

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08713

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症の病態形成における腸管ミネラルコルチコイド受容体機能の関与の検討

研究課題名(英文) Involvement of enteric mineralocorticoid receptor in the pathogenesis of diabetic nephropathy.

研究代表者

栗原 勲 (Kurihara, Isao)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師(非常勤)

研究者番号：90338038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸管ミネラルコルチコイド受容体(以下MRと略す)は、腸管におけるNa吸収を介して生体の血圧調節に重要な役割を果たしているが、糖代謝異常および糖尿病性腎症を含めた臓器合併症への関与については、未解明な点も多い。本研究では、腸管MR欠損マウスを用いて、腸管MRの新たな機能を検討することを目的とした。腸管組織を用いたマイクロアレイ解析では、糖代謝関連因子の発現に変化がみられたが、特定の病態形成への関与を示すことはできなかった。MRの機能亢進モデルとして、MRの新規corepressorであるCasz1の腸管特異的欠損マウスの作出し、現在、このモデルを用いて腸管MRの糖代謝への影響を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、日常診療において降圧薬として使用されているMR拮抗薬は、高血圧に対してのみならず、心不全や糖尿病性腎症の予後改善効果など多くの病態において、その有益性が大規模臨床研究によって示されている。中でも、末期腎不全患者におけるMR拮抗薬の有益性は特筆すべき知見であり、MR拮抗薬が、腎臓MRだけでなく、腸管MRをも介してその有益性をもたらしている可能性が推察される。これまで、各種疾患における腸管MRの関与については、ほとんど注目されておらず、本研究の成果は、病態解明において新たな視点を与え、各種疾患、特に糖代謝疾患における新規治療アプローチの開発へ、有用な知見をもたらしてくれることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We recently demonstrated that enteric mineralocorticoid receptor (MR) has a pivotal role in blood pressure regulation through Na uptake in the gut by using enterocyte-specific MR deficient mice, which were originally developed in our research group. In this study, we used the same animal model to elucidate a novel function of enteric MR on glucose metabolism and its related comorbidities including diabetic nephropathy. In the microarray analysis using the intestinal tissues derived from this model, some of the factors related with glucose metabolism had altered expression, but we could not demonstrate the involvement of enteric MR in the pathogenesis of certain metabolic disorders. Then we developed enterocyte-specific Casz1 deficient mice, in which enteric MR is aberrantly activated because Casz1 is a newly-identified corepressor of MR, to conduct further analyses for this unanswered issue.

研究分野：内分泌学

キーワード：ミネラルコルチコイド受容体 腸管 糖代謝

## 1. 研究開始当初の背景

ミネラルコルチコイド受容体 (mineralocorticoid receptor, 以下 MR と略す) 拮抗薬は、日常の高血圧診療において降圧薬として幅広く使用され、中でもアルドステロン過剰を呈する病態である原発性アルドステロン症の診療では、その有用性について多くの報告がなされている。一方、RALES 試験 (Pitt et al. N Eng J Med 1999) や EPHEsus 試験 (Pitt et al. N Eng J Med 2003) など、循環器領域での数々の大規模臨床研究では、慢性心不全患者の生命予後改善効果が示され、単に高血圧症の治療薬としてだけでなく、様々な臓器保護効果を期待されて臨床の現場での使用が拡大された。その流れを受け、糖尿病性腎症においても、MR 拮抗薬によるアルブミン尿の改善効果が多くの臨床研究で示され (Rossing et al. Diabetes Care 2005, Epstein et al. Clin J Am Soc Nephrol 2006) その MR 拮抗薬によるアルブミン尿改善効果は、新規開発過程の MR 拮抗薬の有効性を評価する指標の 1 つとしても使用されるようになった (Katayama et al. J Diabetes Complications 2017)。さらに注目すべきは、末期腎不全患者においても、MR 拮抗薬投与による生命予後の改善が示され、メタ解析の結果も報告されている (Quach et al. Am J Kidney Dis 2016)。このことは、腎以外の MR が病態形成に関与していることを示唆する興味深い知見と考えることができる。

これまで、MR 拮抗薬の主たる作用部位は腎尿管と考えられてきたが、このような背景から腎以外の全身における MR の機能に注目が集まるようになった。心筋や血管平滑筋などで組織特異的 MR 欠損マウスが作出され、その表現型解析から新たな MR の機能が次々と明らかになってきた (Rickard et al. Hypertension 2012, McCurley et al. Nat Med 2012)。しかしながら、これらの非上皮性組織における MR 欠損マウスでは、組織炎症やリモデリングといった局所における MR 作用の表現型は呈するものの、血圧等の全身に及ぶ表現型は軽微であった。MR は、上皮性組織として腸管にも高い発現を認め、我々は、腸管上皮特異的 MR 欠損マウス (以下、腸管 MRKO と略す) を作出し、その表現型解析を通じて、腸管 MR の血圧調節における寄与を明らかにした (Nakamura et al. J Am Heart Assoc 2018、平成 28~30 年度基盤研究 C 採択課題)。

