

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790385
 研究課題名(和文) 腎尿細管特異的発現誘導型トランスジェニックマウスによる病態解明と新規治療法の開発
 研究課題名(英文) Establishment of inducible proximal tubular cell specific transgenic mice and investigation of pathogenesis of hypertension and diabetes.
 研究代表者
 鈴木 健弘 (SUZUKI TAKEHIRO)
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：50396438

研究成果の概要：腎臓の尿細管において、レニン-アンジオテンシン系は体内の Na 貯留の制御に関わり、高血圧、糖尿病、腎症の発症に関わると考えられていたが、腎臓の高度に分化した構造と機能のためその詳細な病態解明が困難であった。そこでアンジオテンシン II 受容体の近位尿細管特異的かつ、薬剤により発現誘導が可能なトランスジェニックマウスの作製を行い、疾患モデルマウスを用いた病態解析を目指した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	0	2,600,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	210,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用生理学

キーワード：トランスレショナルリサーチ、シグナル伝達、レニン-アンジオテンシン系、高血圧、糖尿病

1. 研究開始当初の背景

レニン-アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system: RAS) は全身の体液の Na^+ , K^+ のバランスと血圧の恒常性維持を担うだけでなく、高血圧症、心血管疾患、腎疾患、糖尿病においてもその作用が病態の進行に関わる重要な因子である。RAS の主要な作用は angiotensin II (A II) の血管への作用と腎臓の尿細管への作用からなり、A II の

作用を媒介する受容体には A II type1 受容体 (AT1) と A II type2 受容体 (AT2) の 2 つの subtype が存在している。AT1 が従来の A II の主要な作用である血管収縮、 Na^+ 再吸収を媒介し、また個々の臓器・組織において細胞増殖、炎症、線維化を促進して、高血圧、糖尿病、腎炎などで病態促進的に作用するのに対し、AT2 は AT1 と拮抗的な作用、すなわち、血管拡張、

Na利尿の促進、細胞増殖の抑制と分化の促進、apoptosisの誘導や線維化の抑制などの作用を担う。また、腎臓の尿細管では局所で産生されるAIIがあり(local RAS)、近位尿細管近傍のAII濃度は血中AII濃度の100倍から1000倍と報告されている。食事の塩分摂取量やRAS抑制薬であるアンジオテンシン変換酵素阻害薬(angiotensin converting enzyme inhibitor: ACEI)とAT1特異的拮抗薬(AT1R blocker: ARB)の投与による血中AII濃度(systemic RAS)の変動に対しlocal RASは独立しており、腎炎や糖尿病性腎症のような病態では腎臓局所の炎症、細胞増殖、血行動態異常にこのlocal RASが関与することが近年明らかとなってきた。また、尿細管local RASではAT1を介したAIIのendocytosisによる輸送系が局所AIIの除去・分解やAT1の細胞膜へのrecycleのみならず、尿細管でのRAS機能の発現に必須であることも近年注目されている。高塩食下でsystemic RASは抑制され血中AII濃度は低下するが近位尿細管でのAII濃度はむしろ上昇し、高血圧発症への関与が示唆される。糖尿病モデルラットではAT1を介した尿細管でのNa⁺-H⁺-exchangerやG proteinによるNa⁺K⁺-ATPase活性によるNa⁺再吸収促進作用が報告されている。腎虚血モデルラットにおいてはAT1は再灌流後に増加して近位尿細管増殖に関与し、ARB投与により虚血後の血中Cr値上昇が抑制されることが示されている。一方、AT2は近位尿細管に作用し、Na利尿を促進するものの、その作用機序と病態時の役割は未だ不明である。従来のACEIやARBあるいはAT2特異的なagonist, antagonistによる検討のみでは、個々の臓器や組織毎のlocal RASの作用の詳細な機能のin vivoでの検討が行えず、AT1とAT2の個々の作用についても独立して検討する系が確立されてはいない。

腎臓以外の臓器では心筋や血管内皮特異的なAT1、AT2のトランスジェニックマウス(T

Gマウス)とノックアウトマウス(KOマウス)による検討があり、心筋梗塞後の組織再構築機構でのAT1による細胞増殖と肥大作用、そしてこれに拮抗して組織再構築を促進するAT2の心保護的作用が明らかとなり、RAS阻害による治療の作用機序が解明され、さらにAT2 agonistの治療への応用などRASを介した新たな治療法開発への端緒となっている。腎臓はRASの主要な標的臓器であるが、その組織構成が高度かつ複雑に分化しており、ネフロンにおいてもAIIの標的は糸球体の輸出・輸入細動脈やメサンギウム細胞、近位尿細管やレニン分泌器官としてAIIで直接調節を受ける傍糸球体装置など多岐にわたる。従来の一様なTGマウスやKOマウスにおいては腎臓内の個々の器官でのRASとAT1、AT2の作用について分析的な検討が困難であり、近位尿細管などの局所で特異的にAT1、AT2を遺伝子操作できる系を用いた検討が待たれていた。

