

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590978

研究課題名（和文） 尿細管イオントランスポーターとNEDD4Lの解析による本態性高血圧症の成因の解明

研究課題名（英文） Identifications for molecular mechanisms of essential hypertension in terms of urinary tubular ion transporter and human NEDD4L.

研究代表者

石上 友章 (ISHIGAMI TOMOAKI)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：50264651

研究成果の概要（和文）：

これまでに、尿細管上皮細胞における上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)及び、その翻訳後修飾に重要な働きをするユビキチン化酵素 Nedd4L に着目して、本態性高血圧症の成因を明らかにしてきた。本研究期間の間、Nedd4L の細胞膜での結合にかかわる scaffolding タンパクである NPC2 の同定に成功し、Nedd4L2 ドメインノックアウトマウスの作成に成功し尿細管ナトリウム再吸収機構について検討し、研究発表をしている。

研究成果の概要（英文）：

Nedd4L has been paid attention for its unique ubiquitinating properties that does an important working to cuticle sodium channel (ENaC) in the tubular epithelial cell and the post-transcriptional modification so far. Clarification and study results of the urinary tubular sodium re-absorption mechanism, and the role of Nedd4L in cardio-renal relationship is examined and the research announcement is done.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：尿細管 ナトリウム輸送 Nedd4L 本態性高血圧症 心腎連関

## 1. 研究開始当初の背景

本態性高血圧症の成因論としては、過去に『腎内レニンとネフロン heterogeneity』説(Laragh & Sealey), 『low nephron number』説(Brenner), 『傍糸球体装置(JGA)機能異常』説(Kuroda)などが提唱されていたが、決定的なものはない。1990年代に分子遺伝学的手法が世界的に用いられたことで、本症ならびに遺伝性高血圧症の遺伝子解析研究が隆盛となった。遺伝性高血圧症の遺伝子解析は、Lalouel JM, Lifton RP らの研究成果が著しい。Liddle 症候群、Gordon 症候群、

AME, GRA といった遺伝性高血圧症では、尿細管イオントランスポーターおよびその調節因子の遺伝的異常により高血圧症をもたらすことが、明らかになっている。(Lifton, Gharavi et al. Cell 2001) 多因子疾患である本態性高血圧症の分子遺伝学的研究では、研究代表者の留学先である Lalouel JM らが最初に報告した angiotensinogen (AGT) 遺伝子が有力な候補遺伝子である。(Jeunemaitre, Soubrier et al. Cell 1992) 研究代表者は、これまでにヒト AGT 遺伝子のプロモーター領域の遺伝子多型に注目して、分子遺伝学的手

法(Ishigami T et al. Hypertension. 1997, 1999/Circulation 1995)および、共同研究者らと遺伝進化(Nakajima T, Ishigami T, et al. AJHG 2002, 2004)の観点から、さらには分子遺伝学的手法から離れて、マウスを用いた解析から尿細管レニン・アンジオテンシン(tubular RA)系に注目し、本症の分子病態生理を明らかにしてきた。(Rohrwasser A, Ishigami T, Lalouel JM et al. Hypertension 2002, Kidney Int. 2003, 2004)さらに本症の成因の腎臓尿細管仮説をさらに確かなものにするべく、尿細管上皮細胞におけるナトリウム再吸収に働く主要なイオントランスポーターである上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)の特異的なダウンレギュレーターである、ユビキチン化酵素 Nedd4L に着目した研究に着手した。その結果、ヒト Nedd4L 遺伝子の resequencing と bio-informatics を応用した手法を用いることで、C2 ドメイン(カルシウム依存性細胞膜結合ドメイン)の存在と 38 の新規 SNP を初めて報告した。(Ishigami, T, Dunn M, et al. JHG 2002)このうち第 13 番目の SNP(variant 13 G/A: rs4149601)は、第一エクソンの splice end に存在し、この変異により C2 ドメインを有するヒト I 型 Nedd4L の産生が制御されていることを明らかにした。その後、ラットにも同様な molecular diversity が存在すること(Umemura M, Ishigami T, et al. BBRC 2006)、本邦人を対象にした関連研究で SNP が本態性高血圧症と有意に関連すること(Ishigami T, et al. GGI 2007)を報告した。本 SNP と高血圧症との関連は、我々のみならず、他の研究者からも報告されている。(Fava, von Wöhrn et al. 2006; Dahlberg, Nilsson et al. 2007)さらに我々は、研究を進めた結果、ヒト I 型 Nedd4L の遺伝子、タンパクとしての性質を詳細に解析し下記のような成果を得ている。

