線維化を互いに促進的に調節していると考えられ、本研究に引き続き、血中および腎組織中における RAS の変動などについての評価を検討する。

一方、腎虚血再灌流障害後に進展する間質線維化の評価に際して、いずれ動物モデルが適しているのか。片側の腎虚血再灌流障害を用いた post-AKI fibrosis のモデルは、両側の腎虚血再灌流障害モデルにおける mortality の高さや障害の程度のバラつきという問題を改善できるが、一方で、非虚血側腎の存在の有無が間質線維化メカニズムへ影響し、CKD 治療のゴールデンスタンダードとして使用されている RAS 阻害薬への反応性を変化させることが本研究で示された。非虚血側の腎摘を加えたモデルは、

血清学的手法により経時的かつ簡便に腎障害の程度を評価できる利点があるものの、ヒト臨床に即した動物モデルとは言い難く、また非虚血側の腎摘による RBF の上昇などによってもたらされる多様なメカニズムが作用し、腎虚血後間質線維化の程度が大きく修飾され、真の結果を得られない可能性があることが示唆される。しかしながら一方で、非虚血側の腎摘によりダイナミックに RBF が変化し、間質の線維化に先立つ低酸素や、尿細管上皮細胞における degeneration 促進などといった現象が増幅されうるため、これらのメカニズムのさらなる解明を目的とする際に適している可能性があるだろう。それに対して、AKI to CKD continuum における final common pathway としての間質線維化について、薬剤等の介入に対する反応性の評価などを目的とする際には、線維化への修飾を受けず、ヒト臨床における病態をより再現していると思われる、非虚血側の腎摘を行わない片側腎虚血再灌流障害による動物モデルが適していると考察する。

以上、本研究により **AKI to CKD continuum** の発症機序として **RAS** が関与している可能性が示唆された。また、非虚血側腎の存在の有無による間質線維化メカニズムへの影響が実験結果を左右する可能性が十分考えられ、腎虚血後間質線維化の動物モデルの選択に際しては、研究の目的やターゲットとなるメカニズムに応じて、十分に検討の上選択する必要があることが示唆された。

**AKI to CKD continuum** は臨床的に重要視されており、これに対する腎虚血後間質線維化における動物モデルにおいて、本研究で示した2つのモデルの差異を考慮した上で適切なモデルを採用し、今後の虚血後間質線維化における病態および治療についての究明がなされることが期待される。

## AKI の診断基準

### a. RIFLE 分類

	GFR基準		尿量基準
	血清Cr増加	GFR低下	
risk	基礎値の $\geq 1.5$ 倍	$> 25\%$	$< 0.5$ ml/kg/時 (6時間以上持続)
injury	基礎値の $\geq 2$ 倍	$> 50\%$	$< 0.5$ ml/kg/時 (12時間以上持続)
failure	基礎値の $\geq 3$ 倍 or $\geq 4.0$ mg/dlの増加で 急激なCr 0.5 mg/dl上昇を伴う	$> 75\%$	$< 0.3$ ml/kg/時 (24時間持続) or 無尿 (12時間持続)
loss	持続性の急性腎不全：4週間以上腎機能喪失 (腎代替療法を要する)		
ESKD	末期腎臓病：3ヵ月以上腎機能喪失 (腎代替療法を要する)		

表 1. AKI の診断基準 a. RIFLE 分類<sup>57</sup>

2004年に欧米のADQI (Acute Dialysis Quality Initiative)により血清クレアチニン値と尿量に注目しRIFLE分類が作成された。

## AKI の診断基準

### b. AKIN 分類

ステージ	血清Cr基準	尿量基準
ステージ 1	≥0.3 mg/dlの増加 or 1.5 ~ 2 倍に増加	<0.5 ml/kg/時 (6 時間以上持続)
ステージ 2	2-3 倍	<0.5 ml/kg/時 (12 時間以上持続)
ステージ 3	血清Cr ≥ 3 倍 or ≥4.0 mg/dlの増加で 急激なCr 0.5 mg/dl上昇を伴う (腎代替療法患者はstage 3)	<0.3 ml/kg/時 (24 時間持続) or 無尿 (12 時間持続)

表 1. AKI の診断基準 b. AKIN 分類<sup>58</sup>

RIFLE 分類の後に作成された AKIN 分類では、ベースラインのクレアチニン値を必須としない点が主に異なる。



## AKI の診断基準

### c. KDIGO 分類

ステージ	血清Cr	尿量
1	基礎値の 1.5 ~ 1.9 倍 or ≥0.3 mg/dlの増加	<0.5 ml/kg/時 (6 ~ 12 時間持続)
2	基礎値の 2.0-2.9 倍	<0.5 ml/kg/時 (12 時間以上持続)
3	基礎値の 3 倍 or ≥4.0 mg/dlの増加 or 腎代替療法開始 or 18 歳未満の患者では、 eGFR<35 ml/min/1.73 m <sup>2</sup> の低下	<0.3 ml/kg/時 (24 時間以上持続) or 無尿 (12 時間以上持続)

表 1. AKI の診断基準 c. KDIGO 分類<sup>59</sup>

さらに 2012 年に、主に AKIN 分類を踏まえ、より多くの AKI 患者を診断できる分類が KDIGO 基準として定義された。

## 腎虚血後間質線維化モデル

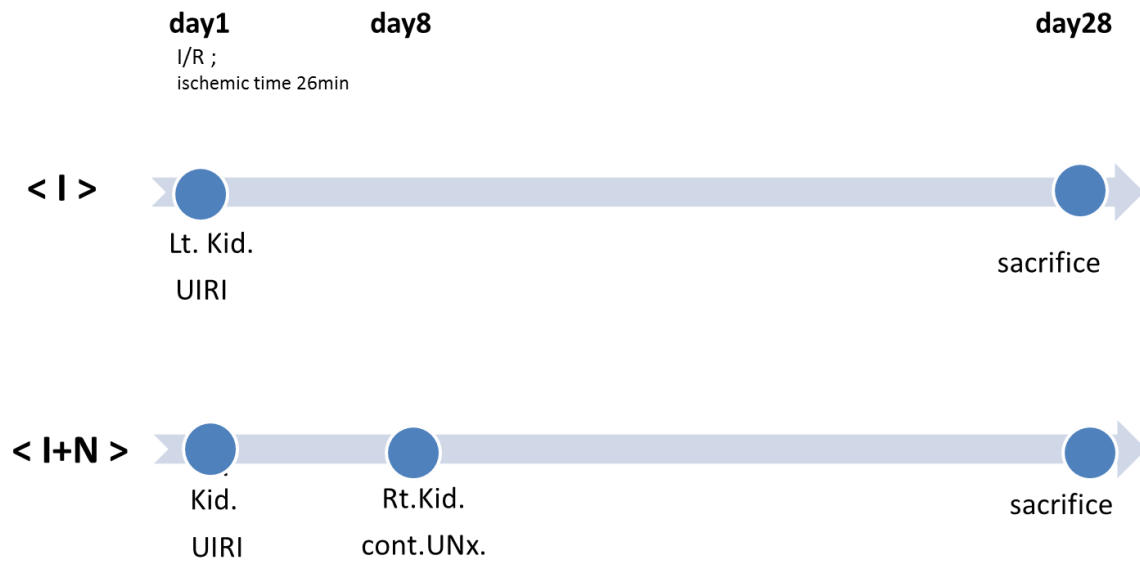


図 1. 腎虚血後間質線維化モデル（実験 1）

実験 1 において、上記のプロトコールに従い二つの腎虚血後間質線維化モデルを作製した。両群に対して 1 日目に左腎臓に虚血再灌流障害を誘導し、I+N 群に対してのみ 8 日目に右腎臓の摘出術を行った。

