

細管のエネルギー代謝, 糖の取り込みにおいて重要である可能性が示唆される。したがって, インスリン抵抗性, 高インスリン血症が腎尿細管のエネルギー代謝に影響を及ぼす可能性も考えられる。

5 肥満関連腎症の治療戦略

肥満関連腎症や肥満に合併する腎障害の治療法は, まず減量することである。またSAS合併例では, 血液の酸素化の改善とともに尿蛋白が消失することも知られている。このような治療戦略に関連して, CKDの進行における肥満の意義について考えてみたい。CKDは性, ネフロン数といった遺伝因子を背景に, 食事, 生活習慣病といった慢性の障害因子や薬剤, 感染など急性の障害因子によって腎臓が障害を受け, 老化, 疲弊することにより進行する。最終的には病理学的に糸球体硬化, 尿細管萎縮, 間質線維化となって萎縮した末期腎不全となる(図2)。慢性障害因子となる食事, 高血圧や糖尿病については詳しい研究がなされ, 低蛋白食, 減塩食, 血糖管理, ACE阻害薬, ARBといったRAS抑制, 血圧管理といった治療法が確立し, ある程度の効果は得られている。しかし, CKDの進行は完全には抑えられず, 維持透析患者の増加に対して完全には歯止めがかけられていない状況であり, 近年にみられる肥満人口増加の影響が示唆される。統計によれば, 末期腎不全患者の原因として糖尿病性腎症の増加が指摘されるが, 非糖尿病性腎症の増加も無視できない¹⁹⁾(図3A)。さらに喫煙, 高コレステロール血症, 高血圧といった糖尿病以外のCVDリスクの管理が1980年までに十分になされるようになってきたが, 一方で末期腎不全患者の増加が抑えられていない現状がある。これについては, 肥満者の数の増加が1980年以降顕著となり, この増加が末期腎不全患者の増

加と一致していることが指摘されている(図3B)。すなわち, インスリン抵抗性, 高インスリン血症を始めとする肥満の病態が, CKDの進行に深く関わっている可能性が示唆される。CKDの今後の治療戦略については, 従来の低蛋白食, 減塩食, 血糖管理, RAS抑制, 血圧管理では十分とは言えず, いまだ解決されていない重要な因子である肥満の病態管理が重要であると思われる(図3)。肥満関連腎症の病態解明とそれに基づくCKDの管理は, 今後ますます重要になるものとする。

文献

- 1) Ross WR et al: Epidemiology of obesity and chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 13(4): 325-335, 2006
- 2) Kambham N et al: Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. *Kidney Int* 59(4): 1498-1509, 2001
- 3) Praga M et al: Clinical features and long-term outcome of obesity-associated focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 16(9): 1790-1798, 2001
- 4) Bagby SP: Obesity-initiated metabolic syndrome and the kidney: a recipe for chronic kidney disease? *J Am Soc Nephrol* 15(11): 2775-2791, 2004
- 5) Iseki K et al: Body mass index and the risk of development of end-stage renal disease in a screened cohort. *Kidney Int* 65(5): 1870-1876, 2004
- 6) Chen J et al: The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U.S. adults. *Ann Intern Med* 140(3): 167-174, 2004
- 7) Wang Y et al: Association between obesity and kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int* 73(1): 19-33, 2008
- 8) Hallan S et al: Obesity, smoking, and physical inactivity as risk factors for CKD: are men more vulnerable? *Am J Kidney Dis* 47(3): 396-405, 2006
- 9) Navaneethan SD et al: Weight loss interventions in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 4(10): 1565-1574, 2009
- 10) Rea DJ et al: Glomerular volume and renal histology in obese and non-obese living kidney donors. *Kidney Int* 70(9): 1636-1641, 2006
- 11) Sharma K et al: Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 118(5): 1645-1656, 2008

- 12) Unger RH: The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol* 65: 333-347, 2003
- 13) Jiang T et al: Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. *J Biol Chem* 280(37): 32317-32325, 2005
- 14) Hall JE et al: Is obesity a major cause of chronic kidney disease? *Adv Ren Replace Ther* 11(1): 41-54, 2004
- 15) Elsayed EF et al: Waist-to-hip ratio and body mass index as risk factors for cardiovascular events in CKD. *Am J Kidney Dis* 52(1): 49-57, 2008
- 16) Huffman DM et al: Role of visceral adipose tissue in aging. *Biochim Biophys Acta* 1790(10): 1117-1123, 2009
- 17) Welsh GI et al: Insulin signaling to glomerular podocyte is critical for normal kidney function. *Cell Metab* 12(4): 329-340, 2010
- 18) Sarafidis PA et al: Insulin resistance, hyperinsulinemia, and renal injury: mechanisms and implications. *Am J Nephrol* 26(3): 232-244, 2006
- 19) El-Atat FA et al: The relationship between hyperinsulinemia, hypertension and progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol* 15(11): 2816-2827, 2004

筆者プロフィール

脇野 修 (わきの しゅう)

1990年慶應義塾大学医学部卒業, 同腎内分泌代謝内科講師。専門は腎臓, 内分泌, 高血圧, 透析医療。

伊藤 裕 (いとう ひろし)

1989年京都大学大学院医学研究科博士課程修了, 2001年同臨床病態医科学講座講師, 2006年慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科教授。専門は高血圧, 糖尿病, 動脈硬化, 内分泌代謝学, 再生医学, 抗加齢医学。

The pathophysiology and the treatment of obesity-related glomerulopathy

Shu Wakino, Hiroshi Ito

Division of Endocrinology, Metabolism and Nephrology Department of Internal Medicine Keio University, School of Medicine

Chronic kidney disease (CKD) associated with obesity is categorized into two clinical entities; one is renal damage due to diabetes and/or hypertension derived from obesity and the other those specific for obesity itself which is called "obesity-related glomerulopathy (ORG)". ORG is characterized with glomerulomegaly and focal segmental sclerosis and its pathogenic mechanisms include; 1, Renal hemodynamic alterations, 2; Renal damages due to adipocytokine, 3; Renal damages due to insulin resistance and/or hyperinsulinemia, 4; Renal damages by lipotoxicity. Although numerous epidemiological evidences supported the association between renal insufficiency and obesity, direct evidences by the large intervention study against obesity have been lacking. However, the global surveillance showing that the rise in the CKD population was paralleled with that in the obese population suggested the importance of the weight control for delaying the progression of CKD. The weight control and treatment against insulin resistance and/or hyperinsulinemia are the promising novel therapeutic choices against CKD in addition to the usual ones including blockade of renin-angiotensin aldosterone system, protein restriction diet, blood glucose control, blood pressure control and diet salt restriction.

Key words

obesity-related glomerulopathy, chronic kidney disease, adipocytokine, insulin resistance/hyperinsulinemia, lipotoxicity

● 成因と病態:臓器の面からー各臓器の役割と臓器連関

腎 臓

* 慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科 専任講師 ** 同 教授

脇 野 修* 伊 藤 裕**

要 旨

メタボリックシンドローム (MetS) に合併する腎障害は肥満関連腎症 (ORG), 高血圧, 耐糖能異常, 脂質異常症による腎障害が合併したものとなる。それらが軽症で合併した際の腎障害は, 尿細管萎縮, 間質線維化, 細小動脈硬化である。その後の尿細管から糸球体への病変の波及, 尿細管細胞・ポドサイト細胞間連関が初期病変である。その一方で, 腎障害は MetS の病態を増悪させ, 危険因子の逆転現象 (RE) も引き起すので, 管理に注意を要する。

はじめに

メタボリックシンドローム (MetS) が注目されてからすでに 10 年以上経過し, その心血管合併症, 糖尿病への意義が明らかにされている。MetS は腹部肥満を基盤病態とし, 糖代謝異常, 脂質代謝異常, 高血圧が合併した病態と定義されるが, MetS およびその基盤病態である肥満が腎障害を引き起し, 慢性腎臓病 (CKD) のリスクにもなっていることも明らかにされている。本稿では, MetS に伴う腎障害とその治療戦略についてにつき述べるとともに, その逆の病態, すなわち CKD による MetS の構成因子への影響についても解説する。

