

学位論文
Doctoral Thesis

慢性腎臓病モデルに対する穏和な全身温熱刺激の腎保護効果の検討
(Renoprotective effects of mild systemic thermal stimulation
in a rodent model of chronic kidney disease)

岩下 佳弘
Yoshihiro Iwashita

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻腎臓内科学

指導教員

向山 政志 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻腎臓内科学

2016年3月

学 位 論 文

Doctoral Thesis

論文題名 : 慢性腎臓病モデルに対する穏和な全身温熱刺激の腎保護効果の検討
(Renoprotective effects of mild systemic thermal stimulation
in a rodent model of chronic kidney disease)

著者名 : 岩下佳弘
(単名) Yoshihiro Iwashita

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻腎臓内科学 向山政志 教授

審査委員名 : 救急・総合診療科学担当教授 氏名 笠岡 俊志
生体機能薬理学担当教授 氏名 光山 勝慶
代謝内科学担当教授 氏名 荒木 栄一
臨床薬物動態学担当教授 氏名 齋藤 秀之

2016年3月

目次

I	要旨	1
II	学位論文の骨格となる参考論文	3
III	謝辞	4
IV	略語一覧	5
V	研究の背景と目的	6
VI	実験方法	10
VII	実験結果	15
VIII	考察	28
IX	結語	32
X	参考文献	33

I. 要 旨

<目的> 近年、温熱療法は心不全に対する非薬物療法としての有効性が確立されている。しかしながら、慢性腎臓病（chronic kidney disease, CKD）に対する効果は明らかではない。温熱の腎臓への作用を明らかにするため、申請者らは深部体温を 1～2℃上昇させるような比較的軽度の反復全身温熱刺激（repeated mild thermal stimulation, MTS）を用いて腎障害に与える影響について検討した。

<方法> 40 匹の 129X1/SvJ マウスを偽手術＋室温（Sh+RT 群；n=7）、偽手術＋MTS（Sh+MTS 群；n=7）、5/6 腎摘除＋室温（Nx+RT 群；n=13）、5/6 腎摘除＋MTS（Nx+MTS 群；n=13）の 4 群に分けた。マウスは偽手術（Sh）または 5/6 腎摘除（Nx）を行い、2 週間回復させた後、電熱式加温装置で 1 日 1 回（39℃15 分＋35℃ 20 分）、週 5 日、4 週間 MTS あるいは RT 加療を行った後に腎障害を評価した。

<結果> MTS による血圧の変化は、Sh 群で 3 mmHg 程度、Nx 群で 8 mmHg 程度の低下が認められた。申請者らは MTS による血圧低下の影響を最小限とする目的で、Nx 群では RT、MTS 両群から血圧がほぼ等しい 9 匹を選んで解析を行った。血圧による選択前後で腎機能、アルブミン尿などを含めたすべての項目の値、あるいは MTS の効果を評価するのに有意の差は認められなかった。MTS は Nx による血清クレアチニン上昇、尿中アルブミン増加を有意に軽減した（各々-17%、-79%）。さらに Nx+MTS 群は Nx+RT 群に比して、尿中 neutrophil gelatinase-associated lipocalin（NGAL）が半減するとともに尿細管組織傷害が軽度であった。MTS は Nx によって増加する TUNEL 陽性細胞数、cleaved caspase 3 を有意に抑制していた。また、MTS は Nx 残存腎組織の NADPH オキシダーゼ構成タンパクの mRNA 発現を亢進させたが、活性酸素種の産生は有意に抑制していた。Nx で減少する腎組織 Mn-SOD 発現は MTS により回復が認められた。MTS は Nx 残存腎組織の

p38 MAPK、Akt、そして熱ストレスタンパクである Hsp27 のリン酸化を亢進させ、さらに腎組織の血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) mRNA 発現を増強した。

<考察> MTS は血圧の上昇を抑制するとともに、NADPH オキシダーゼを介して活性酸素種を増やす方向に作用しうるが、これをトリガーとして p38 MAPK-Akt 経路を介した抗酸化ストレス系の Mn-SOD や熱ストレスタンパクを活性化することで、抗酸化作用や抗アポトーシス作用を増強する可能性が考えられた。また、MTS による eNOS mRNA の発現増加は内皮機能改善に働く可能性が示唆された。

<結論> 以上の成績から、CKD モデルに対する穏和な全身温熱刺激は腎障害進展に対して保護的に作用することが示された。今後、温熱療法は、CKD 患者に対する理学療法の新たな可能性として大いに期待される。

Ⅱ. 学位論文の骨格となる参考論文

参考文献

1 関連論文

1. **Yoshihiro Iwashita, Takashige Kuwabara, Manabu Hayata, Yutaka Kakizoe, Yuichiro Izumi, Junichi Iiyama, Kenichiro Kitamura, Masashi Mukoyama.** Mild systemic thermal therapy ameliorates renal dysfunction in a rodent model of chronic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 310: F1206-F1215, 2016.

②その他の論文

1. **Junichi Iiyama, Makoto Kaburagi, Tomonori Yasuda, Yoshihiro Iwashita.** Thai massage program at Kumamoto Health Science University: Efficacy and scientific evidence. *Journal of Health Sciences* 11: 69-72, 2014.
2. **Takaaki Kubo TY, Yoshihisa Masumitsu, Yoshihiro Iwashita, Satoshi Watanabe, Taichi Ishizawa, Mitsuo Tsunakawa, Shingo Yano, Junichi Iimaya.** A change in bathing style may improve mental fitness. *Health* 7: 270-278, 2015.

Ⅲ. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご支援を賜りました当研究室の向山政志教授、栗原孝成助教、ならびに腎臓内科学講座の皆様、山梨大学医学部内科学講座第3教室の北村健一郎教授に厚く御礼申し上げます。また、リハビリテーション医学の観点からご指導を賜りました熊本保健科学大学の飯山準一教授に深謝いたします。最後に、陰ながら私を支えてくれた家族に心から感謝します。

IV. 略語一覽

ACR	albumin to creatinine ratio
CKD	chronic kidney disease
DHE	dihydroethidium
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
HSP	heat shock protein
Hsp27	heat shock protein 27
Hsp70	heat shock protein 70
IL-6	interleukin-6
JAK	Janus kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mn-SOD	manganese-dependent superoxide dismutase
MTS	mild thermal stimulation
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NOX	NADPH oxidase
PAS	periodic acid-Schiff
PKC	protein kinase C
ROOH	hydroperoxide
ROS	reactive oxygen species
RT	room temperature
SOD	superoxide dismutase
STAT	signal transducer and activator of transcription
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling

V. 研究の背景と目的

全身を温める温水浴やサウナ浴は、一般に広く浸透しており、腰痛や五十肩などの慢性疼痛、関節のこわばり、筋スパズム、冷え性などの症状緩和や心身の疲労回復などを目的に利用されているが、特定の疾患を標的とする医学的治療法としては認識されてこなかった。近年、医療の分野において全身温熱の適応は拡大しており、悪性腫瘍や心不全、末梢動脈疾患の治療として活用されるようになってきた。さらに、微弱電流と温熱刺激の併用による2型糖尿病治療への臨床応用に向けた開発も進んでいる(27, 28, 38)。

通常使用されるフィンランド式サウナは、高い湿度かつ70~90°Cと高温であり、身体に高負荷を与えるため、心疾患患者をはじめ禁忌とされてきた。しかしながら、Teiらはうつ血性心不全患者を対象に、41°C、10分間の温水浴、あるいは60°C、15分間のサウナ浴が温熱性血管拡張を引き起こして心負荷を軽減することを報告した(51)。この温浴やサウナ浴を繰り返すことで、心不全患者や心筋症ハムスターにおいて血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現が誘導されることを示し、血管内皮機能が改善する可能性を示唆した(17, 19, 25)。さらに、酸化ストレスの軽減(9)、交感神経過緊張の軽減(30)、心筋梗塞後のリモデリングの促進作用(46)などの効果について報告された。このような穏和な全身温熱刺激を用いた治療は、近年、和温療法と称され日本において開発が進んでいる(50)。

和温療法は、遠赤外線による加温装置に全身を入れ、約 60℃で加温し深部体温を約 1℃上昇させ、保温、給水を含む治療法である (Fig.1)。和温療法は、心不全患者にとって効果が認められており、さらに肺高血圧などに適応が広がる可能性が示唆されている (9, 30, 35, 52, 55)。しかしながら、そのような温熱治療は、腎障害においては脱水の危険性や熱刺激が強すぎれば交感神経過緊張を引き起こしてしまう可能性からこれまで避けられてきた。

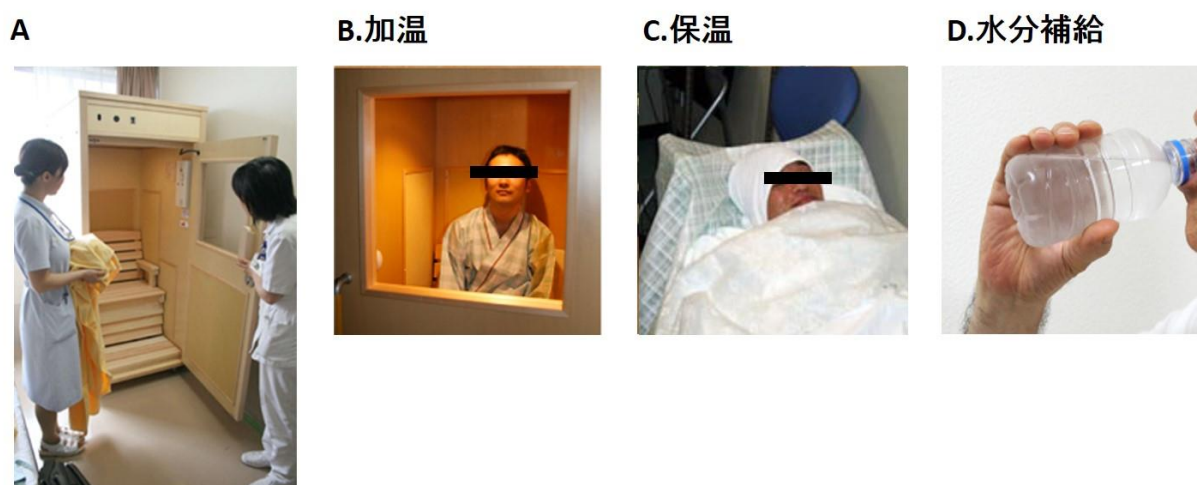


Fig. 1. 和温療法。患者は加温器(A)、または均等加温室に入り、心身を和ませる約 60℃の温度で全身を 15 分間加温(B)し、深部体温を約 1.0℃～1.2℃上昇させた後、さらに 30 分間の安静保温(C)で和温効果を持続させ、終了時に発汗に見合う水分を補給(D)する治療法。waon-therapy.com より一部引用。

