

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08585

研究課題名(和文) ミネラルコルチコイド受容体を介したPendrin制御機構とその病的意義の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism and role of mineralocorticoid receptor-mediated regulation of pendrin

研究代表者

鮎澤 信宏 (Ayuzawa, Nobuhiro)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：50459517

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)：遠位ネフロンにおけるNaCl再吸収は高血圧性病態の形成に関与する。最近、皮質集合管の間在細胞に発現するpendrinが新規のNaCl再吸収因子として働き、昇圧に働くことが報告された。本研究において、我々はレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAAS)の亢進時にはミネラルコルチコイド受容体(MR)を介した二つの異なる経路によりpendrinが上方制御され、体液貯留・昇圧に働くことを明らかとした。さらに、これら経路が特にサイアザイド利尿薬による治療時に高血圧の維持に働き、治療抵抗性病態の形成に働くことも示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により解明されたRAAS亢進時における2つの異なるMRを介したpendrin制御機構は、高血圧性病態、特にサイアザイド利尿薬による治療に抵抗性の病態において、新規の治療標的となる可能性が示された。これら病態において、MR拮抗薬は、2つのpendrin制御機構の両方を抑制する効果的な治療戦略になることが示唆される。また、今後これらpendrin制御機構のさらなる詳細な解明により、新たな治療標的の創出も期待される。

研究成果の概要(英文)：NaCl reabsorption in the distal nephron is involved in the development of hypertension. Recently, it was reported that pendrin, expressed in beta-intercalated cells in cortical collecting ducts, is involved in NaCl reabsorption and elevation of blood pressure. In the present study, we found that pendrin is up-regulated by two distinct pathways via mineralocorticoid receptor (MR) during activation of the renin-angiotensin-aldosterone system, which contributed to fluid retention and blood pressure elevation. We also showed that these pathways act to maintain hypertension, especially during thiazide diuretic treatment, resultantly forming treatment-resistant pathologies.

研究分野：腎臓、高血圧

キーワード：pendrin ミネラルコルチコイド受容体 アルドステロン 高血圧 尿管

1. 研究開始当初の背景

遠位ネフロンは腎における **NaCl** 再吸収の最終調節を行い、その異常は高血圧発症に関与する。同部の遠位曲尿細管に発現する **sodium chloride cotransporter (NCC)** や集合管主細胞に発現する **epithelial sodium channel (ENaC)** およびそれらの調節因子は高血圧における治療標的となってきた。例えば、**NCC** 阻害薬であるサイアザイドは優れた降圧作用と心血管イベント抑制効果を示すことが報告されている。しかし、サイアザイド長期使用例では **RAAS** 亢進や低 **K** 血症・代謝性アルカローシスなどが見られ、一部は治療抵抗性となる。

最近、皮質集合管 間在細胞に発現する **pendrin** が **NaCl** 再吸収に働く新規因子であることが示された。**NCC** と同様に **pendrin** はレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (**RAAS**) により制御され、互いに協調的かつ相補的に働くことが知られる。食塩摂取量減少時などに **RAAS** 系が亢進するとアンジオテンシン II (**Ang II**) により **pendrin** と **NCC** が共に上方制御され体液量・血圧維持に働くが、片方の欠損時には他方が代償的に上方制御されて体液量と血圧は維持される。他方で、1 次性のアルドステロン過剰時には、**ENaC** の活性化から低カリウム (**K**) 血症と代謝性アルカローシスを生じるとともに **pendrin** と **NCC** の活性化が起きるが、高 **K** 食を与えると両者の抑制とともに降圧が得られる。最近、アルドステロン受容体であるミネラルコルチコイド受容体がこれらの **pendrin** 制御機構に関与することが示唆され、**MR** 拮抗薬が **pendrin** を抑制することが示された。しかし、**MR** を介した **pendrin** 制御の詳細な機序やその役割は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では **RAAS** 亢進時における **MR** を介した **pendrin** 制御機構とその意義の解明を目的とした。また、得られた知見を基に、間在細胞以外の遠位ネフロン構成細胞も含めた遠位ネフロンのリモデリングの解明にも着手した。

