

令和元年5月30日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09656

研究課題名(和文) 組織特異的遺伝子改変マウスを用いた心血管リスク管理における腸管MRの意義の解明

研究課題名(英文) In vivo analysis for impact of intestinal mineralocorticoid receptor on cardiovascular risk management

研究代表者

栗原 勲 (Kurihara, Isao)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：90338038

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)：腸管特異的Cre発現マウスであるvillin-CreマウスとMR-floxマウスを交配し、腸管特異的MR欠損マウスを作成した。本マウスの表現型解析を行い、本マウスでは、便中Na排泄が亢進していること、DOCA/salt負荷における血圧上昇が抑制されること、その機序として上皮性Naチャンネル発現の調節を介していることを明らかにした。さらに、本マウスを低塩分食下で飼育すると、Na喪失による著明な体重減少および血圧低下がみられることを明らかにした。本研究結果は、J Am Heart Assoc誌に論文投稿し、受理された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミネラルコルチコイド受容体(MR)による血圧調節作用は、これまで腎尿細管におけるMRの作用が主であると考えられてきたが、本研究に用いた腸管特異的MR欠損マウスは、腎尿細管におけるMR機能は正常であり、それでも血圧調整能に大きな変化が認められたことから、腸管MRが血圧調節において腎尿細管MRに劣らぬ高い寄与を有することが本研究を通じて明らかになった。この点は、MRの生体における機能バランスを考える上で、極めて重要な学術的意義を持つ。これまで、心血管リスク管理という視点では、注目されていなかった腸管MRに焦点をあてるきっかけとなる研究であり、今後の臨床への還元も大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：Intestinal epithelial cell-specific mineralocorticoid receptor (MR) knockout mice were generated through crossbreeding of MR-flox mice with villin-Cre mice. This model exhibited high fecal excretion of sodium and resistance to DOCA/salt-induced blood pressure elevation, in which the regulation of epithelial Na channel (ENaC) expression was mainly involved. It was also demonstrated that this model exhibited severe dehydration probably due to fecal sodium loss, which lead to significantly lower blood pressure compared with control mice. These findings were published in J Am Heart assoc.

研究分野：内分泌学

キーワード：ミネラルコルチコイド受容体(MR) 腸管 上皮性Naチャンネル(ENaC) 高血圧

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

### 1. 研究開始当初の背景

ミネラルコルチコイド受容体(以下、MR と略す)は腎の遠位尿細管~集合管に高発現しており、生体における Na の恒常性に深く関与していることが広く知られている。その拮抗薬であるスピロノラクトンおよびエプレレノンは、臨床において一般に降圧剤として使用されるが、近年の RALES (Pitt et al. N.Eng.J.Med. 1999)・EPHESUS (Pitt et al. N.Eng.J.Med. 2003)・EMPHASIS-HF (Zannad F et al. N.Eng.J.Med. 2011)といった大規模臨床研究において、MR 拮抗薬が降圧作用のみならず心血管イベント抑制、さらには生命予後をも著明に改善することが報告され、MR 作用と長寿の関係性に高い注目が集まるようになった。このように MR の生体における重要性が示される中で、腎以外での MR 機能も注目されるようになり、心筋・血管平滑筋・血管内皮・マクロファージといった他の発現部位における MR 機能解析が臓器特異的 MR 欠損マウスを用いて世界的に行われてきた(Rickard AJ, et al. Hypertension. 2012, McCurley A, et al. Nature Medicine. 2012)。しかし、現状では生命予後に直結するほどの重要な機能は明らかとなっていない。一方、これまで当教室では、MR 相互作用因子、MR の糖鎖修飾・脱 SUMO 化などによる MR の病的活性化といった研究を通して MR 機能や MR 拮抗薬の重要性を検討してきたが、その中で、腸管上皮における MR の高発現を全身臓器の mRNA 定量と免疫染色により確認し、心血管リスク管理における腸管 MR の機能に注目するに至った。

腸管 MR が腸管上皮からの Na 吸収を介して腎と同様に Na 調節に関与することはこれまでも知られているが、血圧・耐糖能などの全身性作用や遠隔臓器への作用といった、Na 動態調節以外の作用については未解明である。生体内で Na に最大限に暴露する環境にある腸管での MR 機能が、生命予後へ影響を及ぼすか否かは注目に値する。

