

令和元年6月12日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06993

研究課題名(和文) 選択的受容体機能調節因子に着目した高血圧の新規治療戦略

研究課題名(英文) Angiotensin II type 1 receptor binding molecule as a therapeutic target for hypertension

研究代表者

小林 竜 (Kobayashi, Ryu)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：60805612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：近位尿細管特異的ATRAP発現制御マウスの作製に成功し、アンジオテンシン依存性高血圧モデルを用いて詳細な検討を行った結果、近位尿細管ではなく遠位尿細管系のATRAPが主に、高血圧発症抑制の内在性システムとして機能している可能性が高いことを明らかにした(J Am Heart Assoc. 2019 Apr 16;8(8):e012395)。その一方で、現在までに、近位尿細管のATRAPは腎老化や寿命などに関与している可能性があることを報告しており、今回作製に成功した近位尿細管特異的ATRAP発現制御マウスをもちいて、今後のさらなる研究展開を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、アンジオテンシン受容体結合蛋白ATRAPは、腎尿細管において高い内在性発現レベルを認め、病的刺激下で生じる尿細管1型アンジオテンシン受容体シグナルの過剰活性化および一次性ナトリウム再吸収亢進を抑制することで、高血圧の発症を抑制する新規内在性システムとして機能していることを明らかにしてきた。今回、近位尿細管特異的ATRAP発現制御マウスの作製に成功し検討を行った結果、近位尿細管ではなく遠位尿細管系のATRAPが主に、高血圧発症抑制の内在性システムとして機能している可能性が高いことを明らかにした。尿管ATRAPの機能を分析したことで、今後新規高血圧治療に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We examined the in vivo functional role of renal proximal tubule ATRAP in angiotensin-dependent hypertension. We succeeded in generating proximal tubule-specific ATRAP knockout (PT-KO) mice for the first time using the Cre/loxP system with Pepck-Cre. ATRAP deficiency in proximal tubules did not exacerbate angiotensin-dependent hypertension in vivo. The results indicate that renal proximal tubule ATRAP has a minor role in angiotensin-dependent hypertension in vivo. (J Am Heart Assoc. 2019;8:e012395. DOI: 10.1161/JAHA.119.012395.)

研究分野：高血圧，慢性腎臓病

キーワード：高血圧 レニン-アンジオテンシン系

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

## 1. 研究開始当初の背景

病的刺激は生体の反応を引き起こし、その持続は組織局所での慢性的な酸化ストレス増加や炎症反応亢進とそれらに伴う代謝系に悪影響を及ぼす。高血圧・高血圧関連臓器障害の発症・進展機序においてもこれらは重要視されている。特に病的刺激の持続による「組織局所における AT1 受容体情報伝達系の過剰活性化」がもたらす組織レニン-アンジオテンシン系 (R-A 系) の異常亢進状態は、慢性的な細胞・組織の酸化ストレス増加・炎症反応亢進・線維化進行を介して高血圧および高血圧関連臓器障害を発症・増悪させ、重篤な心血管病を引き起こす。したがって、AT1 受容体は高血圧・高血圧関連臓器障害の増悪受容体として捉えることができる。実際、高血圧の治療において、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)といった R-A 系阻害薬の有効性が多くの大規模臨床試験で証明されている。

R-A 系自体は生物の進化の過程で獲得されたもので、生体内の水・電解質代謝や循環系の恒常性維持、および臓器発生・分化にとって重要な生理的調節系である。全身性アンジオテンシノーゲン欠損マウス、レニン欠損マウス、AT1 受容体欠損マウスなど、発生段階からの R-A 系欠損マウスでは、生下時からの異常な低血圧と腎などの器官形成異常、臓器機能異常が報告されている。

最近の心血管病高リスク患者や蛋白尿合併 2 型糖尿病・慢性腎臓病患者を対象とした複数の大規模臨床試験では、ARB と ACE 阻害薬の併用治療や、ARB あるいは ACE 阻害薬とレニン阻害薬との併用治療などの強力な R-A 系阻害は心血管病や腎機能障害などの予後改善には無効であり、逆に腎障害、高 K 血症、低血圧などの有害事象を増加させることが報告されている。したがって、臓器の発生・形態形成や恒常的生理機能維持を担う AT1 受容体系の生理的情報伝達系活性の遮断を回避しつつ、同受容体系の病的な過剰活性化のみを選択的に効率的かつ安全に抑制することが重要と考えられる。

一方、心血管系組織や腎組織における「AT1 受容体機能活性化に対する内在性抑制機構」としては、以前から AT2 受容体や ACE2, Ang-(1-7), mas 受容体があげられているが、研究協力者の田村らは、AT1 受容体に直接結合する因子として、C 末端に特異的に結合する低分子蛋白 ATRAP を世界で初めて単離・同定した。研究代表者は現在までに、ATRAP は、『慢性的な病的刺激の持続による AT1 受容体系の過剰活性化に拮抗する内在性抑制分子』である可能性を報告してきた(Wakui H, Kobayashi R, et al. *Cardiovasc Res* 100: 511-519, 2013; Ohsawa M, Kobayashi R, et al. *Kidney Int* 86: 570-81, 2014; Wakui H, Kobayashi R, et al. *J Am Heart Assoc* 19: e001594, 2015; Kobayashi R, et al. *Kidney Int* 91: 1115-1125, 2017; Azushima K, Kobayashi R, et al. *J Am Heart Assoc* 19: e004488, 2017)。

