

令和元年6月15日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16074

研究課題名(和文) RAA系によるMR-pendrin系の制御機構とその病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism and pathophysiological implication of MR-pendrin pathway by renin-angiotensin-aldosterone system

研究代表者

広浜 大五郎 (Hirohama, Daigoro)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号：20749353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：腎集合管間在細胞における鉱質コルチコイド受容体-pendrin系によるNaCl再吸収機構が提唱されているが、その発現制御や病態生理学的意義は不明な点が多い。

本研究では低食塩投与マウス、副腎摘出マウスを用い、塩分欠乏時のpendrin活性化にはアンジオテンシンIIとアルドステロンの両者が不可欠であり、また両者には相乗効果があることを明らかにした。また、pendrin欠損マウスを用い、塩分欠乏時にpendrinが血圧を正常に維持するために重要な役割をしていることを明らかにした。さらに、アルドステロン過剰状態の塩分充足時に、pendrinが低カリウム血症発症に抑制的に作用していることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は体液ホメオスタシスと血圧制御の機構においてpendrinの役割の重要性を指摘した。これはpendrinの異常活性化が食塩感受性高血圧を発症させることだけでなく、pendrin阻害剤が新たな高血圧治療薬となりうることも示唆している。

研究成果の概要(英文)：Although it has been proposed that the mineralocorticoid receptor-pendrin system in intercalated cells of the renal tubules is involved in the NaCl reabsorption, its regulatory mechanism and pathophysiological implication in vivo remained unclear.

In this study using low-salt diet-treated mice or adrenalectomized mice, we demonstrated that both angiotensin II and aldosterone are indispensable for pendrin activation during salt depletion, and that both have synergistic effects. We revealed that pendrin contributes to maintenance of normal blood pressure during the renin-angiotensin-aldosterone system activation with a low-salt diet, using pendrin-knockout mice. Moreover, we revealed that in primary aldosteronism with salt repletion, pendrin plays an important role to prevent hypokalemia.

研究分野：腎臓内科学、高血圧学

キーワード：Pendrin アンジオテンシンII アルドステロン 鉱質コルチコイド受容体 MR 間在細胞 塩分欠乏

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

1. 研究開始当初の背景

(1) レニン・アンジオテンシン・アルドステロン (RAA) 系は生体内で体液バランス保持や血圧調節に重要な役割を担っている。腎尿細管のアルドステロン (Aldo) 感受性遠位ネフロンは、糸球体から濾過された NaCl の約 10% を再吸収するにすぎないが、血圧維持に大きな役割を果たしている。Aldo 感受性遠位ネフロンのうち、集合管間細胞における NaCl 再吸収機序の詳細は不明であったが、最近このプロセスを担う分子として $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送体 (pendrin) が同定された (Royaux IE et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001)。

(2) これまで塩分欠乏時に腎臓 pendrin が発現亢進することが報告されているが、RAA 系による pendrin 活性化機構は明らかでない。さらに最近、集合管間細胞においてミネラルコルチコイド受容体 (MR) のリガンド結合領域のリン酸化レベルの変化が pendrin 発現調節に関与することが報告された (Shibata S et al. *Cell Metab* 2013)。これは MR-pendrin 系による尿細管 NaCl 再吸収調節に対する新たな役割を示唆するものであるが、生体内での病態生理学的意義は明らかでない。

2. 研究の目的

(1) RAA 系による MR-pendrin 系の制御機構を解明すること、(2) MR-pendrin 系の病態生理学的意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 低食塩食および AngII 持続投与マウスでの検討

生体内で MR-pendrin 系の病態生理学的意義を検討するうえで、この系が塩分欠乏時の血圧維持に貢献していると仮説を立てて検証することとした。まず C57BL/6J マウスへ低食塩食投与を行い、さらに、低食塩の状況を再現するためにアンジオテンシン II (AngII) 持続投与も行った。この内因性および外因性 AngII 上昇を認める状況で、Pendrin は活性化を表す膜蛋白発現 (Western Blot、免疫染色) にて評価し、MR リン酸化は全腎蛋白発現 (Western Blot) にて評価した。

