

令和元年5月31日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16095

研究課題名(和文)尿細管MR機能との比較を通じた腸管MRの血圧代謝関連病態における新たな意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel intestinal MR function in hypertension and metabolism associated disorder

研究代表者

中村 俊文(Nakamura, Toshifumi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：10594583

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):腸管上皮特異的なミネラルコルチコイド受容体(MR)欠損マウス(腸MR-KO)では便中Na排泄の増加と尿中Na排泄の抑制が見られた。対照的に尿細管特異的なMR欠損マウスでは尿中Na排泄が増加する一方で便中Na排泄が抑制されており、腸MR・腎MRのそれぞれが生体のNa恒常性に深く関与し、相補的に機能していることが示された。また、Controlマウスへの高脂肪食負荷では通常食に比較し体重・血圧・尿中アルブミン・MR標的遺伝子発現の増加が見られ、腸MR-KOではその増加が抑制される傾向にあった。本研究から、腸MRがNa恒常性のみならず代謝機能や臓器障害にまで広く関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MR拮抗薬による心不全患者の生命予後改善効果が複数の大規模臨床研究で示されたことで、近年は様々な臓器における組織特異的MR機能の解析が行われている。本研究では腸MR-KOマウスを用いた機能解析により、これまでに未解明であった腸MRの多面的な機能を見出しつつある。この腸MRと相補的な関係にある腎MR機能との対比を通して、腸MR・腎MRの病態的役割を解明し、MRを介した代謝障害・臓器障害に対する新たな治療的アプローチの開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文): Intestinal epithelial cells-specific mineralocorticoid receptor knockout (IEC-MR KO) mice showed significantly increased fecal Na excretion and accompanied reduced urinary Na excretion. In contrast, increased urinary Na excretion in renal tubular cells-specific MR knockout mice was compensated by suppression of fecal Na excretion. These results show that both intestinal MR and renal MR play essential roles in Na homeostasis and have mutual complementary relationship. In addition, compared to normal diet, high fat diet elevated blood pressure and increased body weight, urinary albumin and the expression of MR target genes in control mice. These changes tended to be attenuated in IEC-MR KO mice. This study suggests that intestinal MR is not only associated with Na homeostasis but also has a potential to affect the metabolic function and organ disorders.

研究分野：腎臓学

キーワード：ミネラルコルチコイド受容体(MR) 高血圧 食塩感受性

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

1. 研究開始当初の背景

日本における患者数が 4000 万人とされ心疾患・脳血管疾患死の最大の要因でもある高血圧の予防・治療は、医療の最重要課題の 1 つである。その一病態として塩分摂取量に応じて血圧が上昇する食塩感受性高血圧が知られており、平均塩分摂取量の多い我が国においては特に重要な治療対象となる。食塩感受性高血圧では腎 Na 排泄機能の低下が基礎に存在し、renin-angiotensin-aldosterone 系(RAS)や交感神経系の活性化(Mu, S. Nat Med. 2011)、高インスリン血症(Zheng, Y. J Am Soc Nephrol. 2005)などの関与が指摘されているが、詳細な病態機序は明らかとなっていない。その中で近年、食塩感受性高血圧への MR 拮抗薬の有効性が報告され(Yoshiyu, T. Hypertens Res. 2009)、さらにゲノムワイド解析によって食塩感受性高血圧へのミネラルコルチコイド受容体(以下 MR)の関与の強さが指摘された(Williams, G. International Aldosterone Conference. 2016)。そしてこの食塩感受性高血圧は糖尿病や肥満症といった代謝関連疾患により増強されることが知られている。その機序として、肥満症においては交感神経活性化、RAS 活性化、脂肪細胞による直接的なアルドステロン分泌刺激などが指摘されている(Nagase, M. J Am Soc Nephrol. 2006)。これまで研究代表者のグループでは、マウスへの高脂肪食負荷による肥満症モデルにおいては、リガンドであるアルドステロンの上昇を伴わずに MR 標的遺伝子 Sgk1 の発現レベル上昇を認め、肥満症により MR 自体の活性化をきたすことを見出し、また、高糖濃度環境や糖尿病モデルマウスにおいては MR 蛋白の特定のアミノ酸残基が糖鎖修飾されることでユビキチン化を防ぎ、MR 蛋白の安定性を向上させ MR 活性亢進をきたすことを見出している。これらの検討から、糖尿病や肥満症といった代謝関連疾患においては MR 機能の亢進が食塩感受性高血圧の病態形成に強く関与していると考えられている。

