

アンジオテンシン II は TLR4 存在下で AT1 受容体を介して酸化ストレスを増加し、炎症を惹起して糸球体硬化をより促進させる

氏名 岡本 匡史
所属 山口大学大学院医学系研究科
応用医工学系専攻 器官病態内科学分野

平成 28 年 1 月

目次

| | | |
|-------|------|---|
| I. | 要旨 | 1 |
| II. | 諸言 | 2 |
| III. | 方法 | 2 |
| IV. | 結果 | 4 |
| V. | 考察 | 5 |
| VI. | 結語 | 6 |
| VII. | 謝辞 | 6 |
| VIII. | 参考文献 | 8 |

1. 要旨

背景・目的：アンジオテンシン II (AngII) は AngII タイプ 1 (AT1) 受容体を介して活性酸素種 (ROS) を産生し、糸球体硬化を惹起する。一方, Toll-like Receptor 4 (TLR4) は各種腎疾患において, 炎症を惹起し腎障害をさらに進行させる。しかし, AngII による糸球体硬化における TLR4 の役割はいまだ不明である。そこで本研究では, AngII 負荷高血圧において, 酸化ストレス, 糸球体硬化と TLR4 の関係について検討した。

方法：野生型 (Balb/c, WT) と TLR4 機能欠損 ($TLR4^{lps-d}$) マウスに AngII と ノルエピネフリン (NE) をそれぞれ投与し, 併せて血圧に影響を与えない低用量イルベサルタン (IRB) を AngII に追加投与したモデルを作製した。メサンギウム基質量, ROS 含量, NADPH oxidase のコンポーネント ($p22^{phox}$ と $p47^{phox}$), Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) の発現とマクロファージの浸潤を解析した。

結果：WT と $TLR4^{lps-d}$ 対照群は, それぞれの測定項目に差はなく, AngII と NE は同様に収縮期血圧を上昇させた ($P < 0.05$)。WT では, AngII はメサンギウム基質を増生し, ROS 含量, $p22^{phox}$, $p47^{phox}$ と MCP-1 発現量及び糸球体へのマクロファージの浸潤を増加させたが ($P < 0.05$), IRB はこれらの変化を抑制した。一方 $TLR4^{lps-d}$ では, AngII による各指標の増加が WT と比べて抑制され, 対照群と差がなかった ($P < 0.05$)。一方, NE は, WT, $TLR4^{lps-d}$ とともに対照群と差がなかった。

結語：AngII は, TLR4 機能存在下で AT1 受容体を介して糸球体の酸化ストレスを亢進し, 炎症を惹起することで, 糸球体硬化をさらに促進させる可能性が示唆された。

II. 諸言

レニン・アンジオテンシン系の賦活化は、高血圧の進行や病理学的な組織障害において重要な役割を担っている [1, 2]。特に腎臓において、アンジオテンシン II (AngII) は直接的に作用して酸化ストレスや炎症を惹起し、高血圧による糸球体硬化の発症及び進行の一因となっている [3-4]。

Toll-like receptor (TLR) は、微生物病原体の構成成分を認識し、シグナル伝達経路を介して炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を誘導するパターン認識レセプターであり、自然免疫の中心的役割を果たす [5-8]。加えて、TLR4 は腎臓内では糸球体内皮細胞、ポドサイト、メサンギウム細胞、尿細管上皮細胞に分布し [9]、免疫疾患だけでなく腎虚血や腎不全など腎疾患の病因として重要な役割を担っていることが報告されている [10]。

AngII 及び TLR4 はともに nuclear factor- κ B (NF- κ B) のような炎症惹起性転写因子の活性化に続いて活性酸素 (reactive oxygen species; ROS) を産生し、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の発現を誘導して高血圧の発症に関与する [11-13]。しかしながら、腎臓の TLR4 が AngII によるシグナル伝達や炎症惹起に関与しているかについては明らかではない [14, 15]。本研究の目的は、AngII 負荷高血圧モデルを用いて、糸球体硬化の進展に重要な役割を果たす酸化ストレスと TLR4 の関係に着目してその分子病態を探索し、AngII による糸球体硬化の新たな進展調節機序を解明することである。

III. 方法

1. 動物と実験プロトコール

12~16週齢雄の野生型 (WT) マウス (BALB/c, n=24; Charles River Japan, Yokohama, Japan) とリポ多糖に対する反応性を欠如した TLR4 機能欠損マウス (Jackson Laboratory, USA, TLR4^{ps-d}; n=24) [16, 24] を本研究に用いた。

WT と TLR4^{ps-d} は、それぞれ無作為に以下の4群、すなわち、同程度に血圧上昇をきたす AngII (Sigma-Aldrich, USA) を $1.1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ で皮下投与した群 (AngII 投与群; n=6)、血圧のみによる影響を検討する目的でノルエピネフリン (NE) を $5.6\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ で皮下投与した群 (NE 投与群; n=6)、対照として生理食塩水を皮下投与した群 (対照群; n=6)、さらに AngII 皮下投与に加えて血圧を下げない程度の AngII 受容体拮抗薬イルベサルタン (IRB, Shionogi Pharmaceutical, Tokyo) を低用量 ($6\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) で経口投与した群 (IRB 投与群; n=6) に割り付けた。これらの投与量は既報の方法に従った [18]。なお、皮下投与についてはイソフルレン (Abbott Japan, Tokyo, Japan) を用いた吸入麻酔下に Osmotic mini-pump (Model 1002; Alzet Osmotic Pumps, USA) を皮下に埋め込み2週間持続投与した。IRB は、mini-pump 植え込み中の2週間飲用水

