

令和元年5月22日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09609

研究課題名(和文) MKおよび血管拡張因子EETsを介した腎・血圧調節機構の解明と新規降圧療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel antihypertensive therapy with tissue protection in renal and cardiovascular diseases through elucidation of MK-EETs blood pressure regulation mechanism

研究代表者

加藤 佐和子 (Kato, sawako)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：80625757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多光子共焦点レーザー顕微鏡A1R MP (Nikon)を用いた生体深部にいたる観察を目的としたシステムにおいて、血管収縮作用をもつepoxyeicosatrienoic acids (EETs) 阻害剤やアデノシン阻害剤を投与するとMidkine(MK)欠損型マウスは、血管が収縮し、血圧の上昇とともに血流量の低下や血管径の収縮が確認できた。また、血流速度は上昇していた。一方で、交感神経系評価のためニコチンアセチルコリン受容体阻害薬をMK欠損型マウスに投与した結果、血圧が下降し、血流量の増加を示した。MKは血管拡張因子を介して腎・血圧調節を行うことが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧症は腎硬化症を引き起こし、ひいては末期腎不全に至り、血液浄化療法を必要とする。現在の降圧剤は血管平滑筋に作用し、血管拡張作用を促すCa拮抗薬やRenin-angiotensin系阻害を促すACE阻害剤やARBといった薬剤が主流である。本研究では、血管拡張因子を介して血管拡張を調整する新規分子としてMidkineの血圧調整についてその有用性と根底にある機序を解明した。今後、新規降圧療法の一助となると考える。

研究成果の概要(英文)：In a system aiming at deep observation of the living body using multiphoton confocal laser microscope A1R MP (Nikon), administration of epoxy eicosatrienoic acids (EETs) inhibitor and adenosine inhibitor, induced the vasoconstrictive action in Midkine (MK) deficient mice. The blood vessels were contracted and blood flow was decreased, as blood pressure increased. The blood flow rate was rising. On the other hand, when a nicotinic acetylcholine receptor inhibitor was administered to evaluate the sympathetic nervous system, blood pressure dropped in MK deficient mice, indicating an increase in blood flow. MK has been shown to regulate renal and blood pressure via a vasodilator.

研究分野：腎臓分野

キーワード：Midkine 血管拡張因子 EETs

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)、心血管疾患(CVD)などにおいては、内皮障害 高血圧の悪循環を繰り返しながら臓器障害が悪化していく。血管内皮細胞は血管収縮作用や血管拡張作用をもつ種々の液性因子を分泌し、これらのバランスにより vascular tone を制御している。

血管内皮細胞由来の液性因子のうち、血管拡張作用をもつものとして、特に内皮細胞依存性過分極因子(EDHF) で CYP450 由来の epoxyeicosatrienoic acids (EETs) に注目した。EETs は NO や PG12 に継ぐ第 3 の血管拡張因子として世界的に注目を集めているが、生体内での制御方法や詳細な機能解析の研究は立ち遅れている。また、EETs は直接的な血管拡張機能以外に、近位尿細管での Na^+/H^+ exchanger を活性化、Ang の利尿作用発現におけるメッセンジャーの役割、皮質集合管においてアミロライド感受性チャネルのイオン輸送を阻害など、Na 排泄の関与が報告されている。この作用により体内に Na 貯留が起こり高血圧症や心不全を惹起する。これらの多彩な機能を持つ EETs の作用機序を解明することで、CKD や CVD を制御する今までにない新たな治療法や診断法を開発することに繋がる。ミッドカイン (MK) は癌の進展、神経の生存と分化、炎症などに関与する成長因子で、我々は虚血性腎症や糖尿病性腎症の進展に関与することを報告してきた。加えて、MK は血圧調節に深く関与しており、我々は 5/6 腎摘モデルを用いて、MK が肺血管内皮細胞のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の分泌を亢進し、高血圧に寄与することを報告した。これらの知見を更に発展させ、L-NAME 投与による内皮障害モデルを作成し MK を介した血管拡張因子 EETs の抑制により血圧上昇を調節していることを世界で初めて解明した。

