

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17720

研究課題名(和文) 傍系球体装置で基質接着因子インテグリンのリン酸化が血圧調節に關与する機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms about regulation of blood pressure by phosphorylated integrin in juxtaglomerular apparatus

研究代表者

近藤 真澄 (KONDO, Masumi)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：60710275

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)：糖尿病性腎症による高血圧の誘導は、傍系球体細胞からのレニン分泌量の増加に依存しているが、傍系球体細胞自身が輸入細動脈の血圧変化を感知して反応するメカニズムについては、まだ明らかにされていない部分が多い。本研究では、 $\alpha 1$ -integrinのスレオニン-788/789部位が、傍系球体細胞特異的にリン酸化されていることを発見し、そのリン酸化の程度はレニン産生と負の相関があることをin vivoとin vitroで明らかにした。培養系での $\alpha 1$ -integrinのノックダウンはレニン産生を増加させ、 $\alpha 1$ -integrinが細胞の圧感知機能の制御を介してレニン産生の調節に深く関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症による高血圧の誘導は傍系球体細胞からのレニン分泌量の増加に依存している。レニン産生制御の機序として、レニン産生細胞である傍系球体細胞への外部からの分泌因子による調節が集中的に研究されているが、傍系球体細胞自身が輸入細動脈の血圧変化を感知して反応するメカニズムについては未だ明らかにされていない部分が多い。本研究では、 $\alpha 1$ -integrinが細胞の圧感知機能に影響し、そのリン酸化がレニン産生の調節に深く関与していることが明らかにされた。詳細の知られていない傍系球体細胞の圧感知の機序を明らかにすることで、糖尿病性腎症における高血圧の誘導を抑制する治療法の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The induction of the high blood pressure due to diabetic nephropathy depends on increase of the renin secretion from juxtaglomerular cells, but there are many parts which are not yet apparent about the mechanism that juxtaglomerular cell itself senses a blood pressure change of the afferent arteriole and reacts. In this study, we found a juxtaglomerular cell-specific phosphorylation of the threonine-788/789 site of $\alpha 1$ -integrin, and its expression level was negatively correlated with renin production. This relationship was also observed in a culture system of juxtaglomerular cell line, suggesting that $\alpha 1$ -integrin is deeply involved in the regulation of renin production. The knockdown of $\alpha 1$ -integrin in the culture system increased renin production, which suggests that the mechanism of $\alpha 1$ -integrin regulation of renin production in juxtaglomerular cells may contribute to the pressure-sensing function of juxtaglomerular cells themselves.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：レニン インテグリン リン酸化

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症(DN)と高血圧は互いの憎悪因子であることは広く知られている。DN による糸球体の血管障害が血流を低下させると、傍糸球体(juxtaglomerular, JG)細胞からのレニン分泌が刺激されレニン-アンジオテンシン系の作用により血圧が上昇するが、増大した血流は糸球体の血管をさらに障害する結果、より一層血圧を上昇させる悪循環に陥る。レニン-アンジオテンシン系による血圧調節の律速酵素はレニンであり、腎機能低下と高血圧の悪循環の鍵となっている。JG細胞からのレニン分泌に関与する調節機構は、(a)血流量や血圧の減少を感知した腎交感神経の興奮によるアドレナリン受容体を介した亢進、(b)緻密斑(マクラデンサ、MD)において原尿中のNaCl濃度変化を感知して放出されるプロスタグランジンE₂(PGE₂)を介した亢進、およびアデノシン/ATPを介した抑制、(c)JG細胞の圧受容体(baroreceptor)での血圧感知による亢進/抑制、(d)アンジオテンシンなどの体液性因子による調節、が知られている。この内、(c)はレニン分泌の最も強力な調節機構と考えられているが、JG細胞の圧感知に関する詳細な機序は未だ明らかになっていない。

