

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08250

研究課題名(和文)新規転写共役因子LSD1のMR活性制御及び食塩感受性高血圧発症における意義の解明

研究課題名(英文) Regulation of MR activity by a novel transcriptional coactivator, LSD1, and its significance in the development of salt-sensitive hypertension

研究代表者

小林 佐紀子 (KOBAYASHI, Sakiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師

研究者番号：80383727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アルドステロンの短期投与実験で、腎尿細管特異的LSD1ノックアウトマウス(KspLSD1-KO)はENaCの発現上昇の程度がコントロールマウスに比して有意に強く、アルドステロン感受性の亢進が示唆された。16週齢から42週齢までの長期の高食塩負荷ではKspLSD1-KOではコントロールマウスに比べて有意な血圧上昇が認められ、MR拮抗薬(スピロノラクトン)投与により消失した。両群で強い線維化が認められたがスピロノラクトン投与により通常食と同程度まで抑制された。KspLSD1-KOでは線維化が強い傾向があり、アルドステロン感受性の亢進が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではエピゲノム修飾因子の1つであるLSD1がMRのcorepressorとして機能し、MR作用を介し食塩感受性高血圧の発症リスクに関与していることが示された。本研究の成果はLSD1のエピゲノム修飾因子としての新たな機能を明らかにしたのみならず、これまで疫学的に示唆されていたLSD1と食塩感受性の背景にある分子機序を明らかにした点で価値が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In short-term aldosterone administration experiments, renal tubule-specific LSD1 knockout mice (KspLSD1-KO) showed a significantly stronger increase in the expression of ENaC than control mice, suggesting increased aldosterone sensitivity. KspLSD1-KO mice showed a significant increase in blood pressure compared to control mice, which disappeared after administration of MR antagonist (spironolactone). Strong fibrosis was observed in both groups, but was suppressed by spironolactone to the same extent as in the normal diet; there was a strong tendency toward fibrosis in KspLSD1-KO, suggesting increased aldosterone sensitivity.

研究分野：内分泌内科

キーワード：食塩感受性高血圧 MR 転写共役因子 LSD1 高血圧

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RALES 試験¹⁾や EPHEBUS 試験²⁾など、心血管リスク管理および生命予後改善における MR 拮抗薬の有益性を示した大規模臨床研究の結果から、我々はこれまで、MR 機能制御の分子メカニズムに高い関心を持ち、質量分析法を用いた MR 相互作用因子の網羅的探索およびその解析を進めてきた。MR は塩分摂取と高血圧を結びつける重要な因子でもある。MR はアルドステロンと結合することで、腎臓では尿管上皮性 Na チャネル (ENaC)、SGK-1 などの標的遺伝子転写を活性化することでナトリウムの再吸収を調節している。MR が応答配列に結合すると、様々な転写共役因子がそこにリクルートされ、遺伝子発現が制御される。このようなゲノム配列の変化を伴わない遺伝子調節発現生後機構をエピゲノムと称するが、どのような転写共役因子が MR に結合し、どのようなエピゲノムの変化によりその転写活性を調節しているかは未解明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、我々が同定した新規 MR 相互作用因子の中から、ヒストン脱メチル化酵素であり、かつ食塩感受性高血圧への関与が提唱されている LSD1 に注目した³⁾⁴⁾。我々は主に *in vitro* の系を用いた解析から、LSD1 が MR の corepressor として作用しているという新知見を得ていたが、本研究ではその臨床的意義の検討として、血圧への関与を中心に、*in vivo* モデルである腎尿管特異的 LSD1 ホモノックアウトマウス (以下 KspLSD1-KO と略す) の表現型を詳細に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) KspLSD1-KO の腎組織における LSD1 発現の評価