## 腎虚血後間質線維化モデルへの telmisartan 投与

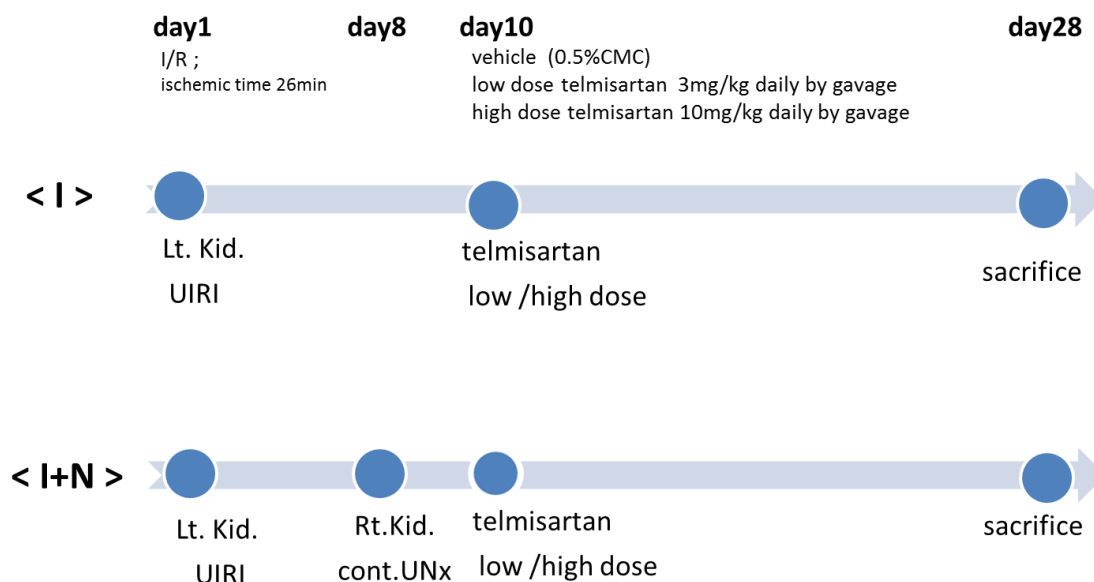


図 2. 腎虚血後間質線維化モデルへの telmisartan 投与スケジュール (実験 2)

実験 2 において、実験 1 で作成した二つのモデルに対し 10 日目から薬剤による介入を行った。telmisartan による介入群を低用量群 (3mg/kg daily) および高用量群 (10mg/kg daily) の 2 群に振り分け、vehicle 群には telmisartan の溶媒に用いた 0.5%CMC を 28 日目まで投与した。

体重当たりの腎重量

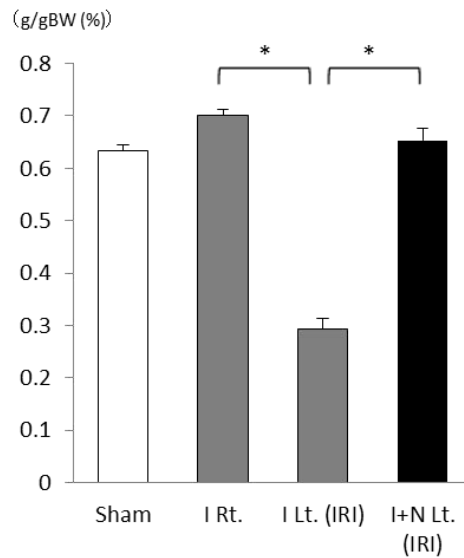
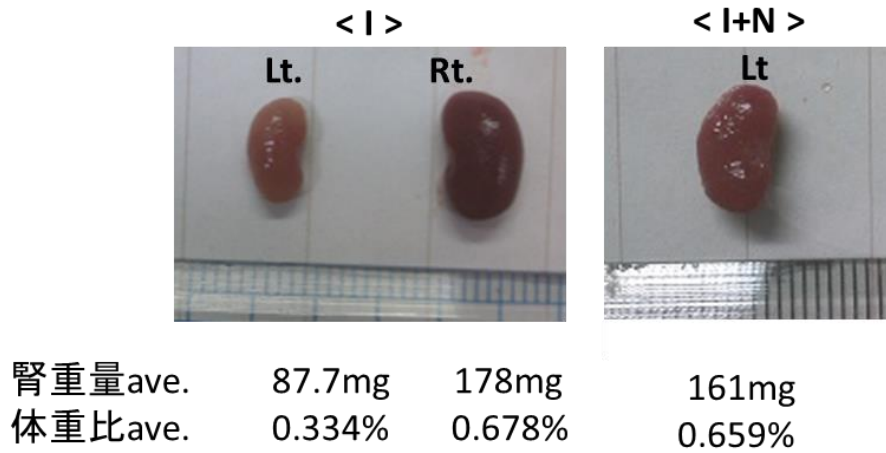


図3. I群, I+N群における体重補正した腎重量 (g/g・BW (%)) (28日目)  
 I+N群の虚血側腎 (Lt.) の腎重量はI群と比較し有意に抑制された[p<0.0001]。  
 I群の非虚血側腎 (Rt.) において統計的有意差はないものの Sham群と比較し, 増大傾向にあった[p=0.07]。 (Sham ; n=6, I ; n=4, I+N ; n=6) \* p < 0.05

## 両モデルにおける BUN の経過

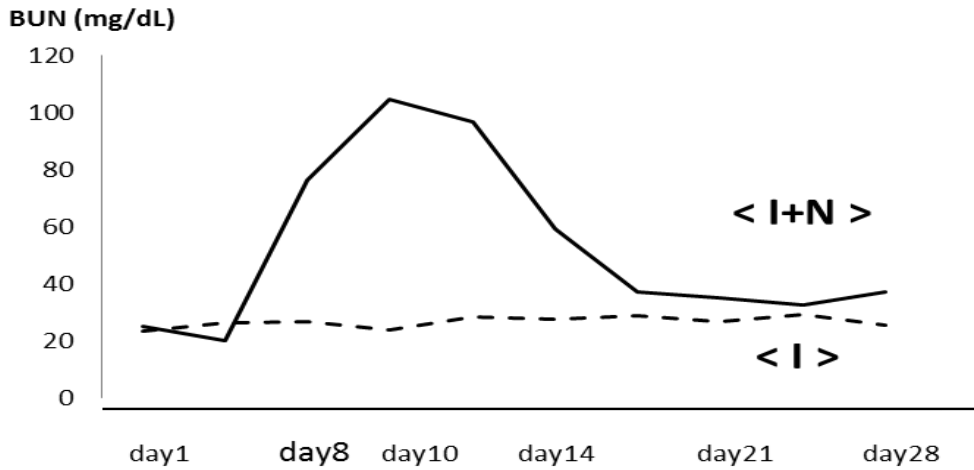
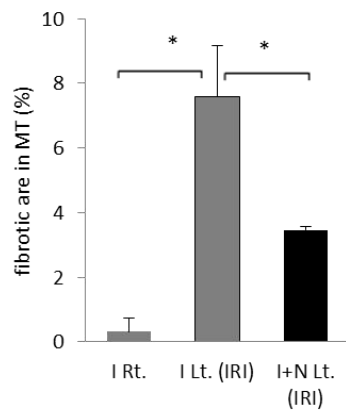
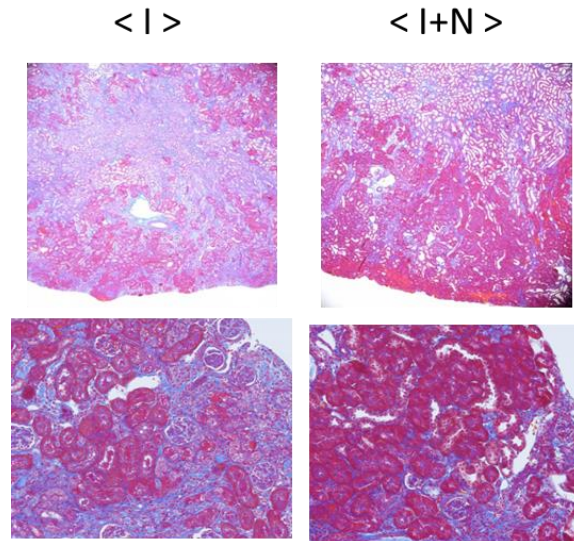


