

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15969

研究課題名（和文）間在細胞ミネラルコルチコイド受容体欠損マウスを用いたPendrin制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of pendrin regulation using mice with deletion of mineralocorticoid receptor in renal intercalated cells

研究代表者

鮎澤 信宏（Ayuzawa, Nobuhiro）

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：50459517

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）：腎皮質集合管の間在細胞に発現するPendrinはNaCl再吸収に働き、体液量や血圧の調節に寄与する。本研究では、体液量減少時にはアンジオテンシンII刺激が間在細胞のミネラルコルチコイド受容体（MR）を介したPendrin活性化を起こし、これが体液量・血圧維持に働くことを示した。一方、1次性アルドステロン過剰時には、主細胞のMR-ENaC経路の活性化により生じた低K血症性代謝性アルカローシスが間在細胞MR非依存性に直接Pendrin活性化を起こし、血圧上昇を起こすことを示した。さらに、これらの経路がサイアザイド利尿薬標的であるNCCの相補経路として働くことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧は世界中で多く見られ、心血管・腎臓病の重大なリスクである。複数の降圧薬が開発されてきたが、治療抵抗例も少なくない。例えば、腎遠位曲尿細管のNCCを阻害しNaCl再吸収を抑えて降圧作用を示すサイアザイド利尿薬は第一選択薬であるが、一部症例ではレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系（RAAS）の活性化や低K血症性アルカローシスなどを呈して治療抵抗性になることがある。

本研究成果により、サイアザイド利尿薬抵抗性の高血圧の治療においてMR拮抗薬が有用な治療戦略となることが示唆された。また、今回見出されたPendrinの制御の仕組みのさらなる解明により、新たな治療標的の発見も期待される。

研究成果の概要（英文）：Pendrin, expressed in α -intercalated cells (ICs) in renal cortical collecting ducts, mediates NaCl reabsorption, and contributes to the regulation of fluid balance and blood pressure. We showed that, during volume depletion, angiotensin II causes pendrin activation via mineralocorticoid receptor (MR) in ICs, and that this pathway maintains fluid volume and blood pressure. We also showed that, during primary aldosterone excess, hypokalemic alkalosis caused by activation of the MR-ENaC pathway in principal cells directly induces pendrin activation independently of MR in ICs, resultantly causing salt-sensitive hypertension. Furthermore, we show that these pathways act as complementary pathways for NCC, a thiazide diuretic target.

研究分野：高血圧、腎臓

キーワード：高血圧 腎臓 ミネラルコルチコイド受容体 アンジオテンシンII アルドステロン Pendrin NCC 食塩感受性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎遠位ネフロンは腎 NaCl 再吸収の最終調節を担い、体液量・血圧の恒常性維持において中心的な役割を果たし、その破綻は高血圧の発症に関与する。例えば、遠位尿管細胞に発現する Na-Cl 共輸送体 (NCC) は同部の NaCl 再吸収に働き、その異常活性化は食塩感受性高血圧を引き起こす。NCC の阻害薬であるサイアザイド利尿薬は優れた降圧作用と予後改善効果を有し、高血圧の第一選択薬の一つとなっているが、時に治療抵抗例も見られる。

昨今、接合尿管～皮質集合管の 間在細胞に存在する Pendrin も NaCl 再吸収に関わり体液量・血圧の調整および高血圧発症に関与することが報告された。Pendrin 欠損マウスでは低食塩食時に脱水・低血圧が見られ、間在細胞 Pendrin 過剰発現マウスは食塩感受性高血圧を示す。なお、Pendrin による NaCl 再吸収は NCC と相補的に働くことが報告されている。Pendrin 欠損マウスや NCC 欠損マウスはそれぞれ NCC と Pendrin の代償性活性化を示し、通常食塩食下では表現型を示さないが、Pendrin・NCC 両欠損マウスは通常食塩食下でも脱水・低血圧を示す。