#1 ヒト I 型、II 型、III 型 Nedd4L 遺伝子のクローニングに成功し、in vitro, in vivo でのタンパク質の発現を証明した。

#2 定量的 PCR 法を用いて、I 型 Nedd4L 遺伝子産物の発現が腎臓特異的に認められること、一方同様な C2 ドメインを有する II 型 Nedd4L 遺伝子産物は、肺に特異的に発現が認められることを発見した。

#3 独自に作成した抗 C2 ドメイン特異的抗体を用いたヒト腎臓に対する免疫組織染色法による観察から、Nedd4L タンパクが ENaC の発現と一致して、late DCT~CCD~CD の terminal nephron に発現していることを発見した。

#4 I 型 Nedd4L 遺伝子のプロモーター領域の解析から、CREBP コンセンサス配列を見出し、同部位が有意に遺伝子の発現制御に働いていることを見出し、生体における発現調節機構の一部を明らかにした。

#5 *Xenopus laevis* の遺伝子発現系を用いた電気生理学的検討により、I 型 Nedd4L と II 型、III 型 Nedd4L との相互作用により、ENaC 電流の抑制が有意に減弱し restore することを明らかにした。

#1~#5 の実験結果は、英文学術誌に掲載されている。(Araki N, Ishigami T, et al. Hypertension 2009) 以上のような学術的背景のもと、本研究の目的は、terminal nephron 上皮細胞における ENaC-Nedd4L 系とに着目し、その上流に存在する腎臓尿細管独自のレニン・アンジオテンシン系(尿細管 RA 系)もあわせて、本態性高血圧症の成因を明らかにすることにある。なかでも C2 ドメインを有し、ヒトの SNP により発現が制御されている I 型 Nedd4L の分子病態生理の解明、および、in vivo, in vitro における ENaC-Nedd4L 系に対する、tubular RA 系を含めた他の生体システム(aldoosterone, ADH, insulin)による制御機構の解明、さらには ENaC と Nedd4L との細胞膜上での邂逅を仲立ちする scaffolding タンパクのクローニングを計画している。scaffolding タンパクのクローニング計画に関しては、Yeast two hybrid 技術を応用したクローニングにより、すでに 5 つのクローンにまで絞り込んでおり、本研究期間中にたんぱく質の同定、機能解析を予定している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、原因不明とされる、本態性高血圧症の成因を、腎臓尿細管における主要なイオントランスポーターである ENaC(上皮性ナトリウムチャンネル)及び、その調節タンパクである Nedd4L に注目し、その分子メカニズムを分子生物学的手法、分子遺伝学的手法、電気生理学的手法等を用いることで明らかにすることにある。さらに、本症の成因を明らかにすることにある。究極的には、分子病態に基づいた診療(診断、治療、生活指導)の最適化を確立することが、本研究の目標になる。

## 3. 研究の方法

### ① ENaC-Nedd4L 系の in vitro/in vivo での分子病態生理学的解析

#### -1 尿細管由来セルラインを対象にした分子動態/分子電気生理学的解析解析

これまでの研究から、高血圧症の発症には尿細管上皮細胞における ENaC-Nedd4L 系が重要な役割を果たしていることが明らかになった。しかし、ENaC-Nedd4L 系の生理的な制御メカニズムに関しては、ほとんどわかっていない。今後このメカニズムを明らかにすることで、降圧をもたらす新規の薬理学的作用点として、新薬開発に繋がることが期待される。本研究では、mIMCD3、M1 というマウス尿細管上皮細胞由来の ENaC 発現セルラインを対象にして、angiotensin II, aldosterone,