腎臓には、およそ 500~600 mL/min の血漿が流入するが、髄質血流は総腎血流のわずか 10%程度しかないため、腎血流量の低下は髄質虚血につながりやすい。とくに、髄質外層の尿細管は酸素を消費するナトリウム再吸収を行っているため、髄質血流が減ると低酸素が助長され、腎障害が進行すると考えられている (20)。近年、申請者らはヒトを対象に穏和な全身温熱刺激が腎血行動態に与える影響について検討したところ、腎血漿流量を増加させるものの糸球体濾過量には影響を与えず、糸球体濾過比を下げることを明らかにし、輸入細動脈と輸出細動脈の両方に温熱性血管拡張が起こる可能性、および髄質血流量を増加させる可能性を示した (16) (Fig.2)。また、深部体温が 41.5°C程度に上昇する熱負荷を加えているときの腎血流動態を調べた実験においても、数時間程度であれば腎血漿流量や糸球体濾過量は通常と同程度かそれ以上に維持されることが示された (23)。

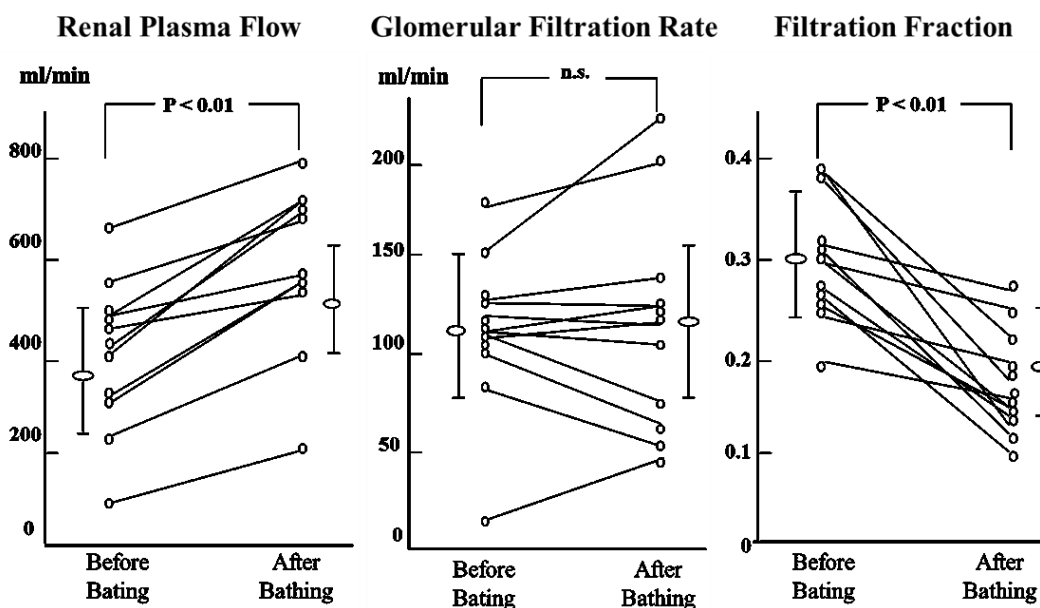


Fig. 2. 健常成人を対象に 41°C 10 分間温水浸した後の腎血漿流量 (renal plasma flow, RPF)、糸球体濾過量 (glomerular filtration rate, GFR)、糸球体濾過比 (filtration fraction, FF) の変化。引用文献 16 より。

身体への熱負荷が熱ショックタンパク質（HSP）の発現に影響を及ぼすことは周知の事実である（44）。HSPは熱刺激のみならず様々なストレスによって誘導され（31, 42）、分子シャペロンとして機能し、タンパク質の凝集やミスフォールディングの防止、輸送、集合や分解、抗炎症などに関与している（2, 3, 56）。腎障害においては、HSPの過剰発現が急性腎障害モデルに対して腎保護に作用する可能性が示された（40, 64）

しかしながら、申請者らが調べた限り、腎障害に対して全身温熱刺激を生体に適応した研究は散見されなかった。そこで、今回、慢性腎臓病（CKD）の進行における温熱療法の意義を明らかにするために、5/6腎摘除動物モデルに対する穏和な全身温熱刺激を用いて検討を行った。

VI. 実験方法

動物

動物実験プロトコールは、熊本保健科学大学の承認（No. 13-023）を受け、実験動物の管理と使用に関するガイドラインに従って実施した。体重 21-23g の雄性 129X1/SvJ マウス（Japan SLC, Shizuoka, Japan）を用いた。すべてのマウスは 12 時間の明暗サイクルで湿度、温度ともに調整された環境下におかれ、食餌および水は自由摂取とした。

腎亜全摘除マウスモデル

腎部分摘除 (Nx) マウスモデルの作製は、申請者らのこれまでの研究に従って行った (11)。まず左腎の 2/3 を鉗で切除し、2 週間の回復期間の後、右腎を全摘し 5/6 腎摘とした。40 匹のマウスは無作為に 4 グループに分類した。すなわち、グループ 1 は、コントロールとしての偽手術を行い 25°C の室温 (RT) に置いた群 (Sh+RT group; n = 7)、グループ 2 は、偽手術を行い MTS を施行した群 (Sh+MTS group; n = 7)、グループ 3 は、5/6 腎摘除を行い室温に置いた群 (Nx+RT group; n = 13)、グループ 4 は、5/6 腎摘除を行い MTS を施行した群 (Nx+MTS group; n = 13) とした。MTS により血圧が低下傾向となったため、血圧による影響を最小限とするため、両方の 5/6 腎摘除群から血圧がほぼ等しいマウスを選択した。すなわち、Nx+RT 群と Nx+MTS 群からそれぞれ 4 匹を除いた 9 匹ずつを解析対象として選択した。血圧による選別前後において、血清クレアチニンやアルブミンクレアチニン比、クレアチニンクリアランスなどの腎機能データやすべての生理学的データ (Table 1) に有意のバイアスが認められなかったため、申請者らは最終的に 5/6 腎摘除群の血圧で選別したマウス (各 n = 9) を用いて解析を行った。

穏和な全身温熱刺激

直腸温を 1~2°C 上昇させる温熱強度は、心筋症ハムスターを使用した先行研究を参考に決定した (18)。5/6 腎摘除し 2 週間の回復期間を置いた後、1 日 1 回、週 5 日、4 週間 MTS を施行した。MTS は電熱式加温装置 EKK-450 (AS ONE, Osaka, Japan) を使用し、39°C で 15 分間加温した後、35°C で 20 分間保温した。加温により直腸温はおよそ 2°C 上昇し、保温によってやや低下したが 1°C 程度上昇を維持した (Fig.3)。

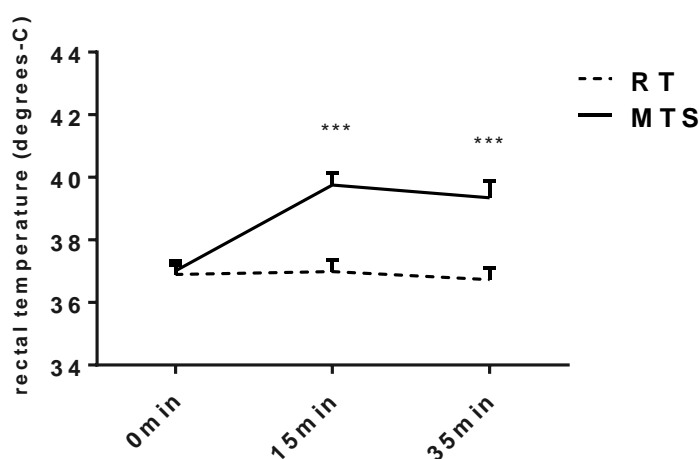


Fig. 3. 電熱式加温装置を用いて、39°C で 15 分間加温、35°C で 20 分間保温したときのマウス直腸温の変化。直腸温はおよそ 2°C 上昇し、保温によってやや低下したが 1°C 程度上昇を維持した。RT は room temperature (室温) 群、MTS は mild systemic thermal stimulation (加温) 群を表す。数値は平均値 \pm SEM (n = 7)。*** P < 0.001 (vs. MTS 0min.)。

分析方法

4 週間の MTS 介入終了後、すべてのマウスは体重測定、および MK-2000ST manometer (Muromachi Kikai, Osaka, Japan) を用いた tail-cuff 法による血圧測定を行った。また、代謝ケージで 24 時間蓄尿を行い、食餌量、飲水量を記録した。その後、ペントバルビタールナトリウム (60 mg/kg) を腹腔内投与し、完全な麻酔下で下大静脈から血液を採取し、腎機能のパラメーターを測定した。その後、残存腎について組織学的検討を行った。

血清および尿中クレアチニン値は、酵素法による Aqua-auto Kainos CRE-II test kit

(Kainos, Tokyo, Japan)を用いて、尿中アルブミン値は、免疫比濁法による mouse urinary albumin assay kit (AKRAL-021, Shibayagi, Gunma, Japan) を用いて、Hitachi 7180 biochemistry automatic analyzer (Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan) を使用し測定した。

組織学的検討

腎組織は Duboscq-Brazil 溶液で固定しパラフィン切片を作製した。腎組織を厚さ 2 μm に薄切して PAS 染色を行い、糸球体肥大、糸球体硬化、尿細管傷害の程度を調べた。糸球体面積は、それぞれのマウスから少なくとも 15 個以上の糸球体を Image-Pro Plus 4.5 software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) を用いて測定した。糸球体硬化度は、先行研究に従って各腎組織切片から少なくとも 30 個以上の糸球体を記録し、スコアは 0 から 5+で表した (63)。尿細管傷害においても先行研究に従い、スコアは 0 から 5+で表した (59, 61)。糸球体面積、糸球体硬化度、尿細管傷害の程度は、病理医を含む 2 名が盲検下で評価した。また、活性酸素産生を in situ で観察するため、ジヒドロエチジウム (DHE) 染色を行った (13)。5 μm の凍結切片を 0.1 mM の DHE とともに 37°C で 30 分間インキュベートし、Olympus BX50 with BH2-RFL-T3 (Olympus, Tokyo, Japan) で撮像した。蛍光強度の定量化には Image-J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いた。腎組織におけるアポトーシスの分析は、TUNEL 染色を研究所に委託し実施した (Biopathology Institute, Oita, Japan)。3,3'-diaminobenzidine (DAB) で染色されたアポトーシス細胞は少なくともスライドあたり 6 箇所 of 腎皮質を無作為に選び、200 倍率の顕微鏡下でカウントした。