Pendrin は NCC と同様にレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (RAAS) による制御を受けることが知られ、アンジオテンシン II (AII) やアルドステロン (Aldo) 投与により Pendrin 活性化が起こる。最近、間在細胞では特異的 MR 制御機構が働き Pendrin 活性化に寄与する可能性が示された (Shibata, et al. Cell Metab. 2013;18:660-71)。間在細胞では平常状態では MR のリガンド結合部位に抑制的リン酸化を有するが、AII 刺激時や、Aldo 過剰に伴う低カリウム (K) 血症時には脱リン酸化が起き MR が活性化する。この MR 脱リン酸化は Pendrin 蛋白の発現増加を伴い、さらにこの Pendrin 発現増加は MR 拮抗薬により抑制されることから間在細胞 MR が Pendrin 制御に関わると想定されていた。しかし、間在細胞 MR による Pendrin 制御の直接的な証明はなく、また MR を介した Pendrin 制御機構の生理・病理的意義や NCC との相補性は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では間在細胞特異的に MR 欠損を起こす遺伝子改変マウス等を用いて、RAAS による Pendrin 制御機構の解明に取り組むこととした。さらに、この Pendrin 制御機構が体液量維持や高血圧発症において持つ意義について、NCC との相補性も含めて検討することとした。

3. 研究の方法

間在細胞 MR 欠損マウス等の作成、入手

MR-flox マウスと Atp6v1b1-cre マウスを交配して間在細胞 MR 欠損マウスを作成した。本マウスの腎の免疫染色にて間在細胞 MR の欠損が確認された。また、MR-flox マウスと Pax8-rtTA;tetO-cre マウスの交配により全ネフロン MR 欠損マウスも作成した。さらに、NCC 欠損マウスも入手した。

AII 上昇時の MR を介した Pendrin 制御機構とその意義の解明

間在細胞 MR 欠損マウスと野生型同胞に AII の持続皮下注を行った。また、間在細胞 MR 欠損マウスと野生型に低食塩食投与を行ったのち NCC 阻害薬であるヒドロクロロチアジド (HCTZ) を投与した。これら実験系において、血漿電解質を測定し、腎臓の Pendrin、pT53-NCC (活性型 NCC)、上皮性 Na チャネル (ENaC) 等の発現をウェスタンブロットもしくは免疫染色にて評価し、tail-cuff 法およびテレメトリ法で血圧を測定した。

Aldo 過剰時の MR を介した Pendrin 制御機構とその意義の解明

間在細胞 MR 欠損マウスと野生型同胞に高食塩食投与と Aldo 持続皮下注を行い、これに高 K 食投与による介入を行った。また、野生型マウス (C57BL/6J) に高食塩食投与と Aldo 持続皮下注を行い、これに ENaC 阻害薬 (アミロライド)、高 K 食投与、炭酸脱水素酵素阻害薬 (アセタゾラミド) による介入を行った。全ネフロン MR 欠損マウスと野生型同胞にも高食塩食投与と Aldo 持続皮下注を行い、これに低 K 食投与による介入を行った。NCC 欠損マウスと野生型同胞に高食塩投与と Aldo の持続皮下注を行い、これに高 K 食投与による介入を行った。これら実験系において、血漿電解質を測定し、腎臓の Pendrin、活性型 NCC、ENaC 等の発現をウェスタンブロットもしくは免疫染色にて評価し、tail-cuff 法およびテレメトリ法で血圧を測定した。

4. 研究成果

1) AII 上昇時の MR を介した Pendrin 制御機構とその意義

野生型マウスに AII 持続皮下注を行うと腎における Pendrin 発現の増加と、活性型 NCC の増加が見られた。間在細胞 MR 欠損マウスではこの Pendrin 増加が抑制されており、AII による Pendrin 制御が間在細胞 MR を介して起こることが明らかとなった。