キーワード: メタボリックシンドローム, 慢性腎臓病, 肥満関連腎症, 腎性インスリン抵抗性症候群, 危険因子の逆転現象

メタボリックシンドローム (MetS) による腎障害

1. 疫学

MetS と腎障害の関連を示す疫学的事実は、2004 年の NHANES study のコホート研究を始めとして、これまで多くのものが報告されている。表 1 に主なものを示すが、まとめると、① オッズ比 (OR) は 1.3 ~ 2.1 程度の中等度のリスクであること、② コンポーネントの数が増えるとリスクが上昇すること、③ 高血糖、血圧の上昇の影響を除外しても有意な関係を保つものの OR は低下すること、が知られている¹⁾。その一方で、MetS のコンポーネントである高血圧、耐糖能異常、脂質異常症の腎臓への影響を完全に排除した臨床試験はない。さらに、MetS の診断基準より明らかなように、体格指数 (BMI) よりも内臓脂肪、腹部肥満のほうが腎機能障害とよく相関するというデータも存在する。MetS に伴う腎症の、より正確な病態説明が必要と思われる²⁾。

2. 肥満による腎障害

MetS の基盤病態、必須項目である肥満については、腎障害の関係が古くから指摘されていた。肥満に特徴的な腎病理所見として、肥満関連腎症 (ORG) の概念が提唱されている。まず 1974 年に、肥満症とタンパク尿との関連が初めて報告された。その後 2001 年に、Kambham らは腎生検 6,818 症例中の BMI > 30 の肥満 71 症例の解析を行った³⁾。その結果、ORG は腎生検施行例の 2 % の頻度であること、1986 ~ 2000 年の 15 年で 10 倍に頻度が増加していること、巣状糸球体硬化症 (FSGS) の組織像をとるが、原発性の FSGS と比較してネフローゼの頻度が低く、血清アルブミンのレベルは高く、血清コレステロールのレベルは低く、浮腫の頻度が低いことなどが明らかとなり、ORG という疾患概念が確立した。現在 ORG は、① 病的な肥満症 (BMI > 40)、② 浮腫を認めないタンパク尿、③ 正常血清アルブミン値の 3 つを triad とし、高血圧による腎硬化症および糖尿病性腎症とを除外したものと定義される。予後については、8 年間の観察期間で 14 % が血清クレアチニン値の倍加、3.6 % で末期腎不全への進行が認められ、必ずしも良くないと考えられている³⁾。

表1 メタボリックシンドローム (MetS) と腎障害の関連を示す疫学データ

報告者, 年	研究デザイン	患者数	MetS の診断基準	CKD の診断基準	オッズ比 (OR)	コンポーネントの数との関連	備考
Chen J et al. 2004	横断研究 NHANES III study	n=6,217	NCEP-ATPⅢ	eGFR が 60 未満 およびマイクロアルブ ミン尿	eGFR が 60未満, OR=2.60 マイクロアルブ ミン尿, OR=1.89	あり	年齢, 性, 生活習慣 の因子を除外しても 有意な関係
Kurella M et al. 2005	前向き研究 ARIC study	n=10,096 9 年	NCEP-ATPⅢ	CKD 発症 (eGFR が 60 未満)	OR=1.43	あり	高血圧, 糖尿病の新 規発症患者は除外し ても有意な関係
Ninomiya T et al. 2006	前向き研究 久山町研究	n=1,440 5 年	NCEP-ATPⅢ	CKD 発症 (eGFR が 60 未満)	OR=2.08	あり	
Tozawa M et al. 2007	前向き研究 沖縄	n=6,371 5 年	NCEP-ATPⅢ	CKD 発症 (eGFR が 60 未満もしくは尿タ ンパク定性で陽性)	OR=1.86	あり	年齢, 性, 喫煙, ア ルコールの影響を除 外した
Chen J et al. 2007	横断研究 中国	n=15,160	NCEP-ATPⅢ	eGFR が 60 未満 および血清クレアチ ニン値の上昇 (男性 1.14 mg / dl, 女 性 0.97 mg / dl 以上)	eGFR, OR=1.64 クレアチニン値, OR=1.36	あり	
Ryu S et al. 2009	前向き研究 韓国	n=10,685 3.8 年	NCEP-ATPⅢ	CKD 発症 (eGFR が 60 未満)	OR=1.75	あり	高血圧, 糖尿病の新 規発症患者は除外し ても有意な関係
Kitiyakara C et al. 2007	前向き研究 東南アジア	n=2,067 12 年	NCEP-ATPⅢ または IDF 基準	CKD 発症 (eGFR が 60 未満)	OR=2.86 (NCEP-ATPⅡ) 有意差なし (IDF 基準)	あり (NCEP-ATPⅢ)	

略語：巻末の「今号の略語」参照

その後、肥満と腎障害との関連は多くの疫学研究で明らかにされている。Wang らは、1980～2006年に報告された247の肥満と腎症に関する疫学調査のうち、信頼性の高い25のコホート研究、3の横断研究、19の症例・対照研究を選び、メタアナリシスを行った⁴⁾。その結果、健常者 ($18.5 < \text{BMI} < 25$) に比べ、軽度肥満者 ($25 < \text{BMI} < 30$) では腎疾患のリスクが高く、相対危険率が1.40であった。高度肥満者 ($\text{BMI} > 30$) ではさらにリスクが高く、相対危険率は1.83であった。男女差があり、女性の肥満者の相対危険率は1.92で男性は1.49であった。BMIと腎疾患発症の危険率は正の相関を示し、先進国の腎疾患において、男性で13.8%、女性で24.9%がBMI25以上の肥満に起因すると結論された。その一方で、BMIとCKDとの間にJ-shapeの関係を認める報告もある。すなわち、やせの患者 ($\text{BMI} < 18.5$) では、CKDのリスクが逆に健常者 ($18.5 < \text{BMI} < 25$) と比べ高くなることも報告されている⁵⁾。肥満とCKDとの間の直接的な因果関係については、正常血圧のIgA腎症、片腎の患者においては血圧に関係なく肥満が腎障害の危険因子となっていること、肥満 ($\text{BMI} > 30$) の健常者からの移植腎はやせ ($\text{BMI} < 25$) の健常者よりの移植腎と比べて障害が多いことより、関連が示唆されている。

3. MetSによる腎障害

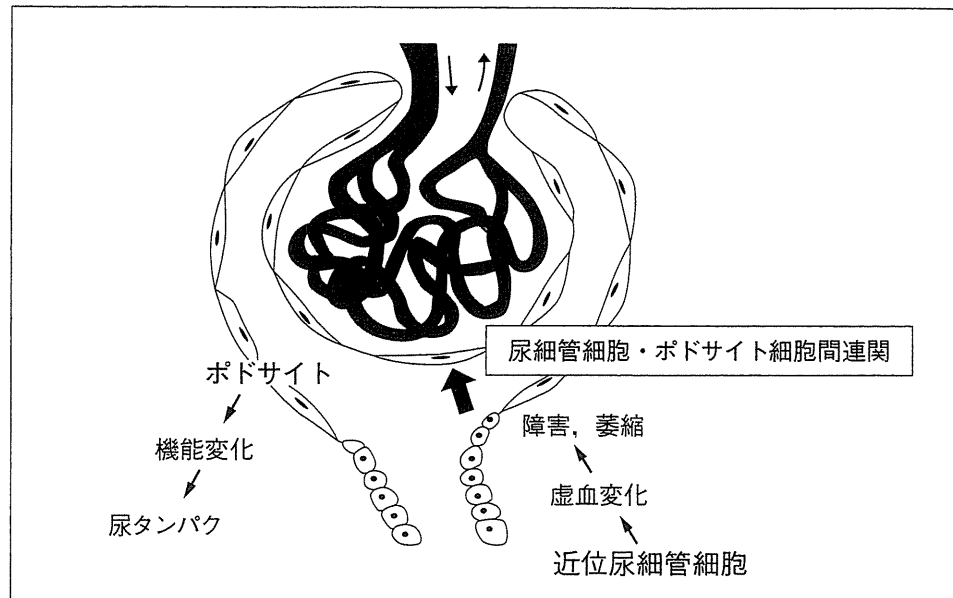
ORGは臨床症状が尿タンパクを主体に明らかであり、BMIが30以上の高度肥満を中心に明らかにされている疾患概念である。したがって、腎生検による組織所見も明確に記述されている。その一方で、MetSに伴う腎臓の障害、すなわち高度の肥満がなくても内臓脂肪蓄積を主体とし、生活習慣病の集積した状態での腎障害がどの程度あるかは、腎生検所見がなく不明である。先述の観察研究では、MetSには2倍程度の腎障害のリスクがあることを考慮すると、腎臓に障害があるのは確かである。しかも、それが高血圧による障害か、耐糖能異常による障害か、それともORGなのかを判別するのが困難であり、MetSに独特な病理所見というのは明確ではない。その点について、近年注目すべき報告がなされている。Harvard大学のAlexanderらは、2005～2007年の146人の腎細胞癌(RCC)患者について後ろ向き研究を行い、手術時のMetSの有無とそのときのがん以外の腎