以上より、MK が全身血圧の調節や CKD・CVD の進展に EETs を介して深く関与していることが判明した。

2. 研究の目的

MK-EETs 経路が 微小血管内皮障害において RAS と共にどのような腎血行動態変化を呈するか検証し、治療標的分子の同定を行なう。高血圧・心不全の原因となる Na 貯留・排泄にいかに関与するかを検証し、MK-EETs 経路における腎・心血管病変に対する予後判定 Biomarker の同定を目指す。

3. 研究の方法

本研究では研究目的を達成するために、以下の検証を行う。

- (1) 生体顕微鏡により PTC や糸球体の血管容積や血流をリアルタイムに観察し、随時テレメトリーシステムによる血圧測定を行う。血管調節因子や阻害薬の投与、MK-KO を用いた心不全・高血圧合併腎機能障害、I 型糖尿病、血管内皮障害モデルを作製し、リアルタイムに生体での血圧、糸球体や PTC の血管容積や血流を評価し、糸球体・間質障害の程度と共に比較検証する。
- (2) MK-EETs 系の評価のため RAS 非依存性モデルにおける血圧測定、Na 排泄量、臓器障害(腎臓、心臓など)を病理組織での解析、EETs の代謝産物と共に Na^+/H^+ exchanger、sgk-1、NHE3 を含む Na 排泄関連の分子生物学的解析を行う。
- (3) 新規血圧調節機構における治療標的の同定を通じ、腎疾患の新たなバイオマーカーの検索を行う。

4. 研究成果

以下に示す(1)~(8)の結果から MK が EETs を抑制し、血圧制御に関与する事を示した。(9)、(10)にて実験動物モデルを用いて MK 抗体の高血圧治療における有効性を実際に示し、血管内皮細胞障害修復・高血圧治療薬として特許申請した。

- (1) MK 遺伝子欠損マウス (*Mdk*^{-/-}) では NOS 阻害薬投与による血圧上昇が抑制された(図 1 L+UNx:*Mdk*^{+/+}と L+UNx:*Mdk*^{-/-}の比較)。また糸球体硬化や蛋白尿といった腎障害も軽度であった。
- (2) NO 経路は MK 欠損型マウスで野生型と比較し、有意な差を認めなかった(尿中・臓器の NO 代謝産物、腎・心・大動脈の eNOS およびそのリン酸化を検証)。
- (3) RAS および PG12 に差を認めなかった(RAS はレニン、ACE、アルドステロン、Sgk1 を検証)。
- (4) EETs 分解産物の DHETs が高血圧症を呈した MK 欠損型マウスの尿や MK 欠損型マウス由来初代培養腎血管内皮細胞の上清で、野生型モデルに比して増加していた。
- (5) EETs 阻害剤(カリプトキシシンや 14,15-EEZE)を MK 欠損マウスに投与した際、血圧

の上昇を示したが、野生型では血圧の変化を認めなかった(図 2)。MK 欠損型マウスにリコンビナント MK を投与すると野生型マウスと同様の血圧推移となった。以上より、MK 欠損型マウスでは EETs 経路の亢進が示された。

- (6) 腎臓の傍尿細管毛細血管に対して多光子生体顕微鏡 (In vivo imaging microscopy) を用いて観察。MK 欠損型マウスで EETs 阻害剤による腎血流の低下を認めた。
- (7) EETs 産生酵素である CYPmRNA 発現に MK との関連を認めなかった。しかし、アデノシン阻害剤を投与したところ EETs 阻害剤と同様に MK 欠損型マウスで血圧の上昇を示した。
- (8) 交感神経系評価のためニコチンアセチルコリン受容体阻害薬を MK 欠損型マウスに投与すると血圧が下降した。その現象は MK 欠損によって生じた EETs 亢進に伴う血圧降下を防ぐため交感神経系が補完・亢進されていた。

