

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19464

研究課題名(和文)腎ミネラルコルチコイド受容体の糖鎖修飾による高血圧および腎障害発症機構の解明

研究課題名(英文)The role of glycosylation of renal mineralocorticoid receptor in hypertension and renal dysfunction.

研究代表者

武田 彩乃(TAKEDA, Ayano)

慶應義塾大学・保健管理センター(日吉)・講師

研究者番号：90468497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミネラルコルチコイド受容体(MR)の糖鎖修飾(O-GlcNAc修飾)が血圧や尿蛋白などの病態形成に与える影響を明らかにすることを目的とし、腎系球体ポドサイトおよび腎尿細管においてO-GlcNAc転移酵素(OGT)を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作成し、その表現型解析を行った。腎尿細管におけるOGT過剰発現モデルにおいて、腎組織におけるMR活性が亢進しており、MRの糖鎖修飾(O-GlcNAc修飾)が、糖尿病における「MR関連高血圧」の病態形成の一機序を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established podocyte-specific and renal tubule-specific O-GlcNAc transferase (OGT) transgenic mouse models and analyzed their phenotypes to elucidate the effect of glycosylation of mineralocorticoid receptor (MR) in hypertension and renal dysfunction. MR activity examined in kidney tissues was enhanced in renal tubule-specific OGT transgenic mice, which suggested that the glycosylation of MR could be involved in the underlying mechanism of “MR-associated hypertension” in diabetes.

研究分野：腎臓内分泌

キーワード：ミネラルコルチコイド受容体(MR) 糖鎖修飾 OGT(O-GlcNAc転移酵素) 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

RALES 研究 (N Eng J Med 341: 709-717, 1999) や EPHEsus 研究 (N Eng J Med 348: 1309-1321, 2003) など多くの大規模臨床研究の結果から、心不全や高血圧などの病態生理にミネラルコルチコイド受容体 (MR) の活性化が非常に重要な役割を担うことが明らかとなっている。さらに近年、糖尿病や肥満、慢性腎臓病などに合併する治療抵抗性高血圧の患者の一部で、高アルドステロン血症を呈さないにも関わらず MR 拮抗薬の併用により著明な血圧のコントロールが得られ、尿蛋白が減少する症例が存在することから、何等かの MR の病的活性化機構の関与が示唆され、我々はこのような病態を「MR 関連高血圧」という新しい概念で提唱してきた (Shibata et al: Am J Hypertens, 2012)。

MR は腎尿細管やポドサイト、大腸などの上皮細胞に発現し、アルドステロン依存性に活性化され、腎尿細管においては ENaC や SGK-1 などの標的遺伝子の発現促進を介してナトリウム再吸収を促進し血圧を上昇させるリガンド依存性の核内受容体型転写因子として作用することが知られている。実際の転写調節の場においては、MR に相互作用する転写共役因子と呼ばれる蛋白質群が様々な酵素活性を発揮して転写調節の中心的な役割を果たしていることが推測されており、この転写共役因子による転写活性制御が「MR 関連高血圧」病態形成のメカニズムの1つとされている。

これまで進めてきた新規 MR 相互作用因子スクリーニングにおいて、得られたサンプルを LC-MS/MS 質量分析に供し蛋白同定を試み、多くの同定蛋白質の中から O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) に着目した。OGT は糖鎖転移酵素活性によりヒストン (Nature 480: 557-60, 2011) など多くの標的蛋白に糖鎖修飾をかけることで転写調節などの機能制御に関与することが知られているのみならず、糖鎖修飾は細胞内の糖濃度上昇により促進されるため (Diabetes Metab 36: 423-435, 2010)、糖尿病の病態生理に果たす役割が注目されている。糖尿病では、その病期が進行するにつれ高血圧や尿蛋白、腎障害を発症するため、これらの合併症に OGT による MR 活性化が関与する可能性を検討した。

まず in vitro において研究を進めた結果、OGT が MR に相互作用し、MR の 295、298、299 番目のセリン残基が OGT によって糖鎖修飾を受けると MR が活性化される機構を明らかにした。さらに in vivo においても、2 型糖尿病モデルである 9 週齢の db/db マウスでは、対照群と比較し、腎や大腸組織における糖鎖修飾蛋白量の上昇や MR 活性化が示され、以上から 2 型糖尿病において OGT を介した MR 活性化メカニズムが糖尿病合併症や「MR 関連高血圧」の病態生理に関わる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

これまでの検討から、MR が O-GlcNAc 修飾を受けることにより活性化されることが確認されたため、本研究では、MR の O-GlcNAc 修飾が血圧や尿蛋白などの病態形成に与える影響を明らかにすることを目的とする。具体的には、腎系球体ポドサイトおよび腎尿細管において OGT を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作成し、その表現型解析を行うことで、血圧および尿蛋白に糖鎖修飾が与える影響を観察し、それが MR 活性化を介しているかを確認する。さらに、本マウスに糖尿病を誘発し、同様に血圧や尿蛋白に対する糖鎖修飾の影響および MR 活性化の関与を評価する。