私たちは、糖尿病のヒトとラットの腎臓における $\alpha 1$ インテグリン(ITG $\alpha 1$)の修飾を調査して、傍糸球体装置(JG apparatus)で数種のリン酸化ITG $\alpha 1$ の特異的な発現を検出している(図1)。この際、Thr788/789-リン酸化ITG $\alpha 1$ がJG細胞、Ser785-リン酸化ITG $\alpha 1$ がMD細胞に特異的に検出されることをそれぞれの細胞分化マーカー(レニン、NOS-1)との二重染色により確認した。これらのリン酸化ITG $\alpha 1$ の発現強度はDNの進行に従って変化しており、JG装置の主要な機能であるレニン産生制御を含む血圧調節機能に関与している可能性が考えられた。特に、これらのリン酸化ITG $\alpha 1$ の発現がJG装置に限定されていることから、リン酸化ITG $\alpha 1$ がJG細胞の圧感知によるレニン産生制御に関わっていることが予測された。

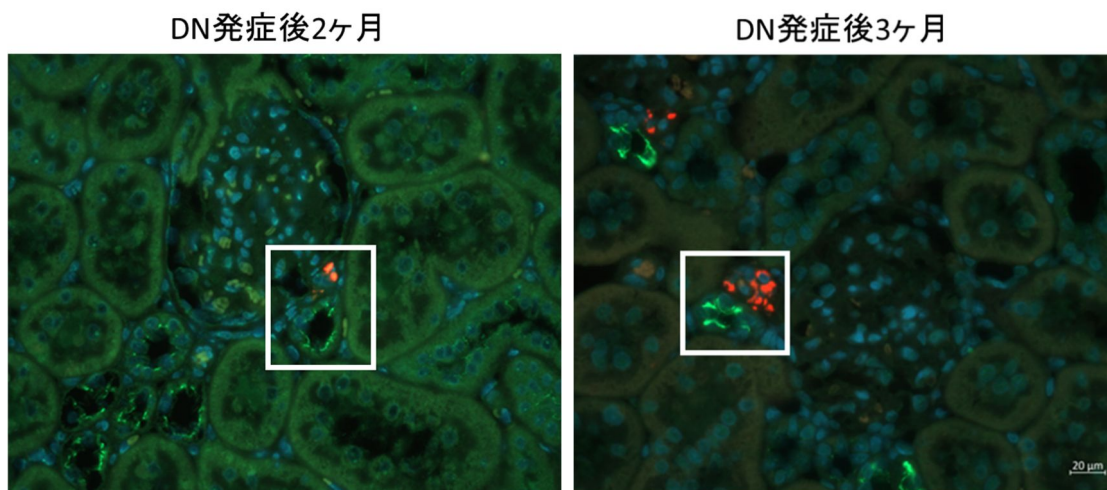


図1.糖尿病性腎症ラットの腎臓でのリン酸化インテグリンの検出。ストレプトゾトシン(STZ)を投与して糖尿病を発症させたラットの腎臓組織切片に対し、抗 Thr788/789-リン酸化 ITG $\alpha 1$ 抗体(赤色)および抗 Ser785-リン酸化 ITG $\alpha 1$ 抗体(緑色)を作用させて二重染色を行った。核はDAPI染色(青色)されている。(四角):傍糸球体装置(JG装置) bar:20 μ m

2. 研究の目的

以上の調査より、本研究の目的は「DNの進行に伴う血圧変化の調節にJG細胞とMD細胞のITG $\alpha 1$ リン酸化が関与する可能性を検討し、その機序を解明する」ことであり、具体的には細胞-基質間接着因子であるインテグリンの機能に着目して、ITG $\alpha 1$ リン酸化がJG細胞の圧感知機能の制御により血圧の調節を行っている可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1)糖尿病性腎症の進行過程におけるITG $\alpha 1$ リン酸化とレニン産生の関連に関する調査:糖尿病性腎症モデル動物(STZラット)を用いて、DNの進行過程におけるITG $\alpha 1$ リン酸化とレニン発現の定量化を行い、両者の関連性を検討する。

(2)in vitro培養系におけるITG $\alpha 1$ リン酸化/脱リン酸化の効果の検討:株化された、マウス傍糸球体細胞As4.1およびマウス緻密斑細胞NEMDの培養系で、ITG $\alpha 1$ のリン酸化/脱リン酸化を薬剤投与により促進し、レニン発現に対する効果を評価する。