## 2. 研究の目的

ATRAP は、細胞や組織表面に存在する AT1 受容体の細胞内取り込みの促進機序を介し、臓器の発生・形態形成や恒常的生理機能維持を担う AT1 受容体系の生理的情報伝達系活性には悪影響を与えず、慢性的な病的刺激による AT1 受容体系の過剰活性化に対してのみ機能選択的な抑制作用を発揮できる特徴を有する。

本研究課題では高血圧モデル動物、発生工学的手法により作製した組織特異的 ATRAP 発現制御動物およびヒト組織を用いて、ATRAP の発現・活性調節異常と高血圧および高血圧関連臓器障害との関連について Na チャネルや R-A 系構成要素(アンジオテンシノーゲン、血漿レニン活性など)や炎症性サイトカインなどの蛋白発現解析、尿中カテコラミンや腎交感神経活性、血管張力、代謝ケージによる水電解質代謝の解析など多面的に検討し、高血圧・高血圧関連臓器障害の発症・進展における ATRAP の病態生理学的意義の解明、および ATRAP に着目した新規分子標的治療法の開発に向けた検討を行う。

## 3. 研究の方法

内在性 ATRAP は腎近位尿細管～遠位尿細管～集合管にかけて幅広く分布している。研究代表者は今までに、gene targeting 法を用いて作製した全身性 ATRAP 欠損マウスでは、定常状態での血圧や腎機能に異常はみられないが、Ang II 刺激下において高血圧およびタンパク尿の増悪を認め、その機序として、腎尿細管でのナトリウム再吸収亢進が関与することを明らかにしている。そして、尿細管での ATRAP のより詳細な機能解析のために、すでに Cre-loxP システムを用いて、近位尿細管特異的 ATRAP 欠損マウスの作製に成功している。さらに、現在、遠位尿細管特異的 ATRAP 欠損マウス、集合管特異的 ATRAP 欠損マウスを作製中である。本研究では、これらの尿細管各セグメントでの ATRAP 欠損マウスに対して、Ang II 投与、高食塩負荷、5/6 腎摘などを行い血圧および腎障害に与える影響を検討する。血圧上昇のメカニズム解明のために、ナトリウム再吸収、循環血漿量、尿細管 Na チャネルの発現・活性、髄質血流、酸化ストレスなどを評価する。また、腎機能、タンパク尿、糸球体障害、糸球体容積、死亡率、腎病理組織所見を正常マウスと比較検討する。この検討によって、高血圧および腎機能障害の発症・進展における、尿細管の各部位での ATRAP の機能的意義が明らかになると期待する。

## 4. 研究成果

近位尿細管特異的 ATRAP 発現制御マウスの作製に成功し、アンジオテンシン依存性高血圧モデルを用いて検討を行った結果、近位尿細管特異的 ATRAP 発現制御マウスでは野生型マウスと

比較して、テイルカフ法・テレメトリー法ともに野生型マウスと血圧に変化がないことが確認された。つまり、全身性 ATRAP 欠損マウスでは、アンジオテンシン依存性高血圧モデルにおいて有意な血圧上昇を認めたと、近位尿細管特異的 ATRAP 発現制御マウスで血圧上昇がみられなかったことから、近位尿細管ではなく遠位尿細管系の ATRAP が主に、高血圧発症抑制の内在性システムとして機能している可能性が高いことを明らかにした(J Am Heart Assoc. 2019 Apr 16;8(8):e012395)。

また、全身性 ATRAP 欠損マウスを用いた研究から、近位尿細管の ATRAP は腎老化や寿命などに関与している可能性があることを報告しており(J Am Heart Assoc. 2017 Jul 27;6(8))、今回作製に成功した近位尿細管特異的 ATRAP 発現制御マウスをもちいることで今後のさらなる研究展開が可能となり、成果が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. **Kinguchi S, Kobayashi R et al., J Am Heart Assoc. 2019 Apr 16;8(8):e012395 (査読有)**
2. **Azushima K, Kobayashi R et al., Sci Rep. 2019 Apr 17;9(1):6201 (査読有)**
3. **Haku S, Kobayashi R et al., Biomed Res Int. 2018 Nov 1;2018:2817045 (査読有)**
4. **Ohki K, Kobayashi R et al., Sci Rep. 2018 Feb 12;8(1):2846. (査読有)**
5. **Uneda K, Kobayashi R et al., J Am Heart Assoc. 2017 Jul 27;6(8). pii: e006120 (査読有)**

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 第 60 回日本腎臓学会学術総会(2017 年 5 月)
2. 横浜腎臓・高血圧 Symposium (2017 年 6 月)
3. Premium Hypertension Conference (2017 年 7 月)
4. 第 39 回腎臓セミナー・Nexus Japan (2017 年 8 月)
5. 第 40 回日本高血圧学会総会(2017 年 10 月)
6. ASN Kindey week 2018, San Diego(2018 年 10 月)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ：<https://yokohama-medicine.org/>  
にて成果発表

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田村 功一

ローマ字氏名：Tamura Koichi

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。