図4. I群およびI+N群におけるBUN値の推移

I群のBUN値は経過中緩徐に増加傾向であった。

I+N群では10日目（対側片腎摘48時間後）にピークとなり、以降、低下するが28日目においてI群と比較し有意に高値であった[p<0.01]。(Sham ; n=6, I ; n=4, I+N ; n=6)

左腎における組織所見 (MT 染色)



上 ; 図 5a 28 日目における左腎臓の組織所見 (MT 染色, 上 ; Magnification x100, ; Magnification x400) 下 ; 図 5b 左腎臓の間質線維化領域の定量

青く染まる間質線維領域は髓質外層および皮質に認めた。慢性障害の指標として皮質外層における間質線維化領域を評価した。

虚血側腎の間質線維化領域が I+N 群では I 群に比べ著明に減少していた [p=0.012)

(Sham ; n=6, I ; n=4, I+N ; n=6)

\* p < 0.05

telmisartan 投与時の収縮期血圧

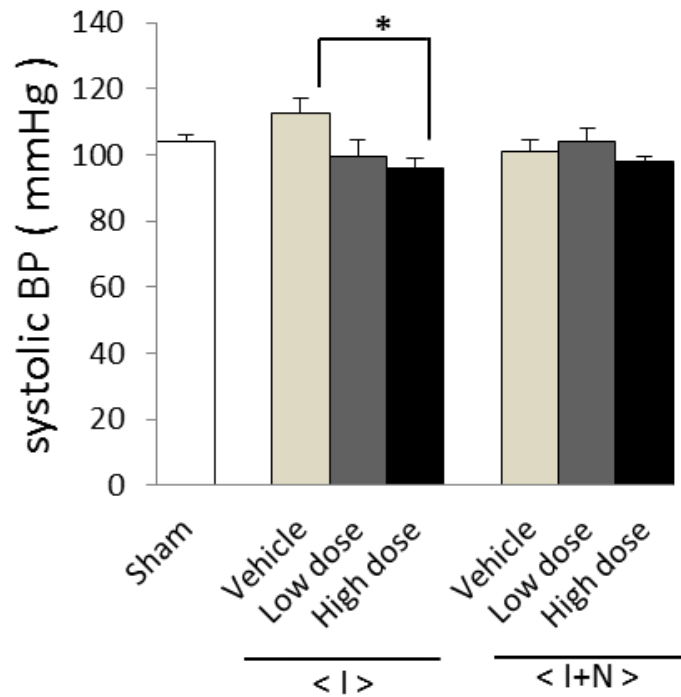


図 6. 28 日目における各群の収縮期血圧

vehicle 群では両群とも Sham と比較し収縮期血圧に有意な差はなかった。telmisartan 投与により血圧に変動を認めたのは I 高用量群のみであり，有意に低下していた [p=0.02]。 (Sham ; n=7, I v ; n=10, I L ; n=6, I H ; n=6 I+N v ; n=7, I+N L ; n=7, I+N H ; n=8)

\* p < 0.05

telmisartan 投与時の体重当たりの左腎重量

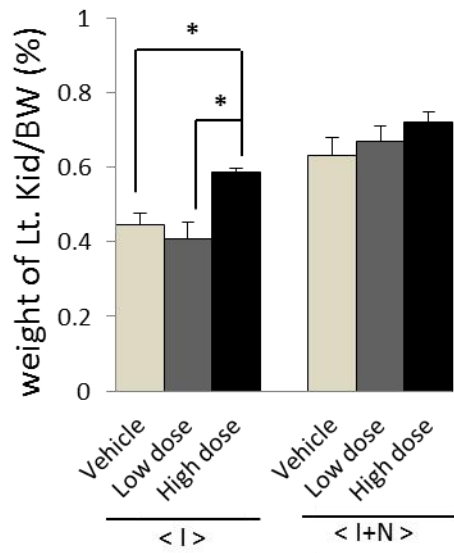
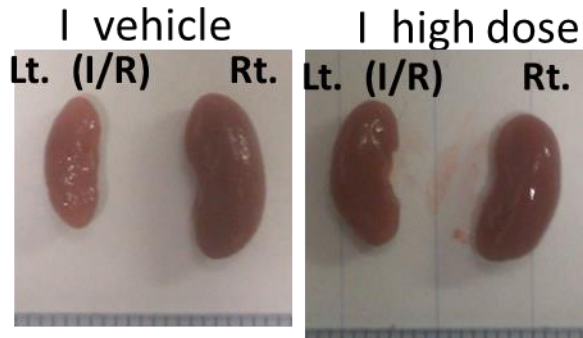


図 7. telmisartan 投与時の 28 日目における体重当たりの左腎重量

vehicle 群において、I+N 群の腎重量は I 群に比し有意に大きく [p<0.001]，1.49 倍に相当した。telmisartan 高用量の投与により I 群での腎萎縮改善効果を認めた [p<0.005]。

(Sham ; n=7, I v ; n=10, I L ; n=6, I H ; n=6 I+N v ; n=7, I+N L ; n=7, I+N H ; n=8)

