

イヌとネコの慢性腎臓病の病態機序における
腎内レニン・アンジオテンシン系の関与

山口大学大学院連合獣医学研究科
臨床獣医学講座 臨床病理学研究室

美谷 沙和音

目次

総緒	1
第一章：レニンおよびアンジオテンシン II の腎内発現と腎病態との関連性	
1) 緒言	5
2) 材料および方法	7
3) 成績	15
4) 考察	19
5) 小括	26
6) 図および表	28
第二章：アンジオテンシン変換酵素およびアンジオテンシン変換酵素 2 の腎内 発現と腎病態との関連性	
1) 緒言	37
2) 材料および方法	40
3) 成績	47
4) 考察	51
5) 小括	58
6) 図および表	60
総括	66
謝辞	72
参考文献	73

総緒

慢性腎臓病（CKD;Chronic Kidney Disease）は、腎臓の構造異常や機能低下が慢性的に続く疾病概念である。ヒトでは世界的な問題として取り上げられており、国内で見ると、日本の CKD 患者数は推計 1330 万人（国内の成人人口の 13. 3%）を占めている。そのうち治療が必要とされている患者は約 600 万人（成人人口の 6%）ともいわれている。

CKD は、獣医学領域でも大きな問題となっており、特にイヌやネコでは近年の高齢化にともない増加の一途を辿っている。イヌとネコの CKD については、国際腎臓病研究グループ（IRIS; International Renal Interest Group）が血漿クレアチニン値を基にした病期分類と推奨治療法を 2006 年に発表しており（2009 年に小改訂）、現在は IRIS の指針に準じた診断と治療がスタンダードになっている。しかしながら、IRIS の指針はヒトの CKD に関する情報が基礎になっており、CKD の病態メカニズムにおける動物種差はほとんど考慮されていない。すでに、CKD の発生および進行に関わる病態メカニズムがイヌとネコで異なることは報告されており（Yabuki et al., 2009）、イヌでは糸球体の障害が、ネコでは尿細管間質障害が CKD の進行に深く関わることが示唆されている。この動物種間の違いには、上皮間葉転換が深く関わりと示唆されているが（Yabuki et al., 2009）、その他のメカニズムについては不明な点が多い。特に、近年注目される CKD とレニンアンジオテンシン系（RAS）との関連についてはその解明が急務である。

RASに関する研究は、レニンの発見以来 100 年以上の歴史を経た現在でも全世界で活発に行われている。RAS の主な役割は、血圧および体液バランスの調節であり、これは血液循環を介した全身調節機構（全身性 RAS）としてよく知られている。一方、近年の研究では、ある組織や器官には RAS の全ての因子が揃い、これが全身性 RAS と関連あるいは独立して機能することが明らかにされており（局所 RAS）、その機能的意義に注目が集まっている (Navar and Nishiyama, 2004)。

RAS は生命維持に必須の生理機構であるが、近年、RAS が過剰に活性化すると様々な病態を引き起こすことが知られるようになった。これには、高血圧のみならず、心筋梗塞や CKD の進行、両者が密に関連した心腎連関など、多くの病理学的イベントが含まれており (Danilczyk and Penninger, 2006)、特に CKD は RAS の活性化が病態進行のリスクファクターとなることが数多くの研究から明らかにされている (Remuzzi et al., 2002; Prieto-Carrasquero et al., 2004)。この病態メカニズムには、全身性 RAS と局所 RAS の双方が関与するが、特に腎内局所 RAS の活性化が重要であるとされている (Navar and Nishiyama, 2004; Huang et al., 2006; Mori et al., 2006)。これらのことは、主に実験動物で明らかにされてきたことだが、ヒトでも腎臓の発生、腎機能の調節および CKD の進行など様々な局面に腎内 RAS が関与することが報告されており (Yamamoto et al., 2007; Siragy and Carey 2010)、腎内 RAS の活性化より増加した Ang II が糸球体や間質の障害を誘発することも明らかにされている (Benigni et al., 2010)。このような病理学的メカニ

ズムが解明され、さらに、数多くの臨床試験の結果から（ヒト臨床試験）、人医ではアンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACEI）やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬（ARB）といった RAS の阻害薬が CKD の進行抑制を目的に汎用されている。

一方、獣医学領域では、イヌとネコの CKD で ACEI の投与が日常的に行われているにも関わらず、CKD と RAS の活性化に関する研究は不足している。特に、腎内 RAS に関する研究は皆無であり、イヌとネコの特徴に合わせた CKD の治療戦略を構築するためには、CKD の発生および進行機序における動物種の特徴を明らかにする必要がある。そこで、本研究では、イヌとネコの CKD における腎内 RAS の関与を明らかにすることを目的とした研究を行った。第一章では、RAS の律速酵素であるレニンと最終産物かつ細胞障害に深く関わる Ang II について、腎臓の組織学的障害とその発現動態との関連性を明らかにすることを目的として組織学および免疫組織化学的検索を行った。さらに、第二章では、Ang II 産生に深く関わる ACE および ACE のホモログで新しい RAS の因子として注目されている ACE2 (Wolf and Ritz, 2005) について、その発現の動態と組織学的障害との関連性を解析した。

第1章

レニンおよびアンジオテンシン II の 腎内発現と腎病態との関連性

緒言

レニン・アンジオテンシン系（RAS）は血圧調節、糸球体濾過量の調節、体液成分の調節など生命維持に必須の生理学的機構である。一方、RAS は組織の線維化やリモデリングの病理機序にも深く関与することが知られており、特に慢性腎臓病（CKD）では、RAS の亢進により引き起こされるアンジオテンシン（Ang）II の過剰産生、およびそれに続発する全身性高血圧が直接的あるいは間接的に血管動態の異常を引き起こす（van Kats et al., 2001）。

このような血行動態の異常により、腎臓では糸球体高血圧や糸球体の硬化性変化が誘導される。一般的には、血行動態の異常による腎障害は、全身性の循環 RAS の影響を強く受けると考えられるが、近年では、腎障害、特に腎臓の線維化機序には循環 RAS だけではなく局所 RAS の活性化も深く関与することが示唆されている（Mahmood et al., 2006）。

局所 RAS とは、近年提唱されている新しい RAS の機構である。古くから知られている古典的な循環 RAS は肝臓で産生されるアンジオテンシノーゲン、腎臓の傍糸球体装置で産生されるレニン、および肺や血管内皮のアンジオテンシン変換酵素（ACE）の作用によって循環血液中で Ang II が産生されるのに対し、局所 RAS は RAS の構成因子の全てが組織および器官内に *in situ* で合成されて循環血液を介さずに作用するものである。局所 RAS の活性化は腎臓、心臓、肺、脳など多くの器官で線維化の機序に関与することが証明されており、特に、腎臓はこの病理機序がよく知られている代表的な器官である（Schunkert et al.,

1991)。局所 RAS が活性化すると組織 Ang II が過剰に産生され、この組織 Ang II は複雑な経路を介して腎臓を線維化に導く。例えば、過剰に産生された Ang II は、その受容体である AT1 レセプターあるいは AT2 レセプターを介して nuclear factor κ B や activator protein 1 などの転写因子を活性化させる (Mezzano et al., 2001)。これら転写因子の活性化は、種々の成長因子 (transcription factor β など)、サイトカイン (interleukin 6 など)、ケモカイン (monocyte chemoattractant protein 1) およびその他の因子 (plasminogen activator inhibitor 1) を活性化させ、これら因子が細胞外基質産生のメディエータとなって最終的に腎臓の線維化を引き起こす (Mezzano et al., 2001)。この機序は実験動物を用いた研究により証明されてきたが、(Ishidoya et al., 1995; Pimentel et al., 1995; Takase et al., 2005) ヒトの腎疾患の進行にも同様のメカニズムが関与することが明らかにされている (Kobori et al., 2009)。しかしながら、イヌとネコの腎疾患については RAS の構成因子の腎組織内発現を調べた報告は無く、イヌやネコでも腎疾患の進行に RAS、特に局所 RAS の活性化が関与するのかは明らかではない。

そこで本章では、イヌとネコの CKD について、RAS の律速酵素として働くレニン、および最終産物である Ang II の腎内発現と動態について免疫組織化学的に精査を行った。始めに、CKD と診断されたイヌおよびネコの腎臓組織を病理組織学的に観察し、腎臓の組織障害を定量的に評価し、イヌとネコの CKD の病態の違いを明らかにした。次いで、レニンおよび Ang II の変化が腎臓の組織障害の程度とどのような関係性を持つのかを明らかにした。

材料および方法

1. 症例

鹿児島大学農学部附属動物病院において死亡あるいは安楽死後に病理解剖に供されたイヌ 19 頭およびネコ 13 頭の腎臓を使用した。また、獣医外科学実習において外科手術を実施した後に安楽死されたビーグル 3 頭の腎臓を正常腎として使用した。この実習は鹿児島大学の動物実験指針に従って適正に実施された。猫では、組織観察の結果から腎臓の組織構造に病変が観察されない 2 頭のネコの腎臓を正常腎として取り扱った（6 ヶ月齢のネコ伝染性腹膜炎の症例と 6 ヶ月齢交通事故のネコ）。なお、本研究では、症例のカルテ情報および組織学的検査の結果から急性腎不全と診断される症例、糸球体腎炎と診断される症例を除外した。また、ACEI を投与されていた症例も除外した。

腎臓を採取したイヌの年齢は約 6 ヶ月齢から 20 歳齢、ネコの年齢は約 6 ヶ月齢から 17 歳齢であった。全ての症例において血漿クレアチニン（pCre）濃度を含む血液検査を実施した。最後に測定された pCre 濃度の平均値は、イヌでは平均 2.3 mg/dl（中央値 0.62 mg/dl、四分位範囲 0.53-3.36 mg/dl）、ネコでは平均 2.3 mg/dl（中央値 1.33 mg/dl、四分位範囲 0.71-3.54 mg/dl）だった。病理解剖に供されたイヌ 20 頭とネコ 11 頭は、カルテ情報および組織学的評価から CKD と診断された。血漿クレアチニン値を基にした International Renal Interest Society（IRIS）の CKD の病期分類では（Grauer, 2009）、イヌ 10 頭と猫 5

頭がステージ 1 (イヌ ; <1.4 mg/dl、ネコ ; <1.6 mg/dl) に、イヌ 1 頭とネコ 2 頭がステージ 2 (イヌ ; 1.4-2.0 mg/dl、ネコ ; 1.6-2.8 mg/dl) に、イヌ 5 頭とネコ 2 頭がステージ 3 (イヌ ; 2.0-5.0 mg/dl、ネコ ; 2.8-5.0 mg/dl)、イヌ 3 頭とネコ 2 頭がステージ 4 (イヌ およびネコ ; >5.0 mg/dl) に分類された。

2. 標本作成

2-1. 組織切片作製および一般染色

採取した腎臓は、約 5 mm 厚 (約 1×1 cm 角) にスライスした後、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬した。24 時間 4°C で固定した後に、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄し、常法に従いパラフィン包埋した。3 μm 厚の切片を作製し、組織学的観察のためにはヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色、マッソン・トリクロム (MT) および過ヨウ素酸メセナミン銀 (PAM) 染色を施した。免疫染色は、レニンと Ang II について以下の方法で行った。

2-2. 免疫組織化学 (免疫染色)

一次抗体には、抗レニン兔ポリクローナル抗体 (筑波大学 村上教授より分与) と抗 Ang II 兔ポリクローナル抗体 (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, U.S.A.) を使用し

た。二次抗体にはビオチン化抗兔 IgG (H+L) 山羊血清 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, U.S.A.) を使用した。抗体希釈の希釈は 1%の牛血清アルブミン (BSA; Fraction V, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) を含む生理的リン酸緩衝液 (PBS; pH7.4) で行った。抗レニン兔ポリクローナル抗体は 10,000 倍希釈、抗 Ang II 兔ポリクローナル抗体は 4,000 倍希釈、ビオチン化抗兔 IgG (H+L) 山羊血清は 200 倍希釈で使用した。陰性コントロール試験は一次抗体の代わりに正常ウサギ IgG (R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.) を 2.5 μ g/ml の濃度で使用して行った。

免疫染色は以下の手順で行った。

- 1) 脱パラフィン
- 2) 再水和
- 3) マイクロウェーブ熱処理による抗原賦活化処理

抗原賦活化には 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を使用した。マイクロウェーブ照射 (750W) には家庭用電子レンジ (NE-5350F; National, Osaka, Japan) を使用した。予加熱 5 分で緩衝液を沸騰させ、スライドグラスを投入してマイクロウェーブ照射を 10 分間行った。照射後は室温で 20 分間放置した。

- 4) 3%過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの不活化 (30 分)
- 6) PBS 浸透 (5 分×3 回)

- 7) 3%BSA/PBS によるブロッッキング (室温、60 分)
- 8) 一次抗体でインキュベート (4 °C、一晚)
- 9) PBS で洗浄 (5 分×3 回)
- 10) 二次抗体でインキュベート (室温、30 分)
- 11) PBS で洗浄 (5 分×3 回)
- 12) ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン液 (Ready to use、DakoCytomation, Glostrup, Denmark) でインキュベート (室温、15 分)
- 13) PBS で洗浄 (5 分×3 回)
- 14) 3,3'-diaminobenzidine (DAB buffer tablet, Merck, Darmstadt, Germany) による発色 (1 ml につき 3 μ l の 3%過酸化水素を混和、室温、5 分)
- 15) 冷却蒸留水による反応停止
- 16) マイヤーのヘマトキシリンで核染色

2-3. 組織計測

腎臓の組織障害度を定量的に評価するために、以下の項目について組織計測を行った。

- 1) 腎小体の直径 : PAS 染色標本を使用し、過去の報告に基づいて計測を行った (Yabuki et al., 1999)。すなわち、1 切片上から血管極および尿細管極が認められる腎小体を 1 個体あたり約 20 個選抜した。血管極と尿細管極を結ぶ線を縦軸と仮定し、接眼マイクロメー

タを用いてその横軸の糸球体包外壁から外壁までの最大幅を計測した。

2) 糸球体の硬化スコア : MT 染色標本を使用し、過去の方法に基づいて計測を行った (Raji et al., 1984)。1 個体あたり約 50 個の糸球体を観察し、メサンギウム基質の増殖、メサンギウム細胞の増殖および基底膜病変により毛細血管腔が圧迫あるいは消失した硬化領域を基に各糸球体を以下のグレードに分類した。

グレード 0 ; 正常な糸球体 (係数 0)

グレード 1 ; 25%未満の領域に硬化を認める糸球体 (係数 1)

グレード 2 ; 25~50%領域に硬化を認める糸球体 (係数 2)

グレード 3 ; 50~75%の領域に硬化を認める糸球体 (係数 3)

グレード 4 ; 75%以上の領域に硬化を認める糸球体 (係数 4)

グレード 0 の糸球体数を a、グレード 1 の糸球体数を b、グレード 2 の糸球体数を c、グレード 3 の糸球体数を d、グレード 4 の糸球体数を e とし、以下の数式によりスコアを算出した。

$$\text{硬化スコア} = \{ (0 \times a + 1 \times b + 2 \times c + 3 \times d + 4 \times e) / a + b + c + d + e \} \times 100$$

3) 間質への細胞浸潤スコア : PAS 染色標本を使用した。各件 200 倍の倍率の重複しない領域を約 20 カ所観察し、各視野を間質への細胞浸潤の程度により以下のグレードに分類した。