組織の検討を行った⁶⁾。その結果、MetS 群 (n=12) では年齢、性を一致させたコントロール群 (n=12) と比べて尿細管の萎縮 (p=0.006)、間質の線維化 (p=0.001)、細動脈硬化 (p=0.001) が有意に認められ、糸球体肥大、糸球体硬化といった病変は、差がないか軽度であることが明らかとなった。この病理変化は、細小動脈硬化症→尿細管周囲の細動脈の硬化に伴う、尿細管虚血→尿細管線維化という病態の表れと考えられた。さらに、1年後の残腎機能についての比較を行ったところ、コントロール群では推算糸球体濾過量 (eGFR) の有意な変化が認められなかったのに対し、MetS 群は有意に eGFR の低下が認められた。ここで報告されている組織学的特徴は、高血圧、糖尿病、ORG などに伴う腎障害の初期の病変とも考えられるが、MetS と診断されたときは、たとえ糸球体障害やそれを反映する微量アルブミン尿がなくとも、すでに尿細管、間質に組織異常が生じ、将来 eGFR の低下に寄与していることに注目すべきである。

4. 尿細管細胞・ポドサイト細胞連関

MetS で認められる微量アルブミン尿、タンパク尿は、高血圧や耐糖能異常、あるいは ORG で認められるような糸球体高血圧、糸球体過剰濾過、糸球体硬化といった糸球体病変で説明される。しかし、MetS の初期の段階ですでに尿細管、間質を中心とした腎組織変化が生じており、これが微量アルブミン尿、タンパク尿といった糸球体病変の発症に寄与するとも考えられる。事実、糖尿病では、微量アルブミン尿が出現する前の段階より、尿細管マーカーの上昇が認められることが知られている⁷⁾。また、糖尿病の初期においては、糸球体・尿細管バランスの過剰な活性化、尿細管細胞におけるライソゾームの異常が、その後のタンパク尿発現に寄与していることなどが報告されている⁸⁾。近位尿細管細胞は代謝が活発であり、虚血や高尿酸などへの曝露に対し障害を受け、MetS において最初に変化が生じることは理解しやすい。その近位尿細管の病変が近傍の尿タンパク発現に影響を与えるポドサイトの形質を変化させ、尿タンパク、微量アルブミンの発現に寄与することも十分考えられる (図1)。このような「尿細管細胞・ポドサイト細胞間連関」の解明が、MetS に伴う腎病変の発症予防に重要であると思われる。

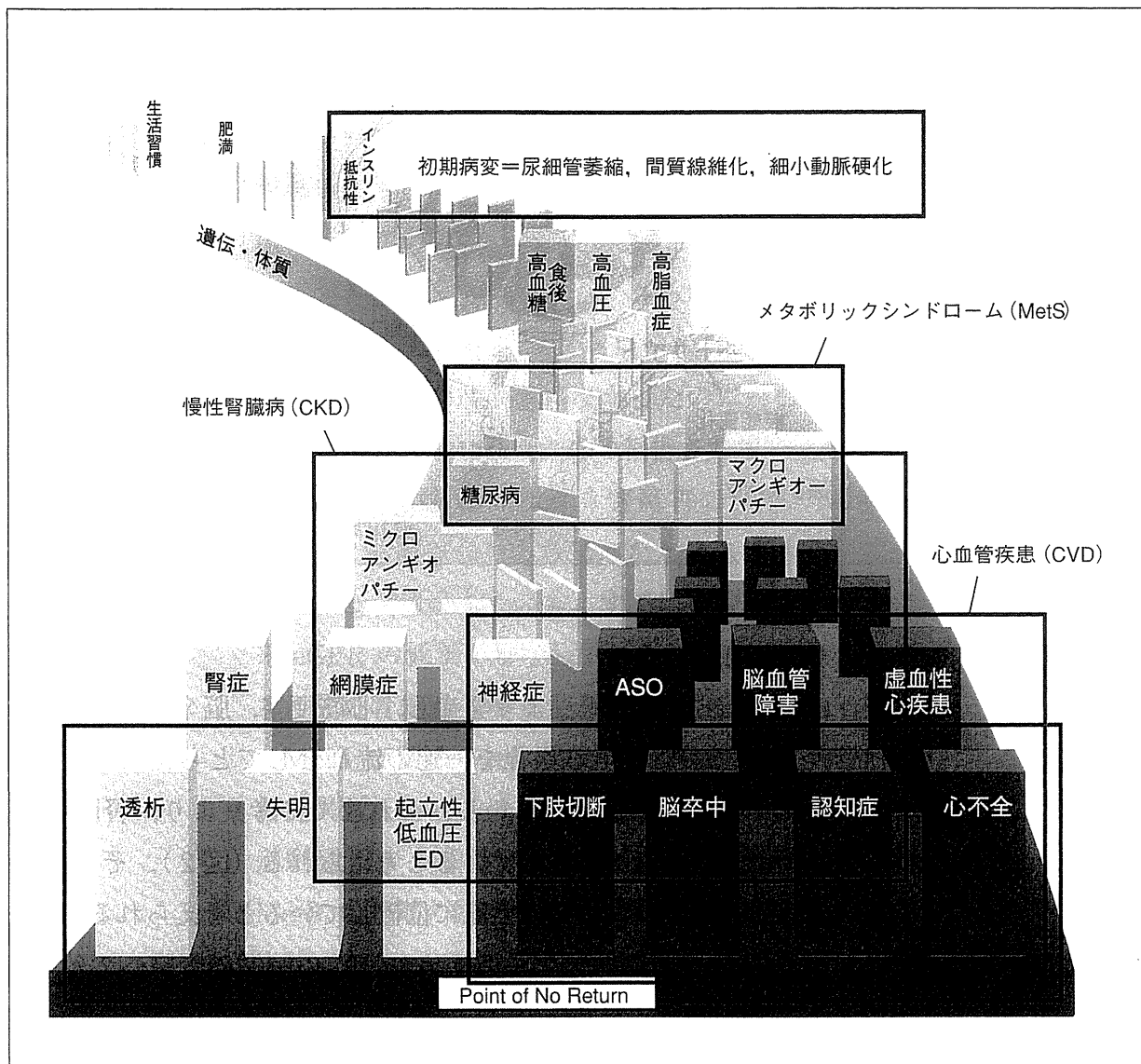
図1 尿細管細胞・ポドサイト細胞間連関



5. 治療戦略

我々は、MetS が内臓肥満より発症し、心筋梗塞、脳卒中といった心血管疾患（CVD）へ至る過程を一連の流れとしてとらえたメタボリックドミノの概念を提唱している。これまでの考察より、腎障害、CKD は MetS の下流に存在していると考えられる（図2）。そして、先述の尿細管、間質障害はその上流に位置していると考えられる。この時期が MetS 発症に重要であるように、この時期の腎臓への治療介入こそが MetS やその下流の耐糖能異常、高血圧に伴う CKD の発症の抑制に重要であると考えられる。さらに、MetS による腎障害の病態生理とその治療戦略は図3のようにまとめられる⁹⁾。より積極的な治療手段として、インスリン抵抗性を改善させるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR γ) リガンド、脂質異常を改善させる PPAR α リガンド、スタチンなども挙げられるが、CKD の進行に伴い、体液貯留、横紋筋融解などのこれらの薬剤の副作用の発現に注意すべきである。肥満外科手術、食欲抑制薬による減量の腎症に対する効果も報告されている。近年 Navaneethan らは、CKD における減量の効果についてメタアナリシスを報告している。13 の前向き研究について解析がなされ、食事療法、運動療法、食欲抑制薬による非外科的減量により、平均 7.4 ヶ月の観察期間でタンパク尿の減少（-