AII の増加は生理的には食塩摂取量低下などによる体液量減少時に起こり、腎臓では NCC や Pendrin を活性化し、これらを介した NaCl 再吸収の亢進が体液量や血圧の維持に働く。また、この NCC や Pendrin の活性化は遠位側の集合管への Na 流を減らすなどして、主細胞に発現する ENaC による K 排泄を抑制し、正常 K の維持にも寄与することが想定されている。そこでまず、野生型マウスに低食塩食投与を行ったところ、Pendrin 発現の増加と、活性型 NCC の増加が見られた。さらに HCTZ 投与を加えて NCC を阻害したところ腎 Pendrin 発現の増加はより

増強し、血圧低下や電解質異常は見られなかった。一方、間在細胞 MR 欠損マウスに低食塩食投与を行ったところ、野生型に比べて腎 Pendrin 発現が低下しており、一過性の体重減少と低血圧をきたした。ただし、本系では野生型より強い NCC 活性化が見られ、経過とともに体重と血圧は正常化した。そこで、さらに HCTZ 投与を加えたところ著しい体重減少と血圧低下が見られ、また低 K 血症も生じた。同条件において、間在細胞 MR 欠損マウスでは野生型に比べて腎髄質の ENaC 活性増強が見られたため、本系では NCC と Pendrin の低下による遠位側 Na 流の増加と髄質 ENaC 活性化により尿中 K 喪失が起きるものと推定された。以上から、体液量減少時には AII 刺激により間在細胞 MR を介した Pendrin 発現増加が起こり、これが NCC 活性化と相補的に体液量・血圧の維持と正常 K 濃度の保持に働くことが分かった。特に、NCC 阻害時には Pendrin 制御機構が代償的に血圧維持に働くことも明らかとなった。

2) Aldo 過剰時の Pendrin 制御機構における MR の関与とその意義

野生型マウスに高食塩食投与・Aldo 持続皮下注を行ったところ、腎における ENaC の発現増加と活性化断片の増加が起こり低 K 血症と代謝性アルカローシスが見られた。これに伴い腎における Pendrin 発現の増加と NCC 活性化が見られ、高血圧を発症した。本系にアミロライドや高 K 食の投与で介入したところ、低 K 血症性アルカローシスの補正とともに、Pendrin 発現と NCC の活性化が抑制され、高血圧が改善した。以上から、Aldo 過剰時には主細胞の MR-ENaC 経路の活性化により引き起こされた低 K 血症性アルカローシスが Pendrin 発現増加と NCC 活性化を起こし、高血圧発症に寄与するものと考えられた。

次に間在細胞 MR の関与を解析するため、間在細胞 MR 欠損マウスに高食塩食投与・Aldo 投与を行った。本系において、間在細胞 MR 欠損マウスでは野生型同胞と同程度の低 K 血症性アルカローシスが見られ、Pendrin 発現量の増加は野生型に比してほとんど抑制されず、また NCC 活性化も抑制されず、高血圧も是正されなかった。さらに、高食塩食投与・Aldo 投与を行った間在細胞 MR 欠損マウスに高 K 食を与えて低 K 血症性アルカローシスを補正したところ、Pendrin 発現と NCC 活性化が著明に抑制され高血圧が改善した。以上から、Aldo 過剰時には低 K 血症性アルカローシスが間在細胞 MR 非依存的に Pendrin 発現増加を引き起こす経路が存在することが示された。この点を検証するため、さらに全ネフロン MR 欠損マウスに高食塩食投与・Aldo 投与と低 K 食による介入を行った。全ネフロン MR 欠損マウスでは集合管主細胞の MR-ENaC 経路が遮断されるため、高食塩食・Aldo 投与時に低 K 血症性アルカローシスが見られず、Pendrin 発現増加や NCC 活性化も乏しかった。一方、高食塩食・Aldo 投与した全ネフロン MR 欠損マウスに低 K 食を与えて低 K 血症性アルカローシスを引き起こすと、Pendrin 発現増加と NCC 活性化が起こった。この結果は先の結論を支持するものであった。