腸管において、MR は十二指腸から遠位結腸まで幅広く分布するが、血圧調節において重要なエフェクターである上皮性 Na チャネル (epithelial Na channel, 以下 ENaC と略す) は結腸にしか発現しておらず、小腸 MR には、血圧調節とは別の生体における役割があると考えられた。上述した糖尿病性腎症における MR 拮抗薬の有益性について、腸管 MR の関与を検討した報告はこれまでになく、小腸 MR の未知の機能との関連も予想された。なお、海外からの臨床報告に関するメタ解析によれば、MR 拮抗薬は血糖値を変化させないとされている (Korol et al. Medicine 2018)。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々がすでに腸管上皮特異的 MR 欠損モデルを確立しているというアドバンテージを活かして、本マウスモデルを用い、糖代謝異常およびそれに関連する臓器障害の病態形成における腸管 MR の関与を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

villin-Cre マウスと MR-flox マウスの交配により作出した腸管 MRKO を用いて、5 週齢より高脂肪食負荷を行い、申請時よりサンプル数を増やして、血圧、空腹時血糖、アルブミン尿の評価を行った。対照マウス (以下 Control と略す) として、MR-flox/flox マウスを用い、同様の評価を行った。また、2 群に対し、カロリー制限食負荷も行い、比較検討した。

続いて、腸管 MRKO および Control に、シリンジポンプを用いて 1 週間のアルドステロン投与を行い、空腸、回腸、遠位結腸の 3 部位の腸管組織から mRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。vehicle として、PBS を投与し、4 群での比較を行った。この後、追加検討として、OGTT による耐糖能の評価も行った。

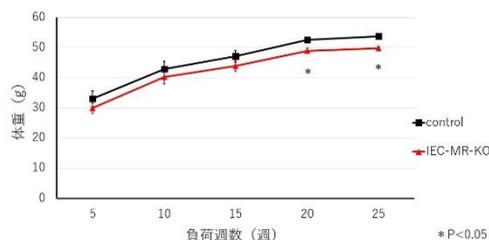
また、MR の機能亢進モデルとして、腸管上皮特異的 Casz1 欠損マウスの作出も行った。Casz1 は、我々が新規 MR corepressor として報告した因子であり (Yokota et al. Hypertens Res 2021) その欠損マウスでは、MR 機能が亢進していることが想定される。villin-Cre マウスと Casz1-flox マウスの交配により作出した。

## 4. 研究成果

### (1) 腸管 MRKO の表現型解析

高脂肪食負荷開始後 20~25 週において、Control および腸管 MRKO とともに、体重の増加を認めたが、腸管 MRKO において体重の抑制傾向が認められた (図 1)。体重増加に伴う血圧上昇においても、腸管 MRKO で抑制傾向が認められたが、有意差を認めなかった。便中 Na 排泄は、腸管 MRKO において有意に高値であり、代償的に、腸管 MRKO では尿中 Na 排泄の低下が認められた。アルブミン尿は、高

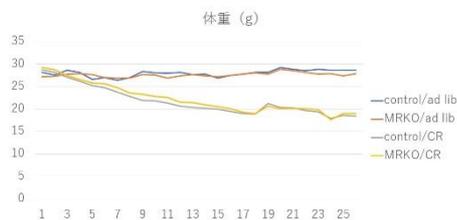
図1 高脂肪食下の体重の推移



脂肪食負荷の週数が進むにつれ増加を認めましたが、腸管 MRKO でアルブミン尿の有意な抑制は認められなかった。6 時間空腹後の血糖の評価を行ったところ、腸管 MRKO で低値傾向を示したが、群間で有意な差は認めなかった。

高脂肪食負荷で、両群間に体重の差が認められたため、カロリー制限食負荷による検討も行った。カロリー制限食負荷後 4 週において、Control および腸管 MRKO とともに体重減少が認められたが、両群間で有意差は認めなかった ( 図 2 )

図2 カロリー制限食(CR)下の体重の推移



### ( 2 ) 腸管 MRKO の腸管組織を用いたマイクロアレイ解析

各組織におけるパスウェイ解析では、結腸では予想されたとおり、salt reabsorption を中心としたミネラル代謝調節が腸管 MR の主たる機能であることが示され、実際、ENaCB や ENaCy などの既知の腸管 MR 標的遺伝子が高い fold change を示していた。一方、興味深いことに、回腸では、carbohydrate digestion and absorption など糖代謝に関連する機能が上位を占めていた。個々の遺伝子では、GLUT2 や G6Pase などが高い fold change を示していた。その他にも、多くの SLC ファミリーが腸管 MR 作用下で発現変化している結果が得られた。

図3 OGTTにおける血糖の推移



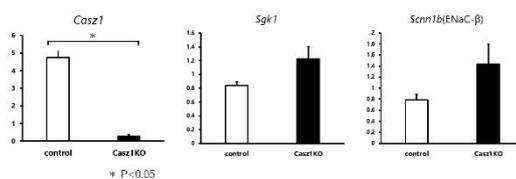
そこで、追加の検討として、Control および腸管 MRKO に対し OGTT によるより詳細な耐糖能の評価を行った。図 3 に示すとおり、腸管 MRKO では血糖上昇の抑制傾向が認められたが、再現性を評価したところ、両群間で有意な差は認められなかった。