グレード 0 ; 細胞浸潤を認めない (係数 0)

グレード1；視野の25%未満の領域に細胞浸潤を認める（係数1）

グレード2；視野の25～50%の領域に細胞浸潤を認める（係数2）

グレード3；視野の50～75の領域に細胞浸潤を認める（係数3）

グレード4；視野の75%以上の領域に細胞浸潤を認める（係数4）

グレード0の視野数をa、グレード1の視野数をb、グレード2の視野数をc、グレード3の視野数をd、グレード4の視野数をeとし、以下の数式によりスコアを算出した。

$$\text{間質への細胞浸潤スコア} = \{(0 \times a + 1 \times b + 2 \times c + 3 \times d + 4 \times e) / a + b + c + d + e\} \times 100$$

4) 間質の線維化スコア：MT染色標本を使用した。各個体につき200倍の倍率で重複しない領域を約20カ所観察し、各視野を間質の線維化の程度により以下のグレードに分類した。

グレード0；結合組織の増生を認めない（係数0）

グレード1；視野の25%未満の領域に結合組織の増生を認める（係数1）

グレード2；視野の25～50%の領域に結合組織の増生を認める（係数2）

グレード3；視野の50～75の領域に結合組織の増生を認める（係数3）

グレード4；視野の75%以上の領域に結合組織の増生を認める（係数4）

グレード0の視野数をa、グレード1の視野数をb、グレード2の視野数をc、グレード3の視野数をd、グレード4の視野数をeとし、以下の数式によりスコアを算出した。

$$\text{間質の線維化スコア} = \{(0 \times a + 1 \times b + 2 \times c + 3 \times d + 4 \times e) / a + b + c + d + e\} \times 100$$

5) Ang II 陽性シグナルスコア：Ang II に対する免疫染色標本を使用した。各個体につき 200 倍の倍率での重複しない領域を約 10 カ所観察した。陽性シグナルは尿細管と間質の浸潤細胞に観察されたため別々に評価した。評価は皮質で行った。なお、免疫染色では尿細管の部位の同定が困難であるためネフロンの各区画には分類せず一括して尿細管として評価した。

5-1) 尿細管の Ang II 陽性シグナルスコア：各視野を以下のようにグレードに分類した。

グレード 0；尿細管上皮に陽性シグナルを認めない（係数 0）

グレード 1； 25%未満の尿細管に陽性シグナルを認める（係数 1）

グレード 2； 25～50%の尿細管に陽性シグナルを認める（係数 2）

グレード 3； 50～75 の尿細管に陽性シグナルを認める（係数 3）

グレード 4； 75%以上の尿細管に陽性シグナルを認める（係数 4）

グレード 0 の視野数を a、グレード 1 の視野数を b、グレード 2 の視野数を c、グレード 3 の視野数を d、グレード 4 の視野数を e とし、以下の数式によりスコアを算出した。

尿細管の Ang II 陽性シグナルスコア = $\{(0 \times a + 1 \times b + 2 \times c + 3 \times d + 4 \times e) / a + b + c + d + e\} \times 100$

5-2) 間質の浸潤細胞における Ang II 陽性シグナルスコア：各視野を以下のようにグレードに分類した。

グレード 0；陽性浸潤細胞を認めない（係数 0）

グレード1；視野の25%未満の領域に陽性細胞浸潤を認める（係数1）

グレード2；視野の25～50%の領域に陽性細胞浸潤を認める（係数2）

グレード3；視野の50～75の領域に陽性細胞浸潤を認める（係数3）

グレード4；視野の75%以上の領域に陽性細胞浸潤を認める（係数4）

グレード0の視野数をa、グレード1の視野数をb、グレード2の視野数をc、グレード3の視野数をd、グレード4の視野数をeとし、以下の数式によりスコアを算出した。

間質の浸潤細胞におけるAng II陽性シグナルスコア = $\{(0 \times a + 1 \times b + 2 \times c + 3 \times d + 4 \times e) / (a + b + c + d + e)\} \times 100$

6) レニン陽性シグナルスコア：過去の報告に基づいて計測を行った (Oliverio et al., 1998, Yabuki et al., 2002)。すなわち、レニンに対する免疫染色標本の全視野を観察し、陽性シグナルの認められる血管数をA、全糸球体数をBとして測定した。以下の数式によりスコアを算出した。

レニン陽性シグナルスコア = $(A / B) \times 100$

3. 統計学的解析

pCre 値および上記の組織計測で得られた各パラメータの関連性をピアソンの相関係数を用いて評価した。解析には、PASW software program for Windows (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, USA)を使用した。

成績

1. 慢性腎臓病の病理組織学的特徴および病態との関連

1-1. 組織学的観察

健康犬として採取した 3 頭のビーグルの腎臓には、明らかな組織学的異常は認められなかった。また、6 ヶ月齢のネコ 2 頭（交通事故後の安楽死と猫伝染性腹膜炎の罹患後に安楽死）の腎臓にも組織学的異常は認められなかった（図 1-1）。その他の症例では、全ての症例でメサンギウム基質の増殖と糸球体基底膜の肥厚を主徴とする糸球体の硬化性病変が様々な程度で観察された（図 1-2 A&B）。少数例ではあるが、糸球体毛細血管内皮の増殖、メサンギウム細胞の増殖、糸球体基底膜の二重化なども観察された。また、間質への単核細胞の浸潤、尿細管の萎縮および扁平化を伴う拡張、間質の結合組織増生からなる尿細管間質病変が観察された（図 1-2 C&D）。間質に浸潤した細胞はリンパ球あるいは形質細胞が主体であり、マクロファージも観察された（図 1-3）。

1-2. 定量的解析

各種病変パラメータと pCre 値との相関関係を表 1-1 に示す。イヌでは糸球体の硬化スコア ($R=0.59$, $P<0.05$)、間質への細胞浸潤スコア ($R=0.71$, $P<0.05$) および間質の線維化スコア ($R=0.68$, $P<0.01$) が pCre 値と正の相関関係を示した。腎小体の大きさは pCre 値と

有意な相関を示さなかった。ネコでは、pCre 値と相関を示したのは間質の線維化スコアのみであった ($R=0.64$ 、 $P<0.01$)。糸球体の硬化スコア、間質への細胞浸潤スコアおよび腎小体の直径は有意な相関を示さなかった。

2. レニンの免疫組織化学的観察

2-1. 腎臓内分布

イヌでは、22 頭全ての腎臓にレニンの陽性シグナルが観察された。正常腎では糸球体近傍の血管壁にシグナルが観察された (図 1-4 B)。CKD 腎でもレニンの陽性シグナルは糸球体近傍の血管壁に観察され、その局在に正常腎との違いは認められなかった (図 1-4 A)。

ネコでは、13 頭中 12 頭の腎臓にレニンの陽性シグナルが観察された。正常腎では陽性シグナルは糸球体近傍の血管壁に観察されたが、イヌに比べて陽性領域は明らかに広く、糸球体から離れた領域まで陽性反応が観察された (図 1-4 D)。CKD 腎の所見も正常腎と同様であり、糸球体近傍のやや広い領域に陽性シグナルが観察された (図 1-4 C)。一次抗体の代わりに正常兔 IgG を使用した陰性コントロールでは、陽性シグナルは検出されなかった。

2-2. 定量的解析

レニン陽性シグナルスコアと各種組織障害パラメータとの相関関係を表 1-2 に示した。イヌでは、腎小体の直径がレニン陽性シグナルスコアと正の相関関係を示した ($R=0.42$ 、

$P<0.05$)。糸球体の硬化スコア、間質の線維化スコアおよび間質への細胞浸潤スコアはレニン陽性シグナルスコアとの間に有意な相関関係を示さなかった。ネコでは、レニン陽性シグナルスコアは如何なる組織障害パラメータとも有意な相関関係を示さなかった。

3. Ang II の免疫組織化学的観察

3-1. 腎臓内分布

3-2. 定量的解析

Ang II 陽性シグナルスコアと各種組織障害パラメータとの相関関係を表 1-2 に示した。

Ang II の陽性シグナルは尿細管上皮細胞と間質の浸潤細胞に観察されるため、両者は別々に評価した。

イヌでは、尿細管上皮の Ang II 陽性シグナルスコアは pCre 値および種々のパラメータのいずれとも有意な相関関係を示さなかった。一方、間質の浸潤細胞の陽性シグナルスコアは、pCre 値 ($R=0.61$ 、 $P<0.01$)、糸球体の硬化スコア ($R=0.85$ 、 $P<0.01$)、間質への細胞浸潤スコア ($R=0.65$ 、 $P<0.01$) および間質の線維化スコア ($R=0.73$ 、 $P<0.01$) との間に有意な正の相関関係を認めた。腎小体の直径との間には有意な相関は認められなかった。

ネコでは、尿細管上皮の Ang II 陽性シグナルスコアは糸球体硬化スコア ($R=0.83$ 、 $P<0.01$) と間質への細胞浸潤スコア ($R=0.67$ 、 $P<0.01$) との間に有意な正の相関関係を認めた。pCre

値、間質の線維化スコアおよび腎小体の直径との間には有意な相関は認められなかった。

間質の細胞浸潤の陽性シグナルも同様の結果を示した。すなわち、糸球体硬化スコア

($R=0.67$ 、 $P<0.01$) と間質への細胞浸潤スコア ($R=0.65$ 、 $P<0.05$) との間に有意な正の相

関関係を認めたが、その他のパラメータとの間には有意な相関を認めなかった。

考察

レニン は RAS の鍵となる酵素とされ、腎臓の糸球体傍細胞から分泌される (Kon, 1999)。

RAS には全身性の循環 RAS と組織固有の局所 RAS があるが、一般的には、健常動物の腎臓に存在するレニンは全身性 RAS の構成因子と考えられている。一方、局所 RAS の構成因子としてのレニンも腎臓内に存在し、ヒト、ラットおよびマウスで行なわれた近年の研究では、レニン mRNA 蛋白は傍糸球体細胞だけではなく、尿細管細胞や集合管の主細胞にも存在することが証明されている (Prieto-Corrasquero et al., 2008)。この尿細管や集合管に存在するレニンは腎臓内局所 RAS の構成因子であり、近位尿細管で合成されて尿細管腔内に分泌されたアンジオテンシノーゲンを下流のネフロン区画である遠位尿細管で Ang I に変換すると考えられている。さらに、この Ang I はさらに下流の集合管において集合管上皮に存在する ACE の作用で Ang II に変換されると考えられている (Rohrwasser et al., 1999; Lantelme et al., 2002; Kang, 2008)。このような腎内局所 RAS は様々な器官の線維化機序に関与していると考えられており、糖尿病性腎症、高血圧性腎症、多発性嚢胞腎など様々な腎疾患で腎内局所 RAS の活性化が証明されている (Kagami et al., 1997; Loghman-Adham et al., 2004; Hartner et al., 2006)。そして、最近のヒト医学では、このような腎内局所 RAS の活性化が、CKD の進行に重要な役割を果たすと考えられている (Siragy and Carey, 2010)。

本研究では、イヌとネコの CKD の進行メカニズムの解明の一端として RAS の構成因子の腎内発現を免疫組織化学的に検索した。本章では、RAS の鍵となる酵素であるレニンと最終産物である Ang II について解析を行なった。

レニンについては、イヌとネコともに、正常腎および CKD 腎を問わず陽性シグナルは糸球体近傍の血管壁に観察され、尿細管や集合管には明らかな陽性シグナルは検出されなかった。免疫染色では同定することは出来ないが、その位置から観察されたレニン陽性細胞は糸球体傍細胞と考えられる。上記のように糸球体傍細胞のレニンは全身性 RAS の構成因子と考えられるため、陽性シグナルの強度や広さでみられる個体差は全身性 RAS の活動性の違いを反映したものと推察される。

Ang II については、イヌとネコともに、正常腎および CKD 腎を問わず陽性シグナルは尿細管上皮細胞に観察された。陽性シグナルが認められた尿細管のネフロン区画を同定するためには、連続切片を用いた免疫染色標本と PAS 染色との比較、および免疫染色と PAS 染色との重染色を行った。その結果、Ang II 陽性シグナルの認められる尿細管は近位尿細管上皮であった。近位尿細管はその走行から近位曲尿細管と近位直尿細管に区分されるが、酵素組織化学的および電子顕微鏡的観察からは S1, S2 および S3 区画に区分される (Craug et al., 1996)。Ang II 陽性シグナルは糸球体から伸びる起始部には観察されなかったため、近位尿細管の S2 および S3 区画に存在すると考えられたが、イヌでは近位尿細管を S1-S3 区画に区分することの妥当性は未だ証明されていない。

近位尿細管上皮の Ang II 陽性シグナルは細胞質で顆粒状に観察され、これは尿細管管腔からの再吸収を反映した所見であると考えられる。ラットで行われた研究では、腎臓の尿細管に高濃度の Ang II が含まれていることが明らかにされており、これは近位尿細管上皮において AT1 受容体およびメガリン受容体を介して Ang II が再吸収された結果であると示唆されている (Kobori et al., 2007)。一方、近位尿細管上皮には ACE が発現することも知られているため、再吸収された Ang I が尿細管上皮内で Ang II に変換された可能性もある。いずれにせよ、今回観察された Ang II の陽性シグナルは全身性の循環 RAS であると考えられる。

Ang II の陽性シグナルは、尿細管上皮だけでなく、間質の単核細胞にも観察された。この Ang II 陽性シグナルを示す単核細胞は、連続切片での観察の結果からマクロファージと同定された。マクロファージが腎臓のメカニズムに深く関与することは実験動物を用いた研究から明らかにされている。よく知られているのは片側尿管結紮モデルでの研究であり、尿管の結紮を刺激として腎臓に浸潤し活性化したマクロファージが、TGF- β やマトリックスメタロプロテアーゼなどの産生を促すことで腎臓の線維化を促すことが明らかにされている (Grande et al., 2010)。イヌとネコの自然発生 CKD における腎線維化のメカニズムに浸潤マクロファージが果たす病理学的役割はこれまで明らかにされていないが、今回の CKD 腎に観察された Ang II 陽性マクロファージは腎臓局所 RAS の活性と深い関係があると考えられる。ラットを用いた研究では、腎臓の間質液中には高濃度の Ang II が含まれ

ていることが明らかにされており (Kobori et al., 2007)、間質のマクロファージに認められた Ang II 陽性シグナルは、局所 RAS の活性化により過剰産生され、間質に蓄積された Ang II をマクロファージが吸収処理した結果かもしれない。一方で、マクロファージが Ang II の産生を行うことで局所 RAS を活性化させることも否定できない。しかしながら、今回の免疫組織化学的観察のみではこれらの仮説を証明することはできなかった。

腎小体の直径は糸球体のサイズの指標として測定し、イヌでのみレニン陽性スコアとの間に有意な相関関係が認められた。CKD における糸球体の肥大は全身性 RAS と関連していると考えられており、げっ歯類やヒトの CKD 患者でも糸球体の肥大と全身性 RAS の活性に関連があることが報告されている (Yamamoto et al., 2007)。前述の通り、今回のレニン陽性シグナルの変化は全身性の循環 RAS の変動を反映するとみなされるため、イヌの CKD でみられた腎小体の直径とレニン陽性スコアとの相関は、全身性 RAS の活性化による糸球体の肥大を反映していると考えられる。一方、組織学的観察ではほとんどの CKD 腎に萎縮した糸球体が観察されており (計測からは除外)、イヌの CKD における糸球体の肥大は他の糸球体の萎縮により代償性に起こったと考えられ、そのメカニズムに全身性 RAS の活性化も関与している可能性がある。一方、ヒトの糖尿病性腎症などでは、腎臓局所 Ang II の産生を介した活性酸素 (ROS; Reactive Oxygen Species) の増生が糸球体の肥大に関与することも明らかにされているが (Lodha et al., 2002)、今回の観察では糸球体内に Ang II の陽性シグナルは検出されず、尿細管および間質の Ang II 陽性スコアも腎小体の直径と有意