3. 研究の方法

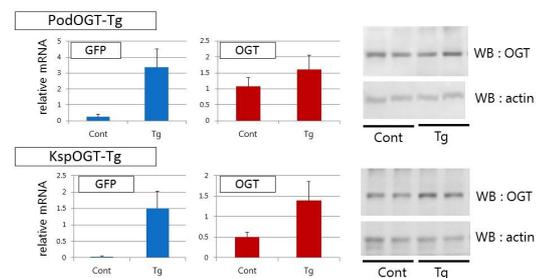
(1) OGT の腎系球体上皮特異的トランスジェニックマウスおよび腎尿細管特異的トランスジェニックマウスを、それぞれ Podocin および Ksp1 遺伝子のプロモーターを用いて作成し、血圧・体重、採血・畜尿データ、組織像・組織を用いた MR 標的遺伝子 mRNA 発現定量などの表現型解析を行った。

(2) これらの組織特異的 OGT 過剰発現マウスにおいて、ストレプトゾトシン (以下、STZ) により糖尿病を誘発し、同様の表現型解析を行った。

4. 研究成果

Podocin プロモーターを用いた腎系球体上皮特異的 OGT 過剰発現マウス (以下、PodOGT-Tg) および Ksp1 プロモーターを用いた腎尿細管特異的 OGT 過剰発現マウス (以下、KspOGT-Tg) の作出を行い、GFP をトレーサーとして、OGT 発現の高いラインの選定を行った (図 1)。

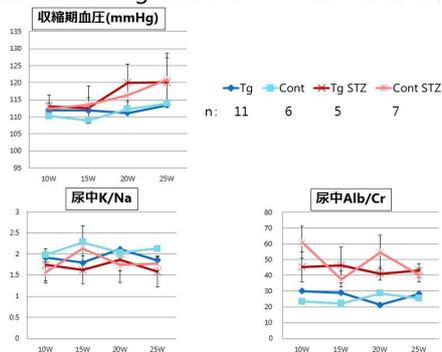
図1 腎臓におけるOGT過剰発現の確認



PodOGT-Tg は、STZ 非投与下において、血圧、尿中 K 排泄、尿中アルブミンいずれにおいても、コントロールマウス (以下、control) と群間差は認められなかった。STZ 投与下では、両群において尿アルブミンの上昇を認めしたが、両群間での差は見られなかった (図 2)。

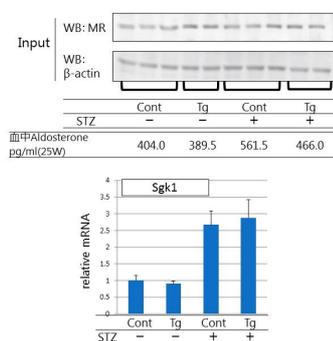
さらに 25 週齢において、採血および組織抽出を行い、MR 活性の評価を行った。PodOGT-Tg は、control と比べ、血中アルドステロン値に有意差はなく、また組織にお

図2 PodOGT-Tgにおける血圧・尿所見の推移



る MR 発現および MR 標的遺伝子である Sgk1 発現も変化を認めなかった。STZ 投与下では、血中アルドステロンの上昇に伴い、両群において Sgk-1 発現の上昇を認めたが、両群間で有意な差は認められなかった (図 3)。この結

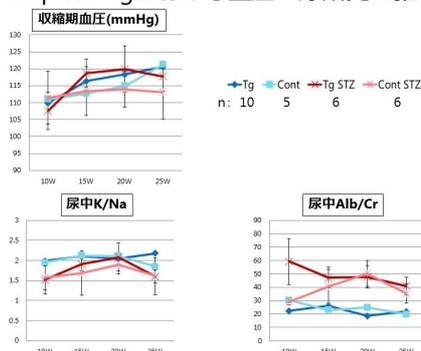
図3 腎組織におけるMR活性 (PodOGT-Tg)



果の解釈として、ポドサイトにおいては、尿管に比べ MR 発現が低いことが知られており、ポドサイトにおける OGT 過剰発現 (糖鎖修飾促進) では、MR への影響が検出できなかったと考えている。

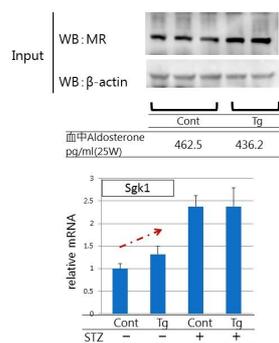
一方、KspOGT-Tg では、STZ 非投与下および投与下群いずれにおいても、control に比べ血圧高値傾向を認め、また STZ 投与下においては、尿中 K 排泄も亢進している傾向を認め、MR 活性の亢進が示唆された。PodOGT-Tg と同様に、STZ 投与により尿アルブミンの上昇を認めたが、上昇の程度に KspOGT-Tg と control の群間で有意差は見られなかった (図 4)。