加えて本研究代表者は、MR の臓器別機能にも着目し、腸管上皮 MR 機能の解析も併行して進めてきた。近年の RALES (Pitt, B. N.Eng.J.Med. 1999)、EPHESUS (Pitt, B. N.Eng.J.Med. 2003)、EMPHASIS-HF (Zannad, F. N.Eng.J.Med. 2011)といった大規模臨床研究を通じて心血管疾患抑制における MR 抑制の重要性が示されて以降、心筋・平滑筋・血管内皮細胞・マクロファージなどの心血管臓器における MR 機能の解析が進められてきたが、研究代表者は全身臓器の MR 発現量解析を行い、小腸から結腸にわたる腸管全域の腸管上皮においても MR の高発現を確認した。MR による血圧調節には主に腎尿細管 MR が寄与すると考えられてきたが、腸管上皮は腎尿細管と同様に上皮性細胞であるだけでなく、摂取した塩分の第一感知器官であり、Na 吸収と血圧調節に深く関与することが予想された。それを踏まえ、腸管上皮特異的 MR 欠損マウス(以下 腸 MR-KO)を作成し、その表現型解析を行い、血圧調節における腸管上皮 MR の関与を明らかにした。

2. 研究の目的

上記のようにこれまでの研究により、食塩感受性高血圧に深く関与することが指摘される MR について、糖尿病・肥満症といった代謝関連疾患においては MR 自体が活性化されること、MR 活性増強時の血圧上昇には腸管上皮 MR も重要であることを示してきた。これらのことは、糖尿病・肥満症の代謝関連疾患で見られる高血圧・食塩感受性・臓器障害の病態機序においては MR が深く関与し、特に腸管上皮 MR による寄与が尿細管 MR と異なる寄与も有する可能性を示唆するものである。そこで本研究では、代謝関連疾患における MR 関連臓器障害について、腸管上皮 MR と尿細管 MR 機能の直接的比較を行い、各臓器 MR の寄与度を解析することを目的とする。第一に、これまでに作成した腸 MR-KO に加えて尿細管特異的 MR 欠損マウス(以下 腎 MR-KO)を作成し、通常食および各種負荷を行い、各 MR 欠損による Na 動態変化と腸・腎による代償性・血圧調節能について腸 MR-KO と腎 MR-KO を直接的に比較する。さらに高脂肪食負荷による肥満症誘発や Streptozotocin による糖尿病誘発を行った上で直接比較し、各負荷群における MR 関連臓器障害の比較評価を行う。これらにより、代謝関連疾患での高血圧・食塩感受性・臓器障害における病態機序について、尿細管 MR と異なる腸管上皮 MR の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

既に作成済みの腸 MR-KO と同様に腎 MR-KO を作成し、その表現型解析(形態的評価、尿・便中電解質変動、血圧変動、遺伝子発現等)を腸 MR-KO と対比して行い、それぞれの欠損による腎性代償、腸管性代償を評価する。さらに、これらのモデルマウスに DOCA/salt や高脂肪食等の負荷を行い、Control マウス(MR-flox/flox)を含めた 3 群比較で、血圧上昇および臓器障害等の表現型の差を評価する。

(1) 腎 MR-KO の作製

これまでの検討で、MR flox マウスおよび Villin-Cre マウスを用いて腸 MR-KO を作成し、腸管上皮特異的に MR 発現が約 95%低下していることを既に確認した。同様に MR flox マウスおよび尿細管特異的 Cre 発現マウスである Ksp1-Cre マウスを用いて、腎 MR-KO を作製する。そして全身臓器の MR 発現をリアルタイム PCR 法・免疫染色法で評価し、MR 欠損の尿細管特異性を確認する。

(2) 腎 MR-KO の表現型解析および腸 MR-KO との比較

通常食下での解析

腸 MR-KO について、体重・血圧に加えて専用代謝ケージを用いて尿中・便中電解質測定を行った。その結果、MR 標的遺伝子である ENaC の発現が約 95%低下したことで、腸 MR-KO で Control に比較し便中 Na 排泄が約 40%増加し、その一方、尿中 Na 排泄が約 40%減少し腎性に代償されていること、結果として血圧・体重に群間差のないことを確認した。腎 MR-KO についても同様に、経時的に体重・血圧、尿・便中電解質を測定する。尿細管 MR の欠損により ENaC 発現の著明な減少と尿中 Na 排泄の増加が予想されるが、その尿中 Na 排泄の増加を腸管 MR 活性亢進・Na 吸収増加により代償されるかを腸・腎における ENaC 発現量測定も行い比較解析する。