\* p < 0.05



### telmisartan 投与時の BUN の経過

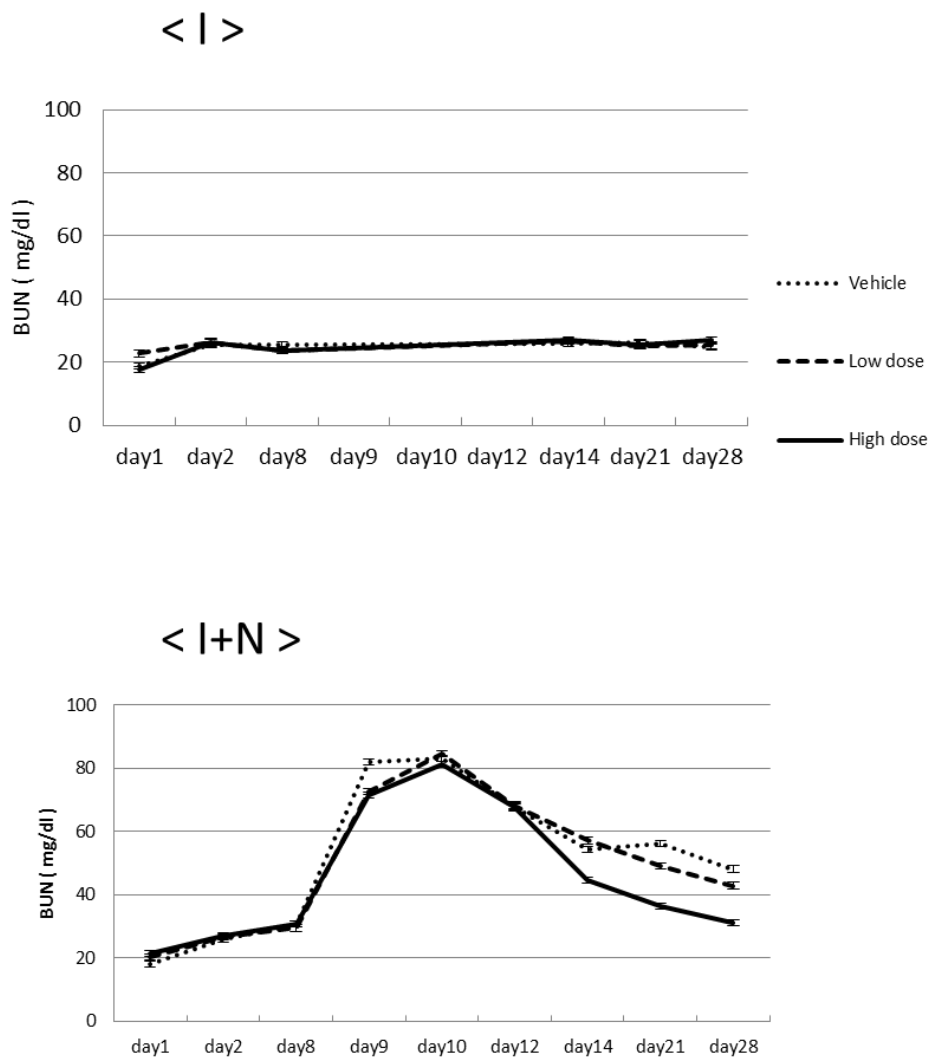


図 8. telmisartan 投与時の BUN の経過（上；I 群，下；I+N 群）

I+N 群ではピークとなる 10 日目（対側片腎摘 48 時間後）の BUN 値（カットオフ値；65-120 mg/dl）により無作為に均等割付し 3 群に分け薬剤介入を開始した。telmisartan 投与群は vehicle より低値で経過したが統計的有意差を認めなかった。（Sham；n=7, Iv；n=10, IL；n=6, IH；n=6 I+N v；n=7, I+N L；n=7, I+N H；n=8）

\*  $p < 0.05$  (vs vehicle)

telmisartan 投与時の血清クレアチニン値 (HPLC)

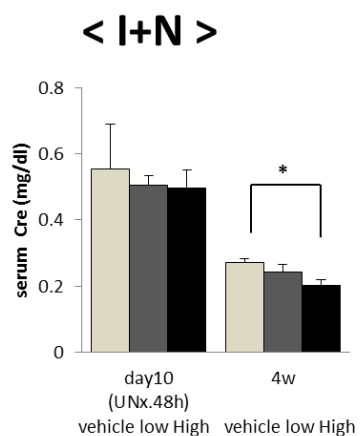
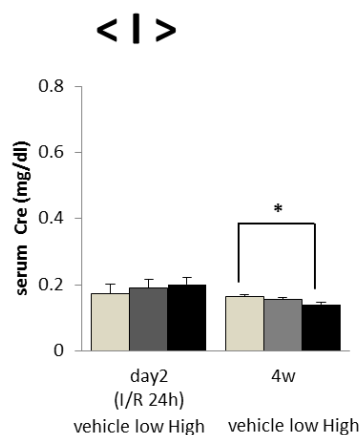
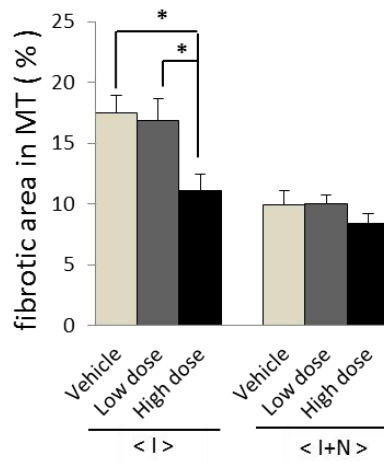
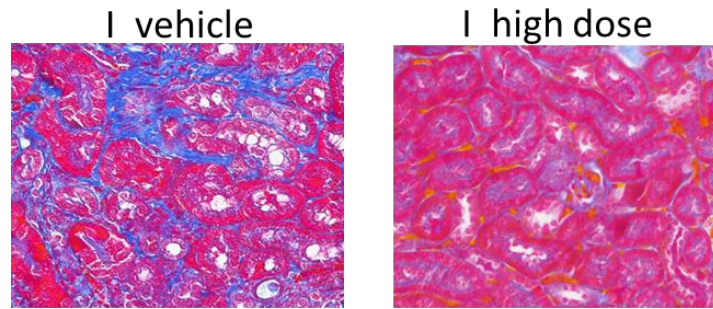


図9 telmisartan 投与時の血清クレアチニン値 (上 ; I 群, 下 ; I+N 群)

I+N 群では telmisartan 高用量投与によりクレアチニン値が低下した[p<0.005]。I 群においてわずかではあるが統計的に有意な低下を認めた[p=0.045]。(Sham ; n=7, I v ; n=10, I L ; n=6, I H ; n=6 I+N v ; n=7, I+N L ; n=7, I+N H ; n=8)

\* p < 0.05

telmisartan 投与時の左腎における組織所見 (MT 染色)



上; 図 10a 28 日目における I v 群および I v 群の左腎臓における組織所見 (MT 染色)

下; 図 10b 左腎臓の間質線維化領域の定量

実験 1 と同様に皮質外層を評価した。I+N 群では telmisartan 投与により間質線維化領域に有意な変化を認めなかった。I 群においては高用量群で線維化領域が vehicle 群の 63.4% まで減少した [p<0.001]。 (Sham ; n=7, I v ; n=10, I L ; n=6, I H ; n=6 I+N v ; n=7, I+N L ; n=7, I+N H ; n=8)

\* p < 0.05

## 定量的リアルタイム PCR

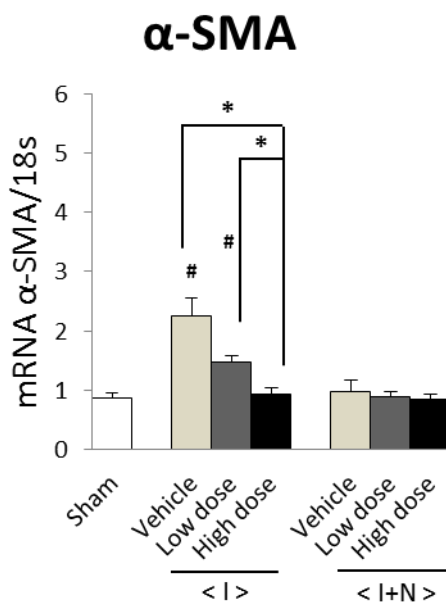


図 11a. 定量的リアルタイム PCR による  $\alpha$ -SMA の mRNA 発現量

28 日目に採取した左腎組織における  $\alpha$ -SMA の mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR を用いて評価した。I 群においてのみ telmisartan 高用量投与により明らかに発現が抑制された [ $p < 0.01$ ]。 (Sham ; n=7, I v ; n=10, I L ; n=6, I H ; n=6 I+N v ; n=7, I+N L ; n=7, I+N H ; n=8)

# vs Sham,  $p < 0.05$ , \*  $p < 0.05$

## 定量的リアルタイム PCR

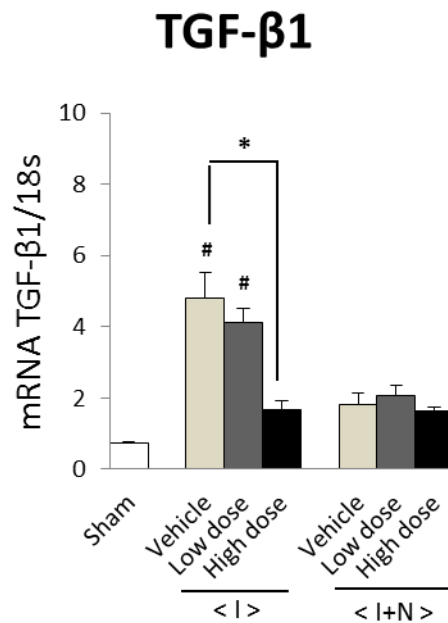


図 11b. 定量的リアルタイム PCR による TGF-β1 の mRNA 発現量

28 日目に採取した左腎組織における TGF-β1 の mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR を用いて評価した。I 群においてのみ、telmisartan 高用量投与により vehicle 群と比較して明らかに発現が抑制された[p<0.01]。(Sham ; n=7, I v ; n=10, I L ; n=6, I H ; n=6 I+N v ; n=7, I+N L ; n=7, I+N H ; n=8)