尿中 neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) 値の測定

尿中 NGAL 値は ELISA kit (BioPorto, Gentofte, Denmark) を用いて測定し、尿中クレアチニン濃度で補正した (29)。

酸化ストレスの測定

血清中の酸化ストレスマーカーであるヒドロペルオキシド (ROOH) は、diacron-reactive oxygen metabolites test kit (Diacron International, Grosseto, Italy) を用い、active oxygen-free radical autoanalyzer (Free Radical Elective Evaluator, Diacron International) で測定した。

血清 superoxide dismutase (SOD) 活性の測定

血清 SOD 活性は、SOD assay kit (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を使用し、プロトコールに従って測定した。

リアルタイム PCR

RNA later 中に 4°C で一晩保存した腎組織から、Maxwell 16 LEV simply RNA Tissue Kit (Promega, Madison, MI, USA) を使用して RNA を抽出し、PrimeScript RT Master Mix Kit (Takara Bio, Otsu, Japan) を用いて逆転写した。得られた cDNA を鋳型として Taq Man probe 法で NOX1、NOX4、eNOS、NGAL、actin の mRNA 発現を解析した。NOX1、NOX4、eNOS、actin のプライマーは Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) から購入した。NGAL mRNA の TaqMan プライマーとプローブは、以前の研究に準じて作製した (forward, 5'-ggcagctttacgatgtacagca-3'; reverse, 5'-tctgatccagtagcgacagcc-3'; and probe, 5'-FAM-catcctggtcagggaccaggaccag-TAMRA-3') (29)。データの処理については得られた各々の Ct 値を actin の Ct 値で補正した (Ct gene of interest-Ct ACTIN)。各サンプルの発現量の変化は actin で補正した ΔCt の差 (Ct sample-Ct calibrator) により補正

した ($\Delta\Delta\text{Ct}$ 法)。

ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE とブロッティングは標準的な手法で行った。SDS-PAGE には蛋白 20 μg を使用した。抗体に関しては以下のものを使用した。Hsp70 (1:1000, sc-1060, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)、Hsp27 (1:1000, sc-9012, Santa Cruz Biotechnology)、phospho-Hsp27 (1:1000, #2401S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、caspase-3 (1:500, ab4051, Abcam, Cambridge, UK)、cleaved caspase-3 (1:1000, #9661S, Cell Signaling Technology)、manganese SOD (Mn-SOD) (1:1000, sc-30080, Santa Cruz Biotechnology)、total-p38 MAPK (1:1000, #9212S, Cell Signaling Technology)、phospho-p38 MAPK (1:1000, #4511, Cell Signaling Technology)、total-Akt (1:1000, #9272, Cell Signaling Technology)、phospho-Akt (1:1000, #9275, Cell Signaling Technology)、beta-actin (1:1000, sc-130656, Santa Cruz Biotechnology)。プロットは ECL Prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare, UK) を用いて処理した。データは beta-actin に対する相対定量で示した。

統計学的解析

すべての数値は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) で表示した。2 群間の比較には unpaired Student's t test を行い、多群間の比較には一元配置分散分析 (ANOVA)、事後比較に Bonferroni's post-hoc test を用いた。P < 0.05 を統計学的に有意と判定した。

VII. 実験結果

MTS による Nx マウスにおける腎障害の軽減

Table 1 に実験終了時の生理学的データ、および腎機能を示した。申請者らが先行研究で示した (13) ように、5/6 腎摘により血清クレアチニン上昇、尿アルブミンクレアチニン比 (ACR) 増加、そして収縮期血圧の上昇が認められた (Table 1)。しかしながら、MTS は尿量や飲水量には影響を与えず、血清クレアチニン上昇と尿 ACR 増加を有意に軽減した。腎機能障害における MTS のこれらの改善効果は、血圧値による選別前後においても同様の結果であった。

Table 1. 実験終了時の生理学的データおよび腎機能

	Sh+RT	Sh+MTS	Nx+RT	Nx+MTS	without selection by blood pressure adjustment	
					Nx+RT	Nx+MTS
n	7	7	9	9	13	13
BW, g	27.0±0.3	26.3±0.4	25.8±0.5	24.7±0.7	26.3±0.5	24.7±0.7
Rate of BW gain, %	8.0±1.1	4.0±0.8	8.0±1.9	7.0±1.4	10.0±1.8	7.0±3.5
Food consumption, g/day	3.4±0.0	3.6±0.7	3.2±0.2	2.8±0.1	3.2±0.1	3.0±0.1
Water intake, mL/day	4.4±0.2	4.8±0.5	7.5±0.4***	7.8±0.3***	7.4±0.3***	7.6±0.2***
UV, mL/day	1.0±0.1	1.3±0.2	3.3±0.3***	3.2±0.3***	3.4±0.2***	3.0±0.2***
SBP, mmHg	110±3	107±3	141±2***	140±2***	145±3***	137±2***#
sCr, mg/dL	0.13±0.01	0.12±0.00	0.29±0.02***	0.24±0.01***†††	0.30±0.05***	0.24±0.02***###
ACR, µg/mg	16.9±6.0	16.4±3.0	603.4±126.6***	127.7±26.1*††	549.7±97.6***	125.6±21.0*##
CCr, mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	10.6±1.6	14.4±1.5	7.4±0.6	8.2±0.7	7.6±0.5	7.7±0.6

数値は平均値 ± SEM で表す。BW, 体重; UV, 尿量; SBP, 収縮期血圧; sCr, 血清クレアチニン; ACR, アルブミンクレアチニン比; CCr, クレアチニンクリアランス; Sh+RT, 偽手術および室温 (約 25°C) 群; Sh+MTS, 偽手術および穏和な温熱刺激を実施した群; Nx+RT, 5/6 腎摘および室温群; Nx+MTS, 5/6 腎摘および穏和な温熱刺激を実施した群。* P < 0.05 (vs. Sh+RT) ; *** P < 0.001 (vs. Sh+RT) ; †† P < 0.01 (vs. Nx+RT) ; ††† P < 0.001 (vs. Nx+RT) ; # P < 0.05 (vs. 血圧による選別前の Nx+RT) ; ## P < 0.01 (vs. 血圧による選別前の Nx+RT) ; ### P < 0.001 (vs. 血圧による選別前の Nx+RT)。

MTSによる尿中 NGAL 排泄と尿細管傷害の軽減

Nx 群に対する 4 週間の MTS は、糸球体肥大や糸球体硬化といった糸球体の組織学的変化に有意な影響を与えなかった (Figs. 4A-4C)。一方、近位尿細管の刷子縁の萎縮や囊胞性拡大などの尿細管傷害は、MTS によって有意の軽減を認めた (Figs. 4A, 4D; $P < 0.001$)。次に尿細管傷害の指標として、腎組織の NGAL mRNA の発現、および尿中への NGAL 排泄量を測定した。Nx+MTS 群において、尿中 NGAL 排泄は Nx+RT 群に比してほぼ半減した (Fig. 5A; $P = 0.10$)。また、腎組織での NGAL mRNA の発現も減少傾向を認めた (Fig. 5B; $P = 0.07$)。