に混入して経口投与した。血圧と心拍数は、無麻酔下にtail-cuff法で、投与前、投与開始7、14日後にそれぞれ測定し、14日目に体重と腎重量を計測した。

動物実験プロトコールは、山口大学医学部動物実験委員会の承認を受け、すべての実験手技は山口大学の実験動物の管理と使用に関するガイドラインに沿って実施した。

2. 組織学的検討

2週間の薬剤投与終了後、イソフルレンの過剰投与にてマウスを安楽死させ、その後腎臓を摘出し速やかにリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、液体窒素で急速凍結した腎組織を用いて薄切切片を作成し、また95%エタノール・1%氷酢酸液で腎組織を固定し、パラフィン包埋した薄切切片を作成した[19-20]。

1) 組織学および免疫組織化学的分析

糸球体硬化度の組織学的解析のため、パラフィン包埋から2 μ mの薄切切片を作成し、ヨウ素酸シッフ（PAS）染色を行った。機械的圧力による影響を避けるため、皮質最外層部分を除いた50個の糸球体について糸球体面積におけるメサンギウム領域の面積比を測定し、その平均値を糸球体硬化度として各群で比較検討した[21]。

免疫組織化学的分析は、ABCキット（Vector Laboratories, USA）を使用した酵素抗体法間接法にて行った。糸球体内におけるNADPH oxidaseの細胞内コンポーネントであるp22^{phox}と細胞外コンポーネントであるp47^{phox}の発現量を観察するため、ヤギ抗p22^{phox}、p47^{phox}ポリクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology, USA）を用いて染色し、また糸球体内におけるMonocyte chemotactic protein-1（MCP-1）の発現量はウサギ抗MCP-1ポリクローナル抗体（Cell Signaling Technology, USA）で染色し、糸球体内のマクロファージの浸潤を観察するためにラット抗マクロファージマーカーBM8モノクローナル抗体（BMA Biomedicals, Switzerland）を用いてそれぞれ染色した。p22^{phox}、p47^{phox}とMCP-1の発色強度をImage-J（NIH, USA）を用いて定量し、BM8については陽性細胞数をカウントした。

2) 糸球体ROS含量の測定

ROS産生をin situで観察するためジハイドロエチジウム（DHE, Polysciences, USA）染色[19-20]を行った。5 μ mの凍結切片を0.1 mMのDHEと共に室温で30分間インキュベートし、共焦点レーザー顕微鏡（LSM; Zeiss, Munich, Germany）で撮影し、蛍光強度をImage-J（NIH, USA）にて定量した。

3. 統計学的解析

すべての数値は平均値±標準誤差 (SE) で表示した。StatView (SAS, USA) を用い、多群間比較は1元配置分散分析 (one-way ANOVA) の後Scheffe法にて行った。P<0.05の場合、統計学的に有意と判定した。

IV. 結果

1. 体重, 収縮期血圧と腎重量の推移

WT・TLR4^{lps-d} の対照群はともに、体重, 心拍数に差はなく、薬物投与もこれらの指標に影響を与えなかった。AngII 投与群, NE 投与群, IRB 投与群は対照群に対してそれぞれ有意かつ同等に血圧が上昇した。AngI, NE および IRB の投与はいずれも WT・TLR4^{lps-d} の各対照群と比較しても腎重量と腎重量/体重比に影響を与えなかった。(表1)

2. 糸球体硬化度

AngII は WT で糸球体硬化を高度に促進したが, TLR4^{lps-d} では WT と比べて有意に抑制されていた。NE 投与は WT・TLR4^{lps-d} とともに軽度の糸球体硬化を示したが対照群と比較して有意差はなかった。また WT では IRB 投与は AngII 投与による糸球体硬化を有意に抑制した (図. 1A, B)。

3. 糸球体 ROS 含量

AngII は, WT において対照群の2倍近くに糸球体の $\cdot O_2^-$ を増加させたのに対し, TLR4^{lps-d} ではその増加が有意に抑制された。また WT では IRB 併用投与でも ROS 含量の増加が有意に抑制されたが, TLR4^{lps-d} では IRB の ROS 含量に対する影響は無かった。NE 投与群でも, ROS 含量が増加したが, WT, TLR4^{lps-d} とともに対照群と比較して ROS 含量は有意に増加しなかった (図. 2A, B)。

4. 糸球体における NADPH oxidase コンポーネントの発現

p22^{phox}, p47^{phox} の免疫染色は淡青色の背景に茶染されて観察され, 主にその発現はメサングウム細胞やポドサイトに認められた (図 3A)。AngII 投与は WT で, p22^{phox}, p47^{phox} の発現量を対照群と比較して 3~4 倍と有意に増加させた。TLR4^{lps-d}, WT の IRB 併用投与群では p22^{phox}, p47^{phox} の発現がそれぞれ有意に抑制された。また, NE は WT, TLR4^{lps-d} とともに軽度これら指標の発現量を増加させたが差はなかった (図. 3B)。

5. 糸球体におけるマクロファージの浸潤と MCP-1 の発現

マクロファージの免疫染色は淡青色の背景に赤染されて観察された (図. 4A)。

AngII 投与では、マクロファージの浸潤は WT で対照群と比較して 7.5 倍と有意に増加した。TLR4^{lps-d}、WT の IRB 併用投与ではその浸潤量を有意に抑制した。NE は WT、TLR4^{lps-d} とともにマクロファージの浸潤量に影響を与えなかった (図. 4B)。

免疫染色では、MCP-1 は淡青色の背景に褐色に染色され、その発現はメサンギウム細胞とポドサイトで見られた (図. 5A)。AngII 投与は、WT では MCP-1 の発現を対照群と比較して 2.5 倍有意に増加させたが、TLR4^{lps-d}、WT の IRB 併用投与では MCP-1 の発現は抑制された。また、NE は WT、TLR4^{lps-d} とともに MCP-1 の発現を軽度増加させたが有意ではなかった (図. 5B)。