ADH, insulin 等、従来より尿細管上皮細胞におけるイオントランスポーターを制御しているといわれている生体内システムの ENaC-Nedd4L 系に対する影響を分子生物学的、電気生理学的に解析して、明らかにする。遺伝子の発現の解析には、定量的 PCR 法、Western blotting 法を用いる。Nedd4L には、molecular diversity があり、C2 ドメインを有する isoform と C2 ドメインを有さない isoform とでは、発現制御が異なる可能性があり、同じ遺伝子産物でも個々に解析する必要がある。そこで、我々はすでに、C2 ドメインを特異的に認識する抗体と、両者に共通する WW ドメインを認識する抗体との作成に成功していることで、可能である。定量的 PCR 法では、それぞれの isoform にカスタム化した TaqMan プローブを作成し、定量する。電気生理学的には、すでに Xenopus Oocyte を用いた heterologous gene expression の系による Nedd4L による ENaC 発現制御の検討をすませており、培養細胞を用いた、Isc (短絡電流) の計測により Nedd4L による ENaC 制御を検討する。

#### -2 げっ歯類を対象にした、in vivo での ENaC-Nedd4L 系の分子病態の解析

-1 と同様に、in vivo での ENaC-Nedd4L 系の分子動態を、様々な刺激 (angiotensin II, aldosterone, ARB 等降圧薬投与下) 下で解析し、各種病態での ENaC-Nedd4L 系の意義を検討する。ENaC-Nedd4L 系は高血圧症の発症に関わる重要な細胞内システムと考えられながら、これまでに十分な検討がなされていない。代謝ケージを使用し、分子生物学的手法 (northern blotting, western blotting, in situ hybridization 他) を用いて、in vivo での様々な因子 (内分泌因子、降圧薬物) の作用を解析することから、その意義を明らかにする。

#### ② ヒト Nedd4L-C2 ドメイン細胞膜 scaffolding タンパクの同定と機能解析

ENaC が生体のナトリウムバランスに応じて効率よく Nedd4L によってユビキチン化されるためには、尿細管上皮細胞膜表面上の clathrin pit に集積する ENaC と Nedd4L との邂逅を仲立ちするような scaffolding タンパクが存在することが予想される。Nedd4L の ortholog である rat Nedd4 では annexin XIIIb が、その役割を果たすとされている (Plant, Lafont et al. 2000) が、ヒト Nedd4L では明らかになっていない。scaffolding タンパクを明らかにすることにより、ENaC-Nedd4L 系のユビキチン化メカニズムの詳細が明らかになるばかりでなく、Nedd4L による組織特異的なユビキチン化のメカニズムの解明にもつながる可能性がある。既述のように、我々は、すでに Yeast two hybrid 系を用いて、当該クローンを 5 種類まで絞り込

んでおり、本研究において、クローンを同定し、組織学的検討、分子生物学的検討を行い、機能を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### ① ヒト Nedd4L-C2 ドメイン細胞膜 scaffolding タンパクの同定と機能解析

我々は、すでに Yeast two hybrid 系を用いて、当該クローンの同定に成功している。同定した分子の、組織学的検討、分子生物学的検討を行い、機能を明らかにする。ENaC が生体のナトリウムバランスに応じて効率よく Nedd4L によってユビキチン化されるためには、尿細管上皮細胞膜表面上の clathrin pit に集積するといわれている ENaC と Nedd4L との邂逅を仲立ちするような scaffolding タンパクが存在することが予想される。Nedd4L の ortholog である rat Nedd4 では annexin XIIIb が、その役割を果たすとされている (Plant, Lafont et al. 2000) が、ヒト Nedd4L では明らかになっていない。その結果、ヒト NPC2 タンパクを Yeast two hybrid 法でクローニングすることに成功した。(Araki N, Ishigami T, et al. BBRC 2009)

##### ② Nedd4L 遺伝子ノックアウトマウスの作成

と解析については、targeting vector の作成、ES 細胞への electroporation、偽妊娠マウスの子宮への接種、キメラマウスの作成を終え、一昨年 12 月へテロマウスを得ることができた。現在、ホモノックアウトマウスを繁殖中で、今後表現型の解析を進めていく。一部先行して、代謝ケージでの飼育による検討を行い、これまでの研究成果に基づいた、食塩感受性の尿細管機能障害を見出している。今後は、その分子メカニズムを解明し、病態に基づいた診療への応用を目指す。