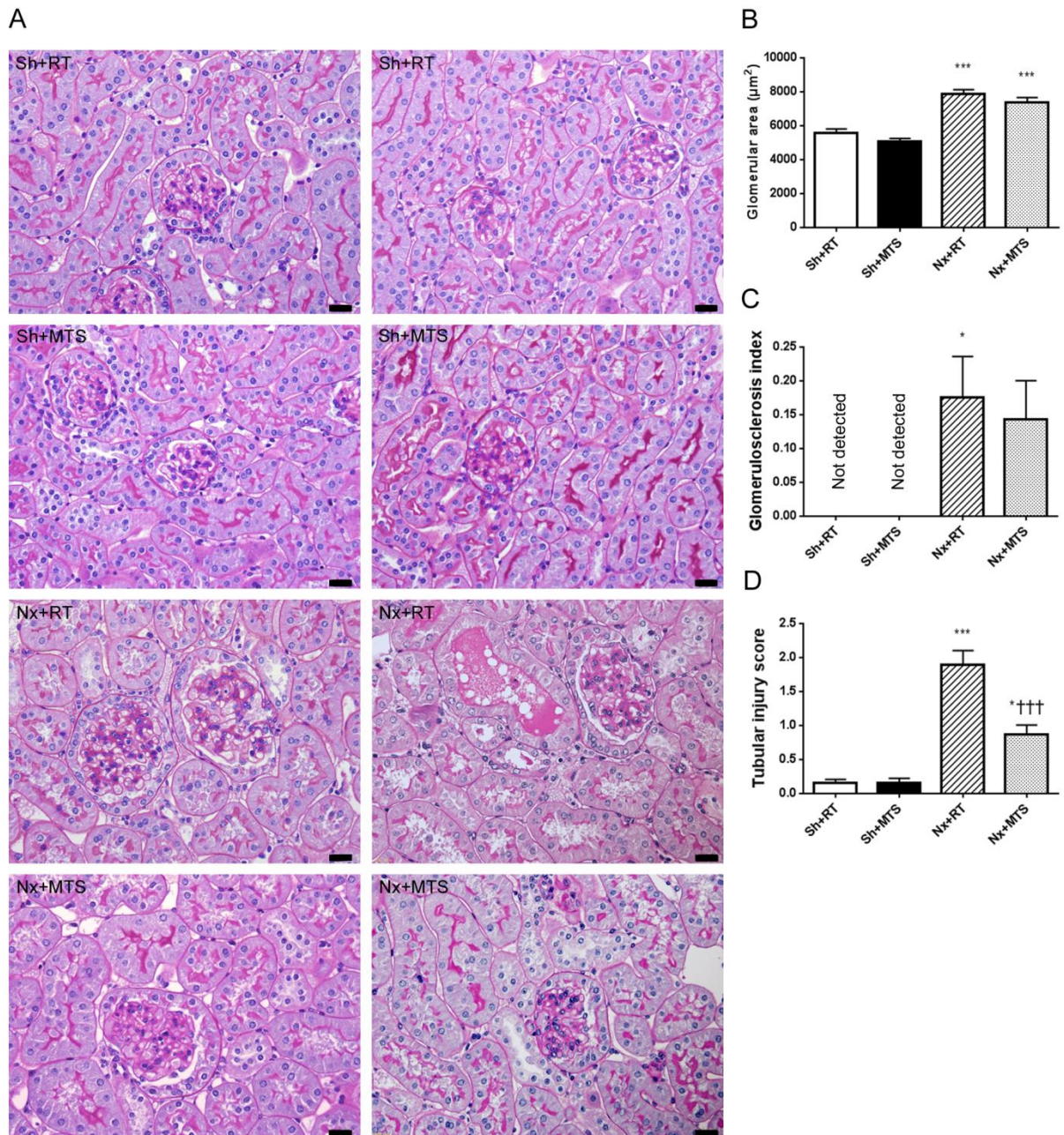


Fig. 4. (A) 腎組織切片の periodic acid-Schiff (PAS) 染色 (倍率×400)。スケールバー: 20 μm。室温に置かれた 5/6 腎摘 (Nx+RT) 群で観察された冊子縁の萎縮や近位尿細管の囊胞性拡大は、穏和な温熱刺激を加えた 5/6 腎摘 (Nx+MTS) 群では軽減していた。(B) 定量化した糸球体面積。温熱刺激は 5/6 腎摘に伴う糸球体肥大に影響を与えなかった。(C) 糸球体硬化度。温熱刺激は糸球体硬化に影響を与えなかった。(D) 定量化した尿細管傷害スコア。温熱刺激によって尿細管傷害は明らかな改善を示した。数値は平均値 ± SEM ($n = 7-9$)。* $P < 0.05$ (vs. Sh+RT); *** $P < 0.001$ (vs. Sh+RT), ††† $P < 0.001$ (vs. Nx+RT)。Sh: 偽手術。

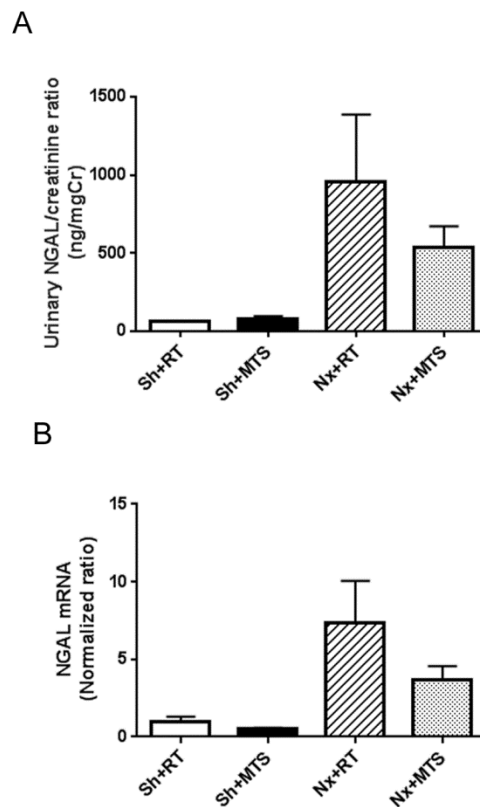


Fig. 5. 尿中 NGAL 排泄および腎組織 NGAL mRNA 発現に対する温熱刺激の効果。(A, B) 温熱刺激により、尿中 NGAL 濃度と残存腎における NGAL mRNA の発現はともに減少傾向を示した。数値は平均値 \pm SEM ($n = 7-9$)。

MTS による残存腎におけるアポトーシスと酸化ストレスの減少

急性および慢性腎障害においてアポトーシスや酸化ストレスは重要な役割を果たしており (34, 43)、またそれらは温熱刺激の影響を受けることが示唆されている (9, 57)。そこで申請者らは、これらに対する MTS の効果について評価した。Nx マウスにおける MTS は、残存腎の TUNEL 陽性細胞数を減少させるとともに、カスパーゼ 3 の分解を抑制した (Figs. 6, 7)。これらの結果から、MTS が 5/6 腎摘によって誘発されるアポトーシスシグナル伝達を抑制することが示唆された。

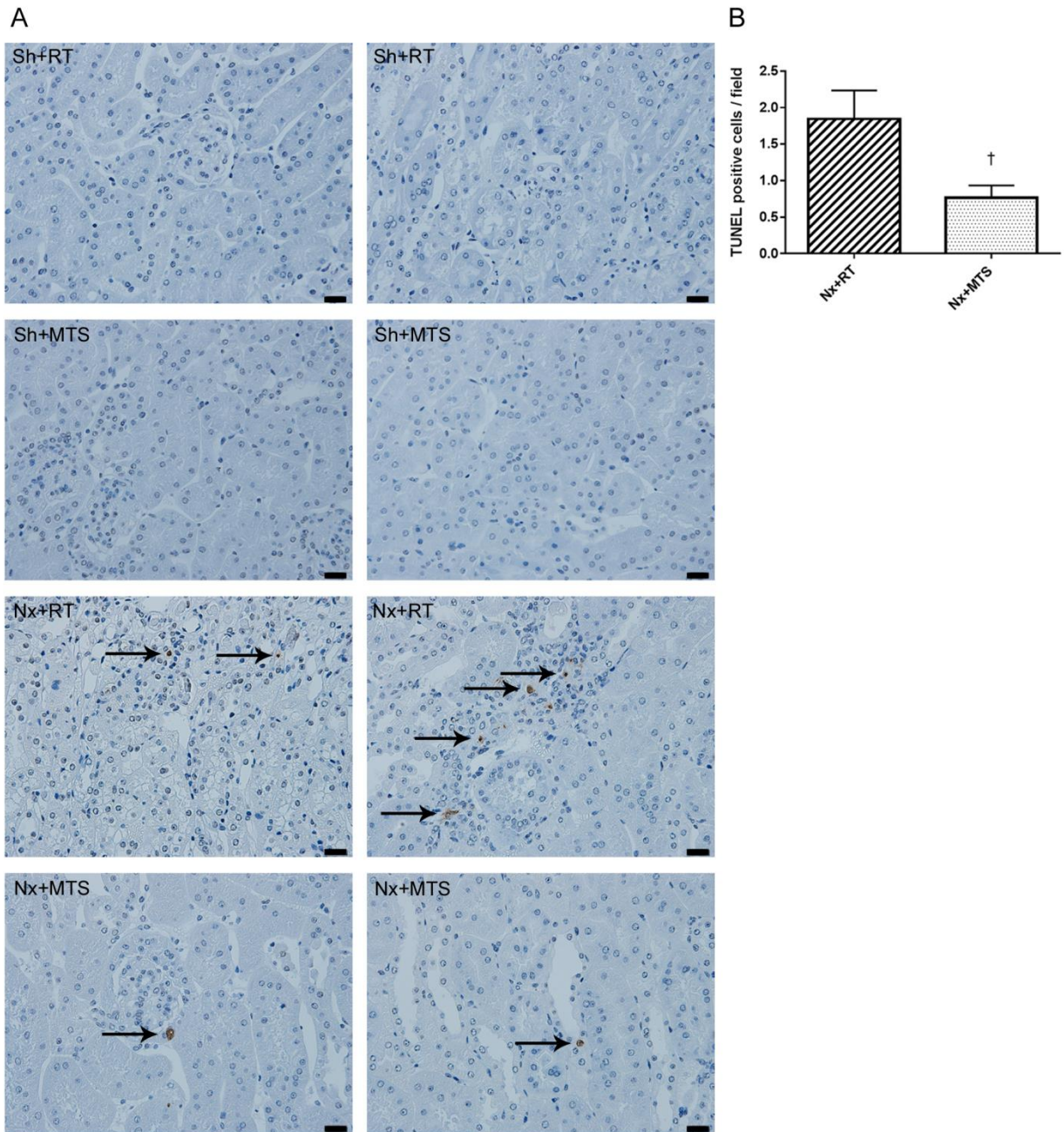


Fig. 6. 残存腎皮質領域の TUNEL 染色。(A) 矢印は TUNEL 陽性細胞を示す。スケールバー: 20 μm 。

(B) 腎皮質領域での TUNEL 陽性細胞数。残存腎での TUNEL 陽性で示されるアポトーシス細胞数は温熱刺激により有意に抑制された。数値は平均値 \pm SEM ($n = 9$)。† $P < 0.05$ 。

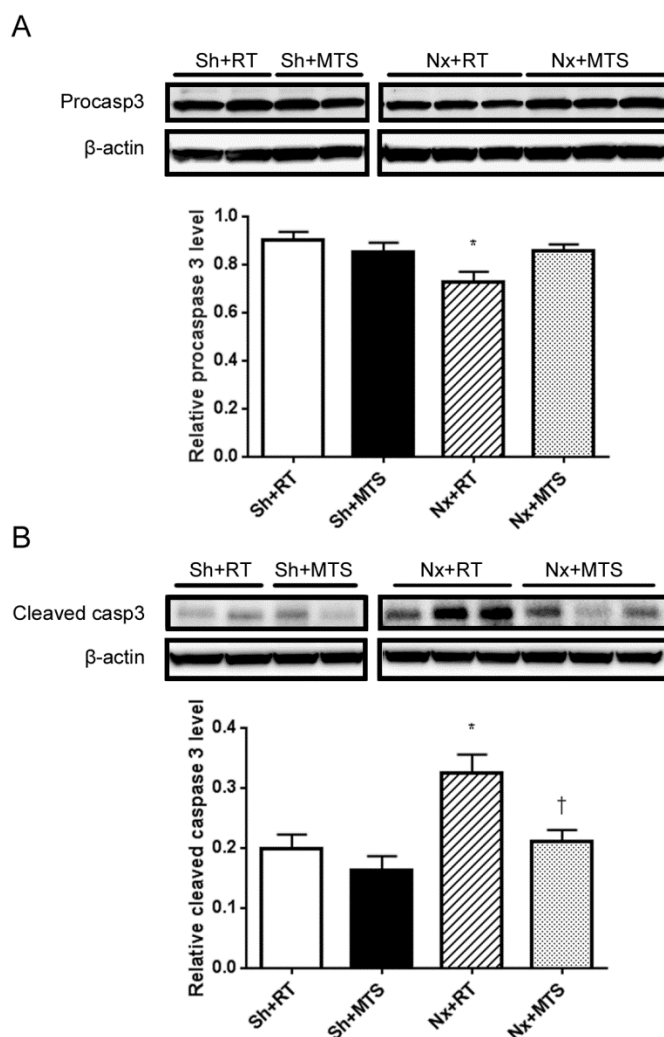


Fig. 7. 残存腎における caspase 3 活性化に対する温熱刺激の効果。(A) Nx+RT 群の腎組織における pro-caspase 3 は減少したが、Nx+MTS 群では保持された。(B) cleaved caspase 3 は、Nx+RT 群に比して Nx+MTS 群で有意に減少した。数値は平均値 \pm SEM ($n = 8$)。* $P < 0.05$ (vs. Sh+RT); † $P < 0.05$ (vs. Nx+RT)。