# vs Sham, p < 0.05, \* p < 0.05

## 定量的リアルタイム PCR

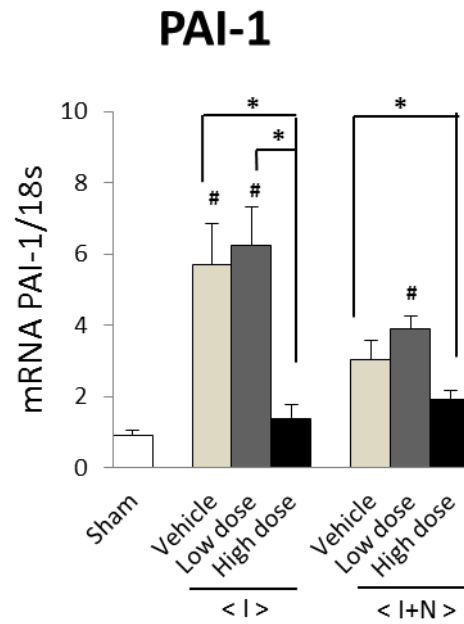


図 11c. 定量的リアルタイム PCR による PAI-1 の mRNA 発現量

28 日目に採取した左腎組織における PAI-1 の mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR を用いて評価した。vehicle 群と比較し，telmisartan 高用量投与により両群において明らかに発現が抑制された[p<0.01]。(Sham ; n=7, I v ; n=10, I L ; n=6, I H ; n=6 I+N v ; n=7, I+N L ; n=7, I+N H ; n=8)

# vs Sham, p < 0.05, \* p < 0.05

## 定量的リアルタイム PCR

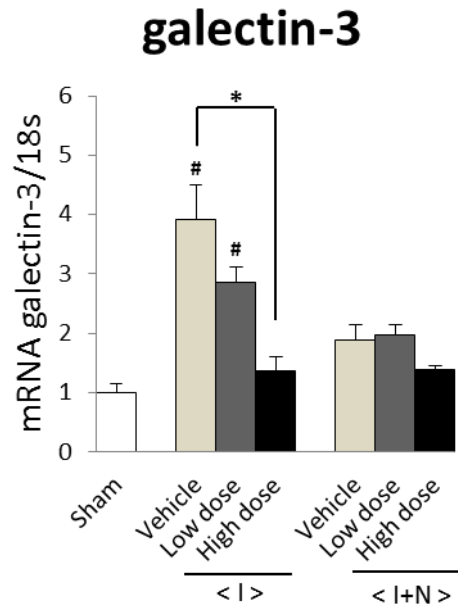


図 11d. 定量的リアルタイム PCR による galectin-3 の mRNA 発現量

28 日目に採取した左腎組織における galectin-3 の mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR を用いて評価した。I 群においてのみ, telmisartan 高用量投与により vehicle 群と比較して明らかに発現が抑制された[p<0.01]。(Sham ; n=7, I v ; n=10, I L ; n=6, I H ; n=6 I+N v ; n=7, I+N L ; n=7, I+N H ; n=8)

# vs Sham, p < 0.05, \* p < 0.05

## 定量的リアルタイム PCR

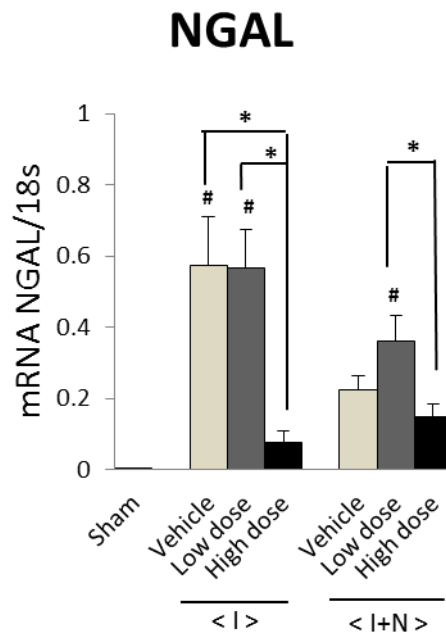


図 11e. 定量的リアルタイム PCR による NGAL の mRNA 発現量

28 日目に採取した左腎組織における NGAL の mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR を用いて評価した。I 群においてのみ、telmisartan 高用量投与により vehicle 群と比較して明らかに発現が抑制された[p<0.01]。(Sham ; n=7, I v ; n=10, I L ; n=6, I H ; n=6 I+N v ; n=7, I+N L ; n=7, I+N H ; n=8)

# vs Sham, p < 0.05, \* p < 0.05



## Western blot 解析

### < I > $\alpha$ -SMA

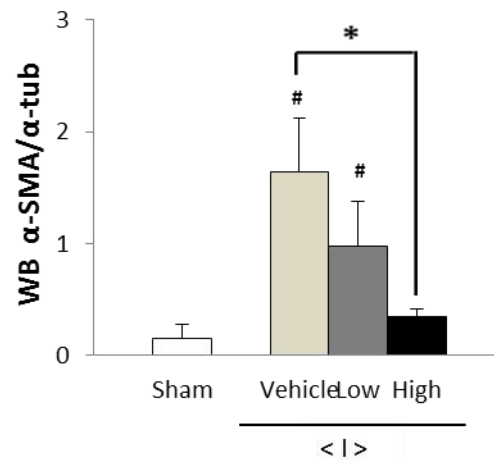
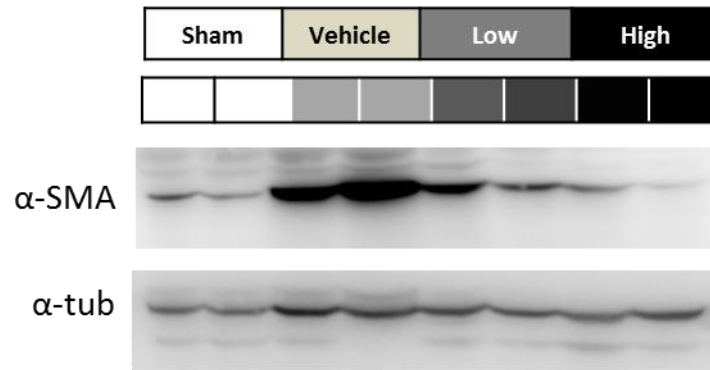


図 12a. Western blot 解析による I 群における  $\alpha$ -SMA の蛋白の mRNA 発現量

I 群において、高用量の telmisartan により mRNA と同様に  $\alpha$ -SMA の蛋白発現量においても、vehicle 群と比較して有意な低下を認めた。Sham ; n=7, I v ; n=10, I L ; n=6, I H ; n=6)