3. 研究の方法

MR-flox マウスと **Atp6v1b1-cre** マウスの交配により間在細胞特異的 **MR** 欠損マウス (**MR^{flox/flox};Atp6v1b1-cre^{+/+}**) を用意した。また、**MR-flox** マウスと **Pax8-rtTA;tetO-cre** マウスの交配により、**MR^{flox/flox};Pax8-rtTA^{+/+};tetO-cre^{+/+}** を作成し、成体に **doxycycline** を投与して全ネフロン **MR** 欠損を誘導した。また **NCC** ホモ欠損マウスを用意した。

野生型マウスおよび上記遺伝子改変マウスに対し、**Ang II** やアルドステロンの持続皮下投与、食塩制限 (内因性 **RAAS** 亢進モデル)、高食塩食投与などを行った。また、これらモデルに、**NCC** 阻害薬や **ENaC** 阻害薬の投与、**K**・アルカローシスの補正などの介入も行った。**tail-cuff** 法や **telemetry** 法で血圧を測定し、また血液・尿検体を採取し電解質変化の評価を行った。腎検体を採取し、**pendrin** および **NCC**、**ENaC** の発現変化をウェスタンブロット法や蛍光免疫染色により評価した。

4. 研究成果

RAAS 亢進時には 2 つの異なる **MR** を介した経路により **pendrin** が制御される各種遺伝子改変マウスの解析などから **RAAS** 活性化時に二つの異なる細胞の **MR** により **pendrin** が制御されるメカニズムが明らかとなった。

Ang II 持続投与や食塩制限に伴う内因性 **Ang II** 増加時には **pendrin** と **NCC** の上方制御が起こる。以前我々は、これら **Ang II** 刺激時には間在細胞の **MR** が脱リン酸化により活性化し、この間在細胞特異的な **MR** 活性化が **pendrin** 上方制御と相関することを報告した (引用文献 1)。今回の研究において、間在細胞特異的 **MR** 欠損マウスではこれら **Ang II** 刺激による **pendrin** 上方制御が抑制されることが示され、**Ang II** 刺激時の **pendrin** 活性化には間在細胞の **MR** が関与することが証明された。また、食塩制限下に **NCC** 阻害薬である **hydrochlorothiazide** を投与した場合、野生型マウスでは **pendrin** の代償性増加により体重・血圧が維持されたが、間在細胞特異的 **MR** 欠損マウスでは **pendrin** が抑制されて体重減少・血圧低下を来することが示された。つまり、**Ang II** 増加時には間在細胞 **MR** を介して **pendrin** が上方制御され、**NCC** 阻害時における体液量・血圧維持に関与することが示された。

他方、野生型マウスにアルドステロン持続投与と高食塩食投与を行うと、**ENaC** 活性化により低 **K** 血症と代謝性アルカローシスが起こり、**NCC** と **pendrin** の上方制御が見られ、食塩感受性高血圧を示したが、間在細胞 **MR** 欠損マウスではこの際の **pendrin** 上方制御は殆ど抑制されなかった。対照的に、主細胞を含む全ネフロン **MR** 欠損や **ENaC** 阻害薬投与、高 **K** 食投与による低 **K** 血症・アルカローシスの補正を行うと、アルドステロン持続投与による **NCC** や **pendrin** の上方制御は抑制された。すなわち、本モデルの **pendrin** 制御は間在細胞 **MR** に依らず、主細胞の **MR-ENaC** 経路活性化に伴う低 **K** 血症・アルカローシスに依存していた。なお、同モデルにおいてアセタゾラミド (炭酸脱水素酵素阻害薬) を投与すると、低 **K** 血症は変化なくアルカローシスのみが抑制され、**NCC** の変化は無いまま **pendrin** のみが抑制された。この結果は、一

次性アルドステロン過剰時の **NCC** 制御が低 **K** 血症に依存するという既報と矛盾なく、一方で、**pendrin** の制御が **NCC** とは異なりアルカローシスに依存することを新たに示すものとなった。なお、高食塩食・アルドステロン持続投与した **NCC** 欠損マウスでは **pendrin** が代償的に増加して高血圧が維持されたが、高 **K** 食により低 **K** 血症・アルカローシスを補正すると **pendrin** 抑制とともに降圧が得られ、**pendrin** が **NCC** 阻害時の血圧維持に寄与することが示唆された。