V. 考察

今回の研究結果は、AngII が血圧とは独立して ROS 産生や糸球体内へのマクロファージ浸潤や糸球体硬化を惹起するというこれまでの報告 [22-25] と一致する。特に重要な点は、AngII による糸球体硬化・進展において TLR4 が重要な役割を果たしていることである。

腎臓では、TLR4 は微生物病原体の外因性リガンドを認識することで自然免疫の重要な役割を果たす [5]。TLR4 のリガンドは、免疫応答反応とは独立して炎症反応を惹起することで腎障害を進展させる [26]。つまり、TLR4 のシグナル伝達が白血球よりも腎細胞内で優位であり [27]、また、炎症や酸化ストレスに伴い放出された内因性リガンドによって刺激されることも示唆されている [10, 28, 29]。今回の結果では AngII による糸球体内の ROS 産生や炎症惹起の過程で TLR4 が関与していることが示唆された。

これまでに TLR4^{lps-d} の腎臓では WT と比較して顆粒球の浸潤がより少なく、またケモカイン発現量も低いことが報告されている [10]。我々のグループでは AngII による心肥大・心不全において血管リモデリングや血管周囲線維化、マクロファージの浸潤が TLR4 を介した酸化ストレスの増加と MCP-1 の選択的活性化によってもたらされていることを報告した [18]。加えて、腎臓において AngII はメサンギウム細胞内 TLR4 の mRNA の転写を刺激し TLR4 の発現増加を引き起こすことで NF- κ B のシグナル伝達を賦活化しケモカインを誘導することから報告されている [30]。このことは AngII が自然免疫を利用して炎症を惹起していることを示唆している。本研究でも AngII は TLR4 を介して糸球体内にマクロファージの遊走を誘導することで ROS 産生や炎症を惹起したことが観察された。

ROS 産生を起こす NADPH オキシダーゼは酸化還元シグナリングの重要なメディエータであり、酸化ストレスは各種腎疾患の進展に関与している [31]。レニン・アンジオテンシン系は NADPH オキシダーゼ依存性酸化還元シグナリング経路で重要であり、MCP-1 の発現増加を引き起こすが、この過程は AT1 受容体阻害薬によって減弱される [32]。本研究では AngII による糸球体硬化に続いて生じる

NADPH オキシダーゼの発現量増加に TLR4 の機能が不可欠であるかもしれないことが示唆された。つまり腎臓において TLR4 シグナル経路がマクロファージ浸潤による炎症と糸球体硬化に続く NADPH オキシダーゼ依存性酸化還元反応に必要な不可欠な役割を担っていることを示した。

これまで AngII による高血圧は ROS 依存性であることが示されてきた。対照的に我々は AngII 投与下で TLR4^{lps-d} は ROS 産生が抑制されているにも関わらず WT と同様に血圧上昇を観察した。この不一致の理由は不明であるが遺伝的背景の違いや AngII 暴露により寿命が短縮することで ROS もしくは AngII が増加したことの関与が推察される。実際に Lassegue らは AngII によって生成された ROS の高血圧における作用は矛盾することを示している [33, 34]。

本研究では、腎における AT1 受容体やアンジオテンシン変換酵素の発現に対する AngII の関与を直接検討していないが、今回のわれわれの結果を勘案すると AT1 受容体シグナル経路は糸球体硬化に関与するとともに血圧値を規定し、さらには AngII による酸化ストレス増加において TLR4 を必要とすることが考えられる。更なる研究では、腎におけるアンジオテンシン受容体とアンジオテンシン変換酵素の発現について確認する必要がある。

またアルドステロンは NADPH オキシダーゼ経路を含む AngII とは別の経路で酸化促進作用を有する [25]。アルドステロンは NF- κ B の活性化や炎症、免疫、細胞増殖に関連する因子の賦活化によって炎症や線維化を促進し、腎線維化や糸球体硬化を起こす可能性があることが示唆されている [35] が、今後の研究で明らかにされる必要がある。

本研究では TLR4 の存在に関わらず高血圧は軽度の糸球体硬化を引き起こすが、AngII は TLR4 存在下で AT1 受容体を介して酸化ストレスを増加させ、さらには炎症を惹起し糸球体硬化を促進することが実証された。これらの結果は、AngII による糸球体硬化に対する TLR4 の役割を初めて検証したものであり、TLR4 阻害薬が高血圧による腎障害において糸球体硬化進展を予防する新たな治療薬となる可能性を示唆している。

VI. 結語

AngII は TLR4 機能存在下で AT1 受容体を介して糸球体内の酸化ストレスを亢進し、炎症を惹起することで、糸球体硬化をさらに促進させる可能性が示唆された。