高血圧、糖尿病をはじめとする生活習慣病は、脳卒中、虚血性心疾患、慢性腎臓病(末期腎不全を含む)などの主要疾病の基礎疾患となっており、これらに関わる医療費は、本邦国家予算の医療費支出の 8~9 割をも占めるとされている。これらの疾患への進展を未然に食い止める先制医療の必要性が叫ばれ、現在さまざまな形で、新規治療確立へのアプローチがなされている。臨床的には、糖尿病分野における大規模臨床試験(DCCT/EDIC や UKPDS)において、ある一定期間に施されたインスリン強化療法による tight な血糖のコントロールが、試験終了後も長期にわたり、細小血管障害の発症を抑え続けることが示され(NEJM 2005、NEJM 2008)、「メタボリックメモリー」(「レガシー効果」とも呼ばれる)と称され、メモリー概念の先制医療への応用が期待されている。また高血圧の分野でも、高血圧発症前(pre-hypertension)のある一定期間のみに施された RAS 系阻害薬による集中治療が、その後の高血圧発症を低下させることが示され(TROPHY 試験)(Hypertension 2004)、「アンジオテンシブブロックメモリー」として、その現象が注目されている。さらに当教室では近年、高血圧発症において塩分摂取にもメモリー現象があることを報告し(Hypertension 2014)、「ソルトメモリー」という概念で提唱している。このように、これまで様々なメモリー現象が報告・提唱されているが、メモリー現象における MR の関与についてはこれまで報告はない。

### 2. 研究の目的

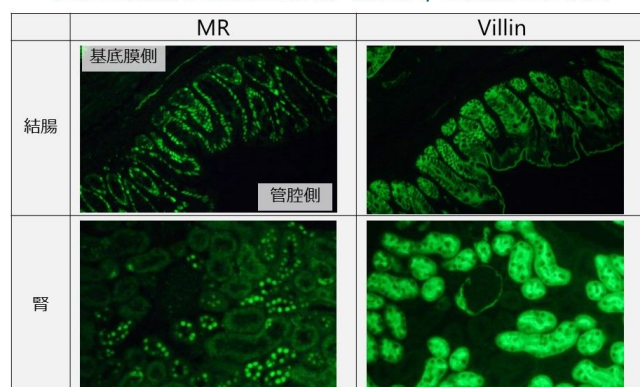
本研究では、腸管上皮特異的な MR 欠損マウスを作成し、その表現型解析を通じて、腸管における MR の生理的機能と病的活性化による生体への影響、ひいてはその拮抗作用による生命予後改善メカニズムの解明を目指すことを目的とする。また、心血管リスク管理において注目されているメモリー現象に、腸管 MR の機能がどのように関与しているかも明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

まず、腸管上皮特異的 Cre 発現トランスジェニックマウス(villin-Cre マウス)と MR flox マウスを交配させ、腸管上皮特異的 MR 欠損マウス(以下、腸管 MR-KO と略す)を作成する。また、タモキシフェン(TAM)誘導型の腸管上皮特異的 Cre 発現トランスジェニックマウス(villin-Cre ERT2 マウス)と MR flox マウスを交配させ、TAM 誘導型腸管上皮特異的 MR 欠損マウス(以下、誘導型腸管 MR-KO と略す)を作成する。

作出したマウスについて、各臓器からゲノム DNA を抽出し、PCR により腸管以外に recombination が生じていないことを確認する。villin は、腎臓にも発現することが知られている。腸管上皮では villin と MR の発現局在が一致するのに対し、腎臓では、villin は近位尿細管に、MR は遠位尿細管~集合管に発現し、両者の局在が異なるため(図 1) これらのマウスにおいては、腎臓における MR 欠損は生じないことを確認している。

図1 結腸と腎におけるMR, Villinの局在



腸管 MR-KO 群について 5 週齢時より体重・血圧・便中および尿中電解質動態の経時的な測定を行い、Control 群 (MR flox/flox マウス) と比較を行う。さらに 13 週齢時には麻酔下に解剖し、十二指腸～結腸の腸管各所に加え、他の MR 発現部位である腎・心臓・血管の形態・細胞構成などを顕微鏡下で評価した。血圧については、tail-cuff 法も用いて測定し、通常食飼育の他に、負荷として、高塩分食負荷、DOCA/salt 負荷等を行う。

誘導型腸管 MR-KO を用いた検討では、MR 発現の低下が何週間持続しているかのプロファイリングを行う。実際の検討では、TAM 投与後 4 週までは MR 発現の低下が続き、その後 8 週までには MR の発現が回復していることを確認している。TAM 投与を 4 週齢、8 週齢、12 週齢、16 週齢、20 週齢で行い、それぞれ TAM 投与後 8 週間は無処置のまま飼育する。Control 群にも同じスケジュールで TAM 投与を行う。腸管 MR 発現が正常に復したところで、上記と同様の DOCA-salt 負荷を含めた各種負荷における表現型解析を行い、誘導型腸管 MR-KO 群の高血圧耐性の有無を評価する。