以上の結果から、**RAAS** 活性化時には間在細胞および主細胞の **MR** を介した二つの **pendrin** 制御機構が働き昇圧に働くことが示され、さらに、いずれの経路もサイアザイド治療抵抗性の病態の形成に関わることが示唆された。これら成果により、**pendrin** およびその制御機構が、高血圧性病態、特にサイアザイド抵抗性の病態における新たな治療標的になることが示された。また、それら病態において、**MR** 拮抗薬は二つの **pendrin** 制御機構を抑制する有効な治療戦略となる可能性が見いだされた。これら成果をまとめた論文を国際学会誌に投稿し、掲載された(引用文献 2, 3)。

MR を介した **pendrin** 制御機構の **K** 代謝への関与の解明

食塩制限時、**AIH** 刺激に伴う **NCC** や **pendrin** の上方制御は協調して **NaCl** 再吸収に働く他に、遠位ネフロンにおける **K** 排泄にも影響を及ぼし、**K** 保持に働くことも示唆されている。実際、前述の間在細胞 **MR** 欠損マウスでは、野生型とは異なり食塩制限・サイアザイド投与時に生じる **pendrin** 増加が見られず、血中 **K** 濃度の低下を呈した。既報において、**pendrin** 抑制をきたす **Atp6v1b1** 欠損マウスでは腎髄質 **ENaC** の活性化による **K** 喪失が起こることが報告されている。そこで、上記の間在細胞 **MR** 欠損マウスにおいて腎髄質における **ENaC** 発現を評価したところ、活性化されていることが明らかとなり、これが低 **K** 血症の発症に寄与している可能性が示唆された。なお、**ROMK** や **BK channel** 自体の発現には変化は見られなかった。

1 次性のアルドステロン過剰時のアルカローシスを介した **pendrin** 制御機構の解明

1 次性のアルドステロン過剰時には、 に述べた通り、集合管主細胞の **MR-ENaC** 経路の活性化により低 **K** 血症性代謝性アルカローシスを生じ、アルカローシスが間在細胞の **pendrin** の上方制御を起こすことが示された。しかし、この経路の詳細な機序は未だ不明であり、解明に取り組んだ。

マウスにおいて重曹投与など単純なアルカリ負荷を行った際にも **pendrin** が上方制御されることが知られるが、この際には尿中 **-ketoglutarate** (**KG**) を介した **GPR99** 活性化による経路や、アルカリ性センサーとして働く **Insulin receptor related receptor** (**IRR**)、**soluble adenylyl cyclase** (**sAC**)、**Ca sensing receptor** (**CaSR**) を介した経路など、複数の経路が関与していることが示唆されている。しかし、少なくともこれら経路の全てがアルドステロン過剰時の **pendrin** 制御に関わるわけではないことが明らかとなった。

例えば、マウスに重曹投与を行った際には尿中 **KG** の有意な増加を認めるとともに **pendrin** 上方制御が見られたが、アルドステロン投与時には低 **K** 血症性代謝性アルカローシスに伴い **pendrin** 上方制御が起こるにも関わらず、尿中 **KG** 変化が見られず、後者における **pendrin** 制御には **KG-GPR99** 経路の関与はないものと思われた。また、薬剤介入試験の結果から、**sAC** はアルドステロン過剰時の **pendrin** 活性化には関連していないことが示唆されている。現在、**IRR** や **CaSR** への介入実験を進めている。

RAAS 亢進時における遠位ネフロンリモデリングの解析

上記の解析の中で、**RAAS** 亢進時やサイアザイドによる介入時などには腎遠位尿細管の各区域・細胞において輸送体の発現などの変化が起こるだけでなく、各区域長や構成細胞数の変化(リモデリング)が起こることも示唆された。免疫染色と **deep learning** による自動計測を組み合わせ、遠位尿細管リモデリングの詳細な解析を進めている。

遠位ネフロン **Rac1** 欠損マウスの解析

腎 **MR** 活性の調節に関わる因子の一つとして多機能低分子 **G** 蛋白 **Rac1** が知られる。我々は **Rac1-flox** マウスと **Ksp-cre** マウスの交配により遠位尿細管特異的 **Rac1** 欠損マウス (**Rac1^{flox/flox};Ksp-cre^{+/-}**) を作成し、高血圧性病態モデルにおいて **Rac1** が **MR** を介した腎尿細管機能変化にどのように関与するか、解析を計画した。しかし、後述のとおり、同マウスは生後の腎髄質の発達に異常をきたすことが明らかとなり、当初の計画には使用できなかった。他方で、本マウスの解析から、**Rac1** が腎髄質の発達において果たす役割が新たに明らかとなった。