VII. 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご助言を頂きました山口大学医学部附属病院臨床研究センター梅本誠治先生をはじめ山口大学大学院医学系研究科応

用医工学系専攻器官病態内科学分野の研究室の方々，ならびに本研究のサポートをしてくださいました石原理恵氏，岡本陽子氏に深謝申し上げます。

VIII. 参考文献

- 1 Sasamura H, Hayashi K, Ishiguro K, Nakaya H, Saruta T, Itoh H: Prevention and regression of hypertension: Role of renal microvascular protection. *Hypertens Res* 2009; 32:658-664.
- 2 Iwanami J, Mogi M, Iwai M, Horiuchi M: Inhibition of the renin-angiotensin system and target organ protection. *Hypertens Res* 2009; 32:229-237.
- 3 Kurdi M, Booz GW: New take on the role of angiotensin ii in cardiac hypertrophy and fibrosis. *Hypertension* 2011; 57:1034-1038.
- 4 Touyz RM, Briones AM: Reactive oxygen species and vascular biology: Implications in human hypertension. *Hypertens Res* 2011; 34:5-14.
- 5 Kumar H, Kawai T, Akira S: Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011; 30:16-34.
- 6 Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11:373-384.
- 7 Schroppe B, He JC: Expression of toll-like receptors in the kidney: Their potential role beyond infection. *Kidney Int* 2006; 69:785-787.
- 8 Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:499-511.
- 9 Anders HJ, Schlondorff D: Toll-like receptors: Emerging concepts in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16:177-183.
- 10 Gluba A, Banach M, Hannam S, Mikhailidis DP, Sakowicz A, Rysz J: The role of toll-like receptors in renal diseases. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6:224-235.
- 11 Harrison DG, Guzik TJ, Lob HE, Madhur MS, Marvar PJ, Thabet SR, Vinh A, Weyand CM: Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension* 2011; 57:132-140.
- 12 Iwai M, Mogi M, Horiuchi M: Role of nad (p) h oxidase and its regulation in chronic hypertension. *Hypertens Res* 2006; 29:743-744.
- 13 Eissler R, Schmaderer C, Rusai K, Kuhne L, Sollinger D, Lahmer T, Witzke O, Lutz J, Heemann U, Baumann M: Hypertension augments cardiac toll-like receptor 4 expression and activity. *Hypertens Res* 2011; 34:551-558.
- 14 Lemarie CA, Schiffrin EL: The angiotensin ii type 2 receptor in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2010; 11:19-31.
- 15 Brasier AR: The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res* 2010; 86:211-218.

- 16 Vogel SN, Wax JS, Perera PY, Padlan C, Potter M, Mock BA: Construction of a balb/c congenic mouse, c. C3h-Ipsd, that expresses the Ipsd allele: Analysis of chromosome 4 markers surrounding the Ips gene. *Infect Immun* 1994; 62:4454-4459.
- 17 Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M-Y, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B: Defective Ips signaling in c3h/hej and c57bl/10sccr mice: Mutations in tlr4 gene. *Science* 1998; 282:2085-2088.
- 18 Matsuda S, Umemoto S, Yoshimura K, Itoh S, Murata T, Fukai T, Matsuzaki M: Angiotensin activates mcp-1 and induces cardiac hypertrophy and dysfunction via toll-like receptor 4. *J Atheroscler Thromb* 2015; 22:833-844.
- 19 Umeji K, Umemoto S, Itoh S, Tanaka M, Kawahara S, Fukai T, Matsuzaki M: Comparative effects of pitavastatin and probucol on oxidative stress, cu/zn superoxide dismutase, ppar-gamma, and aortic stiffness in hypercholesterolemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291:H2522-2532.
- 20 Itoh S, Umemoto S, Hiromoto M, Toma Y, Tomochika Y, Aoyagi S, Tanaka M, Fujii T, Matsuzaki M: Importance of nad (p) h oxidase-mediated oxidative stress and contractile type smooth muscle myosin heavy chain sm2 at the early stage of atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105:2288-2295.
- 21 Harris RD, Steffes MW, Bilous RW, Sutherland DE, Mauer SM: Global glomerular sclerosis and glomerular arteriolar hyalinosis in insulin dependent diabetes. *Kidney Int* 1991; 40:107-114.
- 22 Navar LG: Intrarenal renin-angiotensin system in regulation of glomerular function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2014; 23:38-45.
- 23 Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO: The renin-angiotensin system and progression of renal disease: From hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol* 2003; 93:P3-13.
- 24 Ohtake T, Oka M, Maesato K, Mano T, Ikee R, Moriya H, Kobayashi S: Pathological regression by angiotensin ii type 1 receptor blockade in patients with mesangial proliferative glomerulonephritis. *Hypertens Res* 2008; 31:387-394.
- 25 Mennuni S, Rubattu S, Pierelli G, Tocci G, Fofi C, Volpe M: Hypertension and kidneys: Unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. *J Hum Hypertens* 2014; 28:74-79.

- 26 Brown HJ, Lock HR, Wolfs TG, Buurman WA, Sacks SH, Robson MG: Toll-like receptor 4 ligation on intrinsic renal cells contributes to the induction of antibody-mediated glomerulonephritis via cxcl1 and cxcl2. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:1732-1739.
- 27 Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, Alexander SI, Sharland AF, Chadban SJ: Tlr4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2007; 117:2847-2859.
- 28 Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H: Cutting edge: Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000; 164:558-561.
- 29 Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF, 3rd: The extra domain a of fibronectin activates toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276:10229-10233.
- 30 Wolf G, Bohlender J, Bondeva T, Roger T, Thaiss F, Wenzel UO: Angiotensin ii upregulates toll-like receptor 4 on mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:1585-1593.
- 31 Mao S, Huang S: The signaling pathway of nadph oxidase and its role in glomerular diseases. *J Recept Signal Transduct Res* 2014; 34:6-11.
- 32 Kamioka M, Ishibashi T, Sugimoto K, Uekita H, Nagai R, Sakamoto N, Ando K, Ohkawara H, Teramoto T, Maruyama Y, Takeishi Y: Blockade of renin-angiotensin system attenuates advanced glycation end products-mediated signaling pathways. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17:590-600.
- 33 Lassegue B, Griendling KK: Nadph oxidases: Functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:653-661.
- 34 Welch WJ: Angiotensin ii-dependent superoxide: Effects on hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* 2008; 52:51-56.
- 35 Queisser N, Oteiza PI, Stopper H, Oli RG, Schupp N: Aldosterone induces oxidative stress, oxidative DNA damage and nf-kappab-activation in kidney tubule cells. *Mol Carcinog* 2011; 50:123-135.