NOX1 および NOX4 mRNA の発現は、MTS により偽手術群および Nx 群の両方でアップレギュレートする傾向を示した (Figs. 8A, 8B; $P = 0.10-0.04$)。そこで、腎組織における ROS 産生を調べるために DHE 染色を行った。その結果、Nx 群の残存腎では明らかな ROS の蓄積を認めたが、MTS を加えることによって有意の ROS の軽減を認めた (Fig. 8C)。一方、全身の酸化ストレスを反映する血清 ROOH 値は、すべての群において差を認めなかった (Fig. 8D)。

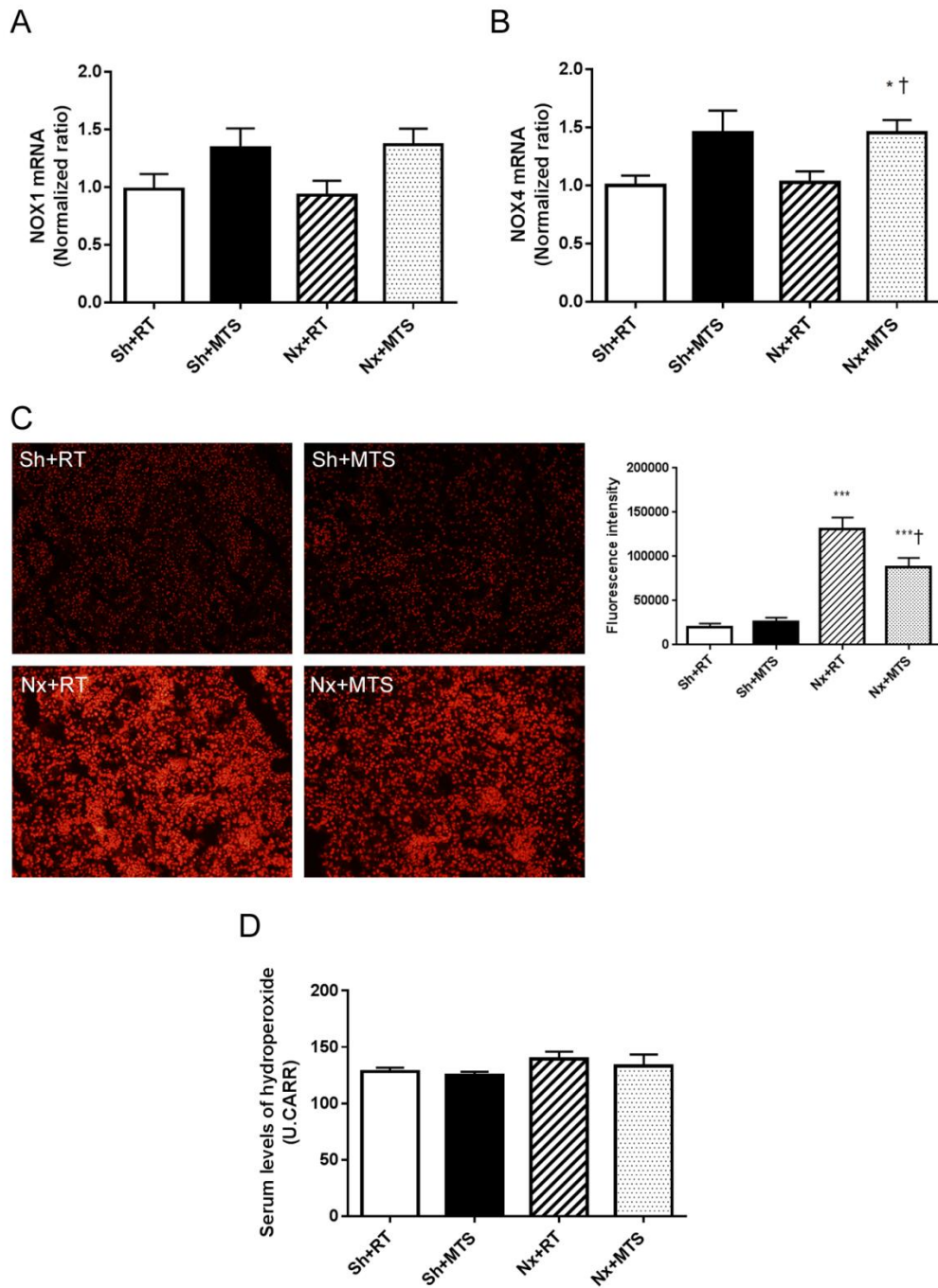


Fig. 8. 酸化ストレスに対する温熱刺激の効果。(A, B) 残存腎における NOX1 および NOX4 mRNA 発現。NOX1 および NOX4 mRNA 発現は、温熱刺激によって偽手術群、5/6 腎摘群の両者ともに増加した。(C) 腎組織の DHE 染色とその定量グラフ。温熱刺激は残存腎において DHE 陽性で示される ROS 産生を有意に軽減した。(D) 血清 hydroperoxide 値。4 群間に差は認められなかった。数値は平均値 \pm SEM ($n = 7-9$)。* $P < 0.05$ (vs. Sh+RT); † $P < 0.05$ (vs. Nx+RT)。

MTSによる残存腎での Mn-SOD 発現の維持

NOX 発現と DHE 染色において矛盾が生じたため、次に HSP によって制御される SOD 活性を検討した。血清 SOD 活性を測定したところ、MTS の効果は認められなかった (Fig. 9A)。それとは対照的に、腎組織においては Nx により発現が減少した Mn-SOD が、MTS を加えることにより有意に改善を認めた (Fig. 9B)。

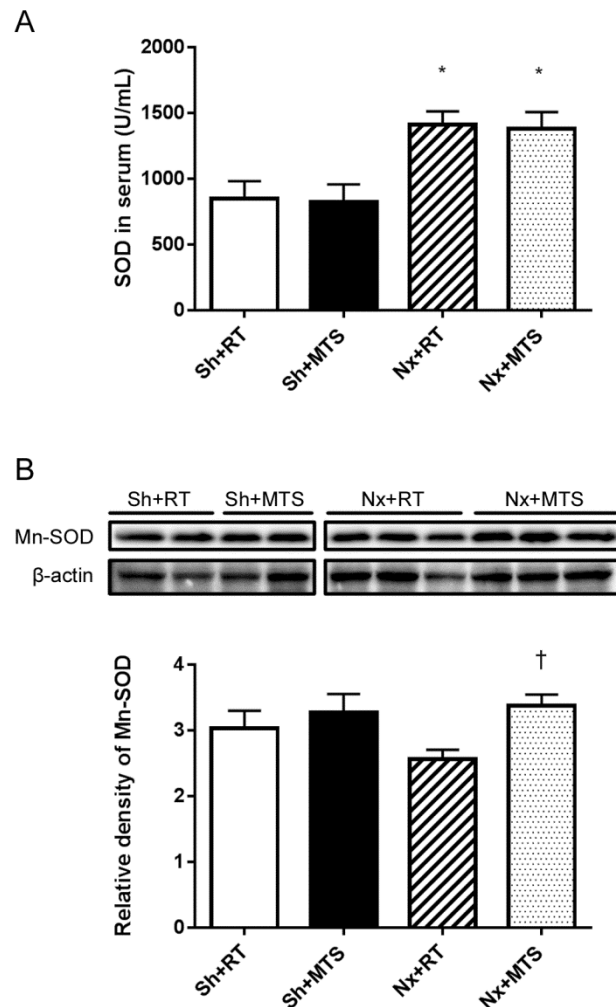


Fig. 9. SOD に対する温熱刺激の効果。(A) 血清における total SOD 活性。血清 SOD 活性は 5/6 腎摘によって増加したが、温熱刺激による影響は認められなかった。(B) 残存腎における Mn-SOD 蛋白発現。5/6 腎摘により減少した Mn-SOD の発現は、温熱刺激により回復した。数値は平均値 \pm SEM ($n = 7-9$)。

* $P < 0.05$ (vs. Sh+RT); † $P < 0.05$ (vs. Nx+RT)。

MTSによる残存腎でのHSP発現とリン酸化の増強

次に申請者らは、温熱刺激によって誘導され、アポトーシスシグナルに影響を与える鍵となるシャペロン分子であるHsp70とHsp27をウエスタンブロット法を用いて解析した。Nx+MTS群の残存腎のHsp70発現はMTSによって維持される傾向が認められた (Fig. 10A; $P = 0.05$ vs. Nx+RT)。Hsp27においては偽手術群とNx群の両方でMTSによる発現の増加が認められた (Fig. 10B)。一方、MTSによるHsp27のリン酸化の増強は偽手術群の腎組織では認められず、Nx群においてのみ増強する傾向が認められた ($P = 0.07$ vs. Sh+RT) (Fig. 10C)。