Ksp1-Cre マウスと LSD1-flox マウスの交配により作出した KspLSD1-KO およびコントロールマウス (LSD1-flox/flox マウス) の腎組織における LSD1 の発現を、腎 whole tissue を用いた定量的 PCR による評価のみならず、LSD1 免疫染色を用いて腎組織内における発現分布およびノックアウトマウスにおける発現低下の確認を行った。

(2) 浸透圧ポンプによる浸透圧ポンプによるアルドステロン短期持続投与実験

KspLSD1-KO およびコントロールマウスに浸透圧ポンプを用いてアルドステロンの 1 週間持続皮下投与を行い、比較検討を行った。

(3) 長期高食塩負荷実験

KspLSD1-KO およびコントロールマウスに 8% 高食塩負荷を 16 週齢 ~ 42 週齢にかけて長期に行い、両群の表現型比較を行った。更に、血圧上昇が見られた場合、それが MR 作用亢進によるものか否かを評価するため、8% 高食塩負荷と同時にスピロラクトン投与も行った。

4. 研究成果

(1) 腎組織における LSD1 発現

KspLSD1-KO の腎組織における LSD1 mRNA 発現を定量したところ、腎では約 40% の発現低下がみられた。さらに LSD1 染色による腎組織内での発現分布およびノックアウト効率の評価を行ったところ、LSD1 は遠位尿管および集合管で高発現を認めた。この分布は、MR 発現の分布に一致するものであり、MR と LSD1 の関連性の深さが示唆された。尿管以外にも、糸球体上皮等に発現を認め、尿管における LSD1 発現は、KspLSD1-KO で著明に低下していることが確認された (図 1)

図1 腎組織におけるLSD1発現

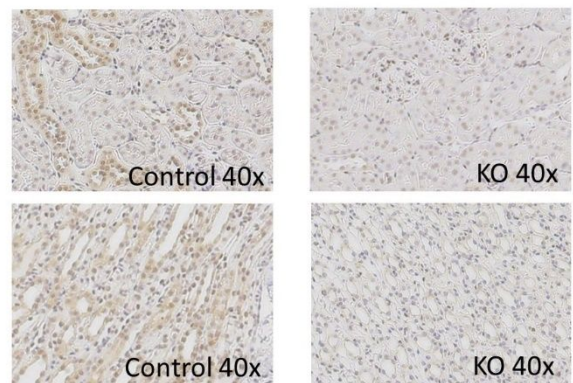
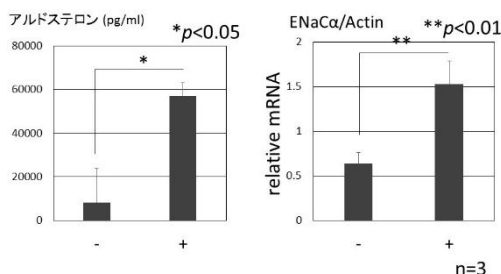


図2 アルドステロン短期投与 (WTマウス)



(2) 浸透圧ポンプによるアルドステロン短期持続投与実験

まず wild-type マウスを用いて条件検討を行った。図 2 に示すように、血中アルドステロンの上昇に伴い、MR 標的遺伝子である ENaC の mRNA 発現上昇が確認され、この系を用いて検討を行ったところ、KspLSD1-KO では、アルドステロン上昇に対する ENaC 発現上昇の程度がコントロールマウスに比較して有意に亢進しており、MR 感受性の亢進が示唆された。

(3) 長期高食塩負荷実験

16週齢～42週齢までの高食塩負荷では、KspLSD1-KOとコントロールマウスとの間で体重の推移に差はなく、血圧については、KspLSD1-KOでコントロールマウスと比べて有意な上昇を認めたことから、KspLSD1-KOでは食塩感受性が亢進していることが示唆された。これはアルドステロン短期投与モデルで示されたLSD1発現低下に伴うMR感受性亢進と合致する結果であった。さらに、スピロラクトン投与でKspLSD1-KOにおける高食塩誘発性の血圧上昇が消失したことから、この食塩感受性血圧上昇がMR作用亢進によるものであったことが確認された。