【図表説明】

図. 1 糸球体の硬化度

WT : Wild-typeマウス, TLR4^{lps-d} : TLR4機能欠損マウス, AngII : アンジオテンシンII, NE : ノルエピネフリン, IRB : イルベサルタン。

- A. 腎組織切片のPAS染色。スケールバーは50 μ mを示す。
- B. 糸球体硬化度の測定値。* $p < 0.05$ vs. WT 対照; 数値は平均値 \pm SEによって示した (n=5)。

図. 2 糸球体におけるROS含量

WT : Wild-typeマウス, TLR4^{lps-d} : TLR4機能欠損マウス, AngII : アンジオテンシンII, NE : ノルエピネフリン, IRB : イルベサルタン。

- A. 腎組織切片のDHE染色。スケールバーは100 μ mを示す。
- B. WT 対照と比較した蛍光強度。* $p < 0.05$ vs. WT 対照; 数値は平均値 \pm SEによって示した (n=3)。

図. 3 糸球体におけるp22^{phox}とp47^{phox}の発現

WT : Wild-typeマウス, TLR4^{lps-d} : TLR4機能欠損マウス, AngII : アンジオテンシンII, NE : ノルエピネフリン, IRB : イルベサルタン。

- A. 腎組織切片の免疫染色。スケールバーは50 μ mを示す。
- B. WT 対照と比較した発現量。* $p < 0.05$ vs. WT 対照; 数値は平均値 \pm SEによって示した (n=3)。

図. 4 糸球体におけるマクロファージの浸潤

WT : Wild-typeマウス, TLR4^{lps-d} : TLR4機能欠損マウス, AngII : アンジオテンシンII, NE : ノルエピネフリン, IRB : イルベサルタン。

- A. 腎組織切片の免疫染色。スケールバーは50 μ mを示す。
- B. 陽性細胞数を示した。* $p < 0.05$ vs. WT 対照; 数値は平均値 \pm SEによって示した (n=4)。

図. 5 糸球体におけるMCP-1の発現

WT : Wild-typeマウス, TLR4^{lps-d} : TLR4機能欠損マウス, AngII : アンジオテンシンII, NE : ノルエピネフリン, IRB : イルベサルタン。

- A. 腎組織切片の免疫染色。スケールバーは50 μ mを示す。
- B. WT 対照群と比較した発現量を示した。* $p < 0.05$ vs. WT対照群; 数値は平均値 \pm SEによって示した (n=3)。

表 1. 薬物投与 14 日目のマウスの体重, 腎重量/体重, 収縮期血圧と心拍数

| | WT | | | | Tlr4 ^{pas-d} | | | |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|
| | 対照 | AngII | IRB | NE | 対照 | AngII | IRB | NE |
| 体重, g | 28.5±0.6 | 27.7±0.8 | 27.7±1.2 | 27.5±0.7 | 28.9±0.8 | 28.6±1.1 | 28.2±1.8 | 27.7±1.5 |
| 左腎臓重量/体重, mg/g | 8.15±0.12 | 8.54±0.54 | 8.74±0.44 | 8.5±0.61 | 8.25±0.58 | 8.51±0.81 | 8.16±0.47 | 8.64±0.48 |
| 右腎臓重量/体重, mg/g | 7.95±0.11 | 8.26±0.49 | 8.31±0.66 | 8.43±0.66 | 8.16±0.61 | 8.4±0.8 | 8.07±0.52 | 8.29±0.69 |
| 収縮期血圧, mm Hg | 108±5 | 170±5* | 162±4* | 164±6* | 109±7 | 171±4* | 163±9* | 161±5* |
| 心拍数, 回/分 | 528±38 | 500±46 | 547±43 | 537±47 | 523±39 | 510±38 | 508±37 | 520±44 |

WT: wild-type マウス, TLR4^{pas-d}: TLR4 機能欠損マウス, AngII: アンジオテンシン II, NE: ノルエピネフリン, IRB: イルベサルタン。数値は平均値±SE で示した (n=5)。* P<0.05 vs. WT 対照群, † P<0.05 vs. Tlr4^{pas-d} 対照群。