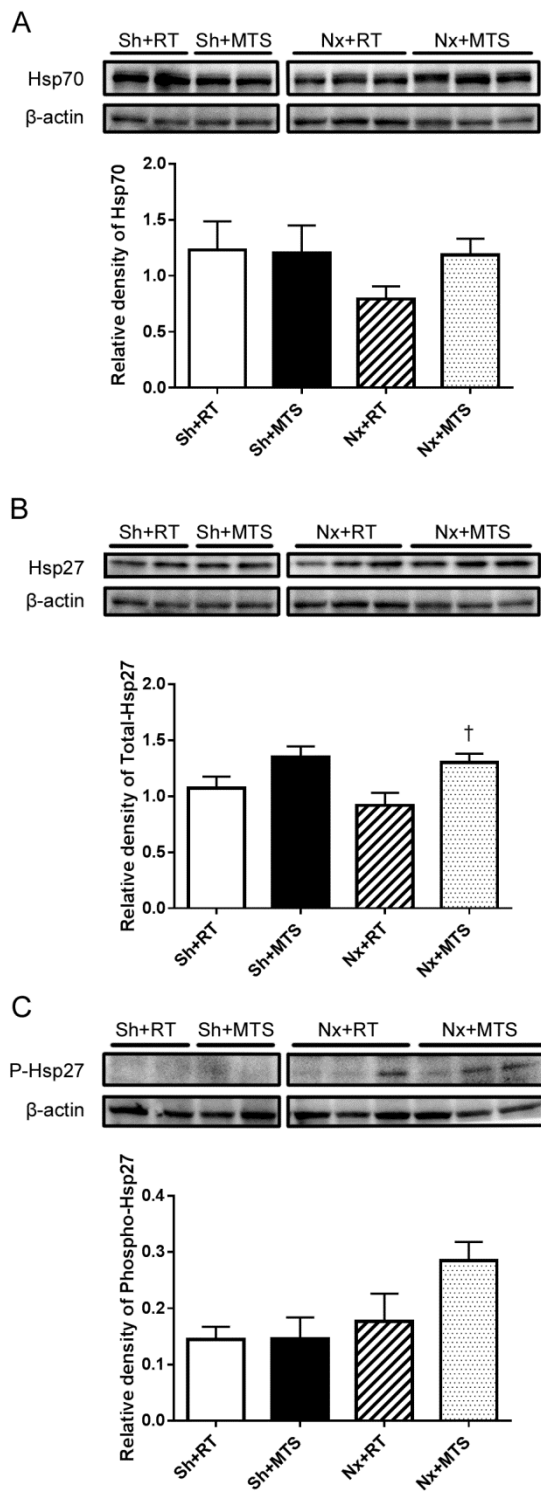


Fig. 10. 残存腎における熱ショックタンパクの発現。(A) 腎組織での Hsp70 は 5/6 腎摘によって減少傾向を示したが、温熱刺激によって維持される傾向が認められた。(B) 温熱刺激は Sh+MTS と Nx+MTS の両群において Hsp27 を増加させた。(C) Hsp27 のリン酸化は温熱刺激を行った残存腎で増加する傾向を認めたが、偽手術群では認められなかった。数値は平均値 \pm SEM ($n = 4-6$)。† $P < 0.05$ (vs. Nx+RT)。

MTSによる残存腎での p38 MAPK と Akt のリン酸化の増加

最後に、MTSによるHsp27のリン酸化を含む機序を検討するために、Hsp27の制御に関与しているp38 MAPKとAktのリン酸化を残存腎で解析した(6, 11)。MTSによって、腎組織でのp38 MAPKのリン酸化($P < 0.01$ vs. Sh+RT)とAktのリン酸化($P = 0.06$ vs. Sh+RT)が増加することが明らかとなった(Fig. 11)。さらに、p38 MAPK-Akt経路の下流にあるeNOS mRNAの発現を検討したところ、MTSにより偽手術群と残存腎の両者において増加する傾向を認めた(Fig. 12)。

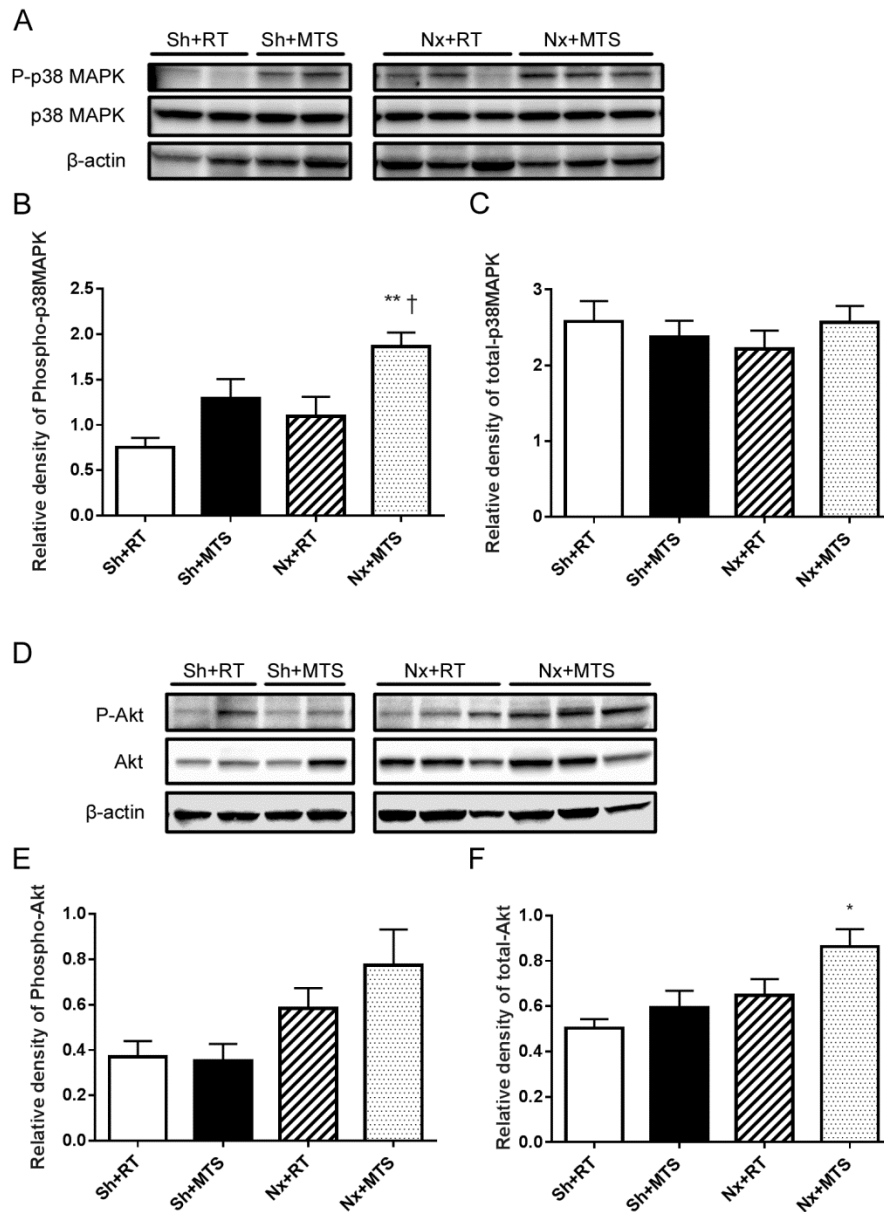


Fig. 11. 残存腎における p38 MAPK と Akt に対する温熱刺激の効果。(A-C) 残存腎における p38MAPK の発現。温熱刺激は Sh+MTS と Nx+MTS の両群の腎組織での p38MAPK のリン酸化を増加させたが、total p38 MAPK の発現には影響しなかった。(D-F) 残存腎における Akt の発現。温熱刺激は 5/6 腎摘群の残存腎における total Akt およびリン酸化 Akt の発現を増加させたが、偽手術群では認められなかった。数値は平均値 ± SEM ($n = 4-6$)。* $P < 0.05$ (vs. Sh+RT); ** $P < 0.01$ (vs. Sh+RT); † $P < 0.05$ (vs. Nx+RT)。

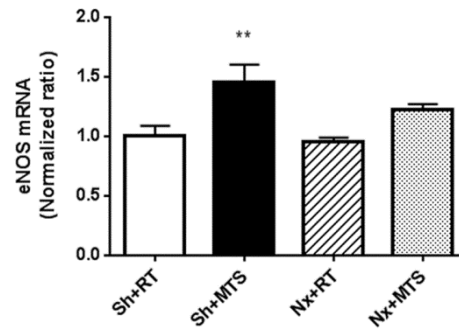


Fig. 12. 腎組織における eNOS mRNA の発現。温熱刺激によって腎組織での eNOS mRNA の発現は増加を認めた。数値は平均値 \pm SEM ($n = 5-7$)。** $P < 0.01$ (vs. Sh+RT)。

VIII. 考 察

今回の実験から、申請者らは MTS によって 5/6 腎摘除マウスモデルにおける慢性腎機能障害の進展が軽減することを明らかにした。この腎保護効果は、腎障害バイオマーカーである NGAL や酸化ストレスの減少によって示され、また HSP のアップレギュレーションとアポトーシスシグナルの減少を伴っていた。熱ストレスが尿細管傷害に対して保護作用を有することを示唆する報告は散見されていたが (4, 15, 57)、in vitro 実験で観察されたものや非生理的な加温条件によるものであった。申請者らが知る限り、今回の成績は、慢性腎機能障害に対して和温療法を模した温熱刺激を行い in vivo での腎保護効果を示した最初の報告である。

MTS は亜全摘後の腎組織における近位尿細管の膨化や刷子縁の萎縮などの尿細管傷害を改善することが示されたが、糸球体の組織学的変化については明らかな影響を与えなかった。糸球体への影響を認めなかったという点は、ヒトを用いた申請者らの以前の研究(16)、すなわち MTS が糸球体濾過量を変えずに腎血流や尿細管間質の血流を増加させたという結果とも一致するものと考えられた。一方で、今回の実験において MTS によりアルブミン尿の減少が認められた。腎組織における eNOS mRNA の発現を検討したところ、MTS によってこの発現が増加、または増加傾向を示すことを確認した。この eNOS mRNA 発現の増加は、ヒトにおける MTS による腎血漿流量増加の機序を説明しうる結果ともいえる。実際、和温療法による血管内皮機能の改善が心不全の改善に寄与することが報告されている (18)。従って、MTS が血管内皮機能に作用することで糸球体濾過バリアーに影響を与えた可能性はある。さらに、腎組織における NGAL mRNA や尿中 NGAL が MTS でおおよそ半減していた。これらの結果から、申請者らが既に示した (29, 37) ように、MTS によるアルブミン尿減少の少なくとも一部は尿細管傷害の軽減によるものであると考えられる。

アポトーシスは腎亜全摘モデルでの腎組織傷害を含んだ種々の組織傷害において、重要な役割を担っていると考えられる (45, 49, 53, 54, 62)。今回の研究においても、MTS は

カスパーゼ 3 の分解や TUNEL 染色で示されるアポトーシスシグナル亢進を改善した。Hsp70 は穏和な熱ストレスによって誘導される抗アポトーシス因子として最も知られているもののひとつである (8)。Wang らは、腎虚血傷害で Hsp70 がアポトーシス過程を規定する鍵分子として作用することを明らかにした (58)。申請者らの腎垂全摘モデルにおいて、Hsp70 は減少傾向を示し、MTS によってその回復が認められた。一方、申請者らは MTS によって Hsp27 のリン酸化が亢進することを認めた。このリン酸化修飾は Hsp27 のシャペロン活性を増強することが知られている (5, 11, 14, 21, 41)。これらを考え合わせると、腎垂全摘モデルにおける MTS の腎保護効果には、Hsp70 よりも Hsp27 が主に関与している可能性が示唆される。加えて Hsp27 はアポトーシスシグナル軽減の役割を担っている可能性がある (10, 11, 60)。注目すべきことに、最近、尿細管における Hsp27 の過剰発現がアポトーシスを抑制するとともに、オートファジーを亢進させることが報告された (32)。