(2) AngII 持続投与マウスへの MR 拮抗薬投与での検討

AngII による pendrin 発現上昇に MR 活性化シグナルが必要かどうか検討するため、AngII 投与マウスへ MR 拮抗薬を投与し、pendrin 発現を評価した。

(3) 副腎摘出マウスでの検討

生体内では AngII により副腎から Aldo 分泌が刺激される。そこで、AngII による pendrin 上昇における AngII、Aldo 各々の役割を検討するため、副腎摘出を行った。これにより、生体内で MR のリガンドである Aldo を血漿中から除去した。この副腎摘出マウスへ AngII 単独投与、AngII-Aldo 同時投与を行い、MR リン酸化レベルの変化、pendrin 発現を評価した。

(4) Pendrin 欠損マウスを用いた血圧評価

塩分欠乏時に pendrin が血圧維持に果たす役割を明らかにするため、低食塩食投与下の野生型マウス、pendrin-KO マウスを用いテレメトリ法で観血的血圧測定を行い評価した。

(5) Pendrin 欠損マウスを用いた電解質評価

Pendrin の存在する Aldo 感受性遠位ネフロンはナトリウム再吸収だけでなく、カリウム排泄にも重要な役割を果たす。そこで、MR-Pendrin 系が電解質調節に果たす役割を明らかにするため、Pendrin 欠損マウスへ Aldo 持続投与を行い血漿カリウムを評価した。

4. 研究成果

(1) 塩分欠乏時の pendrin 活性化には AngII, Aldo の両者が不可欠である

まず初めに C57BL/6J マウスに低食塩食を投与したところ、血漿中の AngII、Aldo 濃度の上昇と共に、MR 脱リン酸化、pendrin 発現の増加を認めた。低食塩投与を再現する目的の AngII 投与においても同様の結果が得られたことから、内因性および外因性 AngII は Aldo/MR シグナルを介して pendrin 発現上昇をもたらすことが明らかとなった。

次に AngII 投与マウスへ MR 拮抗薬投与を行うと、pendrin 上昇の抑制が認められたことから、AngII、Aldo により MR 活性化を介して pendrin 発現が上昇していることが明らかとなった。

さらに pendrin 発現上昇における AngII、Aldo 各々の役割を明らかにするため、副腎摘出マウスを用いて検討した。副腎摘出マウスでは血漿中の Aldo レベルは感度以下まで低下していた。この状況下で AngII の単独投与を行うと、MR の脱リン酸化を認められたが、pendrin 発現上昇は認めなかった。一方、AngII、Aldo の同時投与を行うと、MR の脱リン酸化に加えて pendrin 発現上昇を認めた。このことから、AngII により脱リン酸化した MR に、Aldo が結合することで初めて pendrin 発現が上昇することを明らかにした。その結果、塩分欠乏時の pendrin 活性化には AngII と Aldo の両者が不可欠であり、また両者には相乗効果があることも明らかにした (図 1)。

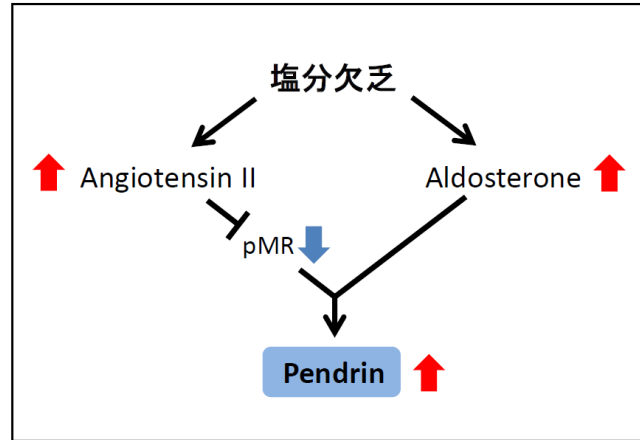
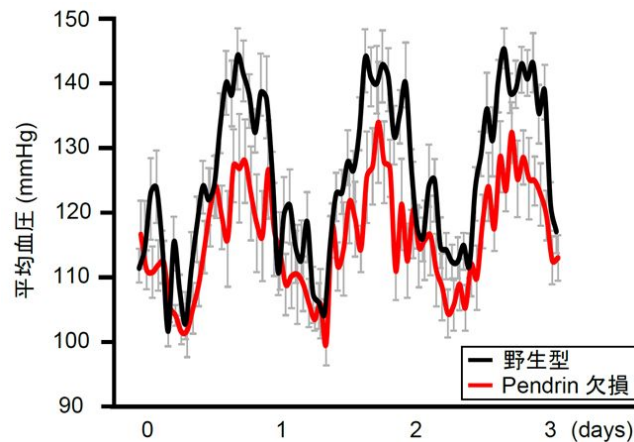