DOCA 錠埋込 + 1%NaCl 飲水負荷下での解析

腸 MR-KO で Control との血圧差を生じさせた DOCA/salt の 3 週間負荷を腎 MR-KO に対しても実施する。Control については血圧上昇が予想されるが、腎 MR-KO における尿中・便中 Na 排泄および昇圧効果の変化を評価する。腸 MR-KO では Control と比較し昇圧効果を 25mmHg→15mmHg 程度へ減弱したが、腎 MR-KO での減弱の有無・程度を測定することで、腸管上皮・尿細管それぞれの MR が DOCA/salt 負荷時に昇圧に寄与する程度を直接的に比較し、食塩感受性高血圧を増強する MR 活性化の責任臓器を探る。先行研究で、3 週間 DOCA/salt 負荷では、心筋の線維化や大動脈壁肥厚、尿中アルブミン増加等の全身の臓器障害については群間差を認めなかったため、臓器障害の比較には、本負荷は適さないと考えた。

高脂肪食負荷による肥満症誘発とその解析

予備実験では、60%脂質含有の高脂肪食の 14 週間負荷による肥満症誘発により、血圧が上昇すること、また臓器障害として尿中アルブミンが増加することを確認している。本研究では 60%脂質含有の高脂肪食の 14 週間負荷による肥満症誘発とともに通常飲水または 1%NaCl 飲水負荷を行う。両負荷群について血圧と尿中・便中 Na 排泄の差を測定し、本実験モデルにおける肥満症での食塩感受性を評価する。さらに 1%NaCl 負荷も行う各 MR-KO、Control については、血圧、尿中・便中電解質の継時的測定、免疫染色を含めた病理学的評価と、各種遺伝子発現変動のマイクロアレイ法およびリアルタイム PCR 法を用いた評価を行う。これらにより、肥満症誘発と高食塩負荷により生じる血圧上昇・臓器障害に対し、腸管上皮 MR 欠損および尿細管 MR 欠損でそれぞれの程度臓器保護効果を示すかを観察し、高血圧・臓器障害・食塩感受性における腸管上皮・尿細管 MR 機能の臓器特異性について解析する。

4. 研究成果

まず、腸管上皮特異的に Cre を発現する Villin-Cre マウスと MR flox マウスとの交配で得られた腸 MR-KO を用いて、腸管上皮 MR が生体の Na 恒常性に深く関与していること、塩分過剰かつ MR 活性亢進下の血圧上昇に寄与することを明らかにし、この成果を論文報告した (Nakamura, T. J Am Heart Assoc. 2018)。Control 群の DOCA/salt における血圧上昇が、腸 MR-KO 群では有意に抑制されていることに加え、逆に低塩分食下における

血圧低下も顕著であり、腸管特異的 ENaC α 欠損マウスよりも強い表現型を認めたことは注目に値する所見であった。腸 MR-KO 群では、低塩分食下において、血圧低下の他、体重減少や著明な血中アルドステロン上昇も認めた (表)。

次に、尿細管特異的 Cre 発現マウスである Ksp1-Cre マウスを用いて腎 MR-KO モデルを作成し、その表現型解析を行ったところ、Control 群と比較して、摂餌量と体重推移には差を認めなかった一方で、腎 MR-KO 群では Control 群に比べ、尿中 Na 排泄量が約 30%増加し、便中 Na 量は約 50%抑制されていた。予想していたように腎 MR-KO 群では、尿細管における MR 欠損による Na 再吸収障害を、腸管 Na 吸収を活性化させることで代償していると考えられた。この現象は腸 MR-KO モデルと対照的であった。

これらの Na 動態の違いが血圧代謝病態にもたらす差異を探求するべく、Control、腸 MR-KO、腎 MR-KO の 3 群に高脂肪食を負荷し、その表現型の比較解析を行った。Control 群では、高脂肪食の長期負荷において、体重増加とともに血圧・空腹時血糖の上昇、尿中アルブミンの増加を認め、MR 標的遺伝子である Sgk1 発現の上昇を認めた。血中アルドステロン

