

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月9日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390171

研究課題名（和文） 糸球体上皮細胞の加齢におけるATP6AP2 /（プロ）レニン受容体の機能と標的治療

研究課題名（英文） Therapy based on the analyses of function of ATP6AP2/(pro)renin receptor in aging of glomerular epithelial cells

研究代表者

市原 淳弘（ICHIHARA ATSUHIRO）

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：60203105

研究成果の概要（和文）：

腎糸球体上皮細胞での（プロ）レニン受容体（PRR）ノックアウトが、V-ATPase サブユニット発現を障害し、細胞小器官 pH を上昇させることにより、スリット膜関連蛋白の細胞内輸送を障害することを明らかにした。さらに、これら障害が、全長型 PRR 遺伝子導入によりレスキューされ、ATP6AP2 遺伝子部分のみではレスキューされないことを発見した。また、ドキシサイクリン投与により PRR 発現を ON-OFF できるマウスの作成に成功した。

研究成果の概要（英文）：

The knockout of (pro)renin receptor in glomerular epithelial cells caused the impaired intracellular trafficking of slit-membrane proteins through elevating vesicular pH due to the disturbed expression of V-ATPase subunits. The impairment was rescued by inducing the full-length gene of (pro)renin receptor, but not by inducing the ATP6AP2 gene which is the (pro)renin receptor gene except the extracellular domain. In addition, we made the mice capable of doxycycline-inducing knockout of (pro)renin receptor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

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：細胞・組織、循環器・高血圧、生体分子、糖尿病、老化

1. 研究開始当初の背景

レニン-アンジオテンシン（RA）系は、血

圧や体液を調節する重要な内分泌因子であるだけでなく、局所の炎症や細胞成長・増殖

を規定する重要な体液性因子である。『これまでの腎機能における RA 系』に関する研究は、RA 系因子が血圧や腎臓における水・Na 調節を介して及ぼす影響を中心として研究されてきた。一方、『腎臓において多種多様に存在する細胞において組織 RA 系が如何なる影響を与えているか』に関しては全く研究されてこなかった。これは、組織 RA 系調節を担う因子の特質が十分に解明されてこなかったことに起因している。

我々はこれまで組織 RA 系を調節する(プロ)レニン受容体の特性を糖尿病モデル動物や高血圧モデル動物の腎臓において解析してきた。その結果、(1) (プロ)レニン受容体との結合によって活性化したプロレニンが組織 RA 系を亢進させ蛋白尿と腎糸球体硬化を惹起することを明らかにした (Ichihara, J Clin Invest, 2004)。また、(2) プロレニンとの結合によって刺激された(プロ)レニン受容体細胞内シグナルも蛋白尿と腎糸球体硬化の発症に関与することを明らかにした (Ichihara, J Am Soc Nephrol, 2006)。さらに、(3) 腎臓内の(プロ)レニン受容体には偏りがあり、糸球体上皮細胞、緻密斑細胞を含む遠位尿管細胞と、集合管の・介在細胞に分布密度が高いことを明らかにした (Ichihara, Semin Nephrol, 2007)。そして最近我々は世界に先駆けて、(4) 『(プロ)レニン受容体を腎糸球体上皮細胞特異的に欠損させたマウス [Pod(P) RRcKO]』の作成に成功した。このマウスは、糸球体上皮細胞にリポフスチンが蓄積する結果、空胞変性を来し生後 21 日目にネフローゼ症候群によって死亡することが明らかになった (Ohshima, prepared for submission)。こうした現象は、加齢で観察される細胞内過酸化物質の処理機能不全と類似の状態、いわば『糸球体上皮細胞の加齢』といえる病態である。しかし、

従来組織 RA 系を調節すると考えられてきた(プロ)レニン受容体が、胎生期から発達期において糸球体上皮細胞で産生される過酸化物質の処理に関与し、細胞レベルでの加齢現象抑制に働いていることは、従来知られていなかった『(プロ)レニン受容体の新たな第 3 の機能』といえる。