2. 研究の目的

- (1) 近位尿細管特異的なAII type1受容体(AT1), AII type2受容体(AT2)の近位尿細管特異的トランスジェニック(TG)マウスを作製し、テトラサイクリン発現誘導システム(tet-on system)を併用することで薬剤による過剰発現誘導を可能にする。
- (2) 上記TGマウスを用いた高血圧、糖尿病、腎症モデルマウスを作製し、AT1, AT2の過剰発現により、AT1, AT2の各病態発症での役割を検討し、新たな治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 高血圧症、糖尿病、虚血腎でその病態進行にAIIが関わる尿細管作用を検討するため、AII受容体の2つのサブタイプであるAT1とAT2で尿細管特異的かつ薬剤誘導型の過剰発現系TGマウスを作製する。具体的には尿

細管特異的 Cre-loxP 発現システムと ROSA26-rtTA-IRES-GFP 発現系(研究成果図 1.)を組み合わせて、doxycycline で任意に AT1 もしくは AT2 の発現を腎臓近位尿細管特異的誘導できる TG マウスを作製とする。この TG マウスを用いた高血圧、糖尿病、虚血腎モデルでの検討を加えることで各病態における AII の作用を、拮抗的な作用が報告されている、2つの受容体サブタイプ AT1 と AT2 について別個に検討する。

(2)尿細管特異的にテトラサイクリントランス活性化因子である rtTA 蛋白を発現するマウス(ROSA26-rtTA-IRES-GFP)と rtTA 蛋白に doxycycline が結合した状態でのみ下流の遺伝子発現が誘導される tetO7 プロモーターに AT1 もしくは AT2 遺伝子が組み込まれた TG マウス(研究成果図 2.)を交配することで得られる TG マウスは、doxycycline 投与時のみに尿細管に AT1 もしくは AT2 蛋白の過剰発現が誘導される(研究成果図 3.)。

これは遺伝子操作に空間的特異性(尿細管特異的発現)と同時に時間的特異性(薬剤による発現誘導)を与える。その利点として他の臓器や腎臓内の AII 標的細胞への影響を避けつつ、疾患モデルでの病態の特定時期に尿細管における AT1、AT2 の作用を直接 *in vivo* で検討できる。

4. 研究成果

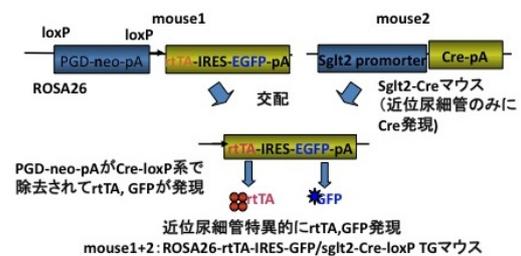
(1)近位尿細管特異的rtTA/GFP蛋白発現トランスジェニックマウスの作製

ROSA-rtTA-IRES-GFP マウス(Belteki G. et al. Nucleic Acids Res. 33. 2765-2774. 2005)は Cre enzyme の発現する臓器でのみ loxP 配列間の PGD-neo 遺伝子が除去され、下流の rtTA 蛋白と GFP 蛋白が発現する TG マウスである。近位尿細管特異的プロモーターである sglT2(Na⁺-glucose cotransporter2) プロモ

ーターにより尿細管特異的に Cre enzyme を発現する TG マウス:sglt2-Cre マウス(Rubera I. et al. J Am Soc Nephrol.)を交配して近位尿細管特異的に rtTA 蛋白と GFP 蛋白が発現する TG マウスを作製する(図 1)。この時点で mouse 1+2 の腎臓から細胞を取り出し、FACS で GFP 蛍光を持つ細胞を選別すると、近位尿細管細胞のみが単離され、近位尿細管の primary culture が容易にできるようになる。