	Control (n = 7)	IEC-MR-KO (n = 7)	P
Body weight (g)	27.4 ± 0.8	17.4 ± 0.3	0.002
Water intake (μ L/24 h)	2023 ± 144	7215 ± 148	<0.001
Urine output (μ L/24 h)	920 ± 114	5391 ± 191	<0.001
Urinary sodium concentration (mmol/L)	33.6 ± 3.4	12.8 ± 2.0	0.001
Urinary sodium (μ mol/24 h)	31.2 ± 4.9	70.3 ± 11.2	0.013
Fecal sodium (μ mol/24 h)	8.5 ± 0.6	30.8 ± 2.3	<0.001
Blood pressure (mmHg)	98.4 ± 3.5	82.6 ± 2.4	0.014
Plasma aldosterone (pg/mL)	982.0 ± 157.7	17587.5 ± 3477.0	<0.001

の上昇は見られず、何らかの機序でMRが活性化され、MR感受性が亢進している病態が考えられた。一方、腸MR-KO群においては、Control群に比べ体重増加が抑制される傾向を認め、血圧上昇は有意に抑制されていた。腎MR-KO群は、妊孕性が落ちている影響か、十分なサンプルサイズの確保に難渋しており、Control群および腸MR-KO群と比較した有意差検討はできていない。

さらに、高脂肪食負荷(HFD)下の腸MR-KOの食塩感受性を評価するために、高食塩高脂肪食負荷(HSFD)も行った。大変興味深いことに、HSFD下では、HFD下と比較し、有意に体重増加が抑制され、通常食(NFD)や高食塩食(HSD)と同等の体重増加であった(図1)。HSFD下のControl群と腸MR-KO群の比較では、高脂肪食負荷時と同様に、腸MR-KOでは有意な体重増加の抑制が認められた(図2)。また、30週齢を過ぎた時期から血圧に差を認めるようになり、腸MR-KO群で低値を示していた。また、尿中アルブミンについても、ある週齢では腸MR-KO群で低値傾向を認めた。今後、サンプルサイズを増やして上記所見の再現性を確認するとともに、腎MR-KO群を加えた比較検討を行っていく予定である。

これまでの解析を通じて、腸管MRは血圧調節のみならず、代謝機能にも深く関与していることが示唆される。腎尿細管MRと異なる機能を示すことができれば、生体におけるMRの生物学的意義に新しい知見を加えることとなり、本研究成果は国内外ともに、高いインパクトを与えることが期待される。

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, Hiroataka 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 4 件)

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

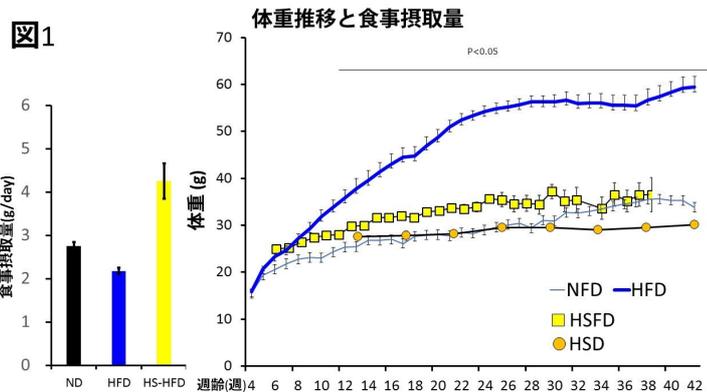
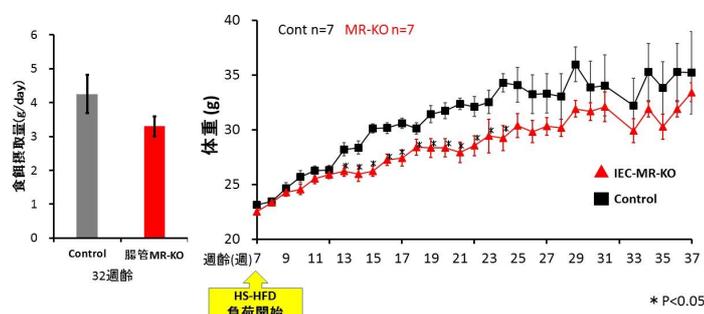


図2 食事摂取量と体重



○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<http://keio-emn.jp/research/group5/>

6．研究組織

該当なし