全ての生体は、出生後にミトコンドリアでの過酸化物質産生が著明に増加し細胞レベルでの老化が始まる。これに対抗し autophagosome によるミトコンドリアの貪食と lysosome による過酸化物質およびそれにより生じた細胞内小器官老廃物の消化が行われる。後者の機能が低下し均衡が崩れると lysosome にリポフスチンが蓄積し、細胞内小器官は空胞化し細胞死へと至る。

Pod(P) RRcKO マウスの糸球体上皮細胞では、ミトコンドリアの形態と発現量に異常を認めることなくリポフスチンの蓄積と空胞変性を観察したため、その原因として lysosome の機能不全が疑われた。Lysosome は細胞内老廃物の処理のための酵素を含んでおり、その活性の維持のため内部環境は pH5.5 の酸性に保たれている。さらに、そのような成熟した lysosome になるためには late endosome との癒合による小胞体からの酵素供給が必須である。『Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase)』は細胞内小器官の膜上に存在し、親水性の V₁ 領域と膜貫通部を含む疎水性の V₀ 領域から構成される。V₁ 領域で ATP から得たエネルギーを利用して V₀ 領域で滑車状に並ぶサブユニット C を回転させ H⁺ を内部に送り pH を下げる。またゴルジ体で V-ATPase は V₁ 領域が外れて V₀ 領域のみになるとゴルジ体以降の細胞内小器官では、V₀ 領域同志が向かい合わせに接合することによって細胞内小器官同志あるいは細胞内小器官と細胞膜との癒合が可能となる。つまり、V-ATPase の機能

不全は lysosome の機能不全を引き起こす。

『(プロ)レニン受容体は V-ATPase に結合する M8-9 蛋白である ATP6 associated protein2 (ATP6AP2) と遺伝子が共通である』。最近の研究により、(プロ)レニン受容体の細胞外領域が外れて可溶性(プロ)レニン受容体となることが報告され、その結果残存した膜貫通部分が ATP6AP2 の前駆体であることが判明した (Cousin, Hypertension, 2009)。しかしながら、ATP6AP2 は V-ATPase に結合する蛋白であること以外に、その機能について全く解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は『(プロ)レニン受容体の新しい第3の機能』である ATP6AP2 としての機能を解明し、『腎糸球体上皮細胞における加齢』現象に関わる(プロ)レニン受容体の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

2010 年度において、(1) Pod(P)RRcK0 マウス腎臓の糸球体上皮細胞内小器官の pH を、LysoTracker 法を用いて決定し、同マウス腎臓のスリット膜関連蛋白発現と V-ATPase サブユニット発現を Western blot 法で検討する。また、(2) Floxed (pro)renin receptor mouse の胎児より分離培養した初代線維芽細胞を用いて、Cre 発現アデノウイルス感染による細胞内 pH 変化をライソトラッカー法で測定し、感染前後での細胞内 V-ATPase サブユニット発現を Western blot 法で検討する。

2011 年度において、(3) Floxed (pro)renin receptor mouse の胎児より分離培養した初代培養線維芽細胞で、Cre 発現アデノウイルス感染による(プロ)レニン受容体ノックアウトが pH 測定に及ぼす影響を、FITC 標識 beads 法でも検討する。(4) Pod(P)RRcK0 マウスに(プロ)レニン受容体断片遺伝子を導入しレ

スキューを試みる実験のために、前述の初代線維芽細胞への、レンチウイルス感染による(プロ)レニン受容体遺伝子断片の導入実験を行う。(5) また、JJ-RRc-CreC と Floxed (pro)renin receptor mouse を交配させ、ドキシサイクリン投与による成熟マウスでの(プロ)レニン受容体ノックアウトが蛋白尿に及ぼす影響を検討する。

2012 年度において、(6) Pod(P)RRcK0 マウスの腎臓に直接(プロ)レニン受容体の全長および断片遺伝子を導入しレスキューを試みる生体実験を行う。(7) JJ-RRc-CreC と Floxed (pro)renin receptor mouse を交配させた 4-6 週齢の産仔において、ドキシサイクリン投与による(プロ)レニン受容体ノックアウトが腎組織に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