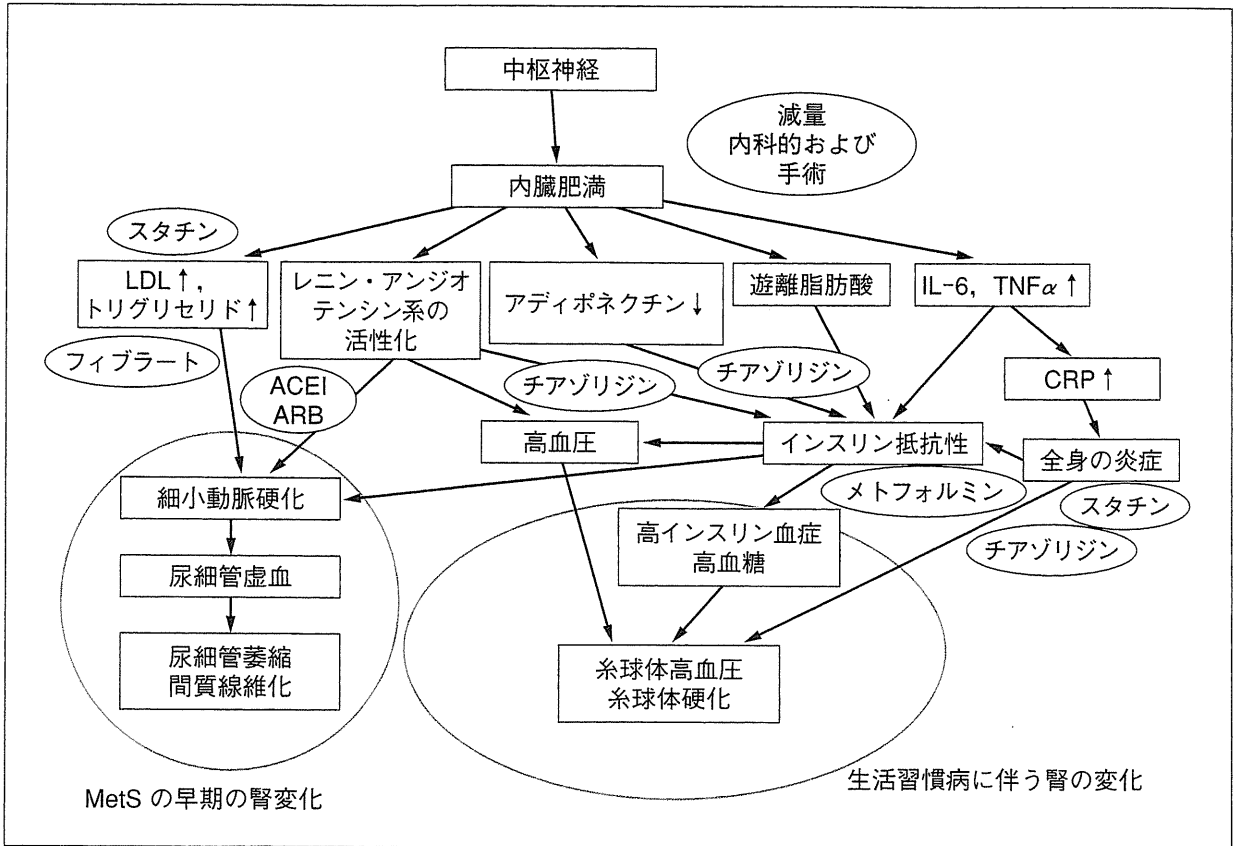
図2 メタボリックドミノ



ASO：閉塞性動脈硬化症，ED：勃起不全

1.31 g/日) と降圧が認められた。重度肥満に対する外科手術による減量では、半年から長期では 13 年の経過観察の症例検討が解析されており、過剰濾過による糸球体濾過量 (GFR) の上昇を低下させ、尿タンパクを減少させる効果が有意にあると結論されている¹⁰⁾。ただし、長期の安全性や腎障害に対する影響については未知であり、今後の評価が必要である。

図3 メタボリックシンドローム (MetS) に伴う腎障害の病態生理と治療戦略 (文献⁹⁾より引用改変)



略語：巻末の「今号の略語」参照

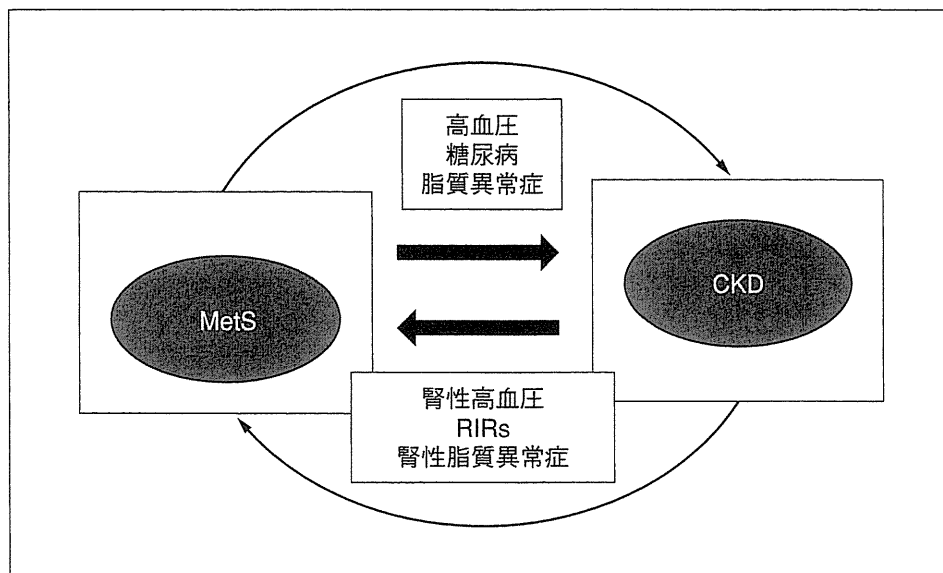
慢性腎臓病 (CKD) における代謝異常

上述のように、MetS およびその各コンポーネントは腎障害を来し慢性腎臓病 (CKD) の発症進展因子となるが、その逆の関連も存在し、CKD が MetS の各コンポーネントを増悪させ、それが悪循環を形成するという病態が考えられる。この悪循環の遮断は、治療戦略上重要となる (図4)。この項では、CKD の MetS のコンポーネントに対する影響について述べる。

1. 腎性インスリン抵抗性症候群 (RIRs)

CKD の早期においても、すでにインスリン抵抗性が生じているということが報告されている。Becker らは、CKD の stage 1 の段階でも HOMA 指数で算出したインスリン抵抗状態がすでに上昇していることを報告しており、RIRs と命名している¹⁰⁾。また、糖尿病でなくとも eGFR が 50 ml / 分 / 1.73 m² 以下になればインスリン抵抗性が認

図4 メタボリックシンドローム (MetS) と慢性腎臓病 (CKD) との間の悪循環



RIRs：腎性インスリン抵抗性症候群

められることが、グルコースクランプ法で証明されている¹¹⁾。このRIRsのメカニズムについては、活性型ビタミンDの欠乏、腎性貧血、尿毒物質がこれまで報告されている。またCKDの患者は腫瘍壊死因子 α (TNF α)、インターロイキン-6 (IL-6) といったインスリン抵抗性を引き起すサイトカインが上昇していることが報告されている。これらサイトカインの血中レベルでの異常は、腎臓でのクリアランスの低下とともに、脂肪組織での発現異常が原因であることが指摘されている。我々はRIRsの発症機序として、①内因性のNO合成酵素阻害物質である非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) の脂肪組織局所での濃度上昇、②腎機能障害に伴う血中アルドステロン濃度の上昇が重要であることを明らかにしている。

2. 腎性脂質異常症 (renal dyslipidemia)

CKDには早期より特有の脂質異常症が存在する¹²⁾。その特徴は、低HDLコレステロール (HDL-C) 血症と高トリグリセリド (TG) 血症であり、MSと同じであることは興味深い。低HDL-C血症の原因となっているのは、ApoA-IおよびApoA-IIレベルの低下である。そのほか、TG-rich なリポタンパクであるVLDLの上昇、コレステロール逆転送系においてHDLにコレステロールを添加する酵素であるレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT)

表2 慢性腎臓病 (CKD) における危険因子の逆転現象 (RE) (文献¹⁹⁾より引用改変)

心血管リスク	一般人口	血液透析患者	CKD 患者	留意点
BMI	BMI が高ければ CVD のリスクが高くなる (N Engl J Med 341: 1097-1105, 1999).	BMI が高ければ生存率が高い (J Am Soc Nephrol 14: 2366-2372, 2003).	BMI が高ければ生存率が高い (Am J Kidney Dis 46: 863-870, 2005). BMI が高ければ生存率が低い (Ann Intern Med 144: 701-702, 2006).	COPD, 慢性心不全, 慢性関節リウマチ, 高齢者では, 高い BMI は高い生存率.
血圧	高血圧ほど CVD のリスクが高くなる (N Engl J Med 345: 1291-1297, 2001).	低血圧ほど生存率が低い (Kidney Int Suppl 55: S173-S174, 1996).	収縮期血圧と生存率については J-shape 現象が成立する (Nephrol Dial Transplant 21: 1257-1262, 2006). 拡張期血圧は低いほど生存率が高い (J Am Soc Nephrol 16: 2170-2179, 2005).	eGFR が 30 未満で血圧と生存率の関係が逆転する (Nephrol Dial Transplant 21: 1257-1262, 2006).
脂質	総コレステロール, LDL コレステロール高値および HDL コレステロール低値は CVD のリスクである (N Engl J Med 322: 1700-1707, 1990).	総コレステロール高値は生存率が高い (Am J Kidney Dis 15: 458-482, 1990).	コレステロール, トリグリセリドが低値は生存率が低い (J Am Soc Nephrol 18: 304-311, 2007).	コレステロール値と生存率との関係は MICS や MIA 症候群において逆転する (J Am Soc Nephrol 18: 304-311, 2007).