#### 4. 研究成果

まず通常食飼育下で、Control 群と腸管 MR-KO 群の比較を行った。その結果、体重は両群間で差を認めず (図 2)、また腸管に組織学的な差も認めなかった (図 3)。電解質動態については、腸管 MR-KO 群では便中 Na 排泄がコントロール群に比較し 1.5~2 倍程度に増加しており、一方腎臓では代償性に MR 作用が亢進していると思われる、尿中 Na 排泄が 2/3 倍程度に抑制されていた (図 2)。MR の標的遺伝子として上皮性 Na チャネルである ENaC が広く知られているが、ENaC には  $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$  の 3 つのサブタイプが存在しており、腸管での標的は ENaC $\beta$ 、 $\gamma$  であるとされる。そこで腸管 MR-KO 群における ENaC 遺伝子の mRNA 発現を測定したところ、ENaC $\beta$ 、 $\gamma$  の著明な低下を認め (図 4)、腸管 MR がその下流遺伝子である ENaC を介して Na 吸収に深く関与することが確認された。

さらにこれらのマウスに対して、週齢 10~13 週の期間に DOCA-salt 負荷を行ったところ、Control 群に比べ腸管 MR-KO 群では血圧上昇が 50% 程度抑制され、このことから、ミネラルコルチコイド誘発性の血圧上昇において、腸管 MR が約 50% の寄与を有していることが示された。また本モデルマウスを、高塩食下 (8% NaCl) で飼育した場合 (5 週齢から 13 週齢まで)、Control 群・腸管 MR-KO 群ともに血圧上昇は示さず、2 群間に有意な血圧の差を認めなかったが、低塩食下 (0.025% NaCl) で飼育した場合 (同じく 5 週齢から

13 週齢まで) 血圧が Control 群  $98.4 \pm 3.5$  mmHg、腸管 MR-KO 群  $82.6 \pm 2.4$  mmHg ( $P=0.014$ ) と腸管 MR-KO 群で有意な低下を認めた。本研究結果は、Na 動態を介した血圧調節機能が主に腎尿細管で行われているという既知の考え方を大きく変えるものであり、腎尿細管に加え腸管も同等に血圧調節に寄与していることを明らかにした点で非常に新規性・独創性が高く、J

図2 通常食飼育下の表現型解析

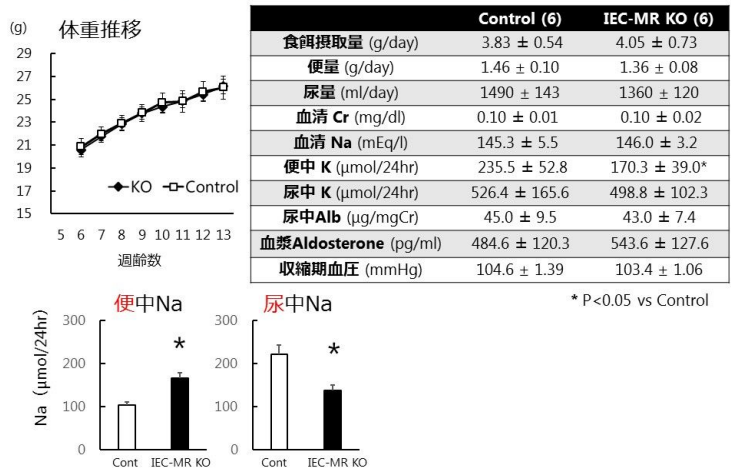


図3 腸管MR-KOのHE染色

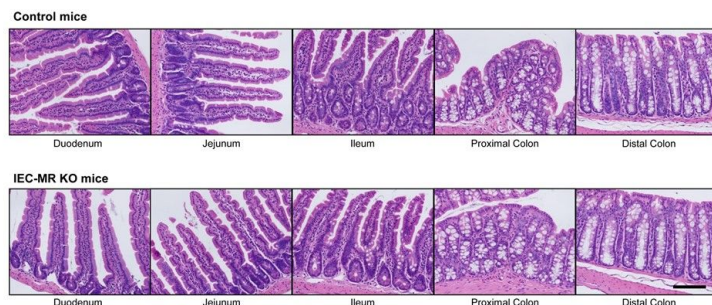
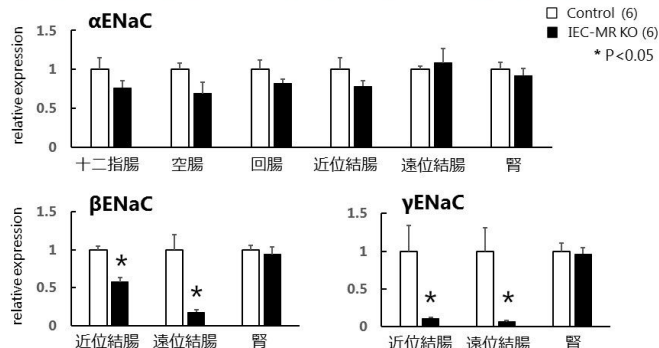