(3)ITG $\alpha 1$ リン酸化による圧感知制御の検討:in vitro培養系を用いて、ITG $\alpha 1$ が圧感知によるレニン産生制御に関与している可能性について検討する。

4. 研究成果

(1) 糖尿病性腎症の進行過程における ITG 1 リン酸化とレニン産生の関連に関する調査
 STZ ラットの腎臓を DN 進行過程 (1~6 ヶ月) で摘出し、抗 Thr788/789-リン酸化 ITG 1 抗体および抗 Ser785-リン酸化 ITG 1 抗体を用いて染色し、切片にみられる糸球体 1 個あたりの ITG 1 のリン酸化細胞数を算出すると共に、同切片におけるレニン産生を定量的 RT-PCR により測定した。Thr788/789-リン酸化 ITG 1 を発現する JG 細胞の数は糖尿病発症後 2 ヶ月目まで減少し続けたが、その後は増加に転じて元のレベルにまで回復したのに対し、腎臓のレニン mRNA 量は発症後 2 ヶ月目でピークに達した後、減少して発症前のレベルにまで戻るといった逆のパターンを示した (相関係数 -0.65 、図 2)。一方、Ser785-リン酸化 ITG 1 は糖尿病の初期段階では遠位尿細管上皮細胞に弱く検出されるだけであったが、発症後 3-4 ヶ月目になると MD 細胞での発現が非常に強く検出されるようになった。蛍光抗体を用いてリン酸化 ITG 1 の発現強度を測定した場合も、同様の結果が得られた。

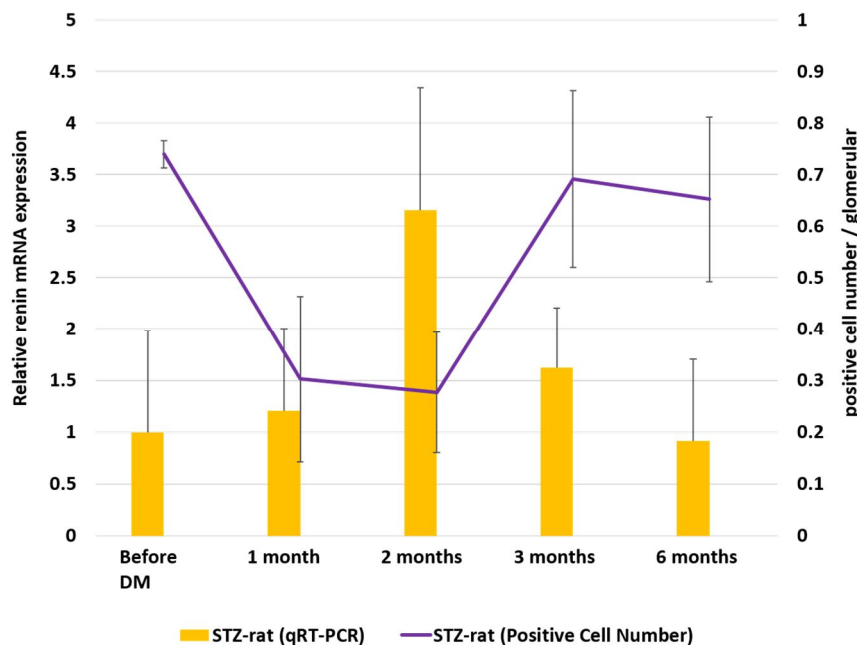


図 2. DN 進行過程の STZ ラットの腎臓切片における抗 Thr788/789-リン酸化 ITG 1 抗体陽性細胞数 (糸球体あたり換算、線グラフ) とレニン発現量 (qRT-PCR、発症前に対する相対値、棒グラフ) の遷移

(2) *in vitro* 培養系における ITG 1 リン酸化/脱リン酸化の効果の検討
 株化されたマウス傍糸球体細胞 As4.1 およびマウス緻密斑細胞 NEMD の培養系で、ITG 1 の Thr788/789-リン酸化を PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) や TGF 1 (Transforming growth factor 1) で促進するとレニン発現は減少し、BIM-1 (bisindolylmaleimide 1) で脱リン酸化を促進すると、レニン発現はそれぞれ増大した。ITG 1-Thr788/789 がリン酸化量とレニン発現が負の相関を持つことが *in vitro* でも確認された (図 3)。