な相関を示さなかったため、腎臓局所 RAS の活性化が糸球体の肥大を引き起こした可能性は低いと考えられる。

イヌでは、尿細管の Ang II 陽性スコアは如何なる組織障害パラメータとも有意な相関を示さなかったが、間質浸潤細胞の Ang II 陽性スコアは糸球体硬化、間質の線維化および間質への細胞浸潤スコアとの間に有意な相関を示した。さらに、間質の浸潤細胞の Ang II 陽性スコアは pCre 値とも有意な相関を示した。獣医学領域では、pCre 値は腎機能評価において最も信頼できる血液化学的マーカーであり、現在、イヌとネコの CKD の病期は pCre 値に基づいて分類されている (Grauer, 2009)。今回の結果は、間質の浸潤細胞における Ang II の誘発が犬の CKD の進行に関与し、そのメカニズムに糸球体硬化が関連していることを伺わせる興味深いものである。ラットを用いた報告では、Ang II は糸球体の血行動態を変化させると同時にメサンギウム細胞の増殖および細胞外マトリックスの産生を促すことで、糸球体の硬化を導くことが明らかにされている (Ji, Z. 2005; Kobori et al., 2007)。今回の定量的解析では、間質の浸潤細胞の Ang II 陽性スコアは腎小体の直径とは有意な相関は示していないため、間質の浸潤細胞に存在する Ang II は糸球体の血行動態ではなく糸球体のメサンギウム細胞の増殖および細胞外マトリックス産生に関与しているのではないかと考えられた。

ネコでは、尿細管の Ang II 陽性スコアおよび間質浸潤細胞の Ang II 陽性スコアの両方が糸球体硬化スコアと有意な相関を示したが、両者とも pCre 値との間には有意な相関は認

められなかった。上記で述べたように、pCre 値はネコでは最も信頼性のある CKD のマーカーであり (Grauer, 2009)、ネコの CKD の予後のマーカーとしての重要性も証明されている (King et al., 2007)。今回の結果は、ネコでは、腎臓内での局所 Ang II の発現は糸球体硬化症の進行に関与するが、実際の CKD の重症度とは関連しないことが示唆された。これは我々の最近の研究結果とも一致する (Yabuki et al., 2010)。その研究では、ネコの CKD の重症度は糸球体の障害ではなく間質の線維化と相関することが明らかにされている。今回、尿細管および間質浸潤細胞の Ang II 陽性スコアは間質の線維化との間に有意な相関を示していない。従って、ネコの CKD では、腎臓内での Ang II 産生が亢進し糸球体の硬化を誘導するが、これは直接的には CKD の進行メカニズムに関与しないものであると考えられた。

まとめると、本章では、イヌとネコの CKD について腎臓内のレニンおよび Ang II の発現を免疫組織化学的に検索した。その結果、CKD の進行における RAS を介した病理メカニズムはイヌとネコで異なることが明らかになった。イヌでは、腎臓内のレニンおよび Ang II の発現上昇と CKD の重症度との間に関連性があることが示唆された。一方、ネコでは、Ang II の発現と糸球体硬化に関連がみられるものの、腎臓内のレニンと Ang II の発現上昇は CKD の重症度に影響しないことが示唆された。このような動物種特異的な CKD の病態メカニズムの違いは非常に興味深い。近年、ACEI による RAS の抑制が CKD の治療戦略としてイヌやネコでも行われており、ACE の腎臓内発現についても詳細な検索を行うべきと考えられた。

そのため、次章では ACE の発現について検索を行った。

小括

近年、腎内レニン・アンジオテンシン系（RAS）の活性化が腎疾患の病態機序に関与することが知られるようになり、ヒトや実験動物では多くの報告がなされている。しかしながら、イヌとネコの慢性腎臓病（CKD）については、腎内 RAS に関する研究は乏しい。そこで本章では、イヌとネコの CKD の病態機序における腎内 RAS の関与を明らかにすることを目的とし、RAS の律速酵素であるレニンおよび最終産物であるアンジオテンシン（Ang）II について免疫組織化学的検索を行った。

本研究には、鹿児島大学において病理解剖されたイヌ 22 頭、ネコ 13 頭の腎臓を使用した。常法に従ってパラフィン切片を作製し、病理組織学および免疫組織化学的に精査した。

レニンおよび Ang II の陽性シグナルは定量的に評価し、血漿クレアチニン（pCre）値と腎臓の組織障害パラメータ（腎小体の直径、糸球体の硬化度、間質の線維化および間質への細胞浸潤）との相関関係を求めた。まず、組織学的重症度と pCre 値との関連性を解析し、イヌでは糸球体障害と尿細管間質障害の双方が pCre 値と関連するが、ネコでは間質の線維化のみが pCre 値と関連することが示された。レニンの陽性シグナルは、糸球体の輸入細動脈に散見され、イヌでは腎小体の直径とのみ正の相関を示し、ネコでは如何なるパラメータとも有意な相関を認めなかった。Ang II の陽性シグナルは、尿細管（主に近位尿細管）と間質の単核細胞で観察された。イヌでは、間質の陽性スコアは、pCre 値および各種パラ

メータとの間に有意な正の相関を示した。ネコでは、有意な相関はほとんど認められず、陽性スコアは pCre 値や間質の線維化（pCre 値と関連）との間に有意な相関を示さなかった。以上の結果から、イヌの CKD では腎臓内 Ang II の増加が病態の進行に関与するが、ネコでは関与しないことが示唆された。

図および表

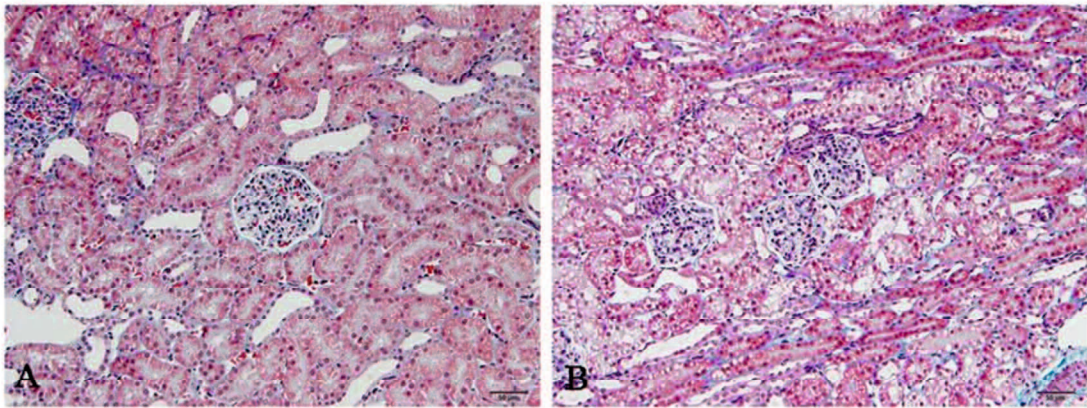


Fig.1-1. Normal kidney of dog (A) and cat (B). Histological abnormalities are not observed. MT stain. Bars: 50 μ m.

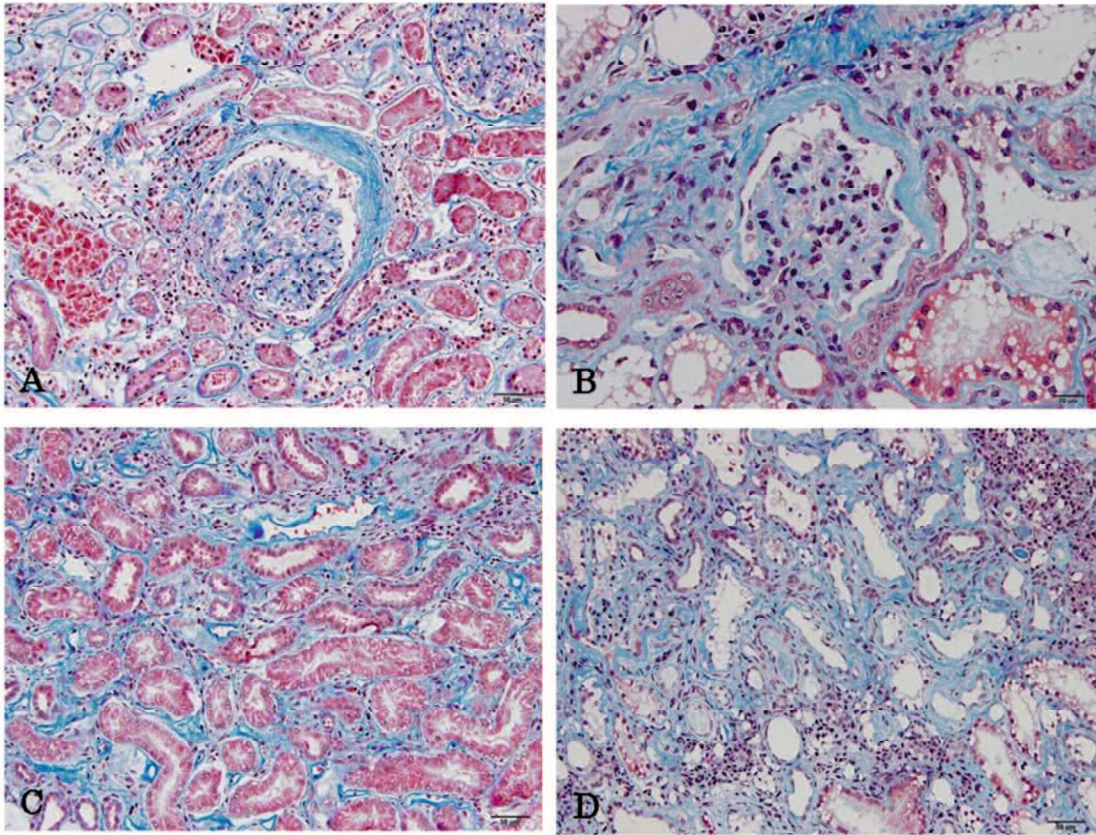


Fig.1-2. Light micrographs of the typical renal lesions from a dog with stage-4 CKD (A&C) and a cat with stage-3 CKD (B&D). In both samples, glomerular and tubulointerstitial damages are very severe. MT stain. Bar: 50 μ m.

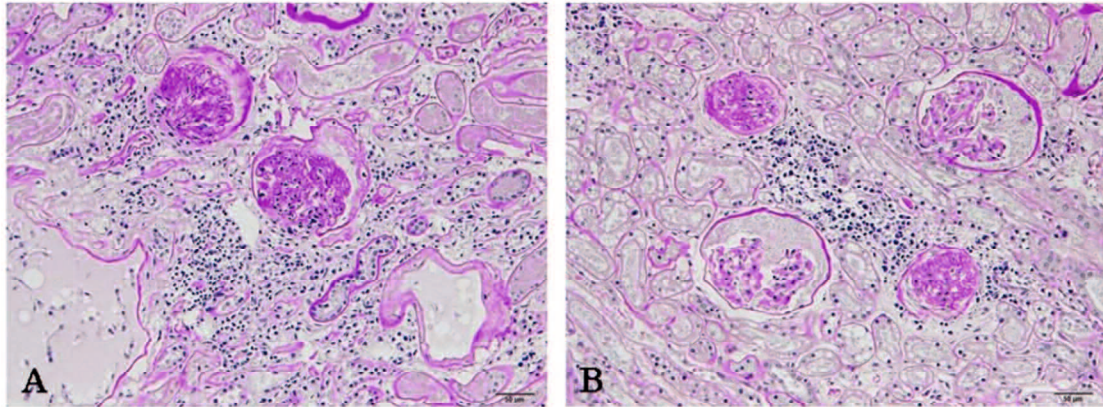


Fig. 1-3. Light micrographs of the typical renal lesions from a dog with stage-4 CKD (A) and cat with stage-4 CKD (B). Interstitial mononuclear cell infiltration is very severe. PAS stain.
Bar : 50 μ m

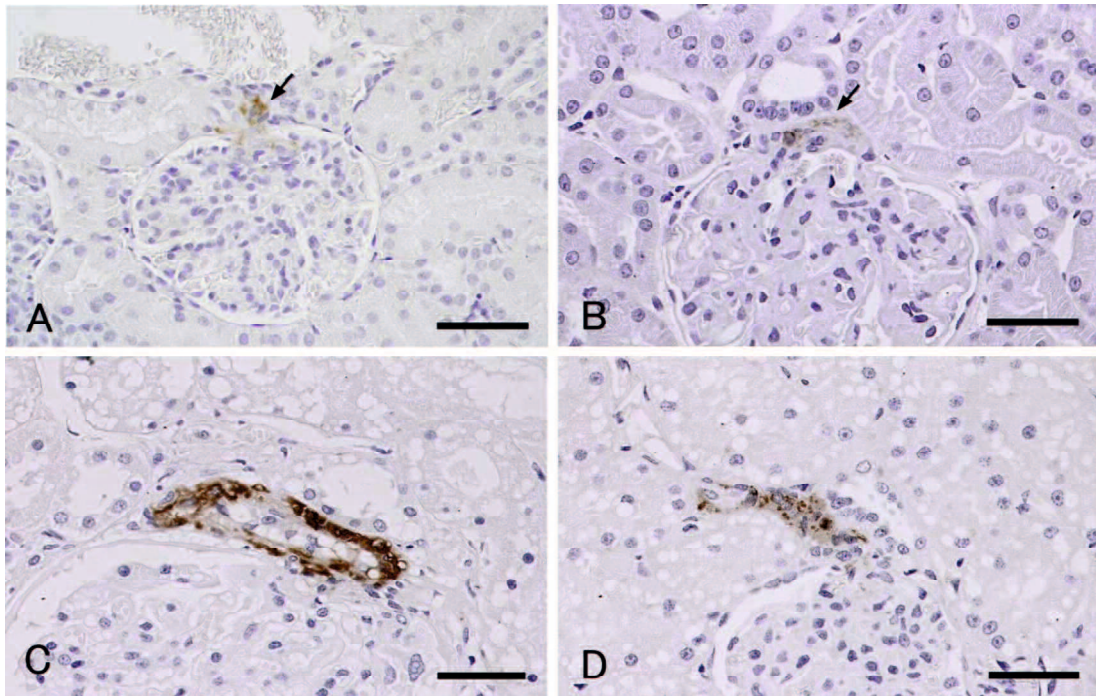


Fig.1-4. Immunohistochemical detection of renin in the kidney. A. Dog kidney with stage 1 chronic kidney disease(CKD). B. Normal dog kidney. C. Cat kidney with stage 2 CKD. D. Normal cat kidney. Positive signals are observed in the vascular walls of the afferent arterioles. In dogs, signals are limited to the narrow regions adjacent to the glomeruli (arrows). In cats, signals are more widely distributed in the afferent arterioles. Counterstain: Mayer's hematoxylin. Bars: 50 μ m.