図3 長期高食塩+/-スピロラクトン負荷

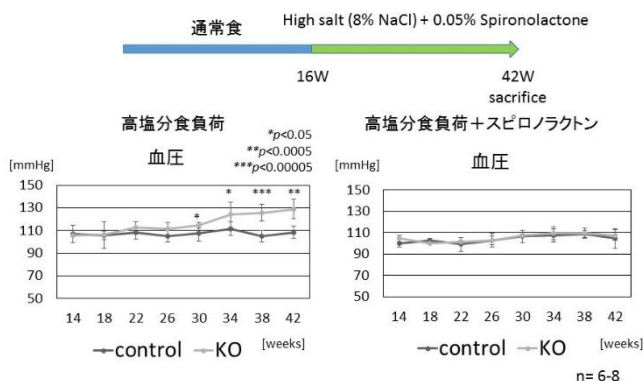
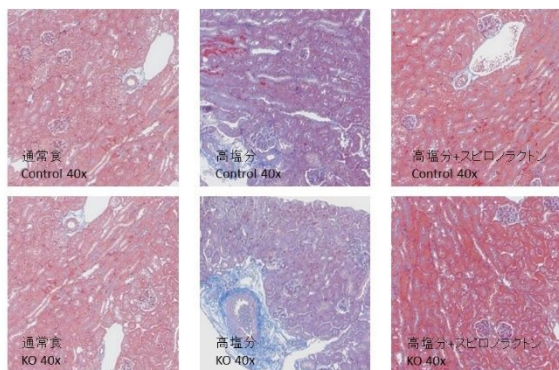


図4 腎組織のマッソトリクローム染色



また、腎組織標本を用いた病理学的検討では、マッソトリクローム染色において、KspLSD1-KOおよびコントロールマウス両群で長期高塩分負荷による著明な線維化の増生を認め、これらの線維化はスピロラクトン投与により通常食と同程度まで抑制されていることが確認された(図4)。線維化の程度は、KspLSD1-KOで強い傾向があり、MR感受性が亢進していると考えられた。

以上より、エピゲノム修飾因子の1つであるLSD1はMRのcorepressorとして機能し、その発現低下がMR感受性亢進をもたらすこと、さらにMR感受性亢進に

伴い、臨床的には食塩感受性高血圧および高血圧関連臓器障害を来しやすい病態を呈することが本研究を通じて示された。ヒトにおいて、LSD1のSNP解析を行うことで内因性LSD1の発現量を推測することができれば、新規テーラーメイド治療の開発につながる成果と考えられた。ヒストン脱メチル化酵素であるLSD1は、これまで主に腫瘍研究の分野で、エピゲノム修飾因子としての機能面の関与が報告されていたが、本研究では新たな知見として、LSD1がMRのcorepressorとして作用することを世界で初めて明らかにした。また、疫学的にLSD1が食塩感受性に関与することが示唆されていたが、その機序を明らかにした研究でもある。研究開始後に、LSD1のヘテロノックアウトマウスを用いた解析結果が他グループより報告された⁵⁾。LSD1は副腎にも発現を認めることから、この報告で用いられたマウスではアルドステロン合成も変化していたため、この論文ではMR感受性の評価が困難であったが、我々の検討は腎尿細管特異的ノックアウトモデルを用いているため、副腎におけるアルドステロン合成には影響を与えずMR活性の評価が可能であった。LSD1ヘテロノックアウトマウスでは、我々のモデルマウスと同様に、長期間の高食塩負荷で血圧上昇を来することが示されている。これは我々の研究結果とも合致するものであり、腎尿細管におけるLSD1がこの食塩感受性亢進の一機序を担っていたことが、本研究により明らかにされた。

< 引用文献 >

Pitt B, Zannad F, Remme WJ et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 1999; 341(10): 709-17.