図4 上皮性Naチャネル(ENaC)の発現



Am Heart Assoc 誌に論文投稿し掲載された。

誘導型腸管 MR-KO を用いたメモリー現象に関する検討では、TAM 投与により一部の MR 標的遺伝子発現が変化してしまうことが実験の過程で判明し、MR 発現低下による影響と TAM 投与による影響が混在する中で表現型を検討することになり、本アッセイ系を用いた検討は困難であると結論した。今後、何らかのアプローチで、MR ブロックメモリーなどの新しいメモリー現象の検出・提唱を試みたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Toshifumi Nakamura, Isao Kurihara, Sakiko Kobayashi, Kenichi Yokota, Ayano Murai-Takeda, Yuko Mitsuishi, Mitsuha Morisaki, Nao Kohata, Yosuke Oshima, Yukiko Minami, Hirotaka Shibata, Hiroshi Itoh. Intestinal Mineralocorticoid Receptor Contributes to ENaC-Mediated Intestinal Sodium Absorption and Blood Pressure Regulation. Journal of the American Heart Association. 査読有り, 7 巻 13 号, 2018 年. 10.1161/JAHA.117.008259.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 栗原 勲, 伊藤 裕. 原発性アルドステロン症の診療 原発性アルドステロン症における術後高血圧予後の予測と性差に関する検討. 第 41 回日本高血圧学会総会. 2018 年
2. 栗原 勲, 伊藤 裕. 近未来の原発性アルドステロン症診療. 第 19 回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会. 2018 年
3. 中村 俊文, 栗原 勲, 伊藤 裕. Analysis of intestinal epithelial MR function in sodium balance and blood pressure regulation. Gastrointestinal hormones update research forum 2018. 2018 年
4. 南 悠季子, 中村 俊文, 三石 木綿子, 横田 健一, 小林 佐紀子, 武田 彩乃, 中島 秀明, 栗原 勲, 伊藤 裕. 腎尿細管特異的 OGT 欠損マウスの表現型解析を通して見る腎尿細管 OGT 機能の多面性. 第 36 回 内分泌代謝学サマーセミナー. 2018 年
5. 栗原 勲, 柴田洋孝, 伊藤 裕. ミネラルコルチコイド受容体関連高血圧の分子病態解明と治療戦略. 日本心血管内分泌代謝学会総会 (CVEM 2017). 2017 年
6. 中村 俊文, 小池 悠季子, 栗原 勲, 小林 佐紀子, 横田 健一, 中島 秀明, 伊藤 裕. 臓器特異的遺伝子改変モデルを用いた腎尿細管における OGT 機能の解析. 第 35 回 内分泌代謝学サマーセミナー. 2017 年
7. 中村 俊文, 栗原 勲, 小林 佐紀子, 横田 健一, 盛崎 瑞葉, 高畑 尚, 大嶋 洋佑, 小池 悠季子, 伊藤 裕. 遺伝子改変マウスを用いた血圧調節における腸管上皮 MR 機能の解析. 第 90 回 日本内分泌学会学術総会. 2017 年
8. Toshifumi Nakamura, Isao Kurihara, Sakiko Kobayashi, Kenichi Yokota, Ayano Murai-Takeda, Yuko Mitsuishi, Mitsuha Morisaki, Nao Kohata, Yosuke Oshima, Gunther Schutz, Hirotaka Shibata, Hiroshi Itoh. Essential role of intestinal epithelial mineralocorticoid receptor in the regulation of sodium absorption and blood pressure. International Society of Hypertension 2016. 2016 年
9. 中村 俊文, 栗原 勲, 小林 佐紀子, 横田 健一, 武田 彩乃, 城 理絵, 三石 木綿子, 盛崎 瑞葉, 高畑 尚, 大嶋 洋佑, 伊藤 裕. 腸管上皮ミネラルコルチコイド受容体は腸管 ENaC を介した Na 吸収により血圧を調節する. 第 53 回 日本臨床分子医学会学術集会. 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

## 6. 研究組織

該当なし