图.1

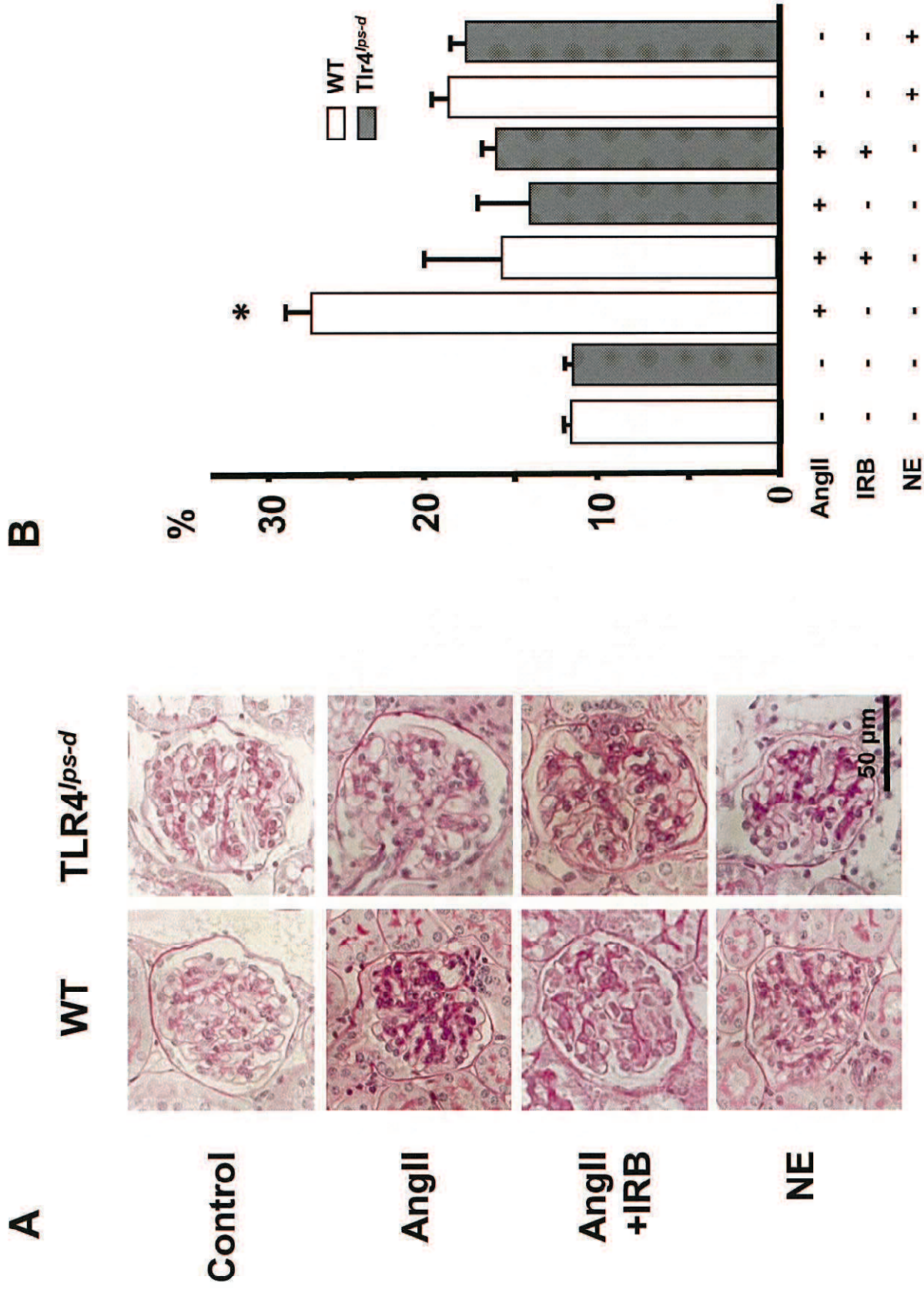


图.2

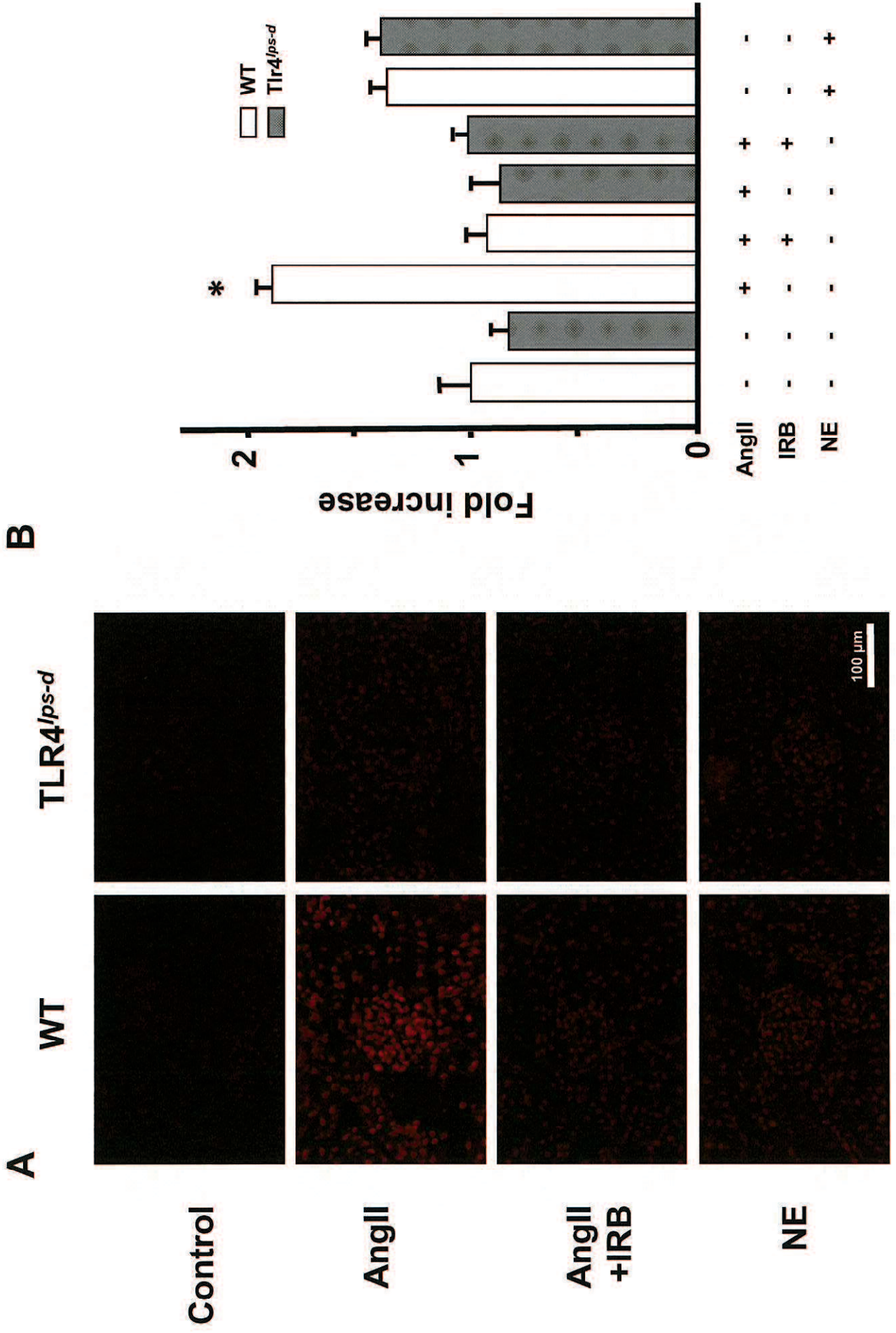