図 1 : AngII と Aldo による塩分欠乏時の pendrin 活性化

(2) 塩分欠乏時に pendrin 活性化は正常血圧維持に寄与する

(1) の検討で、塩分欠乏時に MR-pendrin 系が活性化していることが明らかとなった。そこで MR-pendrin 系の生体内意義を明らかにするため、pendrin 欠損マウスを用いて血圧測定を行った。Pendrin 欠損マウスは、高食塩下では野生型マウスと同等の血圧を示したが、低食塩下では野生型マウスと比較して著明な低血圧を示した (図 2)。以上の結果より、低食塩により RAA 系の活性化した状態では、pendrin が血圧を正常に維持するために重要な役割をしていることが明らかとなった (Hirohama D, et al. *J Am Soc Nephrol* 2018)。



2 : 塩分欠乏時に pendrin 欠損マウスは低血圧を示す

(3) 塩分充足時に pendrin 活性化は低カリウム血症発症に抑制的に働く

Pendrin の存在する Aldo 感受性遠位ネフロンはナトリウム再吸収だけでなく、カリウム排泄にも重要な役割を果たす。そこで、MR-Pendrin 系が電解質調節に果たす役割を明らかにするため、Pendrin 欠損マウスへ Aldo 持続投与を行い血漿カリウムを評価した。その結果、Pendrin 欠損マウスでは Aldo 持続投与により低カリウム血症の増悪を認めることが明らかとなった (Xu N, Hirohama D, et al. *Hypertension* 2017)。これにより、Aldo 過剰の塩分充足時には Pendrin がカリウム保持に重要な役割を持つことが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1 . Yamazaki O, Ishizawa K, Hirohama D, Fujita T, Shibata S. Electrolyte transport in the renal collecting duct and its regulation by the renin-angiotensin-aldosterone system. *Clin Sci (Lond)*. 133, 75-82, 2019. doi: 10.1042/CS20180194、査読あり
- 2 . Hirohama D, Ayuzawa N, Ueda K, Nishimoto M, Kawarazaki W, Watanabe A, Shimosawa T, Marumo T, Shibata S, Fujita T: Aldosterone is essential for angiotensin II-induced upregulation of pendrin. *J Am Soc Nephrol*. 29, 57-68, 2018. doi: 10.1681/ASN.2017030243、査読あり
- 3 . Oba S, Ayuzawa N, Nishimoto M, Kawarazaki W, Ueda K, Hirohama D, Shimosawa T, Marumo T, Fujita T. Aberrant DNA methylation of Tgfb1 in diabetic kidney mesangial cells. *Sci Rep* 8: 16338, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-34612-3、査読あり
- 4 . Kawakami-Mori F, Nishimoto M, Rehemian L, Kawarazaki W, Ayuzawa N, Ueda K, Hirohama D, Kohno D, Oba S, Shimosawa T, Marumo T, Fujita T. Aberrant DNA methylation of hypothalamic angiotensin receptor in prenatal programmed hypertension. *JCI Insight* 3: 95625, 2018. doi: 10.1172/jci.insight.95625、査読あり

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

5. Watanabe A, Marumo T, Kawarazaki W, Nishimoto M, Ayuzawa N, Ueda K, Hirohama D, Tanaka T, Yagi S, Ota S, Nagae G, Aburatani H, Kumagai H, Fujita T. Aberrant DNA methylation of pregnane X receptor underlies metabolic gene alterations in the diabetic kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 314, F551-560, 2018. doi: 10.1152/ajprenal.00390.2017、査読あり
6. Ueda K, Nishimoto M, Hirohama D, Ayuzawa N, Kawarazaki W, Watanabe A, Shimosawa T, Loffing J, Zhang MZ, Marumo T, Fujita T. Renal Dysfunction Induced by Kidney-Specific Gene Deletion of Hsd11b2 as a Primary Cause of Salt-Dependent Hypertension. *Hypertension*. 70, 111-118, 2017. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08966、査読あり
7. Xu N, Hirohama D, Ishizawa K, Chang WX, Shimosawa T, Fujita T, Uchida S, Shibata S. Hypokalemia and pendrin induction by aldosterone. *Hypertension*. 69, 855-862, 2017. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08519、査読あり