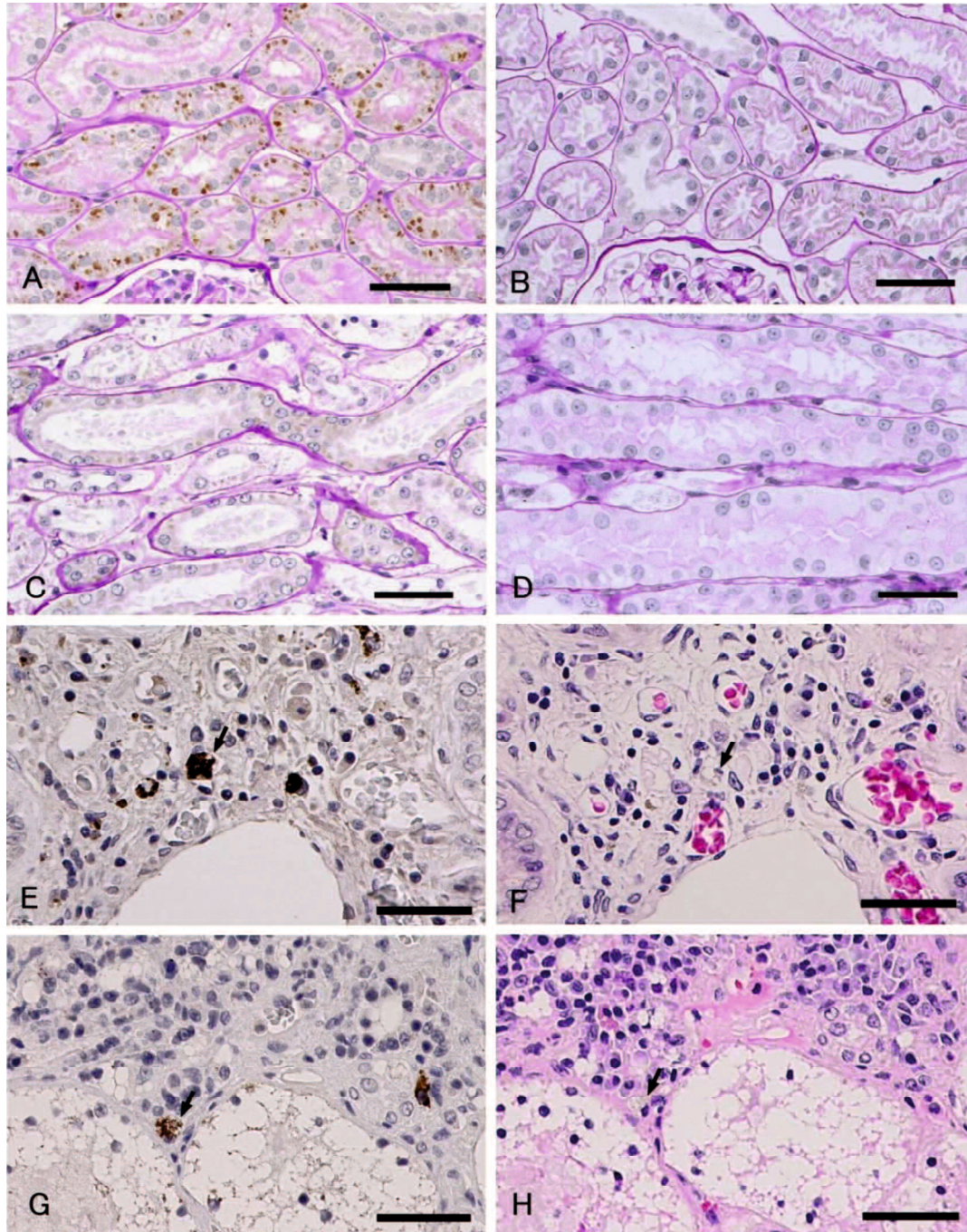


Fig.1-5. Immunohistochemical detection of angiotensin II in the kidney. A dog kidney with stage 1 CKD, cortex. B. Normal dog kidney, cortex. C. Cat kidney with stage 1 CKD, outer medulla. D. Normal cat kidney, outer medulla. E. Dog kidney with stage 4 CKD, cortex. F. Serial section of panel E (HE stain). G. Cat kidney with stage 2 CKD, cortex. H. Serial section of panel G (HE stain). Granular positive signals are detected in proximal tubular cells (A and C), but these signals are weak or absent in normal kidneys (B and D). Signals are more intense and widely distributed in dogs than in cats. Small numbers of mononuclear cells show positive signals (E and G, arrows), and these positive cells resemble macrophages (F and H, arrows). Counterstain: PAS-hematoxylin (A-D) or Meyer's hematoxylin (E and G). Bars: 50 μ m.

Table 1-1 . Correlations between pCre and each of the histopathological parameters.

	pCre-Dogs	pCre-Cats
Diameter of glomeruli	NS	NS
Glomerulosclerosis	0.59*	NS
Interstitial fibrosis	0.68**	0.64**
Cell infiltration	0.71*	NS

pCre: plasma creatinine concentration. Values represent the correlation coefficient. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. NS: not significant.

Table 1-2. Correlations between Renin & Ang II immunoreactivity and histopathological parameters.

	Dogs			Cats		
	Renin	t-Ang II	i-Ang II	Renin	t-Ang II	i-Ang II
pCre	NS	NS	0.61**	NS	NS	NS
Diameter of glomeruli	0.42*	NS	NS	NS	NS	NS
Glomerulosclerosis	NS	NS	0.85**	NS	0.83**	0.67**
Interstitial fibrosis	NS	NS	0.73**	NS	NS	NS
Interstitial infiltration	NS	NS	0.65**	NS	0.67**	0.65*

pCre: plasma creatinine concentration. t-Ang II: tubular angiotensin II, i-Ang II: interstitial angiotensin II. Values represent the correlation coefficient. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. NS: not significant.

第 2 章

アンジオテンシン変換酵素および アンジオテンシン変換酵素 2 の腎内発現と 腎病態との関連性

緒言

レニン・アンジオテンシン系 (RAS) は数々の酵素反応を経てアンジオテンシン (Ang) II を産生するが、慢性腎臓病 (CKD) では RAS の活性化により Ang II の産生が増加する。Ang II は強力な血管収縮作用をもち、さらに様々な増殖因子や炎症性ペプチドを誘発する (Ichihara et al., 2004; Griffin and Bidani, 2006)。そのため、CKD における Ang II の過剰産生は糸球体の硬化および尿細管間質の線維化を誘導する (Mezzano et al., 2003; Sharma et al., 2006)。

Ang 変換酵素 (ACE) は RAS の反応系後半の鍵となる酵素である。ACE は亜鉛依存性メタロプロテアーゼの一種であり、10 アミノ酸から成る Ang I から C 末端の 2 アミノ酸を切断することで 8 アミノ酸から成る Ang II を生成する。近年、ACE 阻害薬 (ACEI) による腎保護効果が注目されており、ヒトの臨床研究では ACEI による RAS の抑制が CKD の進行を抑えると報告されており、特にタンパク尿を伴う症例ではその効果が期待出来るとされている (Maschio et al., 1996; Taal and Brenner, 2000; Parving, 2001)。この CKD に対する治療戦略は小動物臨床でも同様であり、イヌとネコでもタンパク尿を伴う CKD の管理に ACEI が広く使用されている (Roudebush et al 2009, 2010)。

ACE2 は、ヒトやげっ歯類で発見された RAS の新しい構成因子である (Donoghe et al., 2000; Crackower et al., 2002)。ACE2 は Ang I や Ang II を不活性なアンジオテンシ

ン(1-9)と血管拡張作用のあるアンジオテンシン(1-7)に切断する (Burrell et al., 2004; Danilczyk and Penninger, Ferrario, 2006; 2006; Shaltout et al., 2007)。ACE とは 42% の相同性を示すが、ACE2 の作用は ACEI によって阻害されない (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000)。正常組織での ACE2 の発現は、ヒトやげっ歯類で調査されており、腎臓を含む様々な器官で ACE2 の発現が確認されている (Imai et al., 2005; Valdes et al., 2006)。

ACE および ACE2 の腎内発現はヒトおよびげっ歯類の腎疾患で検索されているが、その発現パターンは報告により異なっている。例を挙げると、IgA 腎症と糖尿病性腎症の患者では腎臓内での ACE の発現は増加する一方で ACE2 は減少していると報告されている (Mizuiru et al., 2008, 2011)。腎臓内での ACE2 の発現低下は CKD マウスモデルの初期病態でも報告されている (Dilauro et al., 2010)。これとは逆に、様々なタイプの腎疾患で腎臓内の ACE2 発現が亢進しているとの報告もみられる (Lely et al., 2004)。

一方、獣医学領域では、腎臓内の ACE および ACE2 発現について検索した報告はほとんどなく、両酵素の発現が腎疾患の病態とどのように関連するのかは明らかではない。前章では、腎臓内のレニンと Ang II の発現動態を検索し、イヌの CKD では腎臓内局所 RAS の活性化が CKD の重症度と関連するが、ネコではイヌでみられるような関連性がみられないことを明らかにした。この結果は、ACEI がネコの CKD の進行を抑制する根拠を支持しないものであるが、実際の ACE の腎臓内発現が明らかにされない以上はその有効性を否定すること

はできない。そこで、本章では、イヌとネコの CKD について、ACE およびホモログである ACE2 の腎臓内発現と動態について免疫組織化学的に精査を行い、ACE および ACE2 の変化が腎臓の組織障害とどのような関係性をもつのかを明らかにした。

材料および方法

1. 症例

前章の検索で用いた腎臓サンプルを本章でも使用した。すなわち、鹿児島大学農学部附属動物病院において死亡あるいは安楽死後に病理解剖に供されたイヌ 19 頭およびネコ 13 頭の腎臓を使用した。また、獣医外科学実習において外科手術を実施した後に安楽死されたビーグル 3 頭の腎臓を正常腎として使用した。この実習は鹿児島大学の動物実験指針に従って適正に実施された。猫では、組織観察の結果から腎臓の組織構造に病変が観察されない 2 頭のネコの腎臓を正常腎として取り扱った (6 ヶ月齢のネコの伝染性腹膜炎の症例と 6 ヶ月齢交通事故の猫)。なお、本研究では、症例のカルテ情報および組織学的検査の結果から急性腎不全と診断される症例は除外した。また、ACEI を投与している症例も除外した。その他の詳細については、前章を参照して頂きたい。

本章では、上記のサンプルに加えて、糸球体腎炎と診断された 6 症例の腎生検サンプルも使用した。全ての症例は持続的な高度蛋白尿 (尿蛋白/クレアチニン比 >2.0) を示し、臨床的に蛋白漏出性腎症と診断された。インフォームドコンセントの後、全身麻酔下で開放腎生検が行われた。組織の採取は半自動 Tru-cut 針で採取し、常法に従いホルマリン固定-パラフィンブロックを作製した。

2-1. 組織切片作製および一般染色

採取した腎臓は、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。固定後は、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄し、常法に従いパラフィン包埋した。2 μ m 厚の切片を作製し、組織学的観察のためにはヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色、マッソン・トリクロム (MT) および過ヨウ素酸メセナミン銀 (PAM) 染色を施した。免疫染色は、ACE と ACE2 について以下の方法で行った。

2-2. 免疫組織化学 (免疫染色)

一次抗体には、抗 ACE マウスモノクローナル抗体 (3C5) (Thermo Scientific, Rockford, IL, U. S. A.) と抗 ACE2 兔ポリクローナル抗体 (abcam, Cambridge, U. K.) を使用した。二次抗体にはビオチン化抗マウス IgG (H+L) 馬血清 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, U. S. A.) およびビオチン化抗兔 IgG (H+L) 山羊血清 (Vector Laboratories) を使用した。抗体希釈の希釈は 0.25% のカゼイン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U. S. A.) を含む生理的リン酸緩衝液 (PBS; pH7.4) で行った。抗 ACE マウスモノクローナル抗体は 100 倍希釈、抗 ACE2 兔ポリクローナル抗体は 1,000 倍希釈で使用した。二次抗体はいずれも 200 倍希釈で使用した。

陰性コントロール試験は一次抗体の代わりに正常マウス IgG (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) および正常兔 IgG (DakoCytomation) を 2.5 μ g/ml の濃度で使用して行った。

免疫染色は以下の手順で行った。

- 1) 脱パラフィン
- 2) 再水和
- 3) マイクロウェーブ熱処理による抗原賦活化処理

抗原賦活化には 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を使用した。マイクロウェーブ照射 (750W) は家庭用電子レンジ (NE-5350F; National, Osaka, Japan) を使用した。予加熱 5 分で緩衝液を沸騰させ、スライドガラスを投入してマイクロウェーブ照射を 10 分間行った。照射後は室温で 20 分間放置した。

- 4) 3%過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの不活化 (室温、30 分)
- 6) PBS 浸透 (5 分×3 回)
- 7) 3%BSA/PBS によるブロッキング (室温、60 分)
- 8) 一次抗体でインキュベート (4 °C、一晚)
- 9) PBS で洗浄 (5 分×3 回)
- 10) 二次抗体でインキュベート (室温、30 分)
- 11) PBS で洗浄 (5 分×3 回)
- 12) ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン液 (Ready to use, KPL, Gaithersburg, MD, U. S. A.) でインキュベート (室温、30 分)

13) PBS で洗浄 (5 分×3 回)

14) 3,3'-diaminobenzidine (DAB buffer tablet, Merck, Darmstadt, Germany) による
発色 (1 ml につき 3 μ l の 3%過酸化水素を混和、室温、5 分)

15) 冷却蒸留水による反応停止

16) マイヤーのヘマトキシリンで核染色

2-3. 組織 計測

腎臓の組織障害度を定量的に評価するために、以下の項目について組織計測を行った。

1) 腎小体の直径 : PAS 染色標本を使用し過去の報告に基づいて計測を行った (Yabuki et al., 1999)。すなわち、切片上から血管極および尿細管極が認められる腎小体を 1 個体あたり約 20 個選抜した。血管極と尿細管極を結ぶ線を縦軸と仮定し、接眼マイクロメータを用いてその横軸の糸球体包外壁から外壁までの最大幅を計測した。

2) 糸球体の硬化スコア : MT 染色標本を使用し、過去の方法に基づいて計測を行った (Raji et al., 1984)。1 個体あたり約 50 個の糸球体を観察し、メサンギウム基質の増殖、メサンギウム細胞の増殖および基底膜病変により毛細血管腔が圧迫あるいは消失した硬化領域を基に各糸球体を以下のグレードに分類した。

グレード 0 ; 正常な糸球体 (係数 0)

グレード 1 ; 25%未満の領域に硬化を認める糸球体 (係数 1)

グレード 2 ; 25~50%領域に硬化を認める糸球体 (係数 2)

グレード 3 ; 50~75%の領域に硬化を認める糸球体 (係数 3)

グレード 4 ; 75%以上の領域に硬化を認める糸球体 (係数 4)

グレード 0 の糸球体数を a、グレード 1 の糸球体数を b、グレード 2 の糸球体数を c、グレード 3 の糸球体数を d、グレード 4 の糸球体数を e とし、以下の数式によりスコアを算出した。

$$\text{硬化スコア} = \{(0 \times a + 1 \times b + 2 \times c + 3 \times d + 4 \times e) / a + b + c + d + e\} \times 100$$