Pitt B, Remme W, Zannad F et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2003; 348(14): 1309-21.

Pojoga LH, Williams JS, Yao TM et al. Histone demethylase LSD1 deficiency during high-salt diet is associated with enhanced vascular contraction, altered NO-cGMP relaxation pathway, and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 301(5): H1862-71.

Krug AW, Tille E, Sun B, Pojoga L et al. Lysine-specific demethylase-1 modifies the age effect on blood pressure sensitivity to dietary salt intake. *Age (Dordr).* 2013; 35(5): 1809-20.

Huang Y, Ting PY, Yao TM et al. Histone demethylase LSD1 and biological sex: impact on blood pressure and aldosterone production. *J Endocrinol.* 2019; 240(2): 111-122.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura T, Kurihara I, Kobayashi S, Yokota K, Murai-Takeda A, Mitsuishi Y, Morisaki M, Kohata N, Oshima Y, Minami Y, Shibata H, Itoh H.	4. 巻 7
2. 論文標題 Intestinal Mineralocorticoid Receptor Contributes to Epithelial Sodium Channel-Mediated Intestinal Sodium Absorption and Blood Pressure Regulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.117.008259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 小林 佐紀子	4. 巻 126
2. 論文標題 臓器連関の実態 CKDと内分泌疾患	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 内科	6. 最初と最後の頁 261 - 264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 乃村元子、栗原勲、小林佐紀子、横田健一、宮下和季、武田彩乃、三石木綿子、高畑尚、南悠季子、齋藤光平、上妻高英、中塚誠之、武田利和、伊藤裕
2. 発表標題 原発性アルドステロン症の副腎部分切除術選択における区域別副腎静脈サンプリングの有用性
3. 学会等名 臨床高血圧フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南悠季子、栗原勲、小林佐紀子、横田健一、伊藤裕
2. 発表標題 原発性アルドステロン症における微量アルブミン尿の性差および閉経前後の比較
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横田健一、栗原勲、宮下和季、小林佐紀子、乃村元子、伊藤裕
2. 発表標題 高齢者における機能的副腎腫瘍の治療
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大島洋一、栗原勲、横田健一、小林佐紀子、武田彩乃、三石木綿子、宮下和季、伊藤裕
2. 発表標題 FDG-PETにおける両側副腎の集積亢進を契機に原発性アルドステロン症の診断に至った一例
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motoko Nomura, Isao Kurihara, Sakiko Kobayashi, Kenichi Yokota, Kazutoshi Miyashita, Ayano Murai Takeda, Yuko Mitsuishi, Nao Kohata, Yukiko Minami, Kohei Saito, Takahide Kozuma, Seishi Nakatsuka, Toshikazu Takeda, Hiroshi Itoh
2. 発表標題 Comparison of the efficacy of laparoscopic partial adrenalectomy and total adrenalectomy in the surgical treatment of primary aldosteronism - the result of a single institution in Japan
3. 学会等名 International Aldosterone Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川合未来、栗原勲、宮下和季、小林佐紀子、横田健一、高畑尚、上妻嵩英、鳥光拓人、高瀬圭、中塚誠之、伊藤裕
2. 発表標題 当院にて低侵襲副腎ラジオ波アブレーション治療を行った原発性アルドステロン症の年次経過 2019年報告
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大島洋一、栗原勲、伊藤智章、横田健一、小林佐紀子、武田彩乃、三石木綿子、宮下和季、伊藤裕
2. 発表標題 アルドステロン過剰産生を反映すると考えられたFDG-PET両側副腎集積亢進の一例
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安田格、栗原勲、宮下和季、小林佐紀子、横田健一、三石木綿子、川合未来、伊藤智章、吉本憲史、安田麻里絵、武田利和、伊藤裕
2. 発表標題 薬物治療下で心肥大と心機能低下の進行を認めたアルドステロン産生腺腫の1例
3. 学会等名 第21回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------