既報において、アルドステロン過剰時の NCC の制御は低 K 血症により直接的に引き起こされることが明らかとなっている。一方、Pendrin は元々はアルカリ負荷により活性化し、間在細胞におけるアルカリ排泄を担う分子として発見された経緯がある。これらを鑑みて、Aldo 過剰時の Pendrin 制御は、代謝性アルカローシスにより引き起こされると推測した。そこで高食塩食・アルドステロン投与した野生型マウスにアセタゾラミドによる介入を行ったところ、低 K 血症は是正されないままにアルカローシスのみが是正されたが、この際に NCC 活性化は抑制されないままに Pendrin 発現増加のみが抑制された。以上から、アルドステロン過剰時には NCC が低 K 血症により、Pendrin がアルカローシスにより制御されるという対比的なメカニズムが明らかとなった。

最後に、NCC 阻害下においてアルカローシスによる Pendrin 制御がもつ意義につき検証した。NCC 欠損マウスに高食塩食・Aldo 投与を行ったところ、低 K 血症性アルカローシスとともに Pendrin 発現の増強が見られ、依然として高血圧が持続していた。本系において、高 K 食を与えて低 K 血症性アルカローシスを補正したところ、Pendrin 発現が著明に抑制され高血圧が改善した。すなわち、Aldo 過剰かつ NCC 阻害時には低 K 血症性アルカローシスによる Pendrin 制御が高血圧維持に働くことが示された。

3) 総括

本研究では、RAAS 活性化時には AII による間在細胞 MR を介した経路と、主細胞 MR-ENaC 経路活性化による低 K 血症性アルカローシスによる経路の、二つの異なる経路による Pendrin 制御が起こることを示した。さらに、NCC 阻害時にはこれら 2 経路が体液量や血圧の維持に働くことを示した。これら成果は学術誌に投稿し、受理された (Ayuzawa, et al. J Am Soc Nephrol. 2020;31:748-764)。高血圧治療の臨床において、NCC 阻害薬であるサイアザイド系利尿薬の使用時には、しばしば RAAS 系の亢進や、低カリウム血症・代謝性アルカローシスが起こることが知られ、これらが Pendrin を活性化して治療抵抗性の高血圧を生じることが想定される。二つの Pendrin 制御機構はいずれも MR 拮抗薬の投与により遮断できるため、サイアザイド利尿薬抵抗性の高血圧の治療において MR 拮抗薬が新たな治療戦略となる可能性が見出された。更に、現在開発中の Pendrin 阻害薬は新規の降圧利尿薬となり得ると考えられる。また、アンジオテンシン II による MR 活性化機構や、アルカローシスによる Pendrin 制御の仕組みなどについても研究が進みつつあり、新たな治療標的の発見が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Ayuzawa Nobuhiro, Nishimoto Mitsuhiro, Ueda Kohei, Hirohama Daigoro, Kawarazaki Wakako, Shimosawa Tatsu, Marumo Takeshi, Fujita Toshiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Two Mineralocorticoid Receptor Mediated Mechanisms of Pendrin Activation in Distal Nephrons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 748 ~ 764
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2019080804	査読の有無 有
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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nobuhiro Ayuzawa, Mitsuhiro Nishimoto, Daigoro Hirohama, Wakako Kawarazaki, Takeshi Marumo, Toshiro Fujita
2. 発表標題 Two different mechanism of pendrin regulation by mineralocorticoid receptor in distal nephron
3. 学会等名 The International Symposium of Aldosterone and Related Substance in Hypertension 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鮎澤信宏、広浜大五郎、西本光宏、河原崎和歌子、丸茂丈史、藤田敏郎
2. 発表標題 ミネラルコルチコイド過剰による食塩感受性高血圧におけるPendrin活性化機構
3. 学会等名 第62回 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobuhiro Ayuzawa
2. 発表標題 Mineralocorticoid receptor in renal intercalated cells mediates RAAS-driven pendrin regulation to maintain fluid homeostasis
3. 学会等名 第61回 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nobuhiro Ayuzawa
2. 発表標題 Two distinct regulations of pendrin by mineralocorticoid receptor in distal nephron
3. 学会等名 The 44th International Aldosterone Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/release/20200208.html</p>

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