③ ノックアウトマウスの背景種である C57B16/J を用いて、高食塩食負荷によって生じた高血圧症に対して、ACE 阻害薬、ARB、選択的アルドステロン拮抗薬を投与し、腎、心でのナトリウムチャンネル、Nedd4L の発現に対する影響を検討して、心腎連関との関連や、より効果の高い治療法を検討している。

④ 新規家庭血圧計 HEM-5041 は、夜間血圧測定機能を有しており、携帯型 24 時間自動血圧計のもつ欠点 (測定のばらつき、睡眠の質の影響) を補う有用性が期待される。基礎検討を終えて、実地臨床応用を期待した臨床研究を遂行し、データの解析を行っている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1: Wakui H, Tamura K, Matsuda M, Bai Y, Dejima T, Shigenaga A, Masuda S, Azuma

- K, Maeda A, Hirose T, Ishigami T, Toya Y, Yabana M, Minamisawa S, Umemura S. Intrarenal suppression of angiotensin II type 1 receptor binding molecule in angiotensin II-infused mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Nov;299(5):F991-F1003. Epub 2010 Aug 25. PubMed PMID: 20739392.
- 2: Masuda S, Tamura K, Wakui H, Maeda A, Dejima T, Hirose T, Toyoda M, Azuma K, Ohsawa M, Kanaoka T, Yanagi M, Yoshida S, Mitsuhashi H, Matsuda M, Ishigami T, Toya Y, Suzuki D, Nagashima Y, Umemura S. Expression of angiotensin II type 1 receptor-interacting molecule in normal human kidney and IgA nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Oct;299(4):F720-31. 2010 Aug 4. PubMed PMID:20685825.
- 3: Wakui H, Tamura K, Tanaka Y, Matsuda M, Bai Y, Dejima T, Masuda S, Shigenaga A, Maeda A, Mogi M, Ichihara N, Kobayashi Y, Hirawa N, Ishigami T, Toya Y, Yabana M, Horiuchi M, Minamisawa S, Umemura S. Cardiac-specific activation of angiotensin II type 1 receptor-associated protein completely suppresses cardiac hypertrophy in chronic angiotensin II-infused mice. *Hypertension*. 2010 May;55(5):1157-64. 2010 Mar 15. PubMed PMID: 20231526.
- 4: Ishigami T, Araki N, Umemura S. Human Nedd4L rs4149601 G allele generates evolutionary new isoform I with C2 domain. *Hypertension*. 2010 Feb;55(2):e10;2009 Dec 28. PubMed PMID: 20038744.
- 5: Ozawa M, Tamura K, Okano Y, Matsushita K, Ikeya Y, Masuda S, Wakui H, Dejima T, Shigenaga A, Azuma K, Ishigami T, Toya Y, Ishikawa T, Umemura S. Blood pressure variability as well as blood pressure level is important for left ventricular hypertrophy and brachial-ankle pulse wave velocity in hypertensives. *Clin Exp Hypertens*. 2009 Nov;31(8):669-79. PubMed PMID: 20001459.
- 6: Mitsuhashi H, Tamura K, Yamauchi J, Ozawa M, Yanagi M, Dejima T, Wakui H, Masuda S, Azuma K, Kanaoka T, Ohsawa M, Maeda A, Tsurumi-Ikeya Y, Okano Y, Ishigami T, Toya Y, Tokita Y, Ohnishi T, Umemura S. Effect of losartan on ambulatory short-term blood pressure variability and cardiovascular remodeling in hypertensive patients on hemodialysis. *Atherosclerosis*. 2009 Nov;207(1):186-90. PubMed PMID: 19423110.
- 7: Araki N, Ishigami T, Ushio H, Minegishi S, Umemura M, Miyagi Y, Aoki I, Morinaga H, Tamura K, Toya Y, Uchino K, Umemura S. Identification of NPC2 protein as interaction molecule with C2 domain of human Nedd4L. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct 16;388(2):290-6. Epub 2009 Aug 5. PubMed PMID: 19664597.
- 8: Ushio H, Ishigami T, Araki N, Minegishi S, Tamura K, Okano Y, Uchino K, Tochikubo O, Umemura S. Utility and feasibility of a new programmable home blood pressure monitoring device for the assessment of nighttime blood pressure. *Clin Exp Nephrol*. 2009 Oct;13(5):480-5.
- 9: Uchino K, Ishigami T, Ohshige K, Sugano T, Ishikawa T, Kimura K, Umemura S. Left ventricular geometry, risk factors, and outcomes of hospitalized patients with diastolic heart failure in Japan. *J Cardiol*. 2009 Aug;54(1):101-7. Epub 2009 Jun 9. PubMed PMID: 19632528.
- 10: Mitsuhashi H, Tamura K, Yamauchi J, Ozawa M, Yanagi M, Dejima T, Wakui H, Masuda S, Azuma K, Kanaoka T, Ohsawa M, Maeda A, Tsurumi-Ikeya Y, Okano Y, Ishigami T, Toya Y, Tokita Y, Ohnishi T, Umemura S. Effect of losartan on ambulatory short-term blood pressure variability and cardiovascular remodeling in hypertensive patients on hemodialysis. *Atherosclerosis*. 2009 Nov;207(1):186-90. PubMed PMID: 19423110.
- 11: Ozawa M, Tamura K, Okano Y, Matsushita K, Yanagi M, Tsurumi-Ikeya Y, Oshikawa J, Hashimoto T, Masuda S, Wakui H, Shigenaga A, Azuma K, Ishigami T, Toya Y, Ishikawa T, Umemura S. Identification of an increased short-term blood pressure variability on ambulatory blood pressure monitoring as a coronary risk factor in diabetic hypertensives. *Clin Exp Hypertens*. 2009 May;31(3):259-70. PubMed PMID:19387902.
- 12: Shigenaga A, Tamura K, Dejima T, Ozawa M, Wakui H, Masuda S, Azuma K, Tsurumi-Ikeya Y, Mitsuhashi H, Okano Y, Kokuho T, Sugano T, Ishigami T, Toya Y, Uchino K, Tokita Y, Umemura S. Effects of angiotensin II type 1 receptor blocker on blood pressure variability and cardiovascular remodeling in hypertensive patients on chronic peritoneal dialysis. *Nephron Clin Pract*. 2009;112(1):c31-40. Epub 2009 Apr 3. PubMed PMID: 19342867.
- 13: Takamura T, Takahashi N, Ishigami T, Sugano T, Ishikawa T, Uchino K, Kimura K, Inoue T, Umemura S. Combining chronic