また同様に MD 株細胞 (NE-MD) の ITG 1-Ser785 のリン酸化を促進すると、レニン分泌の促進因子である一酸化窒素 (NO) の合成酵素 (nNOS) の発現抑制が観察された。

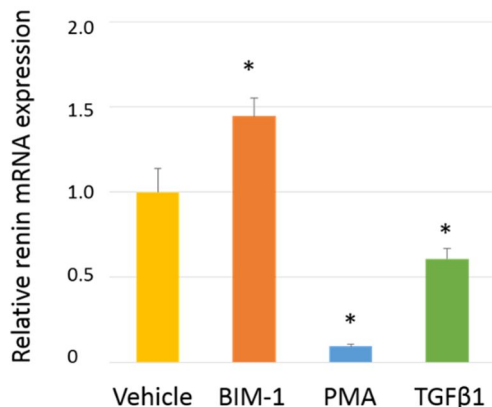


図 3. マウス傍糸球体細胞 As4.1 の培養に $2 \mu\text{M}$ BIM-1、 50 ng/ml PMA、 1 ng/ml TGF 1 を添加して 24 時間後にレニン発現を qRT-PCR で測定した。*: 対照に対し $P < 0.05$

(3) ITG 1 リン酸化による圧感知能制御の検討

マウス傍系球体細胞 As4.1 の培養に対し、ITG 1 の siRNA を導入してノックダウンを行ったところ、レニン発現が増加した。同様に JG 細胞の圧受容体分子である Connexin 40 (Cx40) をノックダウンした場合もほぼ同程度のレニン発現の増加が観察されており、これらは圧感知によるレニン発現制御が失われた状態と考えられた。

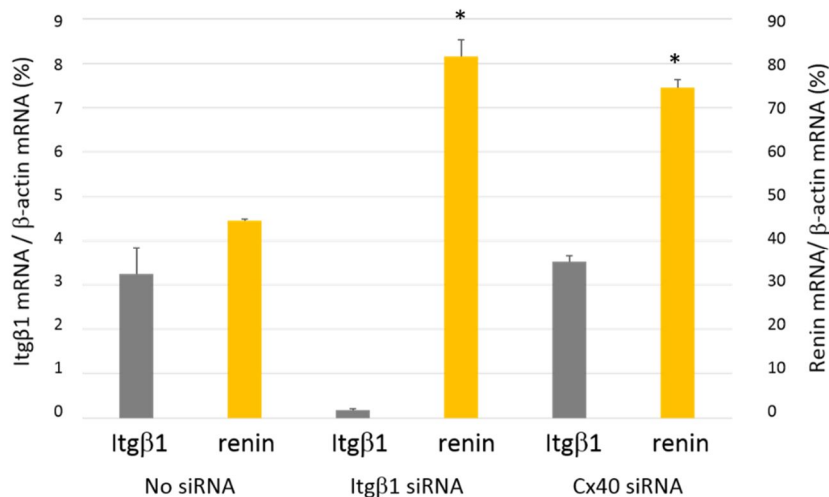


図 4. マウス傍系球体細胞 As4.1 を用いて ITG 1 あるいは Cx40 のノックダウンを行い、レニン発現を qRT-PCR で測定した。* : * : 対照に対し $P < 0.05$

以上の調査結果は、DN において ITG 1 のリン酸化がレニンの産生制御を含む JG 装置の血圧調節機構と密接に関連していることを示しており、その機序として圧感知によるレニン発現制御を推測させるものであると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齊藤仁通、近藤真澄、小野萌、金山典子、木村守次、澤田佳一郎、豊田雅夫、深川雅史
2. 発表標題 糖尿病性腎症の血圧調節に関わる傍糸球体装置のインテグリン機能の解析
3. 学会等名 日本糖尿病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齊藤仁通、近藤真澄、小野萌、金山典子、木村守次、澤田佳一郎、豊田雅夫、深川雅史
2. 発表標題 糖尿病性腎症の血圧変化に関与する傍糸球体細胞 1 インテグリンの機能の検討
3. 学会等名 日本糖尿病学会
4. 発表年 2021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
---------	---------