3) 間質の線維化スコア : MT 染色標本を使用した。各個体につき 200 倍の倍率で重複しない領域を約 20 カ所観察し、各視野を間質の線維化の程度により以下のグレードに分類した。

グレード 0 ; 結合組織の増生を認めない (係数 0)

グレード 1 ; 視野の 25%未満の領域に結合組織の増生を認める (係数 1)

グレード 2 ; 視野の 25~50%の領域に結合組織の増生を認める (係数 2)

グレード 3 ; 視野の 50~75 の領域に結合組織の増生を認める (係数 3)

グレード 4 ; 視野の 75%以上の領域に結合組織の増生を認める (係数 4)

グレード 0 の視野数を a、グレード 1 の視野数を b、グレード 2 の視野数を c、グレード 3 の視野数を d、グレード 4 の視野数を e とし、以下の数式によりスコアを算出した。

$$\text{間質の線維化スコア} = \{(0 \times a + 1 \times b + 2 \times c + 3 \times d + 4 \times e) / a + b + c + d + e\} \times 100$$

4) 間質への細胞浸潤スコア : PAS 染色標本を使用した。各個体につき 200 倍の倍率で重

複しない領域を約 20 カ所観察し、各視野を間質への細胞診順の程度により以下のグレードに分類した。

グレード 0；細胞浸潤を認めない（係数 0）

グレード 1；視野の 25%未満の領域に細胞浸潤を認める（係数 1）

グレード 2；視野の 25～50%の領域に細胞浸潤を認める（係数 2）

グレード 3；視野の 50～75 の領域に細胞浸潤を認める（係数 3）

グレード 4；視野の 75%以上の領域に細胞浸潤を認める（係数 4）

グレード 0 の視野数を a、グレード 1 の視野数を b、グレード 2 の視野数を c、グレード 3 の視野数を d、グレード 4 の視野数を e とし、以下の数式によりスコアを算出した。

$$\text{間質への細胞浸潤スコア} = \{(0 \times a + 1 \times b + 2 \times c + 3 \times d + 4 \times e) / a + b + c + d + e\} \times 100$$

5)尿細管の ACE 陽性スコア：定量はポイント・カウント法で行った。まず、各個体につき 9 枚のデジタル画像を用意した（撮影倍率 200 倍）。画像を Photoshop Elements 9 (Adobe Systems, San Jose, CA, U.S.A.). を用いて開き、画像上に 80 ピクセル毎のグリッドラインを引いた。この設定により 1 枚の画像を 300 個の領域に分け(900 個/個体)。このような画像を用いて、ACE 陽性シグナルの認められる尿細管を含む領域の数をカウントし、全領域数に対する陽性領域数の比率を算出した。なお、糸球体と大血管を含む領域は計測から除外した。

6)尿細管の ACE 陽性スコア：定量はポイント・カウント法で行った。方法は上記 5 の計測方法に従った。

7) 血管の ACE2 陽性スコア：ACE2 には血管にも陽性反応が認められたため、血管の陽性反応は尿細管とは別に評価した。ACE2 に対する免疫染色標本の全視野を観察し、陽性シグナルの認められる血管数を A、全糸球体数を B として測定した。以下の数式によりスコアを算出した。

$$\text{ACE2 陽性スコア} = (A / B) \times 100$$

3. 統計学的解析

pCre 値および上記の組織計測で得られた各パラメータの関連性をピアソンの相関係数を用いて評価した。解析には、PASW software program for Windows (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY. USA)を使用した。

成績

1. 組織学的観察

実験に使用した腎臓の病理組織学的障害は個体により様々だったが、糸球体の硬化、尿管の萎縮および間質の線維化、間質への単核細胞浸潤はすべての CKD の腎臓で共通の病変として認められた。これらの病変のおよび pCre 値との相互関係の結果については前章を参照していただきたい。

腎生検を行ったイヌ 6 症例は糸球体腎炎と診断した。光学顕微鏡、電子顕微鏡および免疫組織化学的（各種免疫グロブリンおよび補体 C3）検索により 3 症例が膜性糸球体腎炎（膜性腎症）、残りの 3 症例は膜性増殖性糸球体腎炎（MPGN）と診断された。

2. ACE の免疫組織化学的観察

2-1. 腎臓内分布

正常なイヌとネコの腎臓では、近位尿管上皮の刷子縁に強い ACE 陽性シグナルが観察された（図 2-1A&B）。これらの陽性シグナルは、イヌよりもネコで広範囲に観察された。

CKD の腎臓では、イヌ、ネコを問わず、すべてのサンプルで陽性シグナルが観察された。その局在は正常な腎臓のものと類似していたが、CKD 腎で陽性シグナルの検出される尿管は正常腎の陽性尿管に比べて少ない傾向が認められた（図 2-1A C）。

イヌでは糸球体腎炎と非糸球体腎炎の症例で比較を行ったが ACE 陽性シグナルに明らかな差を認めることはできなかった (図 2-1 D)。また、全ての症例で、糸球体に ACE 陽性シグナルは観察されなかった。

2-2. 定量的解析

ACE 陽性シグナルの定量スコアと pCre 値および各種病変パラメータとの相関関係を表 2-1 に示した。腎生検標本、すなわち糸球体腎炎の症例は、標本のサイズが小さく正確な定量的解析を行うことが出来ないため本解析から除外した。解析は、皮質、髓質外帯、髓質内帯および皮質髓質全体に分けて行った。

イヌでは、ACE 陽性スコアと様々なパラメータとの間に有意な相関関係が認められた。皮質では、ACE 陽性スコアは pCre 値との間に有意な負の相関を示したが、腎小体直径、糸球体の硬化スコア、間質の線維化スコアおよび間質への細胞浸潤スコアとは有意な相関を示さなかった。髓質外帯では、ACE 陽性スコアは多くのパラメータとの間に有意な相関関係を示した。すなわち、ACE 陽性スコアは pCre 値、糸球体硬化スコア、間質の線維化スコアおよび細胞浸潤スコアとの間に有意な負の相関を示した。髓質内帯では全てのパラメータとの間に有意な相関関係は認められなかった。皮質髓質全体としては、髓質外帯の結果と同様の相関関係を示した。

ネコでは、腎臓の各領域および皮質髓質全体のいずれにおいても、ACE 陽性スコアと各種

パラメータの間に有意な相関は認められなかった。

3. ACE2 の免疫組織化学的観察

3-1. 腎臓内分布

正常なイヌとネコの腎臓では、近位尿細管上皮の刷子縁に強い ACE2 陽性シグナルが観察された (図 2-2 A-C)。遠位のネフロンにも陽性シグナルは観察され、特にヘンレ係蹄で陽性反応が観察された (図 2-2 B & E)。いくつかの糸球体では、ボーマン囊の外壁に陽性シグナルが認められた (図 2-3 A)。また、糸球体近傍の血管壁にも陽性シグナルが観察された。このような ACE2 陽性シグナルの局在はイヌとネコで類似していたが、血管壁の陽性シグナルはネコでより強く、その数もイヌより多い傾向が見られた (図 2-3 B)。

CKD の腎臓では、すべてのサンプルで近位尿細管上皮に ACE2 陽性シグナルが観察されたが、正常腎に比べると陽性を示す尿細管の数が少ない傾向が認められた (図 2-2 C)。一方、ヘンレ係蹄では、正常腎に比べて CKD の腎臓の陽性シグナルが高度であった (図 2-2 E)。

イヌでは糸球体腎炎と非糸球体腎炎の症例で比較を行ったが ACE2 陽性シグナルに明らかな差を認めることはできなかった (図 2-2 F)。また、全ての症例で、糸球体に ACE2 陽性シグナルは観察されなかった。

3-2. 定量的解析

ACE2 陽性シグナルの定量スコアと pCre 値および各種病変パラメータとの相関関係を表 2-2 に示した。ACE の解析の場合と同じく、糸球体腎炎の症例は、標本のサイズが小さく正確な定量的解析を行うことが出来ないため本解析から除外した。解析は、皮質、髄質外帯、髄質内帯および皮質髄質全体に分けて行った。また、ACE2 については血管壁にも陽性シグナルが検出されたため、血管壁での陽性スコアも評価した。

イヌでは、ACE2 陽性スコアと様々なパラメータとの間に有意な相関関係が認められた。皮質では、ACE2 の反応は pCre 値と有意な負の相関を示したが、腎小体直径、糸球体の硬化スコア、間質の線維化スコア、および間質への細胞浸潤スコアおよびとは有意な相関を示さなかった。髄質外帯では、ACE2 陽性スコアは多くのパラメータとの間に有意な相関関係を示した。すなわち、ACE2 陽性スコアは pCre 値、糸球体硬化スコア、間質の線維化スコアおよび細胞浸潤スコアとの間に有意な負の相関を示した。髄質内帯では pCre 値と腎小体の直径との間に有意な正の相関関係が認められた。皮質髄質全体では、全てのパラメータとの間に有意な相関関係は認められなかった。血管の ACE2 陽性スコアは、腎小体の直径との間にのみ有意な正の相関を示した。

ネコでは、髄質内帯において ACE2 陽性スコアと糸球体の硬化スコアとの間に有意な正の相関が認められたが、その他のパラメータとの間に有意な相関関係は認められなかった。血管壁の陽性スコアについても、すべてのパラメータとの間に有意な相関はみられなかった。

考察

本章では、イヌおよびネコの CKD 腎における ACE および ACE2 の発現と病態との関連性を免疫組織化学的に検索した。その結果、CKD の腎臓内では ACE と ACE2 の発現動態が異なることが確認された。すなわち、ACE は CKD 腎ではダウンレギュレーションを示したが、ACE2 は腎臓の部位によって異なっており、皮質から髄質外帯にかけてはダウンレギュレーションを、髄質内帯および血管壁ではアップレギュレーションを示した。興味深いことに、このような ACE と ACE2 の腎臓内発現の変化には動物種差があり、イヌでより顕著であることが明らかになった。

ACE は、RAS の最終段階で Ang II の産生に直接関わる酵素である。ACE は肺の血管内皮細胞で産生される酵素であるが、肺以外にも様々な器官で産生されており、特に腎臓は ACE の主な産生源の一つとされている (Morin et al., 1989)。ACE の腎臓内での分布についてはこれまでも多数の報告があり、ヒトの腎臓では近位尿細管の刷子縁が主要な発現部位とされており (Danilov et al., 1987; Schulz et al., 1988; Sibony et al., 1993)。また、尿細管濾液中の ACE 濃度を測定した報告では、近位尿細管ほどではないが、遠位尿細管でも濾液中に ACE が含まれていることが明らかにされている (Casarini et al., 1997)。ACE の腎臓内分布は動物種により異なることが知られており、ヒトの腎臓では ACE は尿細管全域に発現するが、ラットでは髄質外帯に位置する近位直尿細管に限られていたと報告さ

れている (Metzger et al., 1999)。ACE の腎臓内分布はイヌでも過去に一報のみ報告があり、ヒトと同じく主に近位尿細管上皮の刷子縁に分布していることが報告されている (Balyasnikova et al., 2003)。本章の免疫組織化学的観察の結果もこれと一致しており、イヌの腎臓内では ACE が近位尿細管上皮の刷子縁に分布することに疑いの余地はない。ネコでは、これまで ACE の腎臓内発現を検索した報告はなかったが、ヒトやイヌと同じく近位尿細管上皮の刷子縁が主要な発現部位であることが今回の観察結果から初めて明らかにされた。

本研究では CKD に罹患したイヌとネコの腎臓における ACE 陽性シグナルの動態を定量的に検索し、イヌの CKD では、腎臓内で ACE のダウンレギュレーションが起きており、CKD の重症度と関連していることが示唆された。ネコでも CKD 腎の ACE 陽性シグナルは正常腎に比べて弱い傾向が観察されたが、CKD の重症度との関連性は全てのパラメータで認められず、明らかな動物種差が認められた。イヌで認められた腎内 ACE のダウンレギュレーションは腎臓の部位で異なっており、髄質外帯で最も顕著であった。糸球体の硬化および尿細管間質の障害との間に関係性が認められ、障害度が高いほど腎内 ACE の発現が低下していることが示唆された。これは今回のイヌの CKD に限ったことではなく、糖尿病性腎症のマウスで行われた検索でも腎内 ACE のダウンレギュレーションが報告されている (Park et al., 2010)。一般的に、RAS の活性化は CKD の進行に関わる危険因子と考えられている。イヌでも RAS の抑制を目的に ACEI が使用されており、今回のイヌの CKD における腎内 ACE 発現の

データは臨床的な期待と矛盾するかもしれない。しかし、これはイヌの CKD における腎内 RAS の活性化を否定するものではない。実際に前章での検索では Ang II のアップレギュレーションと CKD の重症度の間に関連性が証明されている。今回認められた ACE のダウンレギュレーションは、腎内 RAS の亢進に呼応したネガティブフィードバック現象なのかもしれない。さらに、後述するように、最近の研究では腎障害に関わる重大なメカニズムの一つに腎内 ACE2 の発現低下が指摘されており (Simões et al., 2013)、ACE のダウンレギュレーションは ACE2 の発現低下に呼応して起こった変化である可能性がある。すなわち、ACE2 は ACE のホモログであるが、その作用は ACE とは異なり、むしろ腎保護的に作用することが知られている (Simões et al., 2013)。最近の研究では、臨床的にみられる ACEI の腎保護作用は ACE の抑制により ACE2/Ang-(1-7)/Mas 軸 (Mas は Ang-(1-7) の 受容体) が活性化して生じることも示唆されている (Simões et al., 2013)。今回の定量的解析では、イヌの CKD 腎では、ACE だけでなく ACE2 も同様のダウンレギュレーションを起こしていることが明らかになった。よって、イヌの CKD 腎臓でみられる ACE の減少は、ACE2/Ang-(1-7)/Mas 軸の不活性化により生じた腎障害に呼応したネガティブフィードバック現象である可能性も考えられる。

ACE2 は ACE のホモログとして 2000 年に新たに発見された RAS の新しい構成因子である (Donoghe et al., 2000; Tipnis et al., 2000)。ACE2 の作用で産生された Ang-(1-7) が腎臓の血行動態、糸球体濾過および尿細管の再吸収の調節に深く関わるということが明らかにさ

れている (Simões et al., 2012; Zimmerman et al., 2012)。また、ACE2 欠損マウスは早期に糸球体硬化症を発症することや (Oudit et al., 2006)、ACE2 欠損マウスと糖尿病マウスの F1 マウスでは腎症の進行が加速することから (Wong et al., 2007)、ACE2 が腎保護作用に深く関与することが示唆されている。ACE2 は、発見当初は心臓と腎臓に限局していると考えられていたが、現在では、肺、肝臓、中枢神経系および胎盤にも存在することが明らかにされている (Gembar dt et al., 2005; Gallagher et al., 2006)。また、ヒトやマウスの腎臓では ACE と共発現することも報告されている (Lely et al., 2004; Ye et al., 2004)。しかしながら、このような ACE2 の局在や分布に関する報告は、マウス、ラット、ヒトに限られていた。本研究は、イヌとネコの腎臓における ACE2 局在に関する初の報告であり、ヒトやマウス同様、近位尿細管上皮の刷子縁に ACE と共発現していることが確認された。ヒトの腎臓では、集合管、遠位尿細管、血管内皮などにも ACE2 の陽性シグナルが報告されているが (Donoghue et al., 2000)、本研究では近位尿細管以外で陽性シグナルが観察されたのはヘンレ係蹄と血管壁 (中膜) であり、ヒトとは異なる腎臓内分布も確認された。特に、血管壁の陽性シグナルはイヌとネコでも違いがみとめられ、ネコの方が明らかに広く分布していた。これがどのような腎機能の動物種差を反映しているのかは明らかではないが、陽性血管は糸球体近傍に観察されるため、糸球体傍細胞におけるレニンの分泌や糸球体濾過量の調節などに関与していることが疑われ、興味深い所見であった。