# vs Sham,  $p < 0.05$ , \*  $p < 0.05$

Western blot 解析

< I > Gal-3

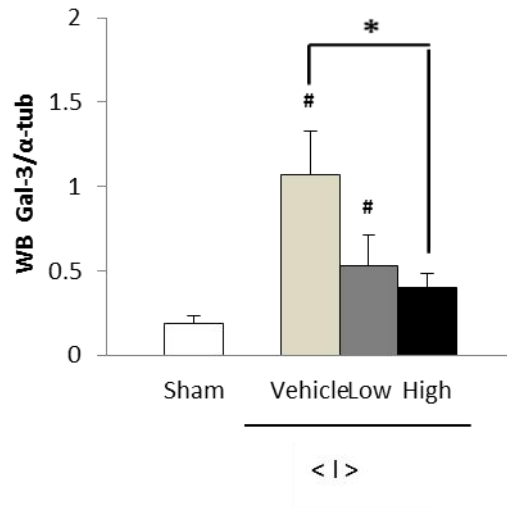
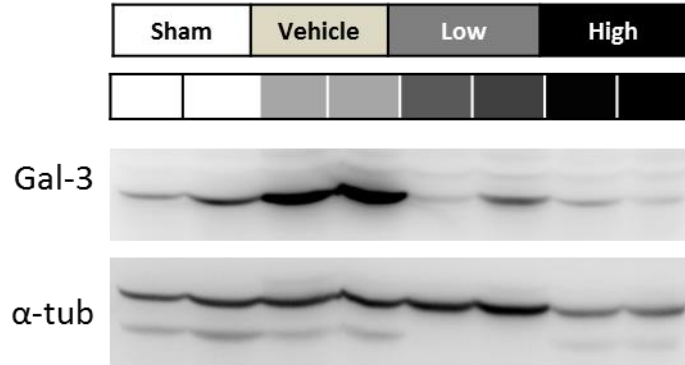
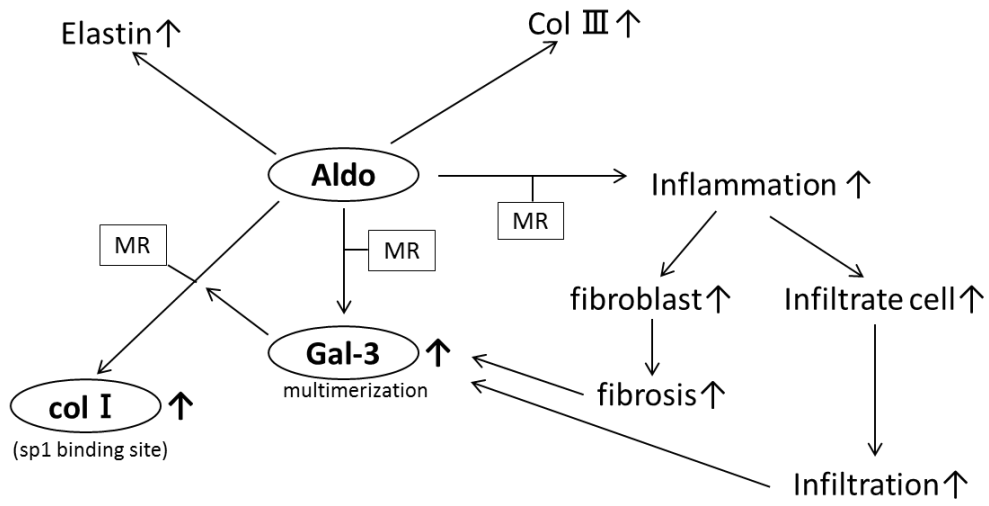


図 12b. Western blot 解析による I 群における galectin-3 の蛋白の mRNA 発現量  
I 群において、高用量の telmisartan により mRNA と同様に galectin-3 の蛋白発現量に  
おいても、vehicle 群と比較して有意な低下を認めた。Sham ; n=7, I v ; n=10, I L ;  
n=6, I H ; n=6)

# vs Sham,  $p < 0.05$ , \*  $p < 0.05$

参考資料

Galectin-3 mediates aldosterone-induced fibrosis  
(MR activation dependent)



参照 Arterioscler Thromb Vasc Biol. 33:67-75, 2013.

## 謝辞

研究の貴重な機会を与えてくださった南学正臣教授に感謝の意を表します。

また、本研究を進めるにあたり、終始適切な助言を賜り、ご指導くださった野入英世

准教授，土井研人講師，濱崎敬文先生に心より感謝します。

参考文献

---

1 図説 日本透析医学会: わが国の慢性維持透析療法の現況 (2013年12月31日現在), 2014.

2 E. Imai, M. Horio, K. Iseki, K. Yamagata, T. Watanabe, S. Hara, N. Ura, Y. Kiyohara, H.

Hirakata, T. Moriyama, Y. Ando, K. Nitta, D. Inaguma, I. Narita, H. Iso, K. Wakai, Y.

Yasuda, Y. Tsukamoto, S. Ito, H. Makino, A. Hishida, and S. Matsuo, 'Prevalence of

Chronic Kidney Disease (Ckd) in the Japanese General Population Predicted by the

Mdrd Equation Modified by a Japanese Coefficient', *Clin Exp Nephrol*, 11, 156-63,

2007.

3 M. Nakayama, T. Sato, M. Miyazaki, M. Matsushima, H. Sato, Y. Taguma, and S. Ito,

'Increased Risk of Cardiovascular Events and Mortality among Non-Diabetic Chronic Kidney

Disease Patients with Hypertensive Nephropathy: The Gonryo Study', *Hypertens Res*, 34,

1106-10, 2011.

- 
- 4 K. Matsushita, M. van der Velde, B. C. Astor, M. Woodward, A. S. Levey, P. E. de Jong, J. Coresh, and R. T. Gansevoort, 'Association of Estimated Glomerular Filtration Rate and Albuminuria with All-Cause and Cardiovascular Mortality in General Population Cohorts: A Collaborative Meta-Analysis', *Lancet*, 375, 2073-81, 2010.
- 5 日本腎臓学会編. CKD 診療ガイド 2012. 東京医学社, 2012.
- 6 R. K. Hsu, C. E. McCulloch, R. A. Dudley, L. J. Lo, and C. Y. Hsu, 'Temporal Changes in Incidence of Dialysis-Requiring Aki', *J Am Soc Nephrol*, 24, 37-42, 2013.
- 7 P. Susantitaphong, D. N. Cruz, J. Cerda, M. Abulfaraj, F. Alqahtani, I. Koulouridis, and B. L. Jaber, 'World Incidence of Aki: A Meta-Analysis', *Clin J Am Soc Nephrol*, 8, 1482-93, 2013.
- 8 S. G. Coca, S. Singanamala, and C. R. Parikh, 'Chronic Kidney Disease after Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Kidney Int*, 81, 442-8, 2012.

- 
- 9 L. S. Chawla, P. W. Eggers, R. A. Star, and P. L. Kimmel, 'Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease as Interconnected Syndromes', *N Engl J Med*, 371, 58-66, 2014.
- 10 R. Kramann, D. P. DiRocco, and B. D. Humphreys, 'Understanding the Origin, Activation and Regulation of Matrix-Producing Myofibroblasts for Treatment of Fibrotic Disease', *J Pathol*, 231, 273-89, 2013.
- 11 J. L. Zhuo, J. D. Imig, T. G. Hammond, S. Orengo, E. Benes, and L. G. Navar, 'Ang II Accumulation in Rat Renal Endosomes During Ang II-Induced Hypertension: Role of  $\alpha_1(1)$  Receptor', *Hypertension*, 39, 116-21, 2002.
- 12 A. Ichihara, J. D. Imig, E. W. Inscho, and L. G. Navar, 'Interactive Nitric Oxide-Angiotensin II Influences on Renal Microcirculation in Angiotensin II-Induced Hypertension', *Hypertension*, 31, 1255-60, 1998.