2010 年度において、(1) Pod(P)RRcK0 マウス腎臓のスリット膜関連蛋白発現と細胞内 V-ATPase サブユニット発現とライソトラッカー法による細胞小器官内酸性環境を確認し、(2) Floxed (pro)renin receptor mouse の胎児より分離培養した初代線維芽細胞を用いて、Cre 発現アデノウイルス感染による(プロ)レニン受容体ノックアウトが、細胞内 V-ATPase サブユニット発現を障害し、細胞小器官内 pH を上昇させることによって、細胞内小器官のスリット膜関連蛋白の細胞内輸送を障害することを明らかにした。

2011 年度において、(3) Floxed (pro)renin receptor mouse の胎児より分離培養した初代培養線維芽細胞で、Cre 発現アデノウイルス感染による(プロ)レニン受容体ノックアウトが細胞小器官内酸性環境を障害する結果は、ライソトラッカー法でも FITC 標識 beads 法でも同様であることを確認した。(4) レンチウイルス感染による Pod(P)RRcK0 マウス由

来初代線維芽細胞への、全長型(プロ)レニン受容体遺伝子およびATP6AP2 遺伝子の導入に成功した。(プロ)レニン受容体ノックアウトによって障害された細胞小器官内酸性環境が、全長型(プロ)レニン受容体遺伝子導入によりレスキューされたこと、ATP6AP2 遺伝子部分のみではレスキューされないことを発見した。(5)また、JJ-RRc-CreC と Floxed (pro)renin receptor mouse を交配させ、8週齢マウスにドキシサイクリンを投与することにより蛋白尿が増加することを確認した。

2012年度において、(6) Pod(P)RRcKO マウスの腎臓に直接(プロ)レニン受容体の全長および断片遺伝子を導入しレスキューを試みる生体実験を行ったが、生体での体外よりの遺伝子導入効率が低いことが判明し、この方法での生体におけるレスキューは目的とする検証に不敵切であることが判明した。今後の課題として、マウス胚レベルでの遺伝子導入が試みられるべきと考察した(7) JJ-RRc-CreC と Floxed (pro)renin receptor mouse を交配させた4-6週齢の産仔において、ドキシサイクリン投与による(プロ)レニン受容体ノックアウトは蛋白尿を発症させ、ドキシサイクリン中止によって蛋白尿が消失することを確認した。また、この ON-OFF 効果は、腎臓組織変化に依存しており、腎臓組織変化を発症後はドキシサイクリンを中止しても蛋白尿は消失しないことが明らかになった。今後は、より高齢での同マウスにおける検討や、糖尿病を発症させた同マウスでの検討が必要であると考察した。

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2件)

(1) Noriyoshi Watanabe, Atsuhiko Ichihara

(他10名、corresponding author), Soluble (pro)renin receptor and blood pressure during pregnancy : a prospective cohort study, Hypertension, 60, 1250-1256, 2012, 査読有

(2) Yoichi Oshima, Atsuhiko Ichihara (他13名、corresponding author), Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function, J Am Soc Nephrol, 22, 2203-2212, 2011, 査読有

[学会発表] (計3件)

(1) 市原淳弘, (プロ)レニン受容体を標的とした治療, 第27回日本糖尿病合併症学会, 2012.11.2-3, 福岡

(2) 市原淳弘, プロレニンと(プロ)レニン受容体, 第35回日本高血圧学会, 2012.9.20-22, 名古屋

(3) 大島洋一, 市原淳弘ら, 糸球体上皮細胞特異的(プロ)レニン受容体ノックアウトマウスの解析, 第33回日本高血圧学会, 2010.10.17, 福岡

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 高血圧の予知方法

発明者: 市原淳弘、丸山順裕、清藤勉

権利者: 市原淳弘、株式会社免疫生物研究所
種類: 用法特許

番号: P J 1 1 0 4 5 I B

出願年月日: 平成23年12月8日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市原 淳弘 (ICHIHARA ATSUHIRO)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60203105