略語：巻末の「今号の略語」参照

の活性が低下していることなどが想定されている。一方、高 TG 血症の原因としては、① ApoC-Ⅲレベルの上昇、② 腎臓での遊離脂肪酸のクリアランスの低下、③ lipolysis に重要な 2つの酵素リポタンパクリパーゼ (LPL) および肝性リパーゼ (HL) の活性の低下、④ TG-rich なリポタンパクである VLDL を肝臓に取り込むための VLDL 受容体のレベルの低下などが報告されている。

3. 危険因子の逆転現象 (RE)

MetS では腹部肥満を基盤として、高血圧、耐糖能異常、脂質異常症が合併することに主眼が置かれた診断基準となっている。したがって、減量、BMI の低下、降圧、脂質のコントロールが CVD 発症の予防となる。ところが、コレステロールの低下を含めたこの古典的な危険因子の管理が CVD の発症、死亡率に逆に作用する現象が報告されている。これが危険因子の RE であり、維持血液透析患者は RE が存在する典型である¹³⁾。すなわち、維持透析患者においては BMI の低下が CVD 発症のリスクになり、BMI の上昇により死亡率が低下することが報告されている (表 2)。そのほか、維持血液透析患者では低血圧、低コレステロール血症、低ホモシステイン血症において有意に死亡率が高いことが報告されている¹³⁾。この RE は維持血液透析患者以外にも、慢性心不全、高齢者、老人ホーム入居者、進行性の悪性腫瘍、後天性免疫不全症候群 (AIDS) で報告されている。本邦でも日本透析学会の疫学調査によれば、週 3 回の血液透析患者の 2000～2001 年の 1 年間の生存に寄与する因子を解析したところ、透析前の血圧が高い患者ほど、また BMI が高いほど生存率が高いことが明らかにされている¹⁴⁾。RE において興味深い現象は、腎臓移植した患者ではこの RE が逆転し、肥満や高コレステロール血症、高血圧が死亡率上昇に寄与することである¹⁵⁾。これは、reversal of RE もしくは back to normal phenomenon と呼ばれている。肥満や MetS の CKD では減量が CKD の進行や CVD 発症に有効であることも考えると、CKD の経過のどこかで危険因子の RE が生じていることとなる。MetS による CKD では、この RE の時期を見定め、細かく管理することが重要になってくると思われる。

おわりに

以上, MetS に伴う腎障害について解説した. 今後肥満人口の増加とともに, 透析人口の抑制のためにも, この病態は临床上重要な位置を占めると思われる. その一方で, CKD の代謝面の問題点も無視できず, MetS, CKD の2大 CVD 危険因子を同時に見据えた管理が重要となってくると思われる¹⁶⁾.

文 献

- 1) Ting SM, et al: Overweight, obesity and chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract* 112 (3): 121-127, 2009.
- 2) Wahba IM, et al: Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2 (3): 550-562, 2007.
- 3) Kambham N, et al: Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. *Kidney Int* 59 (4): 1498-1509, 2001.
- 4) Wang Y, et al: Association between obesity and kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int* 73 (1): 19-33, 2008.
- 5) Hallan S, et al: Obesity, smoking, and physical inactivity as risk factors for CKD: are men more vulnerable? *Am J Kidney Dis* 47 (3): 396-405, 2006.
- 6) Alexander MP, et al: Kidney pathological changes in metabolic syndrome: a cross-sectional study. *Am J Kidney Dis* 53 (5): 751-759, 2009.
- 7) Nauta FL, et al: Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes. *Diabetes Care* 34 (4): 975-981, 2011.
- 8) Thomas MC, et al: Tubular changes in early diabetic nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis* 12 (2): 177-186, 2005.
- 9) Agrawal V, et al: Impact of treating the metabolic syndrome on chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 5 (9): 520-528, 2009.
- 10) Navaneethan SD, et al: Weight loss interventions in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 4 (10): 1565-1574, 2009.
- 11) Manolescu B, et al: Review article: The role of adipose tissue in uraemia-related insulin resistance. *Nephrology (Carlton)* 13 (7): 622-628, 2008.
- 12) Tsimihodimos V, et al: Dyslipidemia in chronic kidney disease: an approach to pathogenesis and treatment. *Am J Nephrol* 28 (6): 958-973, 2008.
- 13) Kovesdy CP, et al: Reverse epidemiology in patients with chronic kidney disease who are not yet on dialysis. *Semin Dial* 20 (6): 566-569, 2007.
- 14) Iseki K: Reverse epidemiology in chronic hemodialysis patients. *Nephrology Frontier* 6: 82, 2006.

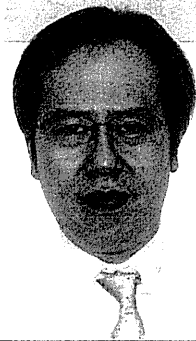
- 15) Kalantar-Zadeh K, et al: Reverse epidemiology: a spurious hypothesis or a hardcore reality? *Blood Purif* 23 (1): 57-63, 2005.
- 16) Chmielewski M, et al: Metabolic abnormalities in chronic kidney disease that contribute to cardiovascular disease, and nutritional initiatives that may diminish the risk. *Curr Opin Lipidol* 20 (1): 3-9, 2009.

Renal Involvement in the Metabolic Syndrome

Shu Wakino, Hiroshi Itoh

Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University

心腎連関と 薬剤性腎障害について考える



監修者 ● 慶應義塾大学医学部 内科学 講師 脇野 修氏

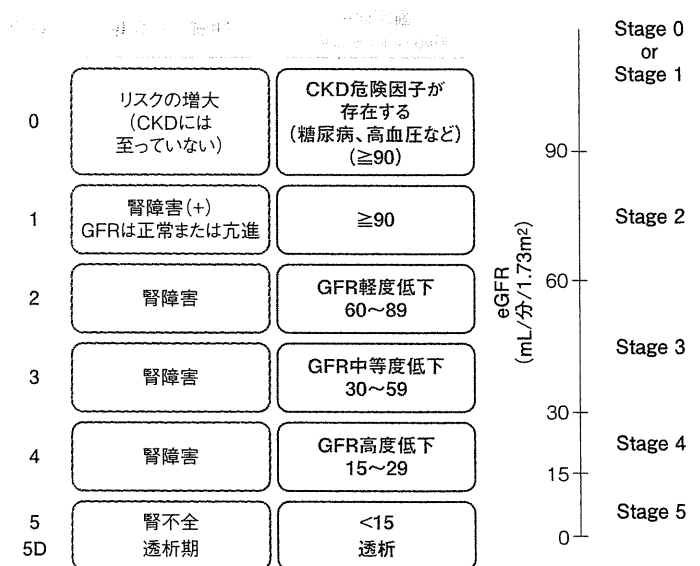
慢性腎臓病は心血管イベントの強力な危険因子です

慢性腎臓病 (CKD) とは、eGFRの低下 (<60mL/分/1.73m²) あるいは蛋白尿をはじめとした腎臓の障害が3ヵ月以上持続する状態、と定義されています。この疾患概念は、今から約10年前の2003年に米国腎臓財団 (NKF) が提唱したもので、腎機能障害の程度をeGFRの値で5つのステージに分けて評価しています (図4)。近年、CKDが重視されている理由は、その病態が単に腎不全の危険因子だけでなく、心血管イベントの極めて重要な危険因子であることが明らかになったからです。