〔学会発表〕(計7件)

1. 広浜 大五郎, 鮎澤 信宏, 西本 光宏, 河原崎 和歌子, 下澤 達雄, 丸茂 丈史, 柴田 茂, 藤田 敏郎: Pendrin の血圧・電解質代謝調節作用に関する役割. 第 54 回高血圧関連疾患学会学術総会 (2018 年 12 月、KKR ホテル熊本、熊本) シンポジウム招聘講演
2. 広浜 大五郎, 鮎澤 信宏, 西本 光宏, 河原崎 和歌子, 下澤 達雄, 丸茂 丈史, 柴田 茂, 藤田 敏郎: Pendrin の血圧・電解質代謝調節作用に関する役割. 第 41 回日本高血圧学会総会 (2018 年 9 月、旭川市民文化会館/星野リゾート OMO7 旭川、旭川). 口頭発表、YIA 最優秀賞受賞.
3. 広浜 大五郎, 鮎澤 信宏, 上田 浩平, 西本 光宏, 河原崎 和歌子, 下澤 達雄, 丸茂 丈史, 柴田 茂, 藤田 敏郎: Pendrin の血圧・水電解質代謝調節作用に関する検討. 第 22 回心血管内分泌代謝学会学術総会 (2018 年 4 月、フェニックス・シーガイア・リゾート、宮崎). 口頭発表、YIA 受賞.
4. Daigoro Hirohama, Nobuhiro Ayuzawa, Kohei Ueda, Mitsuhiro Nishimoto, Wakako Kawarazaki, Atsushi Watanabe, Tatsuo Shimosawa, Takeshi Marumo, Shigeru Shibata, Toshiro Fujita: Aldosterone is essential for angiotensin II-induced upregulation of pendrin. 43rd Meeting of the International Aldosterone Conference (2018 年 3 月、Embassy Suites Chicago Downtown Magnificent Mile, Chicago, USA). 口頭発表. 本カンファレンスにおける YIA 最優秀賞を日本人で初めて受賞した.
5. 広浜 大五郎, 鮎澤 信宏, 上田 浩平, 西本 光宏, 河原崎 和歌子, 渡邊 篤史, 下澤 達雄, 丸茂 丈史, 柴田 茂, 藤田 敏郎: 腎 pendrin の発現機構と血圧調節における役割の解明. 第 21 回心血管内分泌代謝学会学術総会 (2017 年 12 月、大阪国際交流センター、大阪). 口頭発表.
6. Daigoro Hirohama, Nobuhiro Ayuzawa, Kohei Ueda, Mitsuhiro Nishimoto, Wakako Kawarazaki, Atsushi Watanabe, Tatsuo Shimosawa, Takeshi Marumo, Shigeru Shibata, Toshiro Fujita: Aldosterone is essential for angiotensin II-induced upregulation of pendrin. *Kidney Week 2017* (2017 年 11 月、Morial Convention Center, New Orleans, USA). 口頭発表
7. 広浜 大五郎, 柴田 茂, 上田 浩平, 鮎澤 信宏, 西本 光宏, 河原崎 和歌子, 渡邊 篤史, 下澤 達雄, 丸茂 丈史, 藤田 敏郎: Pendrin と NCC 発現調節におけるアンジオテンシン II とアルドステロンの異なる役割. 第 60 回日本腎臓学会学術総会 (2017 年 5 月、仙台国際センター、仙台). ポスター発表

〔図書〕(計1件)

広浜 大五郎, 藤田 敏郎: Pendrin の血圧・電解質代謝調節作用に関する役割. *医学のあゆみ* 267, 11/12, 846-847, 2018

〔その他〕

ホームページ: 東京大学先端科学技術研究センター臨床エピジェネティクス講座
<http://www.c-epi.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

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

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。