図4 KspOGT-Tgにおける血圧・尿所見の推移



さらに、25 週齢における腎組織 MR 活性の評価では、STZ 非投与下 KspOGT-Tg において、血中アルドステロン値の上昇がないにもかかわらず、Sgk-1 発現の上昇がみられ、本モデルマウスにおける MR 活性亢進が確認された。KspOGT-Tg では、ウエスタンブロットにおいて MR 蛋白発現の上昇も確認され、背景機序として、MR 蛋白安定化が MR 活性亢進をもたらしていることが示唆された。このことは、MR が O-GlcNAc 修飾を受けることにより蛋白が安定化しその感受性が亢進するという、invitro 解析の結果と整合性のある結果であった。STZ 投与下では、血中アルドステロン上昇による Sgk-1 発現の上昇が KspOGT-Tg および control 両群においてみられ、両群間に有意差は認めなかった (図 5)。

図5 腎組織におけるMR活性 (KspOGT-Tg)



以上より、尿管における MR は、OGT 過剰発現によりその糖鎖修飾 (O-GlcNAc 修飾) が促進されるとその活性が亢進し、血圧調節等に寄与すると考えられ、糖尿病における「MR 関連高血圧」の病態形成の一機序を担っている可能性が示唆された。

今後の課題としては、まず MR の O-GlcNAc 修飾亢進の検出系の確立が求められる。また KspOGT-Tg の表現型が、MR 作用を介したものであることを検証するために、MR 拮抗薬投与により病態の改善が認められるかの確認も求められる。さらに、本モデルマウスでは、尿アルブミン等の臓器障害の差までは表現型として見られておらず、今後、臓器障害を引き起こすより強い負荷をかけて、表現型を評価する必要があると考えている。

今回の研究に用いたモデルマウスは、GFP のトレーサーを用いた評価では、OGT の過剰発現の程度が非常に高いことが確認できているが、OGT は内因性発現もかなり高く、control 群との OGT 発現レベルの差は 2 倍程度となっている。この発現レベルの差を拡大することで、より強い表現型が得られる可能性も考え、今後の検討として、尿管特異的 OGT 欠損マウスを作成し、その表現系解析を通じて、MR の O-GlcNAc 修飾の生体における意義を評価することも計画している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計6件)

Nakamura T, Kurihara I, Kobayashi S, Yokota K, Murai-Takeda A, Mitsuishi Y, Kohata N, Oshima Y, Gunther Schutz, Shibata H, Itoh H. Essential role of intestinal epithelial mineralocorticoid receptor in the regulation of sodium absorption and blood pressure.

The 26th Scientific Meetings of the International Society of Hypertension.

2016年9月24日~29日・Soul, Korea.

中村俊文、武田彩乃、栗原勲、小林佐紀子、横田健一、伊藤裕・腎MRの糖鎖修飾を介した高血圧および腎障害発症機構の探索.第34回内分泌代謝学サマーセミナー.2016年7月14日~16日・久山温泉ホテル夢家・福岡県久山町

盛崎瑞葉、栗原勲、小林佐紀子、横田健一、武田彩乃、三石木綿子、高畑尚、大嶋洋佑、伊藤裕・塩分調節下高脂肪食負荷マウスにおけるアルドステロン分泌とMR標的遺伝子の検討.第34回日本肥満症治療学会学術集会.2016年7月1日~2日・東京コンベンションホール・東京都中央区

栗原勲、大山貴子、小林佐紀子、横田健一、武田彩乃、三石木綿子、城理絵、中村俊文、盛崎瑞葉、柴田洋孝、伊藤裕・原発性アルドステロン症の病態と内臓脂肪量の関連性の検討.第34回日本肥満症治療学会学術集会.2016年7月1日~2日・東京コンベンションホール・東京都中央区

Morisaki M, Kurihara I, Kobayashi S, Yokota K, Murai-Takeda A, Jo R, Mitsuishi Y, Namakura T, Kohata N, Oshima Y, Shibata H, Itoh H. Aldosterone secretion and MR sensitivity in high fat diet mice under equally-adjusted salt intake. The 41st International Aldosterone Conference.

2016年3月30日~31日・Boston, U.S.A.

Nakamura T, Kurihara I, Kobayashi S, Yokota K, Murai-Takeda A, Jo R, Mitsuishi Y, Morisaki M, Kohata N, Oshima Y, Shibata H, Itoh H. Intestinal epithelial Mineralocorticoid receptor regulates blood pressure through colonic ENaC-mediated sodium absorption. 2016年3月30日~31日・The 41st International Aldosterone Conference. Boston, U.S.A.

慶應義塾大学・保健管理センター・専任講師

研究者番号：90468497

6. 研究組織

(1)研究代表者

武田 彩乃 (TAKEDA, Ayano)