kidney disease with <sup>201</sup>thallium/<sup>123</sup>iodine beta methyl iodophenyl pentadecanoic acid dual myocardial single-photon emission computed tomography findings is useful for the evaluation of cardiac event risk. Nucl Med Commun. 2009 Jan;30(1):54-61. PubMed PMID:19306514.

〔学会発表〕(計4件)

1: Minegishi S, Ishigami T, et al. ANGIOTENSIN II INDUCED SCN5A-NEDD4L TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION WITH MINERAL CORTICOID RECEPTOR TRANSACTIVATION IN CARDIOMYOCYTES 第20回ヨーロッパ高血圧学会 2010.06.20 Norway, Oslo

2: Ushio H, Ishigami T, et al. ALDOSTERONE INDEPENDENT ACTIVATION OF MINERALCORTICOID RECEPTOR-SGK1 SYSTEMS IN URINARY EPITHELIUM FOR THE MODEL OF SODIUM SENSITIVE HYPERTENSION 第20回ヨーロッパ高血圧学会 2010.06.19 Norway, Oslo

3: Ishigami T, et al. A New Programmable Home Blood Pressure Monitoring Device For The Assessment of Night Time Blood Pressure of Total Of 40 Normotensive Subjects 第20回ヨーロッパ高血圧学会 2010.06.18 Norway, Oslo

4: 石上 友章 本態性高血圧症の候補遺伝子としての Nedd4L に関する検討  
日本腎臓学会学術総会 2009年6月5日  
パシフィコ横浜

〔図書〕(計1件)

石上友章ほか 先端医学社  
選択的アルドステロンブロッカーのすべて  
2009 239

〔その他〕

ホームページ

<http://www.yokohama-medicine.org/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石上 友章 (ISHIGAMI TOMOAKI)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号：50264651

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：