実際、CKDによる心血管イベントの危険率は、糖尿病、心疾患関連危険因子、脳疾患関連危険因子よりも高いことが、CASE-J試験¹⁾のサブ解析で示されています (図5)。また、わが国の大規模コホート研究の1つである茨城県コホート研究でも、蛋白尿がみられる患者さんあるいはeGFR<60mL/分/1.73m²の患者では心血管イベント死が極めて高いことが、10年間の追跡によって明らかになっています (図6)。

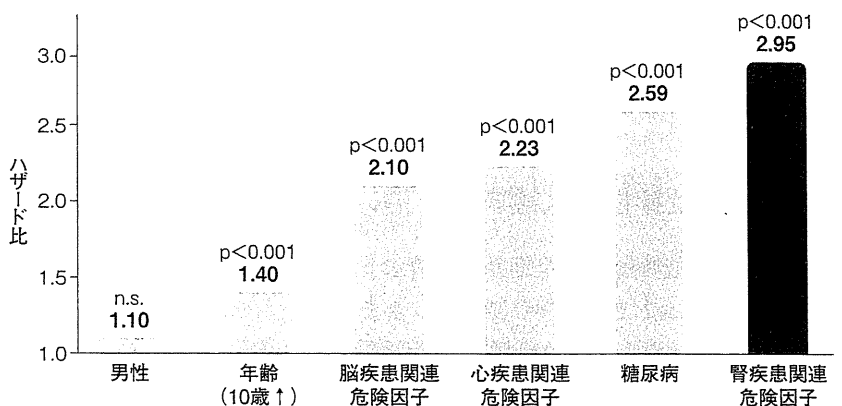
つまり、心血管イベントの危険因子としては、従来から指摘されてきた高血圧、糖尿病、脂質代謝異常より、CKDのほうがより強力であることが明らかになり、このような心血管イベントとCKDとの関係

図4 CKDの重症度分類



[CKD診療ガイド 2009]より引用・改変

図5 心血管イベントの発現に影響した因子



性別、BMI、重症高血圧、血管関連危険因子、被験薬、喫煙で補正

CASE-J研究会: ISH 2006. Fukuda.

は「心腎連関」と呼ばれているのです。

1)日本人ハイリスク高血圧患者4,728例を対象に、降圧薬であるARB(カンデサルタン)とCa拮抗薬(アムロジピン)の予後に与える効果を比較した大規模臨床試験。

心腎連関の機序が徐々に明らかになっています

CKDになると心血管イベントを発症しやすくなる理由として、まず考えられることは、CKDの原因疾患である動脈硬化、糖尿病、高血圧などが、同時に心血管イベントの原因疾患となっていることです。しかし最近、CKD自体が心血管イベントの原因となることが徐々に明らかになってきました。

すなわち、CKDによって酸化ストレス、ホモシステイン²⁾、ADMA(asymmetric dimethylarginine)などが上昇することで腎性のインスリン抵抗性³⁾や脂質異常症⁴⁾、冠動脈の内皮細胞障害が惹起される、と考えられているのです。

ADMAは、CKDに特異的な動脈硬化促進因子として、最近注目されています。動脈硬化は、血管内皮機能の障害による一酸化窒素(NO)の合成阻害やNOの利用阻害が原因となって発症・進展しますが、このNOを合成する酵素(NOS)を阻害する物質がADMAで、腎臓が障害されるとADMAの血中濃度が上昇することが明らかになっています。また、ADMAの蓄積が腎性インスリン抵抗性を惹起していることも明らかになりつつあります。

そこで、CKDにおける心血管イベントを予防するためには、古典的な危険因子(高血圧、糖尿病、脂質異常症など)をコントロールするだけでなく、CKDに特有の因子である腎性インスリン抵抗性、酸化ストレスの亢進、炎症反応の亢進、ADMAによる内皮機能障害などをきめ細かく管理することが求められているのです。

2)ホモシステインは血液中に含まれるアミノ酸の1つ。血漿ホモシステイン濃度の上昇に伴って増加する遊離ホモシステインは、血管内皮細胞を障害して血栓症などの原因となります。

3)糖尿病でなくてもCKDの早期からインスリン抵抗性がみられることが明らかになっています。

4)CKDでは早期から脂質異常症がみられ、その特徴は低HDLコレステロール血症と高中性脂肪血症で、メタボリックシンドロームと類似しています。

CKDは全身性の代謝異常を招いています

近年、腎機能の低下は早期から全身の恒常性に影響をおよぼしていることが明らかになってきました。

すなわち、骨カルシウム代謝異常、電解質異常、酸塩基平衡異常、さらに糖代謝異常、脂質代謝異常、甲状腺ホルモン異常、性腺ホルモン異常、といったさまざまな代謝異

図6 CKDにおける心血管イベント死
日本人のデータ:10年のコホートstudy(40~79歳)

男性(29,492名)

	+以上	なし	<60	60-69	70-79	80-89	90-99	≥100
脳卒中	1.1	1.0	1.98	1.22	1.01	1.09	1.06	1.0
冠動脈疾患	1.96	1.0	1.08	1.31	1.00	0.78	1.38	1.0
全心病患	1.38	1.0	1.65	1.29	1.04	0.95	1.15	1.0
非心病患	1.64	1.0	1.19	0.87	0.87	0.88	0.93	1.0
全ての原因	1.57	1.0	1.31	0.98	0.91	0.90	0.98	1.0

女性(58,942名)

	+以上	なし	<60	60-69	70-79	80-89	90-99	≥100
脳卒中	1.36	1.0	1.85	0.97	1.05	1.20	1.00	1.0
冠動脈疾患	3.08	1.0	1.13	0.79	0.87	0.86	0.72	1.0
全心病患	2.15	1.0	1.81	1.03	1.12	1.17	0.93	1.0
非心病患	1.59	1.0	1.21	0.89	0.91	0.93	0.93	1.0
全ての原因	1.79	1.0	1.39	0.92	0.96	0.99	0.95	1.0

Irie F, et al: Kidney Int. 2006 Apr; 69(7):1264-71.

常をCKD患者さんは併発しているのです。

実際、CKDステージ3の後半(血清クレアチニン値2~3mg/dL)で、副甲状腺機能亢進症(iPTH>60pg/mL)、貧血(Hb<11.0g/dL)、アシドーシス(HCO₃<22mmol/L)、高カリウム血症(K>5mmol/L)、高リン血症(P>4.3mg/dL)といった異常が認められることが臨床で明らかになっています。しかし、こうした代謝異常が治療対象となるのは、ほとんどがCKDステージ5(腎不全:eGFR<15mL/分/1.73m²)になってからです。つまり、CKDステージ3~5の間に、生体はさまざまな緩衝機構やフィードバック機構を駆使して、この状況に適応しているのです。しかし、その代償がCKDの進展に悪影響を及ぼしている可能性は十分考えられます。

さらに、末期腎障害患者さんに対する治療が不十分であることも報告されています。フランスで行われたAVENIR試験は、透析導入1ヵ月以上前に腎臓内科で治療を受けた末期腎障害患者さん420例を対象に、透析導入に至るまでの治療内容を検証しています。その結果、高血圧の治療を受けていた患者さんは93.1%、RAA系阻害薬による治療は67.1%、貧血治療は67.4%でしたが、スタチン治療は36.2%、重炭酸治療は15.5%でした。つまり、代謝異常に対する十分な治療が行われずに透析導入に至っている患者さんが非常に多いのです。

また、ガイドラインにそった厳密な治療を行えば、早期透析導入例(eGFR 10~15mL/分/1.73m²)と晚期透析導入例(eGFR 5~7mL/分/1.73m²)の全死亡率に有意差が認められないことが、IDEAL試験⁵⁾で明らかになりました。つまり、厳格な治療によって心血管イベントを予防し、代謝異常による全身の消耗状態を改善すれば、透析導入を

遅らせても予後は変わらないということです。

従来、CKDの進展抑制にはRAA系の抑制、血圧の管理、貧血の改善などが重要といわれてきました。しかし近年、これらの管理だけでは十分でないことが明らかになってきました。例えば、アシドーシスの改善やビタミンDの補充がCKDの進展を緩徐にし、透析導入時期を遅くで

きることを報告されています。

そこで、CKDを全身性の代謝異常と捉え、初期から積極的に介入することが治療上重要なのです。

5) IDEAL (Initiating Dialysis Early and Late) 試験は、進行性のCKD症例 (eGFR=10.0~15.0mL/分/1.73m²) を早期に透析導入する群と晩期に透析導入する群に無作為に割り付け、その予後(全死因死亡)を検討しています。