遠位尿細管特異的 **Rac1** 欠損マウスは出生期から成体期まで体格の異常などなく成長したが、多飲・多尿を呈し、尿濃縮力障害が確認された。同マウスの腎組織を解析したところ、生直後には明らかな異常は見られなかったが、その後 2 週間において腎乳頭の伸長が阻害されるとともに、同部における細胞死や炎症、線維化を生じていることが明らかとなった。なお、正常な生後の髄質の発達には浸透圧の上昇に応じて起こる **NFAT5** シグナルによる浸透圧応答が必要であることが報告されているが、遠位尿細管特異的 **Rac1** 欠損マウスでは本経路が抑制されており、その結果障害が起こること示唆された。以上の結果から、**Rac1** は生後の腎髄質・乳頭の正常な発達に寄与することが示された。本成果は国際学術誌に投稿し掲載された(引用文献 4)。

<引用文献>

1. Hirohama D, Ayuzawa N, Ueda K, Nishimoto M, Kawarazaki W, Watanabe A, Shimosawa T, Marumo T, Shibata S, Fujita T. Aldosterone Is Essential for Angiotensin II-Induced Upregulation of Pendrin. *J Am Soc Nephrol.* 2018;29(1):57-68.
2. Ayuzawa N, Nishimoto M, Ueda K, Hirohama D, Kawarazaki W, Shimosawa T, Marumo T, Fujita T. Two Mineralocorticoid Receptor-Mediated Mechanisms of Pendrin Activation in Distal Nephrons. *J Am Soc Nephrol.* 2020;31(4):748-764.
3. Ayuzawa N, Fujita T. The Mineralocorticoid Receptor in Salt-Sensitive Hypertension and Renal Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2021;32(2):279-289.
4. Ayuzawa N, Nishimoto M, Kawarazaki W, Oba S, Marumo T, Aiba A, Fujita T. Rac1 deficiency impairs postnatal development of the renal papilla. *Sci Rep.* 2022;12(1):20310.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ayuzawa Nobuhiro, Nishimoto Mitsuhiro, Ueda Kohei, Hirohama Daigoro, Kawarazaki Wakako, Shimosawa Tatsuo, 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 -

1. 著者名 Ayuzawa Nobuhiro, Fujita Toshiro	4. 巻 32
2. 論文標題 The Mineralocorticoid Receptor in Salt-Sensitive Hypertension and Renal Injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 279 ~ 289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2020071041	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 Ayuzawa Nobuhiro, Nishimoto Mitsuhiro, Kawarazaki Wakako, Oba Shigeyoshi, Marumo Takeshi, Aiba Atsu, Fujita Toshiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Rac1 deficiency impairs postnatal development of the renal papilla	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24462-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鮎澤信宏
2. 発表標題 MRを介した間在細胞pendrinの制御機構
3. 学会等名 第64回 日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鮎澤信宏
2. 発表標題 腎臓におけるMRを介した間在細胞pendrinの制御機構とその意義
3. 学会等名 第57回 高血圧関連疾患モデル学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鮎澤信宏
2. 発表標題 ミネラルコルチコイド受容体を介した間在細胞pendrinの制御機構（高峰譲吉研究奨励賞受賞講演）
3. 学会等名 第25回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鮎澤信宏
2. 発表標題 アルドステロン過剰時のPendrin制御と β -ケトグルタル酸
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鮎澤信宏
2. 発表標題 遠位ネフロン特異的Rac1欠損マウスでは腎髄質の生後の発達が障害される
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鮎澤信宏, 藤田敏郎	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 70
3. 書名 医学の歩み 278巻4号 p295-296: TOPICS 腎臓内科学 ミネラルコルチコイド受容体によるpendrin活性化	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>鮎澤信宏特任助教が2021年度高峰譲吉研究奨励賞を受賞しました https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/report/award_20211215.html 尿への食塩排泄量を調節するPendrinにより 治療に抵抗性の高血圧が起こる仕組みを解明 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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------