- 
- 13 H. Kobori, Y. Ozawa, R. Satou, A. Katsurada, K. Miyata, N. Ohashi, N. Hase, Y. Suzuki, C. D. Sigmund, and L. G. Navar, 'Kidney-Specific Enhancement of Ang II Stimulates Endogenous Intrarenal Angiotensinogen in Gene-Targeted Mice', *Am J Physiol Renal Physiol*, 293 , F938-45, 2007.
- 14 T. Mori, and A. W. Cowley, Jr., 'Role of Pressure in Angiotensin II-Induced Renal Injury: Chronic Servo-Control of Renal Perfusion Pressure in Rats', *Hypertension*, 43 , 752-9, 2004.
- 15 Y. Terada, K. Tomita, H. Nonoguchi, and F. Marumo, 'Pcr Localization of Angiotensin II Receptor and Angiotensinogen Mrnas in Rat Kidney', *Kidney Int*, 43, 1251-9, 1993.
- 16 J. P. Richoux, J. L. Cordonnier, J. Bouhnik, E. Clauser, P. Corvol, J. Menard, and G. Grignon, 'Immunocytochemical Localization of Angiotensinogen in Rat Liver and Kidney', *Cell Tissue Res*, 233 (1983), 439-51, 1983.



- 
- 17 I. A. Darby, M. Congiu, R. T. Fernley, C. Sernia, and J. P. Coghlan, 'Cellular and Ultrastructural Location of Angiotensinogen in Rat and Sheep Kidney', *Kidney Int*, 46, 1557-60, 1994.
- 18 M. Sibony, J. M. Gasc, F. Soubrier, F. Alhenc-Gelas, and P. Corvol, 'Gene Expression and Tissue Localization of the Two Isoforms of Angiotensin I Converting Enzyme', *Hypertension*, 21, 827-35, 1993.
- 19 W. W. Schulz, H. K. Hagler, L. M. Buja, and E. G. Erdos, 'Ultrastructural Localization of Angiotensin I-Converting Enzyme (Ec 3.4.15.1) and Neutral Metalloendopeptidase (Ec 3.4.24.11) in the Proximal Tubule of the Human Kidney', *Lab Invest*, 59, 789-97, 1988.
- 20 R. A. Gonzalez-Villalobos, T. Janjoulia, N. K. Fletcher, J. F. Giani, M. T. Nguyen, A. D. Riquier-Brison, D. M. Seth, S. Fuchs, D. Eladari, N. Picard, S. Bachmann, E. Delpire,

- 
- J. Peti-Peterdi, L. G. Navar, K. E. Bernstein, and A. A. McDonough, 'The Absence of Intrarenal Ace Protects against Hypertension', *J Clin Invest*, 123, 2011-23, 2013.
- 21 L. G. Navar, and A. Nishiyama, 'Why Are Angiotensin Concentrations So High in the Kidney?', *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 13, 107-15, 2004.
- 22 H. Kobori, M. Nangaku, L. G. Navar, and A. Nishiyama, 'The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease', *Pharmacol Rev*, 59, 251-87, 2007.
- 23 M. C. Prieto-Carrasquero, H. Kobori, Y. Ozawa, A. Gutierrez, D. Seth, and L. G. Navar, 'At1 Receptor-Mediated Enhancement of Collecting Duct Renin in Angiotensin Ii-Dependent Hypertensive Rats', *Am J Physiol Renal Physiol*, 289, F632-7, 2005.

- 
- 24 J. T. Norman, R. Stidwill, M. Singer, and L. G. Fine, 'Angiotensin Ii Blockade Augments Renal Cortical Microvascular Po<sub>2</sub> Indicating a Novel, Potentially Renoprotective Action', *Nephron Physiol*, 94, p39-46, 2003.
- 25 P. Katavetin, T. Miyata, R. Inagi, T. Tanaka, R. Sassa, J. R. Ingelfinger, T. Fujita, and M. Nangaku, 'High Glucose Blunts Vascular Endothelial Growth Factor Response to Hypoxia Via the Oxidative Stress-Regulated Hypoxia-Inducible Factor/Hypoxia-Responsible Element Pathway', *J Am Soc Nephrol*, 17 , 1405-13, 2006.
- 26 M. E. Pagtalunan, J. L. Olson, and T. W. Meyer, 'Contribution of Angiotensin Ii to Late Renal Injury after Acute Ischemia', *J Am Soc Nephrol*, 11, 1278-86, 2000.
- 27 R. Bellomo, C. Ronco, J. A. Kellum, R. L. Mehta, and P. Palevsky, 'Acute Renal Failure - Definition, Outcome Measures, Animal Models, Fluid Therapy and Information

- 
- Technology Needs: The Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (Adqi) Group', *Crit Care*, 8, R204-12, 2004.
- 28 N. I. Skrypnyk, R. C. Harris, and M. P. de Caestecker, 'Ischemia-Reperfusion Model of Acute Kidney Injury and Post Injury Fibrosis in Mice', *J Vis Exp*, 9 (78), 2013.
- 29 C. Sato-Horiguchi, D. Ogawa, J. Wada, H. Tachibana, R. Kodera, J. Eguchi, A. Nakatsuka, N. Terami, K. Shikata, and H. Makino, 'Telmisartan Attenuates Diabetic Nephropathy by Suppressing Oxidative Stress in Db/Db Mice', *Nephron Exp Nephrol*, 121, e97-e108, 2012..
- 30 H. Sugiyama, M. Kobayashi, D. H. Wang, R. Sunami, Y. Maeshima, Y. Yamasaki, N. Masuoka, S. Kira, and H. Makino, 'Telmisartan Inhibits Both Oxidative Stress and Renal Fibrosis after Unilateral Ureteral Obstruction in Acatalasemic Mice', *Nephrol Dial Transplant*, 20, 2670-80, 2005.

- 
- 31 T. Yamamoto, E. Noiri, Y. Ono, K. Doi, K. Negishi, A. Kamijo, K. Kimura, T. Fujita, T. Kinukawa, H. Taniguchi, K. Nakamura, M. Goto, N. Shinozaki, S. Ohshima, and T. Sugaya, 'Renal L-Type Fatty Acid--Binding Protein in Acute Ischemic Injury', *J Am Soc Nephrol*, 18, 2894-902, 2007
- 32 P. S. Yuen, S. R. Dunn, T. Miyaji, H. Yasuda, K. Sharma, and R. A. Star, 'A Simplified Method for Hplc Determination of Creatinine in Mouse Serum', *Am J Physiol Renal Physiol*, 286, F1116-9, 2004.
- 33 K. Doi, K. Okamoto, K. Negishi, Y. Suzuki, A. Nakao, T. Fujita, A. Toda, T. Yokomizo, Y. Kita, Y. Kihara, S. Ishii, T. Shimizu, and E. Noiri, 'Attenuation of Folic Acid-Induced Renal Inflammatory Injury in Platelet-Activating Factor Receptor-Deficient Mice', *Am J Pathol*, 168, 1413-24, 2006.

- 
- 34 A. J. Polichnowski, R. Lan, H. Geng, K. A. Griffin, M. A. Venkatachalam, and A. K. Bidani, 'Severe Renal Mass Reduction Impairs Recovery and Promotes Fibrosis after Aki', *J Am Soc Nephrol*, 25, 1496-507, 2014.
- 35 C. A. Virbasius, J. V. Virbasius, and R. C. Scarpulla, 'Nrf-1, an Activator Involved in Nuclear-Mitochondrial Interactions, Utilizes a New DNA-Binding Domain Conserved in a Family of Developmental Regulators', *Genes Dev*, 7, 2431-45, 1993.
- 36 M. De Palma, M. A. Venneri, R. Galli, L. Sergi Sergi, L. S. Politi, M. Sampaolesi, and L. Naldini, 'Tie2 Identifies a Hematopoietic Lineage of Proangiogenic Monocytes Required for Tumor Vessel Formation and a Mesenchymal Population of Pericyte Progenitors', *Cancer Cell*, 8, 211-26, 2005.
- 37 D. W. Johnson, H. J. Saunders, R. C. Baxter, M. J. Field, and C. A. Pollock, 'Paracrine Stimulation of Human Renal Fibroblasts by Proximal Tubule Cells', *Kidney Int*, 54, 747-57, 1998.