薬剤性腎障害の機序とその原因となる主な薬剤

高齢者では腎機能に適した投与量を定めることが重要です

高齢者は、いくつかの疾患を合併していることが多いため、数種類の薬剤を処方されているケースが少なくありません。しかし、腎機能は加齢に伴って低下していきます。実際、クレアチニン・クリアランスは、30歳代から徐々に低下し、60歳を過ぎると急速に低下し、70歳以上では30歳代に比べて約30%減少することが報告されています (Rowe et al. 1976)。

そのため、通常量を投与しても腎機能が低下した高齢者には過剰投与になって、副作用が増大することがあります。さらに、腎臓は薬剤による臓器障害の標的器官になる頻度が高く、高齢者では薬剤性腎障害が致命的になることもあります。そこで、高齢者の腎機能を把握することは、腎排泄の薬剤あるいは肝臓で代謝された活性体が腎臓で排泄される薬剤の投与量を決定する上で、とても重要になるのです。

腎臓が薬剤性臓器障害の標的器官になる頻度が高い理由は、いくつか考えられます。まず、他の臓器に比べて腎臓には大量の血液が流れ込みます(心拍出量の20~25%)なので、組織障害物質が腎臓に到達する量も多くなります。また、糸球体毛細血管は非常に高い圧(50~65mmHg)で血漿を濾過するので、組織障害物質も毛細血管の内皮細胞を通過して糸球体の障害が起こりやすくなるのです。さらに、腎臓は老廃物や薬物を濃縮して尿中に排泄する役割を担っているので、血中濃度よりはるかに高濃度の

薬物に暴露されることとなります。このような理由で、糸球体や尿細管・間質や血管が障害されて薬物性腎障害が生じるのです。

副作用の増大や薬剤性腎障害の原因になりやすい主な薬剤

高齢者に広く使われている薬剤のうち、腎機能低下例で副作用が増大しやすい薬剤、あるいは薬剤性腎障害の原因になりやすい主な薬剤として、高尿酸血症薬、H₂受容体拮抗薬(H₂ブロッカー)、非ステロイド抗炎症薬(NSAIDs)、抗菌薬などがあります。

このうち、高尿酸血症薬であるアロプリノール(尿酸合成阻害薬)とH₂ブロッカーは、腎機能が低下すると血中濃度が高くなって副作用の発現頻度が高くなり、重篤な副作用もまれではないといわれています。なお、同じ高尿酸血症薬でも近位尿細管での尿酸の再吸収を抑制して尿中尿酸排泄を促進するベンズブロマロンは腎機能が低下するとその作用が減弱します。

腎障害の原因になりやすい薬剤としては、NSAIDsと抗菌薬がよく知られています。NSAIDsは血管を拡張させるプロスタグランジン(PG)の産生を抑制します。一方、Ang IIは強力な血管収縮物質ですが、PGの産生を増大させることで腎血流量を調節しています。そこで、脱水や糖尿病などでRAA系が亢進しているときにNSAIDsを使用すると腎虚血が生じる可能性があります。また、ARBなどのRAA系阻害薬は腎血流量を下げることで腎保護作用を発揮していますが、そこにNSAIDsを併用するとさらに腎血流量が下がって、重篤な腎虚血を惹起する可能性があります。つまり、NSAIDsは単剤でも腎障害の原因となりますが、ARBなどのRAA系阻害薬を併用すると、さらにその危険が増すのです。

抗菌薬の多くは腎排泄性なので腎機能が低下すると血中濃度が高くなって副作用が増強します。さらに、腎で濃縮された薬剤が尿細管の細胞などに蓄積することで腎障害の原因にもなりますので、腎機能が低下した患者さんでは用量の調節が必要になります。

表 NSAIDsによる腎障害の危険を増大させる因子

腎血流量の低下	腎虚血の低下
高齢者	うっ血性心不全
高血圧	ネフローゼ症候群
CKD	肝硬変
脱水	細胞外液量の低下
糖尿病	利尿薬の投与
RAA系阻害薬の投与	

〔CKD診療ガイドライン2009〕より引用・改変

ORIGINAL ARTICLE

Role of mineralocorticoid receptor/Rho/Rho-kinase pathway in obesity-related renal injury

H Tokuyama, S Wakino, Y Hara, N Washida, K Fujimura, K Hosoya, K Yoshioka, K Hasegawa, H Minakuchi, K Homma, K Hayashi and H Itoh

OBJECTIVE: We examined whether aldosterone/Rho/Rho-kinase pathway contributed to obesity-associated nephropathy.

SUBJECTS: C57BL/6J mice were fed a high fat or low fat diet, and mice on a high fat diet were treated with a mineralocorticoid receptor antagonist, eplerenone.

RESULTS: The mice on a high fat diet not only developed obesity, but also manifested renal histological changes, including glomerular hypercellularity and increased mesangial matrix, which paralleled the increase in albuminuria. Furthermore, enhanced Rho-kinase activity was noted in kidneys from high fat diet-fed mice, as well as increased expressions of inflammatory chemokines. All of these changes were attenuated by eplerenone. In high fat diet-fed mice, mineralocorticoid receptor protein levels in the nuclear fraction and SGK1, an effector of aldosterone, were upregulated in kidneys, although serum aldosterone levels were unaltered. Furthermore, aldosterone and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in renal tissues were upregulated in high fat diet-fed mice. Finally, in cultured mesangial cells, stimulation with aldosterone enhanced Rho-kinase activity, and pre-incubation with eplerenone prevented the aldosterone-induced activation of Rho kinase.

CONCLUSION: Excess fat intake causes obesity and renal injury in C57BL/6J mice, and these changes are mediated by an enhanced mineralocorticoid receptor/Rho/Rho-kinase pathway and inflammatory process. Mineralocorticoid receptor activation in the kidney tissue and the subsequent Rho-kinase stimulation are likely to participate in the development of obesity-associated nephropathy without elevation in serum aldosterone levels.

International Journal of Obesity advance online publication, 20 December 2011; doi:10.1038/ijo.2011.232

Keywords: metabolic syndrome; aldosterone; SGK1; MCP1; adipose tissue

INTRODUCTION

A growing body of evidence has suggested that obesity is causally linked to various disorders, including dyslipidemia and hyperglycemia. Furthermore, obesity is recognized increasingly as a major risk factor for chronic kidney disease (CKD).¹ It has been shown that renal structural and functional changes develop early in the course of obesity-initiated metabolic syndrome and apparently mimic those observed in diabetic nephropathy.² Furthermore, obesity causes glomerular hyperfiltration and alterations in several humoral factors, including hyperinsulinemia and activated renin-angiotensin system, all of which could precipitate in more severe glomerular damage associated with obesity. Nevertheless, specific factors contributing to the initiation and progression of obesity-induced renal dysfunction have not been determined thus far.

A small GTP-binding protein, Rho, and its effector, Rho kinase, have several physiological and pathological functions.³ It has been established that the activation of the Rho/Rho-kinase pathway plays an important role not only in the enhanced systemic vascular tone in several models of hypertensive animals,^{4,5} but also in cellular pathophysiological processes, including migration, proliferation, epithelial-mesenchymal transdifferentiation and matrix production.^{6,7} Moreover, in the kidney, the Rho/Rho-kinase pathway regulates basal and angiotensin II-induced tone of afferent and efferent arterioles,^{8,9} and is activated in hypertensive glomerulosclerosis and interstitial fibrosis.^{10,11} Of note, a recent study has demonstrated that activation of Rho/Rho-kinase pathway interferes with insulin signaling through serine

phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in cultured vascular smooth muscle cells.¹² Conversely, the blockade of the Rho/Rho-kinase pathway has been shown to ameliorate insulin sensitivity and impairment of endothelial dysfunction in Zucker obese rats.¹³ It can be surmised therefore that the Rho/Rho-kinase pathway constitutes a critical mediator linking between metabolic and hemodynamic abnormalities in insulin resistance and obesity.

Several lines of recent studies have documented a potential role of aldosterone in the pathogenesis of renal injury. Severe glomerular injury and interstitial fibrosis were observed in rats treated with aldosterone and salt.^{14,15} In patients with CKD and early diabetic nephropathy, the addition of mineralocorticoid receptor (MR) antagonists to angiotensin-converting enzyme inhibitors had no hemodynamic effects, but markedly reduced proteinuria.^{16,17} Further studies also reported that monotherapy with MR antagonists was more effective than angiotensin-converting enzyme inhibitors in reducing proteinuria in hypertensive patients.^{18,19} Furthermore, aldosterone-induced Rho-kinase activation elicits myofibroblastic transformation in renal cells and contributes to the progression of renal fibrosis.^{20,21} Little is known, however, as to the role of Rho kinase as an effector of aldosterone in obesity-associated renal injury.