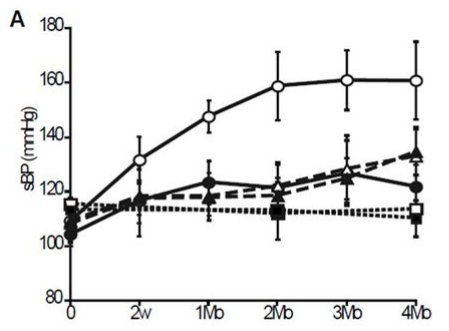
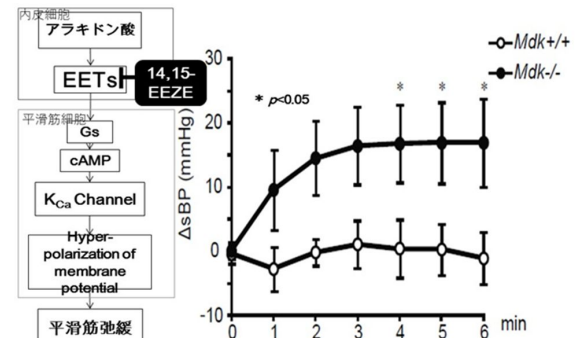


図 1 MK欠損型マウスではNOS阻害薬による血圧上昇が抑制された)



(図 2 EET阻害薬でMK欠損型マウスの血圧が上昇)

- (9) NOS 阻害剤により発症させたマウスの高血圧症は MK 抗体投与により改善した。
- (10) ヒトの尿中の EETs および MK を測定し相互関係を調べた。腎生検で腎硬化症と診断された高血圧の患者尿検体において、EETs の抑制と MK の上昇を認めた。

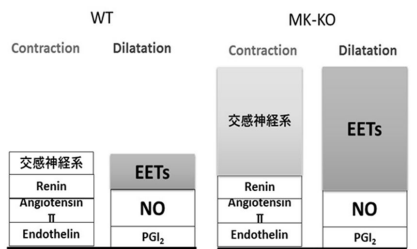
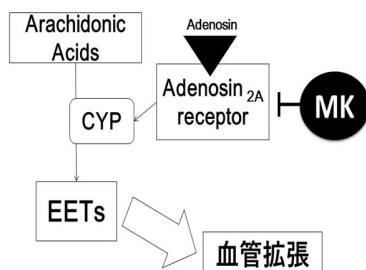
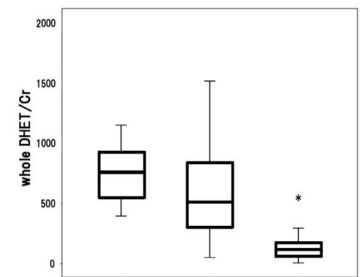


図 3 MK欠損型マウスではEETsが亢進しそれを補完するように交感神経系も亢進している



(図 4 MKはA_{2A}受容体を介してEETsを抑制している)



(図 5 腎硬化症でEET代謝産物の低下を認める)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Hayashi H, Sato W, Kosugi T, Nishimura K, Sugiyama D, Asano N, Ikematsu S, Komori K, Nishiwaki K, Kadomatsu K, Matsuo S, Maruyama S, Yuzawa Y. Efficacy of urinary midkine as a biomarker in patients with acute kidney injury. Clin Exp Nephrol. 2017 Aug;21(4):597-607. (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：湯澤 由紀夫

ローマ字氏名：(YUZAWA, yukio)

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 00191479

研究分担者氏名：丸山 彰一

ローマ字氏名：(MARUYAMA, shoichi)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 10362253

研究分担者氏名：小杉 智規

ローマ字氏名：(KOSUGI, tomoki)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 90584681

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。