酸化ストレスは、温熱刺激の効果を検討するうえでアポトーシスと並んで評価すべき重要な事項である。今回の研究において、MTS は腎組織の NOX1 および NOX4 mRNA の発現を増加させる一方、DHE 染色により評価される酸化ストレスを軽減させた。温熱療法では初期反応として ROS 産生をトリガーとし、PKC や MAPK シグナリングを介して、抗酸化作用を有する SOD や HSP などを誘導することが報告されている (22)。また、腫瘍細胞においても、温熱療法は NOX1 発現の増加と MAPK を介した NADPH の活性を誘導し、再酸素化を促進するために、低酸素誘導因子依存性経路の活性化をもたらす (36)。MTS は血清 SOD 活性には作用しなかったが、腎組織の Mn-SOD を有意に回復させた。その回復は p38 MAPK、Akt、Hsp27 の活性亢進と関連が認められた。すなわち、MTS により誘発される p38 MAPK-Akt 経路が、Hsp27 の活性化 (6, 47) を介して Mn-SOD の増加 (1) を引き起こす可能性が想定される。興味深いことに、p38 MAPK のリン酸化は偽手術群と Nx 群の両方の MTS 施行群で増加しており、Nx 群においてのみ観察された MTS による Akt 活性化には別の機序が関与している可能性が示唆された。これまで、熱負荷が IL-6 産

生を介した JAK/STAT 経路を刺激し、Hsp27 の活性化をもたらすことが示されている (7, 48)。今後、腎組織における Akt および Hsp27 活性化の詳細な機序を解明することが必要である。今回の実験によって考察された MTS による腎保護作用機序を Fig.13 に示す。

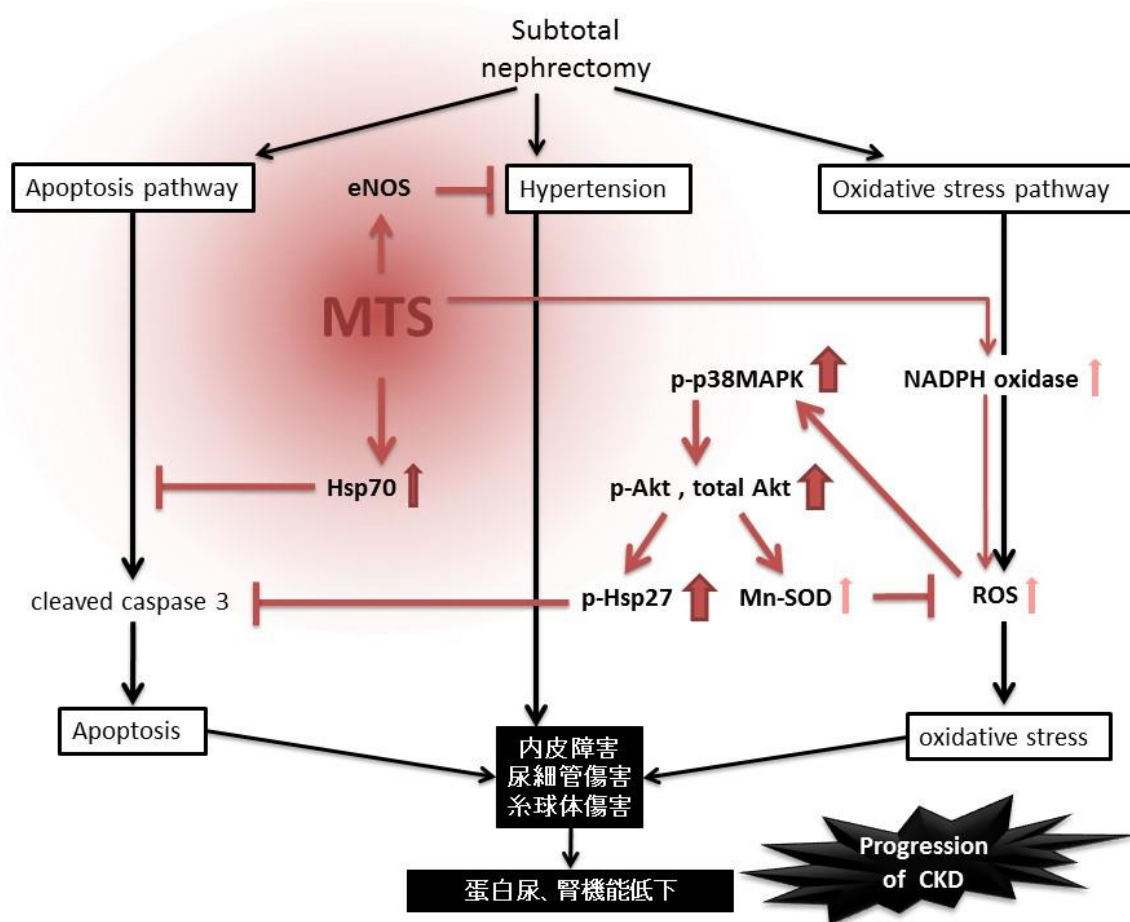


Fig. 13. MTS による腎保護作用機序を示したシェーマ。

以上より、申請者らは *in vivo* での腎全摘モデルに対する MTS の腎保護効果を示したが、その機序および評価にはいくつかの点を考慮する必要がある。第一に、実際に臨床で用いることを想定した MTS の強度や頻度を採用しているため、心臓、筋肉、神経系や代謝系などを含む他の臓器にも影響すると考えられる (9, 25, 33)。実際、心腎連関は全身の恒常性維持において重要な役割を担うことは既知の事実である (12, 24, 39)。従って、MTS が心腎連関を含めた全身性の効果を通して腎保護に作用している可能性も考えられる。また、HSP による腎保護の機序のひとつとされる免疫調節作用の可能性を除外することもで

きない (26)。さらに、全身温熱刺激は血圧を下げる傾向を有するため、MTS による降圧の影響を最小限にする目的で腎垂全摘を行った RT 群、MTS 群の両群から血圧の等しいマウスを選択し解析した。選択前後において生理学データに明らかな違いは認められなかったものの (Table 1)、今回の成績において血圧が関与した可能性とともに、選択バイアスを完全に排除することは困難と思われる。

IX. 結 語

穏和な全身温熱刺激が腎亜全摘モデルマウスの腎障害進展に対して、酸化ストレスやアポトーシスシグナルの軽減を介して腎保護的に作用することが示された。今後、温熱治療は、CKD 患者に対する理学療法の新たな可能性のひとつとして、大いに期待される。

X. 参考文献

1. Banerjee Mustafi S, Chakraborty PK, Dey RS, Raha S. Heat stress upregulates chaperone heat shock protein 70 and antioxidant manganese superoxide dismutase through reactive oxygen species (ROS), p38MAPK, and Akt. *Cell Stress Chaperones* 14: 579-589, 2009.
2. Borges JC, Ramos CH. Protein folding assisted by chaperones. *Protein Pept Lett* 12: 257-261, 2005.
3. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ, Broere F, van der Zee R, Bonorino C, van Eden W. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol* 3: 95, 2012.
4. Borkan SC, Wang YH, Lieberthal W, Burke PR, Schwartz JH. Heat stress ameliorates ATP depletion-induced sublethal injury in mouse proximal tubule cells. *Am J Physiol* 272: F347-355, 1997.
5. Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2: 645-652, 2000.
6. Dorion S, Landry J. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathways by heat shock. *Cell Stress Chaperones* 7: 200-206, 2002.
7. Evans SS, Repasky EA, Fisher DT. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat Rev Immunol* 15: 335-349, 2015.
8. Flanagan SW, Ryan AJ, Gisolfi CV, Moseley PL. Tissue-specific HSP70 response in animals undergoing heat stress. *Am J Physiol* 268: R28-32, 1995.
9. Fujita S, Ikeda Y, Miyata M, Shinsato T, Kubozono T, Kuwahata S, Hamada N, Miyauchi T, Yamaguchi T, Torii H, Hamasaki S, Tei C. Effect of Waon therapy on oxidative stress in chronic heart failure. *Circ J* 75: 348-356, 2011.
10. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13: 1423-1433, 2006.
11. Havasi A, Li Z, Wang Z, Martin JL, Botla V, Ruchalski K, Schwartz JH, Borkan SC. Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem* 283: 12305-12313, 2008.

12. Hayakawa S, Ohashi K, Shibata R, Kataoka Y, Miyabe M, Enomoto T, Joki Y, Shimizu Y, Kambara T, Uemura Y, Yuasa D, Ogawa H, Matsuo K, Hiramatsu-Ito M, van den Hoff MJ, Walsh K, Murohara T, Ouchi N. Cardiac myocyte-derived follistatin-like 1 prevents renal injury in a subtotal nephrectomy model. *J Am Soc Nephrol* 26: 636-646, 2015.
13. Hayata M, Kakizoe Y, Uchimura K, Morinaga J, Yamazoe R, Mizumoto T, Onoue T, Ueda M, Shiraishi N, Adachi M, Miyoshi T, Sakai Y, Tomita K, Kitamura K. Effect of a serine protease inhibitor on the progression of chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 303: F1126-1135, 2012.
14. Hayes D, Napoli V, Mazurkie A, Stafford WF, Graceffa P. Phosphorylation dependence of hsp27 multimeric size and molecular chaperone function. *J Biol Chem* 284: 18801-18807, 2009.
15. Healy DA, Daly PJ, Docherty NG, Murphy M, Fitzpatrick JM, Watson RW. Heat shock-induced protection of renal proximal tubular epithelial cells from cold storage and rewarming injury. *J Am Soc Nephrol* 17: 805-812, 2006.
16. Iiyama J, Horikiri Y, Kawahira K, Tanaka N. The effects of warm water bathing on renal function. *J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med* 66: 85-90, 2003.
17. Ikeda Y, Biro S, Kamogawa Y, Yoshifuku S, Eto H, Orihara K, Kihara T, Tei C. Repeated thermal therapy upregulates arterial endothelial nitric oxide synthase expression in Syrian golden hamsters. *Jpn Circ J* 65: 434-438, 2001.
18. Ikeda Y, Biro S, Kamogawa Y, Yoshifuku S, Eto H, Orihara K, Yu B, Kihara T, Miyata M, Hamasaki S, Otsuji Y, Minagoe S, Tei C. Repeated sauna therapy increases arterial endothelial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in cardiomyopathic hamsters. *Circ J* 69: 722-729, 2005.
19. Imamura M, Biro S, Kihara T, Yoshifuku S, Takasaki K, Otsuji Y, Minagoe S, Toyama Y, Tei C. Repeated thermal therapy improves impaired vascular endothelial function in patients with coronary risk factors. *J Am Coll Cardiol* 38: 1083-1088, 2001.
20. Ito S, Nagasawa T, Abe M, Mori T. Strain vessel hypothesis: a viewpoint for linkage of albuminuria and cerebro-cardiovascular risk. *Hypertens Res* 32: 115-121, 2009.