In this study, we investigated whether the aldosterone/Rho/Rho-kinase pathway was activated and contributed to the development of renal injury in obese animals. Furthermore, the mechanisms for the enhanced aldosterone/Rho/Rho-kinase pathway in mediating the obesity-associated nephropathy were assessed.

SUBJECTS AND METHODS

Animals-1

The 6-week-old male C57BL/6J mice weighing 20 ± 1 g were housed in a temperature- and light-controlled room (22 ± 1 °C; 12-h light day cycle) with *ad libitum* access to tap water and a standard mouse chow. Animals were fed a low fat diet (LFD, $n = 8$; 10% lard; Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA) or a high fat diet (HFD, $n = 8$; 60% lard; Research Diets Inc.), with the latter further randomized to either an MR inhibitor (eplerenone, 100 mg kg⁻¹ per day, via gavage, $n = 8$; Pfizer Inc., Tokyo, Japan)-treated or a vehicle-treated group ($n = 8$) during the 12-week experimental protocol. Animals received daily gavage with either eplerenone or vehicle control until being killed on week 12. Daily food intake was measured in each group.

We implanted a telemetry transmitter probe (model PA-C20; Data Sciences Int., St Paul, MN, USA) into the 6-week-old male mice under sodium pentobarbital anesthesia (50 mg kg⁻¹ intraperitoneally), and the flexible tip of the probe was positioned at the cervical arteries as described previously.²² The mice were returned to their home cages and allowed to recover for 2 weeks before the start of the measurements. We monitored conscious blood pressure (BP), heart rate and the activity in unrestricted and untethered mice with the Dataquest IV system (Data Sciences Int.).²²

After 12-week treatment with eplerenone, body weight was recorded. Mice were then anesthetized with ether and the abdomen was opened through a mid-line incision. Blood and urine were drawn for measuring biochemical assays. Kidneys were harvested and sliced sagittally. The half was snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C and the remaining was immersed in 10% neutral-buffered formalin and embedded in paraffin. The study protocol was performed in accordance with the animal experimentation guideline of Keio University School of Medicine.

Animals-2

To evaluate the renoprotective effects of the Rho-kinase inhibition, animals were fed an LFD ($n = 8$; 10% lard; Research Diets Inc.) or an HFD ($n = 8$; 60% lard; Research Diets Inc.) in the same way, with the latter further randomized to either a Rho-kinase inhibitor (fasudil, 30 mg kg⁻¹ per day, via gavage, $n = 8$; Asahi Kasei Co., Tokyo, Japan)-treated or a vehicle-treated group ($n = 8$) during the experimental protocol. After 12-week treatment with fasudil, the mice were killed and the collection of blood, urine and tissues were performed in the same way as in Animal-1.

Morphological examination

Nuclei within a single glomerulus were counted in 50 hilar glomeruli in each animal. Diameters of glomeruli were measured by photographing at high magnification for image analysis.²³ These morphological evaluations were conducted by two independent observers in a blinded manner.

Immunohistochemistry

Kidney sections (4 μ m) were stained with periodic acid-Schiff's, monoclonal mouse macrophage marker F4/80 (1:300 dilution) and Masson's modified trichrome to demonstrate collagen matrix.^{23,24} The accumulation of matrix, and the extent of histochemical and immunohistochemical staining were quantified using computer-assisted image analysis. The number of macrophages was assessed by counting F4/80-positive nuclei (brown) per mm² with the use of image analysis software.²³ Sections incubated with normal goat serum instead of the primary antiserum served as the negative control.

Tissue aldosterone and immunoblotting

Tissue aldosterone was measured by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry.²⁵ Western blotting was performed as described previously.¹³ To examine the effects of aldosterone on Rho/Rho-kinase pathway, phosphorylated levels of myosin phosphatase target subunit-1 (MYPT1; Upstate Biochemistry, Lake Placid, NY, USA), one of the substrates of Rho kinase, were examined in the kidney and aldosterone-stimulated human mesangial cells (HMCs), with the use of phospho-MYPT1 levels at the inhibitory site (Thr696) as a marker for Rho-kinase activity. Immunoblotting was performed using specific

antibodies against phospho-MYPT1 and mitogen-activated protein kinases, including extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) and p38.^{26,27}

We prepared the nuclear extracts with commercially available kits (Panomics Inc., Fremont, CA, USA).²⁸ MR (Perseus Proteomics, Tokyo, Japan) protein levels in the nuclear fraction of the kidney were examined. Immunoreactive bands were detected using an ECL detection kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

Measurement of MCP-1 and TNF- α protein levels

Tissue monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kit (Westang Bio-tech, Shanghai, China).²⁹ Briefly, kidney samples were homogenized separately in 0.1 M NaCl, 0.05 M Tris-Cl and 2% (*v v*⁻¹) Triton X-100 together with protease inhibitors (Roche Diagnostics, Melbourne, Australia). After centrifugation, the supernatants were collected and stored at -80 °C until assayed. The TNF- α and MCP-1 levels were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay kit. All samples were assayed in duplicate. The results of TNF- α and MCP-1 were calculated as concentration per wet weight of the tissue (picograms per gram).

Cell culture and experimental protocols

Experiment-1. Aldosterone was obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). An aldosterone receptor blocker, eplerenone, was kindly provided by Pfizer Inc.. HMCs in primary culture were purchased from Cambrex Bioproducts (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan). The cells were cultured in SmbM medium (Clonetics Co., Walkersville, MD, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum. For all experiments, early passaged (passages 3–6) HMCs were grown at 60–70% confluence and made quiescent by serum starvation for 48 h. Cells were incubated with various concentration of aldosterone (10^{-11} to 10^{-8} mol l⁻¹) for 1 h and were also treated with eplerenone for 30 min before the addition of aldosterone (1 nmol l⁻¹). HMCs were harvested in 100 μ l lysis buffer containing 20 mmol l⁻¹ of Tris-HCl, 250 mmol l⁻¹ of sucrose and phenylmethylsulfonyl fluoride, as well as aprotinin and leupeptin (10 μ g ml⁻¹ each) 5 min after the aldosterone treatment. After three cycles of freeze and thaw, samples were centrifuged at 250 g at 4 °C for 5 min. The supernatant was then centrifuged at 100 000 g for 30 min at 4 °C. The supernatant was saved and the protein was subjected to immunoblotting.

Experiment-2. Cells were further supplemented with 100 nM human insulin (Sigma) in 2% fetal bovine serum, to mimic hyperinsulinemia, or incubated with standard 1 nM or 10 nM insulin in Dulbecco's modified Eagle's medium with 20% fetal bovine serum over 48-h period. Cells were cultured in 75-cm² flasks (90–95% confluency) for RNA isolation.

Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from the mouse kidneys using Trizol solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Total RNA was subjected to reverse transcription in a 20 μ l reaction mixture containing random primers and Superscript II enzyme (Invitrogen). Quantitative real-time polymerase chain reaction was performed with an ABI Prism 7700 Sequence Detection System using SYBR Green PCR Master Mix Reagent Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).³⁰ Primers used were as follows: serum- and glucocorticoid-induced kinase 1 (SGK1): sense-5'-TGTCTGGGGCTGTCC TGTATG-3', antisense-5'-GCTTCTGCTGCTTCTTCACAC-3'; platelet-derived growth factor subunit B (PDGF-B): sense-5'-CGAGTGAAGACGCGTACA-3', antisense-5'-GGCATTGGTGCGATCGA-3'; TNF- α : sense-5'-GGTGATCGGTCC CAACAAGGA-3', antisense-5'-CACGCTGGCTCAGCCACTC-3'; MCP-1: sense-5'-TAGGCTGGAGAGCTACAAGAGGAT-3', antisense-5'-AGACCTCTCTTGAG CTGGTGA-3'; CYP11B1: sense-5'-ACTCCGTGGCCTGAGACG-3', antisense-5'-CTCTGCCAGTTCGCGATA-3'; CYP11B2: sense-5'-ACTCCGTGGCCTGAGA CG-3', antisense-5'-GAGAGCTCCGAGTCTGA-3'; 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD): sense-5'-GCAGACCATCCTAGATGCAATCTG-3', antisense-5'-CAAGTGGCTCATAGCCAGATCTC-3'; and CYP21 hydroxylase: sense-5'-CA