- 
- 38 S. L. Lin, T. Kisseleva, D. A. Brenner, and J. S. Duffield, 'Pericytes and Perivascular Fibroblasts Are the Primary Source of Collagen-Producing Cells in Obstructive Fibrosis of the Kidney', *Am J Pathol*, 173, 1617-27, 2008.
- 39 W. F. Finn, 'Enhanced Recovery from Postischemic Acute Renal Failure. Micropuncture Studies in the Rat', *Circ Res*, 46, 440-8, 1980.
- 40 A. Kato, and A. Hishida, 'Amelioration of Post-Ischaemic Renal Injury by Contralateral Uninephrectomy: A Role of Endothelin-1', *Nephrol Dial Transplant*, 16, 1570-6, 2001.
- 41 L. Yang, T. Y. Besschetnova, C. R. Brooks, J. V. Shah, and J. V. Bonventre, 'Epithelial Cell Cycle Arrest in G2/M Mediates Kidney Fibrosis after Injury', *Nat Med*, 16, 535-43, 2010.
- 42 R. Lan, H. Geng, A. J. Polichnowski, P. K. Singha, P. Saikumar, D. G. McEwen, K. A. Griffin, R. Koesters, J. M. Weinberg, A. K. Bidani, W. Kriz, and M. A. Venkatachalam, 'Pten Loss Defines a Tgf-Beta-Induced Tubule Phenotype of Failed Differentiation and Jnk Signaling During Renal Fibrosis', *Am J Physiol Renal Physiol*, 302, F1210-23, 2012.

---

43 G. Campanholle, G. Ligresti, S. A. Gharib, and J. S. Duffield, 'Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 3. Novel Mechanisms of Kidney Fibrosis', *Am J Physiol Cell Physiol*, 304, C591-603, 2013.

44 O. H. Maarouf, A. Aravamudhan, D. Rangarajan, T. Kusaba, V. Zhang, J. Welborn, D. Gauvin, X. Hou, R. Kramann, and B. D. Humphreys, 'Paracrine Wnt1 Drives Interstitial Fibrosis without Inflammation by Tubulointerstitial Cross-Talk', *J Am Soc Nephrol*, Jul 23, 2015.

45 M. Iwano, D. Plieth, T. M. Danoff, C. Xue, H. Okada, and E. G. Neilson, 'Evidence That Fibroblasts Derive from Epithelium During Tissue Fibrosis', *J Clin Invest*, 110, 341-50, 2002.

46 S. S. el-Dahr, J. Gee, S. Dipp, B. G. Hanss, R. C. Vari, and J. Chao, 'Upregulation of Renin-Angiotensin System and Downregulation of Kallikrein in Obstructive Nephropathy', *Am J Physiol*, 264, F874-81, 1993.



- 
- 47 K. H. Yoo, V. F. Norwood, S. S. el-Dahr, I. Yosipiv, and R. L. Chevalier, 'Regulation of Angiotensin Ii At1 and At2 Receptors in Neonatal Ureteral Obstruction', *Am J Physiol*, 273 , R503-9, 1997.
- 48 Y. Y. Fan, A. Nishiyama, Y. Fujisawa, H. Kobori, D. Nakano, J. Matsuura, N. Hase, H. Hitomi, H. Kiyomoto, H. Urata, and M. Kohno, 'Contribution of Chymase-Dependent Angiotensin Ii Formation to the Progression of Tubulointerstitial Fibrosis in Obstructed Kidneys in Hamsters', *J Pharmacol Sci*, 111, 82-90, 2009.
- 49 W. Huang, C. Xu, K. W. Kahng, N. A. Noble, W. A. Border, and Y. Huang, 'Aldosterone and Tgf-Beta1 Synergistically Increase Pai-1 and Decrease Matrix Degradation in Rat Renal Mesangial and Fibroblast Cells', *Am J Physiol Renal Physiol*, 294, F1287-95, 2008.
- 50 D. M. Gopal, M. Kommineni, N. Ayalon, C. Koelbl, R. Ayalon, A. Biolo, L. M. Dember, J. Downing, D. A. Siwik, C. S. Liang, and W. S. Colucci, 'Relationship of Plasma Galectin-3

---

to Renal Function in Patients with Heart Failure: Effects of Clinical Status, Pathophysiology of Heart Failure, and Presence or Absence of Heart Failure', *J Am Heart Assoc*, 1 (5), 2012.

51 N. C. Henderson, A. C. Mackinnon, S. L. Farnworth, T. Kipari, C. Haslett, J. P. Iredale, F. T. Liu, J. Hughes, and T. Sethi, 'Galectin-3 Expression and Secretion Links Macrophages to the Promotion of Renal Fibrosis', *Am J Pathol*, 172, 288-98, 2008.

52 A. P. Fernandes Bertocchi, G. Campanhole, P. H. Wang, G. M. Goncalves, M. J. Damiao, M. A. Cenedeze, F. C. Beraldo, V. de Paula Antunes Teixeira, M. A. Dos Reis, M. Mazzali, A. Pacheco-Silva, and N. O. Camara, 'A Role for Galectin-3 in Renal Tissue Damage Triggered by Ischemia and Reperfusion Injury', *Transpl Int*, 21, 999-1007, 2008.

53 L. Calvier, M. Miana, P. Reboul, V. Cachofeiro, E. Martinez-Martinez, R. A. de Boer, F. Poirier, P. Lacolley, F. Zannad, P. Rossignol, and N. Lopez-Andres, 'Galectin-3 Mediates Aldosterone-Induced Vascular Fibrosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33, 67-75, 2013.

---

54 J. K. Chen, K. Nagai, J. Chen, D. Plieth, M. Hino, J. Xu, F. Sha, T. A. Ikizler, C. C.

Quarles, D. W. Threadgill, E. G. Neilson, and R. C. Harris, 'Phosphatidylinositol

3-Kinase Signaling Determines Kidney Size', *J Clin Invest*, 125, 2429-44, 2015.

55 H. Kobori, H. Mori, T. Masaki, and A. Nishiyama, 'Angiotensin Ii Blockade and Renal

Protection', *Curr Pharm Des*, 19, 3033-42, 2013.

56 P. Mehrotra, J. B. Patel, C. M. Ivancic, J. A. Collett, and D. P. Basile, 'Th-17 Cell

Activation in Response to High Salt Following Acute Kidney Injury Is Associated with

Progressive Fibrosis and Attenuated by at-1r Antagonism', *Kidney Int*, 88, 776-84, 2015.

57 R. Bellomo, C. Ronco, J. A. Kellum, R. L. Mehta, and P. Palevsky, 'Acute Renal Failure -

Definition, Outcome Measures, Animal Models, Fluid Therapy and Information

Technology Needs: The Second International Consensus Conference of the Acute

Dialysis Quality Initiative (Adqi) Group', *Crit Care*, 8, R204-12, 2004..

---

58 G. M. Chertow, E. Burdick, M. Honour, J. V. Bonventre, and D. W. Bates, 'Acute Kidney Injury, Mortality, Length of Stay, and Costs in Hospitalized Patients', *J Am Soc Nephrol*, 16, 3365-70, 2005..

59 A. Khwaja, 'Kdigo Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Injury', *Nephron Clin Pract*, 120, c179-84, 2012.