CKD の腎臓では、イヌにおいて腎臓内 ACE2 の増減が CKD の重症度と関連していることが

示唆された。ACE2 の増減は腎臓の部位によって異なっており、皮質から髄質外帯にかけてはダウンレギュレーションが、髄質内帯においてはアップレギュレーションが示唆された。ACE2 は、ACE2/Ang-(1-7)/Mas 軸という RAS の新しい作用軸の律速酵素であるが、近年の研究では、この軸の変化が腎障害の抑制および増悪の両方のメカニズムに重大な役割を担っていることが明らかにされている (Simões et al., 2013)。すなわち、この軸は古典的な RAS の作用軸である ACE/Ang II/AT1 軸と拮抗的に働き、糸球体の硬化、尿タンパクの漏出および細胞外基質の蓄積といった腎障害の進行機序に対して抑制的に作用する。この ACE2/Ang-(1-7)/Mas 軸が抑制されると腎障害は悪化するころも知られている (Mizuri et al., 2011)。今回の検索では、イヌの CKD において髄質外帯で尿細管の ACE2 陽性シグナルの低下が認められ、陽性スコアは糸球体の硬化、間質の線維化および間質への細胞浸潤スコアとの間に負の相関を示した。この結果から、イヌの CKD では進行のメカニズムに髄質外帯における ACE2 の発現低下が関与していると考えられた。事実、髄質外帯の ACE2 陽性スコアは pCre 値とも有意な負の相関が認められ、ACE2 発現の低い症例ほど CKD の病態が進行していることが示唆された。

一方で、イヌの CKD では、ACE2 陽性シグナルの増加も観察された。これは髄質内帯で認められ、陽性スコアは間質における細胞浸潤スコアとの間に正の相関を示した。最近の研究では、ACE2/Ang-(1-7)/Mas 軸は、炎症反応にも関与していることも明らかになっており、ACE2/Ang-(1-7)/Mas 軸の活性は炎症反応に対して抑制的に作用することが報告されている

(Simões et al 2013)。さらに、高血圧および糖尿病モデルラットを用いた検索では、Ang-(1-7)の投与は Mas 受容体を介してインターロイキン-6、腫瘍壊死因子- α 、核内因子 $\kappa\beta$ といった炎症性サイトカインを減少させることが明らかにされている (Giani et al., 2011, 2012)。以上のことから、イヌの CKD でみられた髄質内帯の ACE2 発現の増強は間質の細胞浸潤を誘導したものではなく、逆に細胞浸潤による炎症反応を抑制しようとする自己防護反応であると考えられる。

イヌの CKD における ACE2 陽性シグナルの増加は、血管壁においても認められ、血管の陽性スコアは腎小体の直径との間に有意な相関を示した。ACE2 陽性シグナルは主に糸球体近傍の血管に認められるため、本部位での ACE2 発現の増強は CKD でおこる糸球体肥大症のメカニズムに関与していると考えられる。過去の研究では、ACE2/Ang-(1-7)/Mas 軸が活性化すると腎臓の血行動態が改善することが明らかにされており (Sampaio et al., 2003)、糸球体近傍の血管における ACE2 の発現の増強は、糸球体内圧の上昇に対して糸球体の血行動態を改善させようとしておきる反応なのかもしれない。

糸球体疾患は CKD を引き起こす重要な基礎疾患である。ヒトの腎疾患では、糖尿病性腎症と IgA 腎症で腎臓内における ACE の増加が報告されている (Metzger et al 1999; Mizuiri et al., 2011)。ACE2 については、原発性、続発性を問わず、様々な腎疾患で腎臓内 ACE の増加が認められることが報告されており、正常腎ではみられない ACE2 の陽性シグナルが糸球体内皮細胞、糸球体上皮細胞およびメサンギウムに観察されている (Lely et al., 2004)。

今回の検索では、イヌの糸球体腎炎（膜性腎症および膜性増殖性糸球体腎炎）の 6 症例の生検標本を調査したが、ACE と ACE2 の陽性シグナルの分布は非糸球体腎炎の症例と同様であり、明らかな違いは認められなかった。

ネコの CKD については、腎臓内 ACE の発現動態が CKD の重症度と関連しないことが定量的な結果から明らかになった。ACE2 では髄質内帯での陽性スコアが糸球体の硬化スコアと正の相関を示した。しかしながら、髄質内帯には構造的に糸球体が存在しておらず、今回認められた統計学的相関に病理学的意義があるのか不明である。他の部位の ACE2 陽性スコアはいかなる組織障害パラメータとも有意な相関を示さなかった。このことから、ネコの CKD では、イヌとは異なり、ACE および ACE2 の腎臓内発現と腎障害のメカニズムには深い関係性は示唆されなかった。しかしながら、本研究で使用したネコのサンプル数は決して多いとは言えず、ネコの CKD に関しては今後より多くの症例を集めて検討する必要があると考えられた。

まとめると、本章ではイヌとネコの CKD における ACE と ACE2 の腎内分布およびそれらの発現動態を免疫組織化学的に検索した。イヌでは、ACE の陽性シグナルは近位尿細管上皮で観察され、CKD では腎組織障害と関連して ACE の発現低下が認められた。ACE2 の陽性シグナルも主に近位尿細管で認められた。ACE2 発現の増減は腎臓の部位によって異なっていたが、発現の増加と減少は腎組織障害の程度と関連していた。ネコでは、ACE と ACE2 の腎臓分布はイヌと類似していたが、陽性シグナルの増減は CKD の重症度とは関連性がなかった。

小括

アンギオテンシン変換酵素 (ACE) はレニン・アンギオテンシン系 (RAS) の反応系後半の鍵となる酵素であり、糸球体の硬化や尿細管間質の線維化の誘導に携わる Ang II を生成する。ACE2 は、ACE のホモログであり、近年新たに発見された RAS の構成因子として知られる。ACE2 は、Ang I や Ang II を分解する作用をもち、腎臓内 ACE2 が活性化することで腎保護効果が発揮される。しかしながら、イヌとネコの慢性腎疾患 (CKD) については腎臓内の ACE および ACE2 に関する研究は乏しい。そこで本章では、イヌとネコの CKD の病態機序における腎内 RAS の関与を解明する一端として、ACE と ACE2 について免疫組織科学的に検索を行った。

本研究には、鹿児島大学において病理解剖されたイヌ 22 頭、ネコ 13 頭の腎臓サンプルを使用した。また、糸球体腎炎と診断されたイヌ 6 頭の腎生検サンプルも使用した。常法に従ってパラフィン切片を作製し、病理組織学的および免疫組織化学的に精査した。ACE および ACE2 の陽性シグナルは定量的に評価し、血漿クレアチニン (pCre) 値と腎臓の組織障害パラメータ (腎小体の直径、糸球体の硬化度、間質の線維化、間質への細胞浸潤) との相関関係を求めた。ACE の陽性シグナルは主に近位尿細管上皮の刷子縁で観察され、CKD 腎では正常腎よりも少ない傾向が認められた。定量分析では、イヌでは pCre 値および様々なパラメータとの間に負の相関関係が認められ、特に髄質の外帯で顕著であった。ネコではい

かなるパラメータとも有意な相関を示さなかった。ACE2 の陽性シグナルも近位尿細管上皮の刷子縁に観察され、糸球体近傍の血管壁にも陽性シグナルは観察された。定量分析では、イヌでは、陽性スコアは pCre 値および様々なパラメータとの間に有意な相関を示したが、それは腎臓の部位によって異なっていた。皮質と髄質外帯では負の相関関係が認められたが、髄質内帯および血管壁では正の相関関係が認められた。ネコでは、有意な相関はほとんど認められず、pCre 値や間質の線維化（pCre 値と関連）との間に有意な相関は認められなかった。糸球体腎炎に罹患した犬における ACE および AEC の分布は非糸球体腎炎症例と類似しており、両者に明らかな違いは認められなかった。以上の結果から、イヌでは CKD の病態に腎臓内の ACE と ACE2 の増減が関与するが、ネコでは関連しないことが示唆された。

図および表

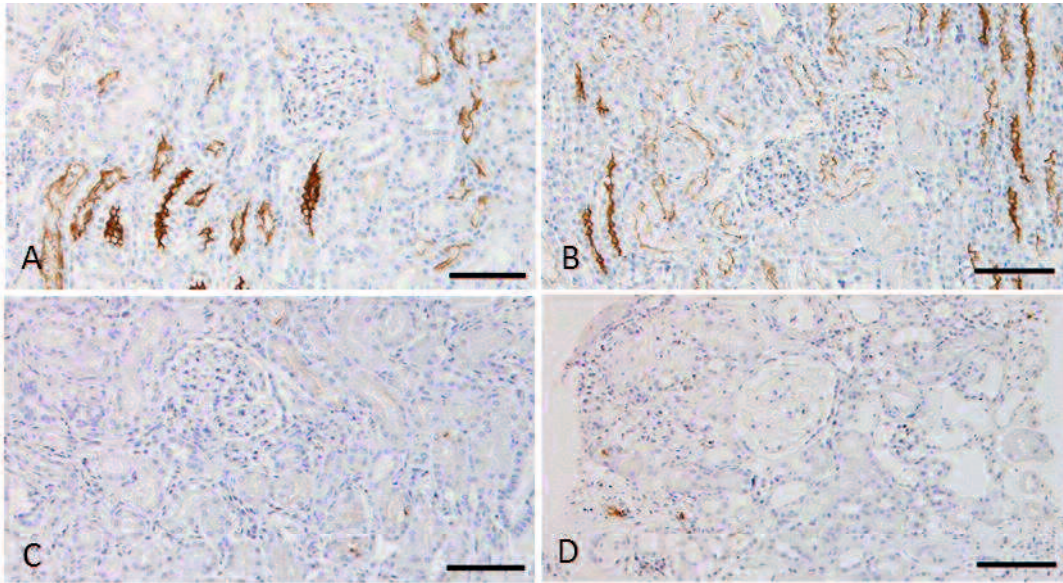


Fig. 2-1. Immunohistochemistry for ACE. A. Normal canine kidney, juxtamedullary cortex. B. Normal feline kidney, juxtamedullary cortex. C. Canine kidney with CKD, juxtamedullary cortex. D. Canine kidney with glomerulonephritis, cortex. Although ACE localization was similar in CKD and normal kidney, the number of positive tubules was lower in many of the CKD samples. No apparent differences were observed between glomerulonephritis and non glomerulonephritis dogs. Counterstain: Mayer's hematoxylin. Bars: 100 μ m.

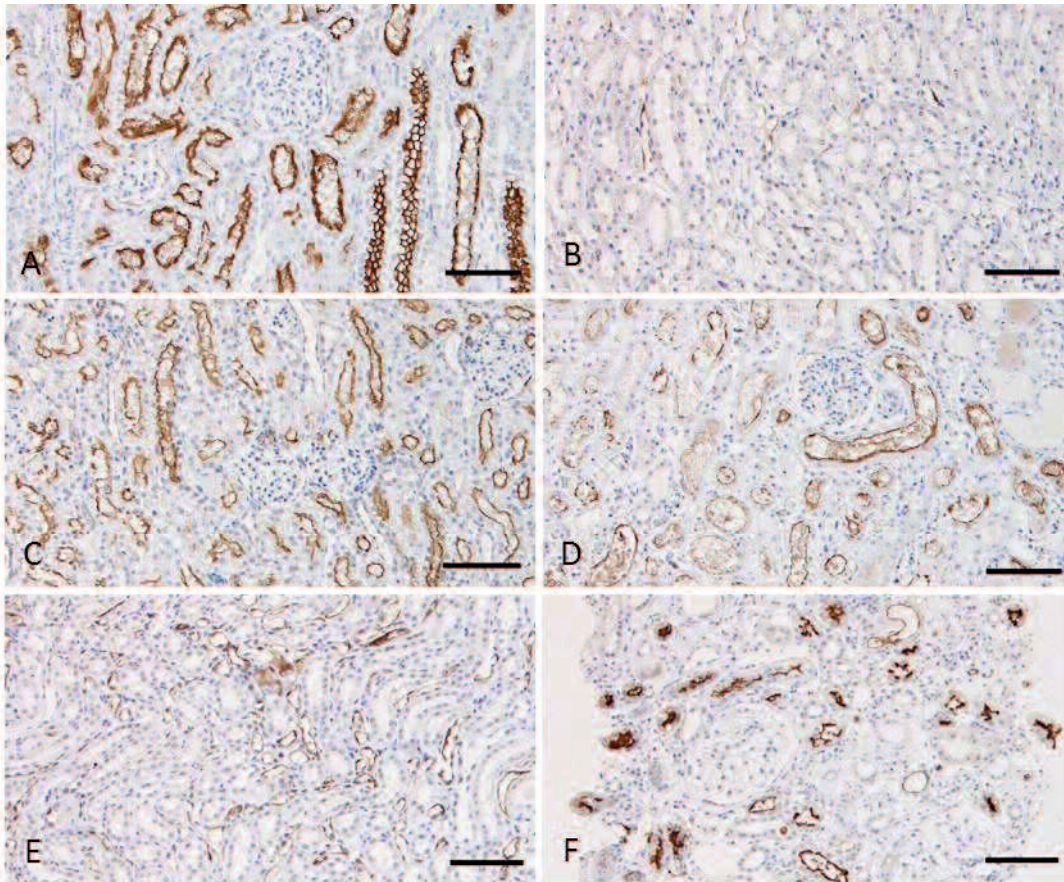


Fig.2-2. Immunohistochemistry for ACE2. A. normal canine kidney, juxtamedullary cortex. B. Normal canine kidney, inner medulla. C. Normal feline kidney, juxtamedullary cortex, D. Canine kidney with CKD, juxtamedullary cortex. E. Canine kidney with CKD, inner medulla. F. Canine kidney with glomerulonephritis, cortex. An increase of ACE2 immunoreactivity was observed in distal nephrons, especially the loops of Henle, in samples with CKD. No apparent differences were observed between glomerulonephritis and non glomerulonephritis. Counterstain: Mayer's hematoxylin. Bars: 100 μ m.