この細胞を用いて高血糖、AII 負荷時の Na⁺輸送とそれに対する各種薬物の効果を検討する。

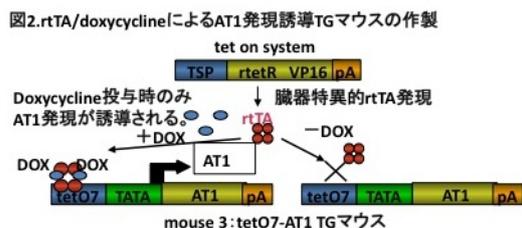
図1.近位尿細管特異的rtTA,GFP発現TGマウスの作製



(2)rtTA/doxycycline誘導型(tet-on system)のAT1/AT2 トランスジェニックマウスの作製

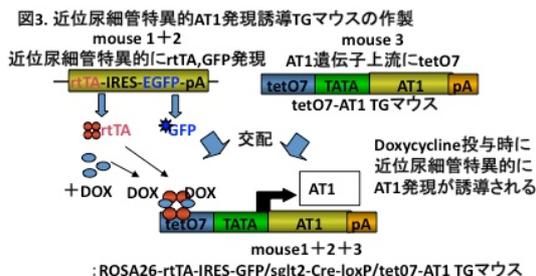
rtTA蛋白はdoxycyclineが結合した時のみ tetO7 プロモーターに結合し、下流の遺伝子発現が誘導される(tet-on system)。tetO7 をもつベクターPBI3(Baron U et al. Nuc Acids Res. 23, 3605-3606. 1995)にcloningしたAT1 もしくはAT2 のcDNAを組み込み、tetO7 プロモーター下に発現が制御されるコンストラクトを構築して、これを用いたTGマウスを作製する(図 2. tetO7-AT1/tetO7-AT2 TGマウス)。このマウスは全身の細胞のgenomeに tetO7-AT1/AT2 のコンストラクトが挿入されているが、rtTA蛋白は発現していないため、AT1 の発現はこの時点では誘導されないままである。このため、さらにrtTA蛋白が発現している臓器特異的に、かつdoxycycline投与時のみAT1/AT2 の発現が誘導されること

になる(図2)。



(3) 近位尿細管特異的発現誘導型AT1/AT2 トランスジェニックマウスの作製

近位尿細管特異的に rtTA 蛋白を発現する TG マウスと tetO7 プロモーター下に tet-on system で AT1/AT2 を発現する TG マウスを交配する。こうして得られる TG マウスは全身の細胞の genome 内に tetO7-AT1/AT2 が組み込まれており、かつ腎臓の近位尿細管細胞にのみ rtTA 蛋白が発現している。この時点で AT1/AT2 発現は誘導されず、doxycycline 投与後、rtTA 蛋白が発現している腎尿細管でのみ rtTA 蛋白-doxycycline 結合体が tetO7 プロモーターに結合して、AT1 もしくは AT2 の過剰発現が近位尿細管特異的に誘導される。現在、TG マウスの作製が進行している。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

①鈴木健弘、伊藤貞嘉 CKDと心疾患

Medicament News 2009年3月15日号(第1973号)第9面-第11面 2009 査読無

②鈴木健弘、海野倫明、阿部高明 トランスポーターと癌 遺伝子医学MOOK 12号「創薬研究者必見!最新トランスポーター研究 2009」

140-141. 2009 査読無

③Suzuki T. and Abe T. Thyroid hormone transporters in the brain. *Cellebellum*

13:1-9. 2007 査読有

④鈴木健弘 甲状腺ホルモントランスポーター一遺伝子群の単離と機能解析 東北医学雑誌

119:59-64, 2007 査読無

[学会発表] (計 14 件)

① 鈴木健弘 「プラバスタチンは有機アニオントランスポーターを介して膵β細胞からのインスリン分泌を刺激する」第31回日本高血圧学会総会 平成20年10月11日、札幌市

② 鈴木健弘 「HMG-CoA還元酵素阻害薬は有機アニオントランスポーターを介して膵β細胞からのインスリン分泌を促進する」第14回成人病の病因・病態の解明に関する研究会 平成20年7月6日、長野県軽井沢市

③ 鈴木健弘 「Pravastatinは有機アニオントランスポーターを介して膵β細胞からのインスリン分泌を刺激する」文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「生体膜トランスポートゾームの分子構築と生理機能」平成19年度第一回班会議 平成19年7月24日、湘南国際村センター(神奈川県)

④ 鈴木健弘 「腎臓近位尿細管特異的薬剤誘導型遺伝子発現機構の開発」第13回成人病の病因・病態の解明に関する研究会 平成19年7月1日、長野県軽井沢市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 健弘 (SUZUKI TAKEHIRO)

東北大学・病院・助教

研究者番号: 50396438