### ( 3 ) 腸管上皮特異的 Casz1 欠損マウスの作出

上述の検討では、腸管 MR が糖代謝異常に関与していることを示唆する所見が部分的には見られているものの、いずれも有意な表現型として捉えることはできなかった。本結果について、腸管 MRKO に生じる何らかの代償的反応が、Control との差を見えにくくしている原因になっている可能性も考えられた。

一般に、機能喪失型のモデルは、生体にとってむしろ有益な機能を解析することに優れており、腸管 MR の疾患への関与を検討するためには、機能獲得型のモデルを用いた解析も行うべきと考えた。我々はこれまで、MR の活性化に関与する因子として MR の転写共役因子に着目し、新規 MR 転写共役因子の探索・同定のプロジェクトを進めてきた。その中で、疫学的に高血圧との関連が示唆されていた 2 つの因子、Casz1 および LSD1 に注目し、これらの機能解析を行った。その結果、Casz1、LSD1 とともに、MR の新規 corepressor であることを明らかにした ( Yokota et al. Hypertens Res 2021, Kohata et al. Hypertens Res 2022 )。villin-Cre マウスと Casz1-flox マウスの交配により得られた villin-Cre, Casz1-flox/flox マウスを腸管上皮特異的 Casz1 欠損マウスとして使用し、対照マウスには Casz1-flox/flox マウスを使用した。作出マウスの validation を行い、腸管における MR 活性の亢進が確認できている ( 図 4 )

図4 遠位結腸における mRNA 発現



### ( 4 ) 本研究結果の国内外における位置づけと今後の展望

本研究は新規性、独創性の高い研究として、腸管 MR の生体における意義について、新たな知見を与えてくれることが期待されたが、当初想定していた以上に複雑な機能があると考えられ、使用したモデルマウスで論文報告可能な結果を引き出すことはできなかった。しかしながら、いくつか興味深い結果は得られており、適切なモデルマウスの選定などを通じて多角的なアプローチを続け、新たな腸管 MR の機能およびその生体における意義を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kohata Nao, Kurihara Isao, Yokota Kenichi, Kobayashi Sakiko, Murai-Takeda Ayano, Mitsuishi Yuko, Nakamura Toshifumi, Morisaki Mitsuha, Kozuma Takahide, Torimitsu Takuto, Kawai Miki, Itoh Hiroshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Lysine-specific demethylase 1 as a corepressor of mineralocorticoid receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 641 ~ 649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-022-00859-7	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 -

1. 著者名 Yokota Kenichi, Shibata Hirotaka, Kurihara Isao, Kobayashi Sakiko, Murai-Takeda Ayano, Itoh Hiroshi	4. 巻 44
2. 論文標題 CASZ1b is a novel transcriptional corepressor of mineralocorticoid receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 407 ~ 416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-020-00562-5	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8件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横田 健一, 柴田 洋孝, 栗原 勲, 曾根 正勝, 伊藤 裕
2. 発表標題 CASZ1bは新規のミネラルコルチコイド受容体転写抑制因子である
3. 学会等名 第43回日本高血圧学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗原 勲
2. 発表標題 MR関連高血圧の概念と分子病態
3. 学会等名 第43回日本高血圧学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川 賢, 宮下 和季, 小林 佐紀子, 木内 謙一郎, 武田 利和, 田村 全, 中塚 誠之, 水谷 洋佑, 大友 佑介, 青山 和樹, 横田 健一, 栗原 勲, 伊藤 裕
2. 発表標題 副腎動脈造影と分枝選択的副腎静脈サンプリングにより診断に至ったアルドステロン産生腺腫の1例
3. 学会等名 第22回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田 利和, 安水 洋太, 田中 伸之, 松本 一宏, 森田 伸也, 小坂 威雄, 水野 隆一, 田村 全, 栗原 勲, 中塚 誠之, 浅沼 宏, 伊藤 裕, 大家 基嗣
2. 発表標題 アルドステロン産生腺腫に対するreduced port surgeryによる副腎温存手術
3. 学会等名 第109回日本泌尿器学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗原 勲, 伊藤 裕
2. 発表標題 水電解質領域および尿細管機能の基礎研究:最近の進歩と臨床へのつながり 腸管におけるNaハンドリングと血圧調節
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 1.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30回臨床内分泌代謝update
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗原 勲, 伊藤 裕
2. 発表標題 原発性アルドステロン症:診断と治療の最前線 原発性アルドステロン症診療における10 年の進歩
3. 学会等名 第107 回日本泌尿器科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野 洋一, 曾根 正勝, 稲垣暢也, 山崎 俊成, 小川 修, 武田 仁勇, 栗原 勲, 伊藤 裕, 馬越 洋宜, 立木 美香, 一城 貴政, 方波見 卓行, 川村 孝, 成瀬 光栄, JPAS 研究
2. 発表標題 肥満は特発性アルドステロン症における重要な背景因子の一つである
3. 学会等名 第42 回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019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