图.3A

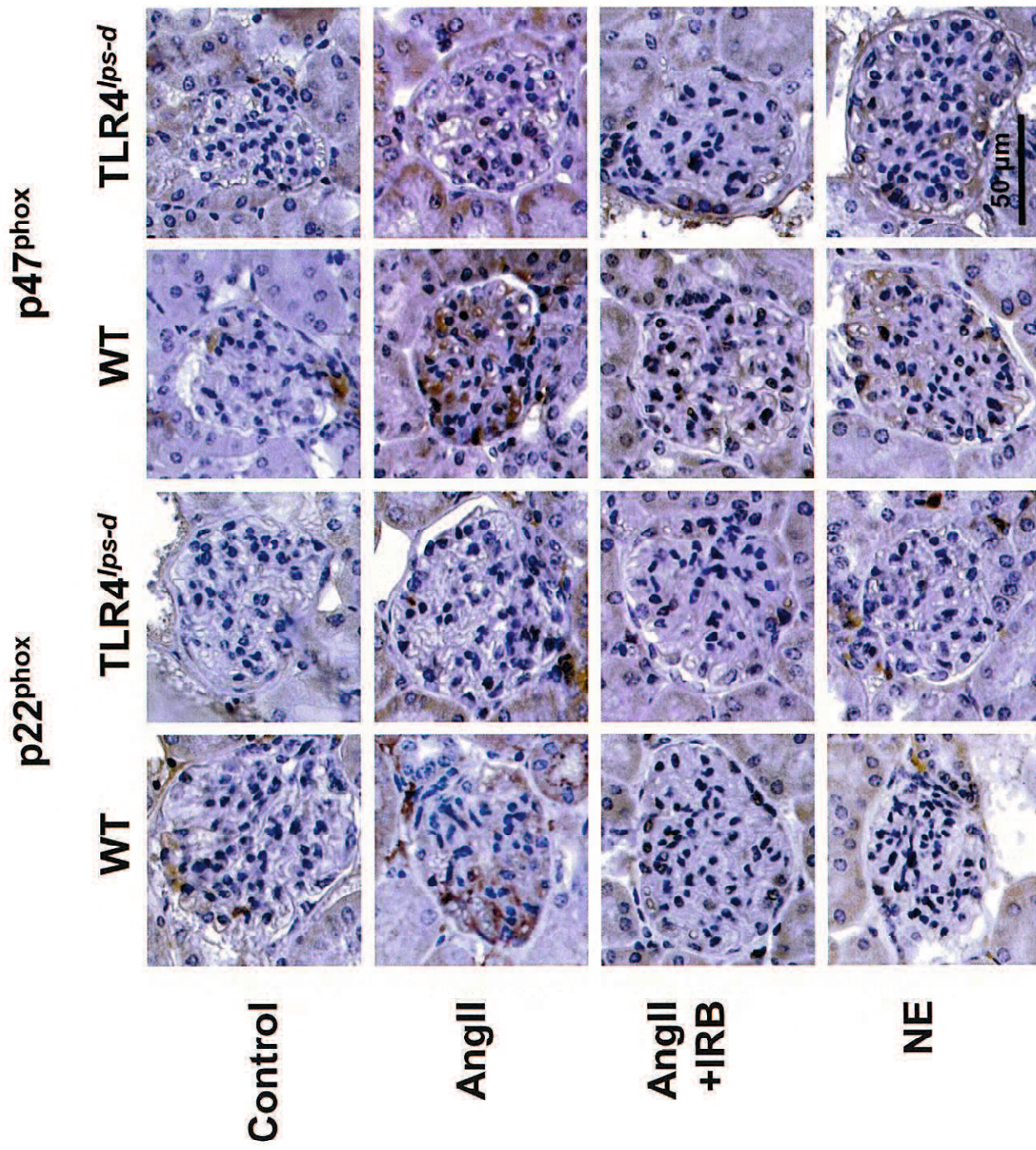


图.3B