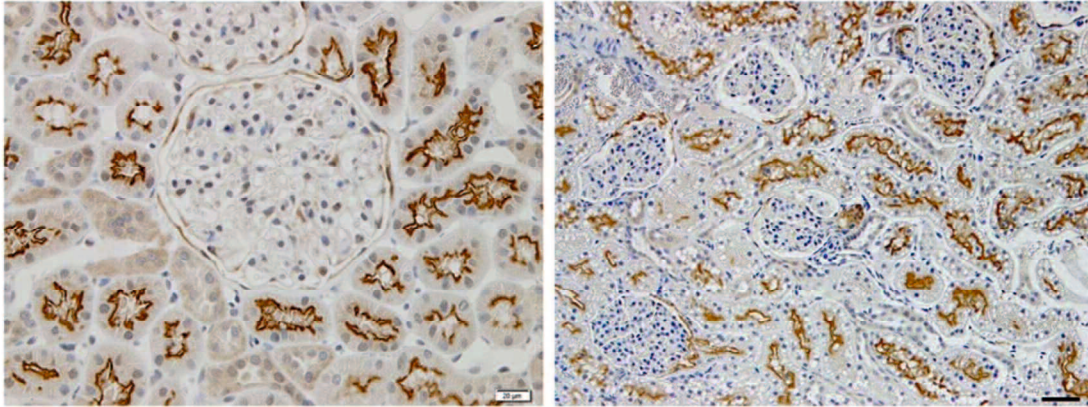


Fig.2-3. Immunohistochemistry for ACE2. A. Normal canine kidney. The parietal layer of Bowman's capsules showed positive signals. B. Normal feline kidney. In some glomeruli, the adjacent blood vessels showed positive signals. Counterstain: Mayer's hematoxylin. Bars: $20\mu\text{m}$ for A, $50\mu\text{m}$ for B.

Table 2-1. Correlations between ACE immunoreactivity and histopathological parameters.

	Dogs				Cats			
	Co	OM	IM	Total	Co	OM	IM	Total
pCre	-0.47*	-0.55**	NS	-0.56**	NS	NS	NS	NS
Diameter of glomeruli	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Glomerulosclerosis	NS	-0.47*	NS	-0.46*	NS	NS	NS	NS
Interstitial fibrosis	NS	-0.50*	NS	-0.47*	NS	NS	NS	NS
Cell infiltration	NS	-0.51*	NS	-0.44*	NS	NS	NS	NS

pCre: plasma creatinine concentration. Co: cortex, OM: outer medulla, IM: inner medulla, Total: Co+OM+IM. Values represent the correlation coefficient. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. NS: not significant.

Table 2-1. Correlations between ACE immunoreactivity and histopathological parameters.

	Dogs				Cats			
	Co	OM	IM	Total	Co	OM	IM	Total
pCre	-0.47*	-0.55**	NS	-0.56**	NS	NS	NS	NS
Diameter of glomeruli	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Glomerulosclerosis	NS	-0.47*	NS	-0.46*	NS	NS	NS	NS
Interstitial fibrosis	NS	-0.50*	NS	-0.47*	NS	NS	NS	NS
Cell infiltration	NS	-0.51*	NS	-0.44*	NS	NS	NS	NS

pCre: plasma creatinine concentration, Co: cortex, OM: outer medulla, IM: inner medulla, Total: Co+OM+IM. Values represent the correlation coefficient. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. NS: not significant.

総括

本研究では、イヌとネコの慢性腎臓病（CKD）において、腎臓内のレニン・アンジオテンシン系（RAS）がどのような動態を示すのか、また、その動態が腎臓の病理学的変化とどのような関連性を持つのかを明らかにすることを目的として組織学的および免疫組織学的検査を行った。

まず始めに、イヌとネコの CKD における腎臓の病理組織学的特性を明らかにするために、組織学的および組織計測学的解析を行った。その結果、臨床的には CKD の重要度は血漿クレアチニン（pCre）値という同一の指標で評価されるにも関わらず、腎臓の病理学的特性はイヌとネコで顕著に異なっていることが明らかにされた。すなわち、イヌでは糸球体と尿細管間質の両方の障害が pCre 値と相関するのに対して、ネコでは pCre 値と相関を示すのは間質の線維化だけであることが明らかになった。一般的に、イヌはネコに比べて CKD の進行が早いことがよく知られており、これは実際の臨床現場でも痛感する。糸球体の障害は直接的に糸球体濾過能に影響し、間質の線維化は間質の循環障害から糸球体への血液流入量の減少を引き起こすことで間接的に糸球体濾過能に影響すると考えられる。そのため、糸球体の障害と間質の障害の双方が腎機能に影響を及ぼすイヌに比べて、間質の障害のみが影響を及ぼすネコの方が CKD の進行が緩やかなのかもしれない。しかしながら、なぜネコでは糸球体の障害が腎機能に影響を及ぼさないのかは依然として不明である。

次いで、RAS の構成因子であるレニン、アンジオテンシン (Ang) II、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) および ACE2 について免疫組織化学的検索を行った。近年、ヒトや実験動物では、局所の組織および器官内に RAS の全ての因子が発現して *in situ* で機能する局所 RAS の存在が注目されており、腎臓は局所 RAS の活性化が組織の線維化メカニズムに深く関与する器官として知られている (Border and Noble, 1998; Gaedeke et al., 2001)。本研究では、Ang II、ACE および ACE2 の陽性シグナルがイヌとネコの双方で近位尿細管上皮に強く認められた。この結果は、RAS の最終反応を構成する因子がネフロンの同じ部位に揃って発現していることを示しており、イヌとネコの腎臓でも局所 RAS が機能していると考えられた。しかしながら、レニンについては、陽性シグナルが認められたのは一般的な全身性の循環 RAS を制御している糸球体傍細胞であり、ヒトや実験動物で局所 RAS として知られる尿細管や集合管にはレニンの陽性シグナルは検出されなかった。さらに、RAS の一連の酵素反応の基質であるアンジオテンシノーゲン (AGT) や中間産物である Ang I については本研究では解析を行っていない。今後、イヌとネコの腎内 RAS に関する研究を発展させることは臨床的に高い意義を持つが、そのためには、まず正常な腎臓での局所 RAS に関する基礎的研究の実施が望まれる。

本研究の免疫組織化学的検索の結果から、イヌの CKD では、RAS の最終産物である Ang II の産生がアップレギュレーションしていることが示唆された。これは CKD の重症度と関連しており、イヌでは CKD の進行メカニズムに腎内 RAS の活性化が関与していると考えられ

た。興味深いのは ACE に関する結果であり、ACE は Ang II とは逆に腎障害の重症化と共に
ダウンレギュレーションしていると考えられた。なぜ、このような現象が起こるのかは明
確なエビデンスがなく不明であるが、ACE2 に関する解析結果から、ACE2 の発現動態が鍵と
なる可能性が考えられた。ACE2 は ACE のホモログであり、新しい RAS の構成因子であるが、
その作用は ACE とはまるで異なっている。古典的な Ang II の産生経路には関与せず、Ang I
や Ang II を切断して Ang (1-7) を産生する (Burrell et al., 2004; Danilczyk et al., 2006;
Ferrario et al., 2006; Shaltout et al., 2006)。Ang (1-7) はその受容体である Mas に
結合すると、Ang II とは逆の作用である血管拡張や炎症性サイトカイン産生抑制といった
機能を担う (Santos et al., 2003)。このような Ang (1-7) の機能は腎臓の保護に役立つた
め、その産生に関与する ACE2 の減少は腎保護作用の低下、すなわち腎障害の進行につな
がる。本研究でみられた ACE のダウンレギュレーションは、Ang II の活性化と ACE2 の減少と
いう腎障害メカニズムに呼応しておこった自己防衛的なネガティブフィードバック現象な
のかもしれない。

イヌの CKD に対する ACEI の腎保護効果については幾つかの報告がある。外科的に腎臓の
大部分を切除したイヌに ACEI を投与すると腎臓の組織障害が軽減することが証明されてお
り (Brown et al., 2003)、実際の症例においても、イヌの CKD では高血圧や糸球体濾過量
の低下に対して ACEI の投与が効果的であると報告されている (Tenhüüdfeld et al., 2009)。
この腎保護作用は、一般的には ACE の抑制による Ang II 産生減少によるものと解釈されて

いるが、腎臓内 ACE の減少という本研究の結果は、そのメカニズムを支持するものではない。ACEI の投与は ACE2 を活性化させることで臓器保護効果を示すことが報告されており (Ishiyama et al., 2004; Liu et al., 2010)、イヌでみられる ACEI の腎保護効果にもこのメカニズムが関与していることが考えられる。すなわち、本研究の結果から、イヌの CKD では腎臓内 ACE2 が減少することが示唆され、ACEI は腎臓内 ACE2 の減少を抑制することで腎保護効果を発揮している可能性がある。しかしながら、今回の検索は全て ACEI の未投与犬についてのものであり、ACEI の投与を受けていた症例は含まれていない。この仮説を証明するためには、症例を重ねて ACEI の投与症例と非投与症例とで比較検討を行う必要がある。

ネコの CKD では、Ang II の陽性スコアが糸球体硬化と間質細胞浸潤のスコアとの間に相関を示したものの、レニン、Ang II、ACE および ACE2 の全てにおいて、pCre 値や pCre 値と関連の深い間質の線維化との間には有意な相関が認められなかった。この結果から、イヌとは異なり、ネコでは CKD の進行メカニズムに腎臓内 RAS の変化が重要な役割を担っていないことが示唆された。ネコの CKD における ACEI の投与は、小動物臨床の現場でも頻繁に行われており、実際に ACEI の投与により CKD の進行が抑制されるという報告もある (Brown et al., 2001; Mizutani et al., 2006)。しかしながら、ネコの CKD で行われた最も大規模な臨床研究では、ACEI は蛋白尿を改善する効果はあるが、寿命そのものには影響しないことが明らかにされている (King et al., 2006)。この報告では、尿蛋白/クレア

チニン比 (UP/C) が 1.0 を超える場合は ACEI 投与により寿命が延長する可能性が示されているが、統計学的には有意差が認められていない。さらに、自然発生のネコの CKD で UP/C が 1.0 を超える可能性は 1 割にも達しないという報告もあり (Syme et al., 2006)、実際の臨床現場にもネコの CKD で蛋白尿に遭遇することは希である。本研究の結果は、ネコでは腎臓内 RAS の活性化や ACE2 の減少が CKD の進行に関与していないことを示しており、ネコの CKD に対して ACEI が腎保護効果を発揮しないメカニズムの一端を解明できたと考えている。

しかしながら、CKD における ACEI の有効性は高血圧の有無や蛋白尿の有無によっても異なるため、小動物臨床において ACEI の投与が真に CKD の進行の抑制に効果的であるのかは議論の余地が多い。本研究では死後の病理解剖により得られたサンプルを主体として解析を行ったため、血圧、UP/C、血中のリンやカルシウム濃度、血中の Ang II 濃度やレニン活性との関連性について解析を行うことはできなかった。これらの臨床病理的データを加味して解析を行うためには、ヒトと同様に腎生検サンプルの解析を重点化しなくてはならないが、イヌとネコでは腎生検を実施する機会は少なく、解析は容易ではない。

近年、実験動物では、腎臓で産生され、尿中に排泄される AGT が腎内 RAS の動態を反映することが報告されている (Ogawa et al., 2009; Nishiyama et al., 2011)。腎生検とは異なり、尿はイヌやネコでも手軽に採取できる臨床サンプルであり、尿の性状から腎内 RAS の動態を評価できれば、イヌとネコの CKD の病態機序の解明に新たな展望が切り開かれる

かもしれない。

本研究では、イヌとネコの CKD における腎臓内 RAS と腎臓の病態との関連性を解析し、イヌとネコでは RAS を介した CKD 進行の機序が大きく異なっていることを明らかにした。

これまで、実験動物やヒトの CKD においては、RAS だけでなく様々な物質の攪乱が複雑に関連して病態が進行することが証明されている。イヌとネコの CKD でも、種々の病態関因子の動態にどのような違いがあるのかを一つずつ解明していくことで、動物種の特性に沿った新規の診断および治療戦略が開発されると期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり、多くの御助言を下さいました鹿児島大学共同獣医学部臨床獣医学講座臨床病理学教室 大和 修 教授、本研究の遂行にあたり終始多大なる御指導、御鞭撻を賜りました鹿児島大学共同獣医学部臨床獣医学講座臨床病理学教室 矢吹 映 准教授ならびに多くの御助言下さいました岐阜大学・鳥取大学共同獣医学科基礎獣医学講座解剖学教室 保坂 善真 准教授に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多くの助言を頂き、助力を惜しまれなかった水上 圭二郎さん、澤 真理子さんを始めとする研究室の皆様にご心から感謝いたします。また、本研究の趣旨を理解し、ご配慮頂いた 肥後 隆志 院長をはじめとする中央愛犬病院スタッフの皆様にご心から感謝いたします。皆様、本当に有難うございました。

最後に、本研究を支えた多くの動物達に追悼の意を表し、深く感謝します。

参考文献

1. Balyasnikova IV, Metzger R, Franke FE, Danilov SM. (2003). Monoclonal antibodies to denatured human ACE (CD 143), broad species specificity, reactivity on paraffin sections, and detection of subtle conformational changes in the C-terminal domain of ACE. *Tissue Antigens*. 61, 49-62.
2. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. (2010). Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med*. 2, 247-257.
3. Border WA, Noble NA. (1998). Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension*. 31, 181-188.
4. Brown SA, Brown CA, Jacobs G, Stiles J, Hendi RS, Wilson S. (2001). Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor benazepril in cats with induced renal insufficiency. *Am J Vet Res*. 62, 375-383.
5. Brown SA, Finco DR, Brown CA, Crowell WA, Alva R, Ericsson GE, Cooper T. (2003). Evaluation of the effects of inhibition of angiotensin converting enzyme with enalapril in dogs with induced chronic renal insufficiency. *Am J Vet Res*. 64, 321-327.
6. Burrell LM, Johnston CI, Tikellis C, Cooper ME. (2004). ACE2, a new regulator

- of the renin-angiotensin system. *Trends Endocrinol Metab.* 15, 166-169.
7. Casarini DE, Boim MA, Stella RC, Krieger-Azzolini MH, Krieger JE, Schor N. (1997). Angiotensin I-converting enzyme activity in tubular fluid along the rat nephron. *Am J Physiol.* 272, F405-409.
 8. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. 2. (2002). Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 20, 822-828.
 9. Craig C. Tisher, Kirsten M. Madsen. (1996). Anatomy of the kidney. P3-71. In; *The kidney, 5th ed.*
 10. Danilczyk U, Penninger JM. (2006). Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res.* 3, 463-471.
 11. Danilov SM, Faerman AI, Printseva OYu, Martynov AV, Sakharov IYu, Trakht IN. Histochemistry. (1987). Immunohistochemical study of angiotensin-converting enzyme in human tissues using monoclonal antibodies. *Histochemistry.* 87, 487-490.
 12. Dilauro M, Zimpelmann J, Robertson SJ, Genest D, Burns KD. (2010). Effect of ACE2 and angiotensin-(1-7) in a mouse model of early chronic kidney disease. *Am J*

Physiol Renal Physiol. 298, F1523-32.

13. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 1, E1-9.
14. Ferrario CM. (2006). Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension.* 47, 515-521.
15. Gaedeke J, Peters H, Noble NA, Border WA. (2001). Angiotensin II, TGF-beta and renal fibrosis. *Contrib Nephrol.* 135, 153-160.
16. Gallagher PE, Chappell MC, Ferrario CM, Tallant EA. (2006). Distinct roles for ANG II and ANG-(1-7) in the regulation of angiotensin-converting enzyme 2 in rat astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290, C420-426.
17. Gembardt F, Sterner-Kock A, Imboden H, Spalteholz M, Reibitz F, Schultheiss HP, Siems WE, Walther T. (2005). Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides.* 26, 1270-1277.
18. Giani JF, Muñoz MC, Pons RA, Cao G, Toblli JE, Turyn D, Dominici FP. (2011). Angiotensin-(1-7) reduces proteinuria and diminishes structural damage in renal tissue of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal*

Physiol. 300, F272-282.