21. Jovceviski B, Kelly MA, Rote AP, Berg T, Gastall HY, Benesch JL, Aquilina JA, Ecroyd H. Phosphomimics destabilize Hsp27 oligomeric assemblies and enhance chaperone activity. *Chem Biol* 22: 186-195, 2015.
22. Joyeux-Faure M, Arnaud C, Godin-Ribuot D, Ribuot C. Heat stress preconditioning and delayed myocardial protection: what is new? *Cardiovasc Res* 60: 469-477, 2003.
23. Kanter GS. Glomerular filtration and renal plasma flow during hyperthermia. *Am J Physiol* 198: 1044-1048, 1960.
24. Kasahara M, Mukoyama M, Sugawara A, Makino H, Suganami T, Ogawa Y, Nakagawa M, Yahata K, Goto M, Ishibashi R, Tamura N, Tanaka I, Nakao K. Ameliorated glomerular injury in mice overexpressing brain natriuretic peptide with renal ablation. *J Am Soc Nephrol* 11: 1691-1701, 2000.
25. Kihara T, Biro S, Imamura M, Yoshifuku S, Takasaki K, Ikeda Y, Otuji Y, Minagoe S, Toyama Y, Tei C. Repeated sauna treatment improves vascular endothelial and cardiac function in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 39: 754-759, 2002.
26. Kim MG, Jung Cho E, Won Lee J, Sook Ko Y, Young Lee H, Jo SK, Cho WY, Kim HK. The heat-shock protein-70-induced renoprotective effect is partially mediated by CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Kidney Int* 85: 62-71, 2014.
27. Kondo T, Ono K, Kitano S, Matsuyama R, Goto R, Suico MA, Kawasaki S, Igata M, Kawashima J, Motoshima H, Matsumura T, Kai H, Araki E. Mild electrical stimulation with heat shock reduces visceral adiposity and improves metabolic abnormalities in subjects with metabolic syndrome or type 2 diabetes: Randomized crossover trials. *EBioMedicine* 1: 80-89, 2014.
28. Kondo T, Sasaki K, Matsuyama R, Morino-Koga S, Adachi H, Suico MA, Kawashima J, Motoshima H, Furukawa N, Kai H, Araki E. Hyperthermia with mild electrical stimulation protects pancreatic beta-cells from cell stresses and apoptosis. *Diabetes* 61: 838-847, 2012.
29. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Yoshioka T, Ogawa Y, Imamaki H, Kusakabe T, Ebihara K, Omata M, Satoh N, Sugawara A, Barasch J, Nakao K. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules,

- and distal nephrons. *Kidney Int* 75: 285-294, 2009.
30. Kuwahata S, Miyata M, Fujita S, Kubozono T, Shinsato T, Ikeda Y, Hamasaki S, Kuwaki T, Tei C. Improvement of autonomic nervous activity by Waon therapy in patients with chronic heart failure. *J Cardiol* 57: 100-106, 2011.
 31. Matsuda M, Hoshino T, Yamashita Y, Tanaka K, Maji D, Sato K, Adachi H, Sobue G, Ihn H, Funasaka Y, Mizushima T. Prevention of UVB radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70. *J Biol Chem* 285: 5848-5858, 2010.
 32. Matsumoto T, Urushido M, Ide H, Ishihara M, Hamada-Ode K, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Taguchi T, Horino T, Fujimoto S, Terada Y. Small heat shock protein beta-1 (HSPB1) is upregulated and regulates autophagy and apoptosis of renal tubular cells in acute kidney injury. *PLoS One* 10: e0126229, 2015.
 33. McCarty MF, Barroso-Aranda J, Contreras F. Regular thermal therapy may promote insulin sensitivity while boosting expression of endothelial nitric oxide synthase--effects comparable to those of exercise training. *Med Hypotheses* 73: 103-105, 2009.
 34. Metcalfe W. How does early chronic kidney disease progress? A background paper prepared for the UK Consensus Conference on early chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 22 Suppl 9: ix26-30, 2007.
 35. Miyata M, Tei C. Waon therapy for cardiovascular disease: innovative therapy for the 21st century. *Circ J* 74: 617-621, 2010.
 36. Moon EJ, Sonveaux P, Porporato PE, Danhier P, Gallez B, Batinic-Haberle I, Nien YC, Schroeder T, Dewhirst MW. NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) via the ERK pathway after hyperthermia treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20477-20482, 2010.
 37. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, Schmidt-Ott KM, Chen X, Li JY, Weiss S, Mishra J, Cheema FH, Markowitz G, Suganami T, Sawai K, Mukoyama M, Kunis C, D'Agati V, Devarajan P, Barasch J. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 115: 610-621, 2005.

38. Morino S, Kondo T, Sasaki K, Adachi H, Suico MA, Sekimoto E, Matsuda T, Shuto T, Araki E, Kai H. Mild electrical stimulation with heat shock ameliorates insulin resistance via enhanced insulin signaling. *PLoS One* 3: e4068, 2008.
39. Niu P, Shindo T, Iwata H, Iimuro S, Takeda N, Zhang Y, Ebihara A, Suematsu Y, Kangawa K, Hirata Y, Nagai R. Protective effects of endogenous adrenomedullin on cardiac hypertrophy, fibrosis, and renal damage. *Circulation* 109: 1789-1794, 2004.
40. Park SW, Chen SW, Kim M, D'Agati VD, Lee HT. Human heat shock protein 27-overexpressing mice are protected against acute kidney injury after hepatic ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F885-894, 2009.
41. Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Sanchez-Lopez E, Ruiz-Ortega M, Benito-Martin A, Saleem MA, Mathieson PW, Mezzano S, Egido J, Ortiz A. HSP27/HSPB1 as an adaptive podocyte antiapoptotic protein activated by high glucose and angiotensin II. *Lab Invest* 92: 32-45, 2012.
42. Santoro MG. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol* 59: 55-63, 2000.
43. Sanz AB, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. Mechanisms of renal apoptosis in health and disease. *J Am Soc Nephrol* 19: 1634-1642, 2008.
44. Schlesinger MJ. Heat shock proteins. *J Biol Chem* 265: 12111-12114, 1990.
45. Shimizu A, Masuda Y, Kitamura H, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N. Apoptosis in progressive crescentic glomerulonephritis. *Lab Invest* 74: 941-951, 1996.
46. Sobajima M, Nozawa T, Shida T, Ohori T, Suzuki T, Matsuki A, Inoue H. Repeated sauna therapy attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in rats by increasing coronary vascularity of noninfarcted myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H548-554, 2011.
47. Son TW, Yun SP, Yong MS, Seo BN, Ryu JM, Youn HY, Oh YM, Han HJ. Netrin-1 protects hypoxia-induced mitochondrial apoptosis through HSP27 expression via DCC- and integrin alpha6beta4-dependent Akt, GSK-3beta, and HSF-1 in mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis* 4: e563, 2013.
48. Song H, Ethier SP, Dziubinski ML, Lin J. Stat3 modulates heat shock 27kDa protein expression

- in breast epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 143-150, 2004.
49. Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, Yamasaki Y, Ota A. Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int* 49: 103-111, 1996.
50. Tei C. Waon therapy: soothing warmth therapy. *J Cardiol* 49: 301-304, 2007.
51. Tei C, Horikiri Y, Park JC, Jeong JW, Chang KS, Toyama Y, Tanaka N. Acute hemodynamic improvement by thermal vasodilation in congestive heart failure. *Circulation* 91: 2582-2590, 1995.
52. Tei C, Shinsato T, Miyata M, Kihara T, Hamasaki S. Waon therapy improves peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol* 50: 2169-2171, 2007.
53. Thomas GL, Yang B, Wagner BE, Savill J, El Nahas AM. Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 13: 2216-2226, 1998.
54. Truong LD, Petrusevska G, Yang G, Gurpinar T, Shappell S, Lechago J, Rouse D, Suki WN. Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy. *Kidney Int* 50: 200-207, 1996.
55. Umehara M, Yamaguchi A, Itakura S, Suenaga M, Sakaki Y, Nakashiki K, Miyata M, Tei C. Repeated waon therapy improves pulmonary hypertension during exercise in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *J Cardiol* 51: 106-113, 2008.
56. Walter S, Buchner J. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl* 41: 1098-1113, 2002.
57. Wang Y, Knowlton AA, Christensen TG, Shih T, Borkan SC. Prior heat stress inhibits apoptosis in adenosine triphosphate-depleted renal tubular cells. *Kidney Int* 55: 2224-2235, 1999.
58. Wang Z, Gall JM, Bonegio RG, Havasi A, Hunt CR, Sherman MY, Schwartz JH, Borkan SC. Induction of heat shock protein 70 inhibits ischemic renal injury. *Kidney Int* 79: 861-870, 2011.
59. 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* 117: 2847-2859, 2007.
60. Xanthoudakis S, Nicholson DW. Heat-shock proteins as death determinants. *Nat Cell Biol* 2: E163-165, 2000.
61. Yamada K, Miwa T, Liu J, Nangaku M, Song WC. Critical protection from renal ischemia

- reperfusion injury by CD55 and CD59. *J Immunol* 172: 3869-3875, 2004.
62. Yang B, Johnson TS, Thomas GL, Watson PF, Wagner B, Skill NJ, Haylor JL, El Nahas AM. Expression of apoptosis-related genes and proteins in experimental chronic renal scarring. *J Am Soc Nephrol* 12: 275-288, 2001.
63. Zheng F, Striker GE, Esposito C, Lupia E, Striker LJ. Strain differences rather than hyperglycemia determine the severity of glomerulosclerosis in mice. *Kidney Int* 54: 1999-2007, 1998.
64. Zhou H, Kato A, Yasuda H, Odamaki M, Itoh H, Hishida A. The induction of heat shock protein-72 attenuates cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Pflugers Arch* 446: 116-124, 2003.