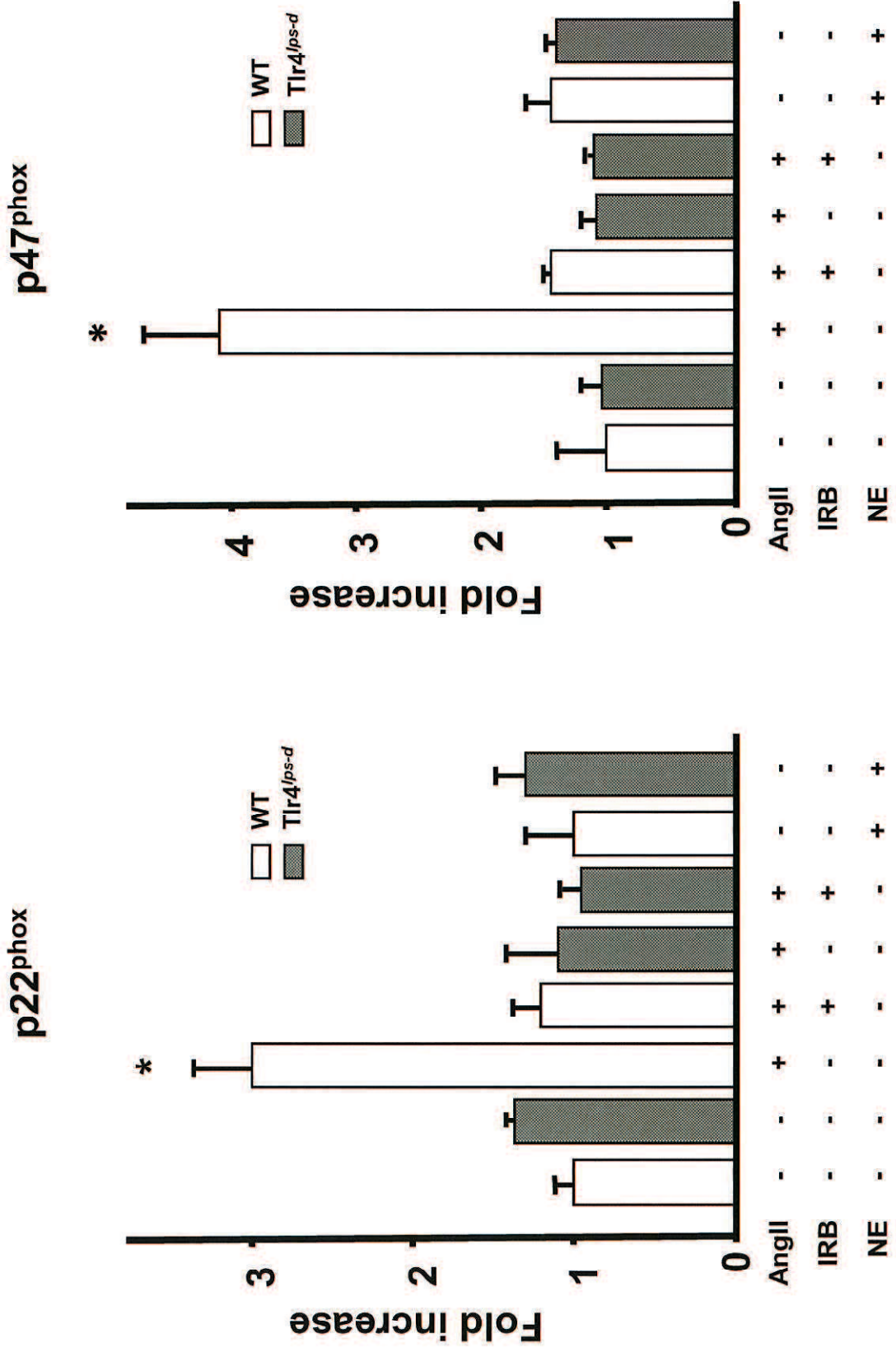


图.4

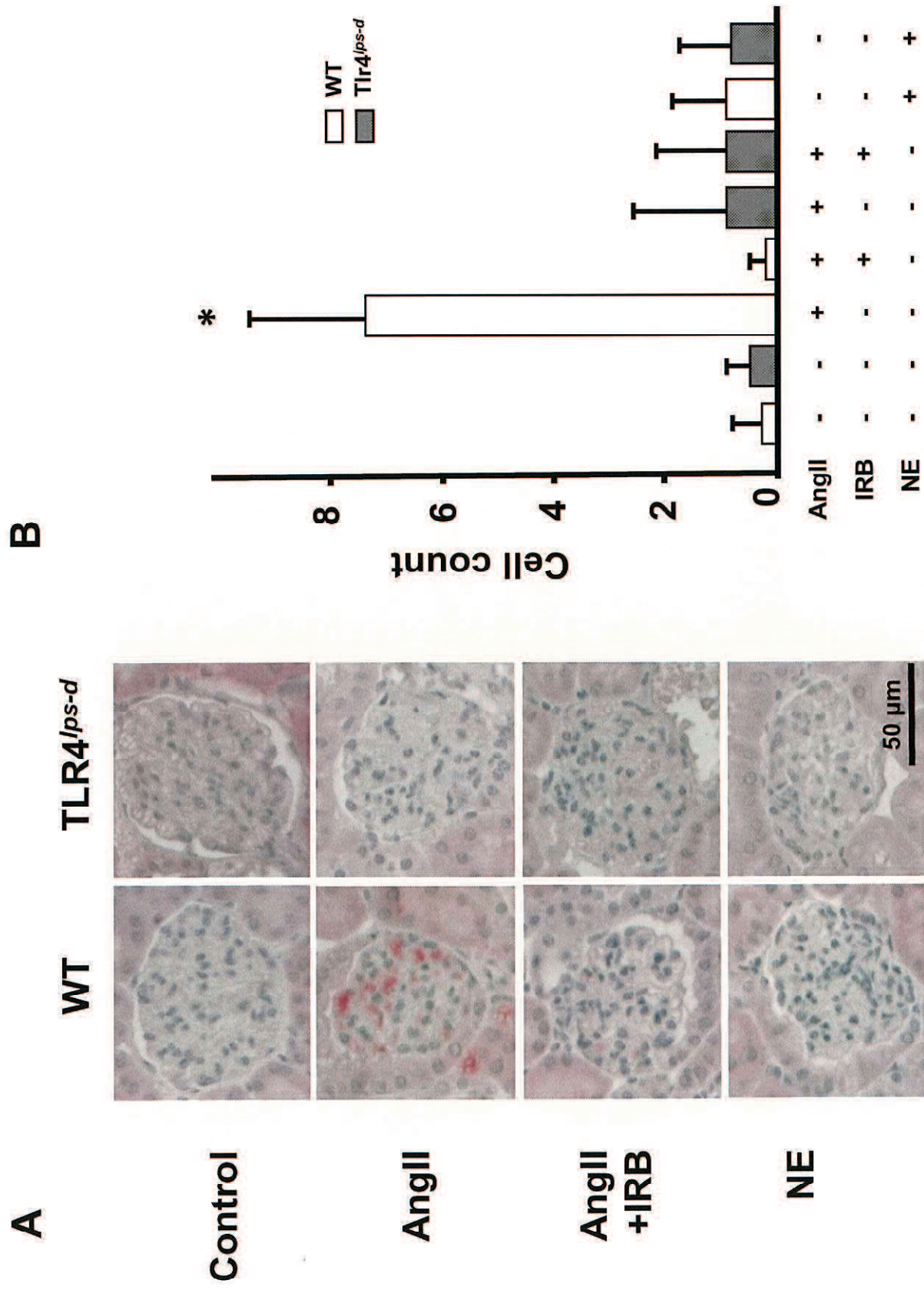


图.5