19. Giani JF, Burghi V, Veiras LC, Tomat A, Muñoz MC, Cao G, Turyn D, Toblli JE, Dominici FP. (2012). Angiotensin-(1-7) attenuates diabetic nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 15, F1606-1615.
20. Grande MT, Pérez-Barriocanal F, López-Novoa JM. (2010). Role of inflammation in túbulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy. *J Inflamm.* 22, 7-19.
21. Grauer G.F. (2009). Acute renal failure and chronic kidney disease. *Small Animal Internal Medicine, 4th ed.* p.645-659.
22. Griffin KA, Bidani AK. (2006). Progression of renal disease: renoprotective specificity of renin-angiotensin system blockade. *Clin J Am Soc Nephrol.* 1, 1054-1065.
23. Hartner A, Porst M, Klanke B, Cordasic N, Veelken R, Hilgers KF. (2006). Angiotensin II formation in the kidney and nephrosclerosis in Ren-2 hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant.* 21, 1778-1785.
24. Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, McQuillan D, Owens RT, Yu L, Noble NA, Border W. (2006). Renin increases mesangial cell transforming growth factor- β 1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent

- mechanisms. *Kidney Int.* 69, 105-113.
25. Ichihara A, Kobori H, Nishiyama A, Navar LG. (2004). Renal renin-angiotensin system. *Contrib Nephrol.* 143, 117-130.
26. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, Yang P, Sarao R, Wada T, Leong-Poi H, Crackower MA, Fukamizu A, Hui CC, Hein L, Uhlig S, Slutsky AS, Jiang C, Penninger JM. (2005). Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature.* 7, 112-116.
27. Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. (1995). Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 47, 1285-1294.
28. Ishiyama Y, Gallagher PE, Averill DB, Tallant EA, Brosnihan KB, Ferrario CM. (2004). Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors. *Hypertension.* 43, 970-976.
29. Ji Z, Huang C, Liang C, Chen B, Chen S, Sun W. (2005). Protective effects of blocking renin-angiotensin system on the progression of renal injury in glomerulosclerosis. *Cell Mol Immunol.* 2, 150-154.
30. Kagami S, Kuhara T, Okada K, Kuroda Y, Border WA, Noble NA. (1997). Dual effects of angiotensin II on the plasminogen/plasmin system in rat mesangial cells. *Kidney*

Int. 51, 664–671.

31. Kang JJ, Toma I, Sipos A, Meer EJ, Vargas SL, Peti-Peterdi J. (2008). The collecting duct is the major source of prorenin in diabetes. *Hypertension.* 51, 1597–1604.
32. King JN, Gunn-Moore DA, Tasker S, Gleadhill A, Strehlau G. (2006). Benazepril in Renal Insufficiency in Cats Study Group. Tolerability and efficacy of benazepril in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 20, 1054–1064.
33. King JN, Tasker S, Gunn-Moore DA, Strehlau G. (2007). BENRIC (benazepril in renal insufficiency in cats) Study Group. Prognostic factors in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 21, 906–916.
34. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 59, 251–287.
35. Kobori H, Alper AB Jr, Shenava R, Katsurada A, Saito T, Ohashi N, Urushihara M, Miyata K, Satou R, Hamm LL, Navar LG. (2009). Urinary angiotensinogen as a novel biomarker of the intrarenal renin-angiotensin system status in hypertensive patients. *Hypertension.* 53, 344–350.
36. Kon Y. (1999). Comparative study of renin-containing cells. Histological

- approaches. *J Vet Med Sci.* 61, 1075–1086.
37. Lantelme P, Rohrwasser A, Gociman B, Hillas E, Cheng T, Petty G, Thomas J, Xiao S, Ishigami T, Herrmann T, Terreros DA, Ward K, Lalouel JM. (2002). Effects of dietary sodium and genetic background on angiotensinogen and Renin in mouse. *Hypertension.* 39, 1007–1014.
38. Lely AT, Hamming I, van Goor H, Navis GJ. (2004). Renal ACE2 expression in human kidney disease. *J Pathol.* 204, 587–593.
39. Loghman-Adham M, Soto CE, Inagami T, Cassis L. (2004). The intrarenal renin-angiotensin system in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 287, F775–788.
40. Lodha S, Dani D, Mehta R, Bhaskaran M, Reddy K, Ding G, Singhal PC. (2002). Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis: role of oxidative stress. *Mol Med.* 8, 830–840.
41. Liu CX, Hu Q, Wang Y, Zhang W, Ma ZY, Feng JB, Wang R, Wang XP, Dong B, Gao F, Zhang MX, Zhang Y. (2011). Angiotensin-converting enzyme (ACE) 2 overexpression ameliorates glomerular injury in a rat model of diabetic nephropathy: a comparison with ACE inhibition. *Mol Med.* 17, 59–69.
42. Mahmood J, Khan F, Okada S, Kumagai N, Morioka T, Oite T. (2006). Local delivery

- of angiotensin receptor blocker into the kidney ameliorates progression of experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 70, 1591-1598.
43. Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, Ponticelli C, Ritz E, Zucchelli P. (1996). Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group. *N Engl J Med.* 11, 939-945.
44. Metzger R, Bohle RM, Pauls K, Eichner G, Alhenc-Gelas F, Danilov SM, Franke FE. (1999). Angiotensin-converting enzyme in non-neoplastic kidney diseases. *Kidney Int.* 56, 1442-1454.
45. Mezzano S, Ruiz-Ortega M, Egidio J. (2001). Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension.* 38, 635-638.
46. Mezzano S, Droguett A, Burgos ME, Ardiles LG, Flores CA, Aros CA, Caorsi I, Vio CP, Ruiz-Ortega M, Egidio J. (2003). Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 86, S64-70.
47. Mizuiri S, Hemmi H, Arita M, Ohashi Y, Tanaka Y, Miyagi M, Sakai K, Ishikawa Y, Shibuya K, Hase H, Aikawa A. (2008). Expression of ACE and ACE2 in individuals

- with diabetic kidney disease and healthy controls. *Am J Kidney Dis.* 51, 613–623.
48. Mizuiri S, Hemmi H, Arita M, Aoki T, Ohashi Y, Miyagi M, Sakai K, Shibuya K, Hase H, Aikawa A. (2011). Increased ACE and decreased ACE2 expression in kidneys from patients with IgA nephropathy. *Nephron Clin Pract.* 117, c57–66.
49. Mizutani H, Koyama H, Watanabe T, Kitagawa H, Nakano M, Kajiwara K, King JN. (2006). Evaluation of the clinical efficacy of benazepril in the treatment of chronic renal insufficiency in cats. *J Vet Intern Med.* 20, 1074–1079.
50. Mori T, Cowley AW Jr, Ito S. (2006). Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: physiological role of angiotensin II-induced oxidative stress in renal medulla. *J Pharmacol Sci.* 100, 2–8.
51. Morin JP, Moulin B, Borghi H, Grise P, Fillastre JP. (1989). Comparative regional distribution of angiotensin-I-converting enzyme in the rat, rabbit, dog, monkey and human kidneys. *Ren Physiol Biochem.* 12, 96–103.
52. Navar LG, Nishiyama A. (2004). Why are angiotensin concentrations so high in the kidney? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 13, 107–115.
53. Navar LG, Prieto-Carrasquero MC, Kobori H. (2006). Chapter 1: Molecular aspects of the renal renin-angiotensin system. In : Re RN, Dipette DJ, Schiffrin EL, Sowers JR(eds) *Molecular mechanisms in hypertension. 1st ed.* 3–14.

54. Nishiyama A, Konishi Y, Ohashi N, Morikawa T, Urushihara M, Maeda I, Hamada M, Kishida M, Hitomi H, Shirahashi N, Kobori H, Imanishi M. (2011). Urinary angiotensinogen reflects the activity of intrarenal renin-angiotensin system in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 26, 170-177.
55. Ogawa S, Kobori H, Ohashi N, Urushihara M, Nishiyama A, Mori T, Ishizuka T, Nako K, Ito S. (2009). Angiotensin II Type 1 Receptor Blockers Reduce Urinary Angiotensinogen Excretion and the Levels of Urinary Markers of Oxidative Stress and Inflammation in Patients with Type 2 Diabetic Nephropathy. *Biomark Insights.* 23, 97-102.
56. Oliverio MI, Madsen K, Best CF, Ito M, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. (1998). Renal growth and development in mice lacking AT1A receptors for angiotensin II. *Am J Physiol.* 274, F43-50.
57. Oudit GY, Herzenberg AM, Kassiri Z, Wong D, Reich H, Khokha R, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM, Scholey JW. (2006). Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis. *Am J Pathol.* 168, 1808-1820.
58. Park S, Bivona BJ, Kobori H, Seth DM, Chappell MC, Lazartigues E, Harrison-Bernard LM. (2010). Major role for ACE-independent intrarenal ANG II formation in type

- II diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 298, F37-48.
59. Parving HH. (2001). Diabetic nephropathy: prevention and treatment. *Kidney Int.* 60, 2041-2055.
60. Pimentel JL Jr, Sundell CL, Wang S, Kopp JB, Montero A, Martínez-Maldonado M. (1995). Role of angiotensin II in the expression and regulation of transforming growth factor-beta in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 48, 1233-1246.
61. Prieto-Carrasquero MC, Harrison-Bernard LM, Kobori H, Ozawa Y, Hering-Smith KS, Hamm LL, Navar LG. (2004). Enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats. *Hypertension.* 44, 223-229.
62. Prieto-Carrasquero MC, Botros FT, Pagan J, Kobori H, Seth DM, Casarini DE, Navar LG. (2008). Collecting duct renin is upregulated in both kidneys of 2-kidney, 1-clip goldblatt hypertensive rats. *Hypertension.* 51, 1590-1596.
63. Raij L, Azar S, Keane W. (1984). Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int.* 26, 137-143.
64. Remuzzi G, Ruggenenti P, Perico N. (2002). Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition. *Ann Intern Med.* 16, 604-615.
65. Rohrwasser A, Morgan T, Dillon HF, Zhao L, Callaway CW, Hillas E, Zhang S, Cheng T, Inagami T, Ward K, Terreros DA, Lalouel JM. (1999). Elements of a paracrine

- tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension*. 34, 1265-1274.
66. Roudebush P, Polzin DJ, Ross SJ, Towell TL, Adams LG, Dru Forrester S. (2009). Therapies for feline chronic kidney disease. What is the evidence? *J Feline Med Surg*. 11, 195-210.
67. Roudebush P, Polzin DJ, Adams LG, Towell TL, Forrester SD. (2010). An evidence-based review of therapies for canine chronic kidney disease. *J Small Anim Pract*. 51, 244-252.
68. Sampaio WO, Nascimento AA, Santos RA. (2003). Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284, H1985-1994.
69. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8, 8258-8263.
70. Schulz WW, Hagler HK, Buja LM, Erdös EG. (1988). 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, 789–797.

71. Schunkert H, Ingelfinger JR, Dzau VJ. (1999). Evolving concepts of the intrarenal renin-angiotensin system in health and disease: contributions of molecular biology. *Ren Physiol Biochem. Ren Physiol Biochem.* 14, 146–154.
72. Shaltout HA, Westwood BM, Averill DB, Ferrario CM, Figueroa JP, Diz DI, Rose JC, Chappell MC. (2007). Angiotensin metabolism in renal proximal tubules, urine, and serum of sheep: evidence for ACE2-dependent processing of angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292, F82–91.
73. Sharma R, Sharma M, Reddy S, Savin VJ, Nagaria AM, Wiegmann TB. (2006). Chronically increased intrarenal angiotensin II causes nephropathy in an animal model of type 2 diabetes. *Front Biosci.* 1, 968–976.
74. Sibony M, Gasc JM, Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Corvol P. (1993). Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension.* 21, 827–835.
75. Simões E Silva AC, Flynn JT. (2012). The renin-angiotensin-aldosterone system in 2011: role in hypertension and chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 27, 1835–1845.

76. Simões e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. (2013). ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol.* 169, 477-492.
77. Siragy HM, Carey RM. (2010). Role of the intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system in chronic kidney disease. *Am J Nephrol.* 31, 541-550.
78. Syme HM, Markwell PJ, Pfeiffer D, Elliott J. (2006). Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure is related to severity of proteinuria. *J Vet Intern Med.* 20, 528-535.
79. Taal MW, Brenner BM. (2000). Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int.* 57, 1803-1817.
80. Takase O, Marumo T, Imai N, Hirahashi J, Takayanagi A, Hishikawa K, Hayashi M, Shimizu N, Fujita T, Saruta T. (2005). NF-kappaB-dependent increase in intrarenal angiotensin II induced by proteinuria. *Kidney Int.* 68, 464-473.
81. Tenhüüdfeld J, Wefstaedt P, Nolte IJ. (2009). A randomized controlled clinical trial of the use of benazepril and heparin for the treatment of chronic kidney disease in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 15, 1031-1037.
82. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. (2000). A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as

- a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 27, 33238–33243.
83. Valdés G, Neves LA, Anton L, Corthorn J, Chacón C, Germain AM, Merrill DC, Ferrario CM, Sarao R, Penninger J, Brosnihan KB. (2006). Distribution of angiotensin-(1-7) and ACE2 in human placentas of normal and pathological pregnancies. *Placenta.* 27, 200–207.
84. van Kats JP, Schalekamp MA, Verdouw PD, Duncker DJ, Danser AH. (2001). Intrarenal angiotensin II: interstitial and cellular levels and site of production. *Kidney Int.* 60, 2311–2317.
85. Wolf G, Ritz E. (2005). Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers to halt progression of chronic renal disease: pathophysiology and indications. *Kidney Int.* 67, 799–812.
86. Wong DW, Oudit GY, Reich H, Kassiri Z, Zhou J, Liu QC, Backx PH, Penninger JM, Herzenberg AM, Scholey JW. (2007). Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (Ace2) accelerates diabetic kidney injury. *Am J Pathol.* 171, 438–451.
87. Yabuki A, Suzuki S, Matsumoto M, Nishinakagawa H. (1999). Morphometrical analysis of sex and strain differences in the mouse nephron. *J Vet Med Sci.* 61, 891–896.
88. Yabuki A, Suzuki S, Matsumoto M, Taniguchi K, Nishinakagawa H. (2002). A simple method for the specific detection of Ren-1 renin. *Kidney Int.* 62, 2294–2299.

89. Yabuki A, Mitani S, Fujiki M, Misumi K, Endo Y, Miyoshi N, Yamato O. (2010). Comparative study of chronic kidney disease in dogs and cats: induction of myofibroblasts. *Res Vet Sci.* 88, 294-299.
90. Yamamoto T, Nakagawa T, Suzuki H, Ohashi N, Fukasawa H, Fujigaki Y, Kato A, Nakamura Y, Suzuki F, Hishida A. (2007). Urinary angiotensinogen as a marker of intrarenal angiotensin II activity associated with deterioration of renal function in patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 18, 1558-1565.
91. Ye M, Wysocki J, Naaz P, Salabat MR, LaPointe MS, Battle D. (2004). Increased ACE 2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice: a renoprotective combination? *Hypertension.* 43, 1120-1125.
92. Zimmerman D, Burns KD. (2012). Angiotensin-(1-7) in kidney disease: a review of the controversies. *Clin Sci (Lond).* 123, 333-346.