

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5月31日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590909

研究課題名（和文）網羅的発現遺伝子解析により抽出された高血圧関連遺伝子AT4/IRAPの役割

研究課題名（英文）Role of AT4/IRAP extracted by systemic transcriptome analysis for hypertensive and diabetic renal tissue.

研究代表者

此下 忠志（KONOSHITA TADASHI）

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：40270954

研究成果の概要（和文）：

高血圧や糖尿病に関係するたんぱく質の遺伝子について、DNAチップを用いて発現様式を網羅的に選び出すクラスター解析とより正確な測定法であるRT-PCR法によりAT4/IRAPを抽出しました。高血圧の病態に重要なレニン-アンジオテンシン系や、糖尿病に重要なインスリンと関係の深いタンパク質です。ELISA法による測定系を確立し、生活習慣病の病態と関係する可能性を見出しました。

研究成果の概要（英文）：

We have identified AT4/IRAP as a hypertension/diabetes-specific gene through systemic transcriptome analysis followed by RT-PCR. This protein is thought to be involved in the renin-angiotensin system and insulin signal transduction. We have established a measurement system by ELISA. Thereby for the first time we could suggest the possibility that AT4/IRAP might be involved in the pathophysiology of life-style related diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：レニン-アンジオテンシン系、網羅的発現遺伝子解析、AT4/IRAP、高血圧、糖尿病、腎臓、インスリン、アミノペプチダーゼ

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は腎組織を用いたトランスクリプトームの網羅的解析を行い高血圧や糖尿病などで特異的に発現低下を示す遺伝子クラスターを抽出しました。その Gene Ontology 解析と Pathway 解析によりアンジオテンシン II 消去系遺伝子群である NLN、ENPEP、ANPEP、C9orf3、ACE2、AT4/IRAP 等が抽出されました。AT4/IRAP は GLUT4 を含む

visicleに存在する aminopeptidase として知られており、遺伝子改変動物の知見からも糖尿病の病態に関わる可能性が示唆されている。一方、そのアミノペプチダーゼ活性によりアンジオテンシン III をアンジオテンシン IV に変換、さらにアンジオテンシン IV を Degraded fragments に分解することが知られており、臓器あるいは組織障害で主要な役割を演じているアンジオテンシン II を分解する

方向に作用すると想定されますが病態における役割は明らかではありません。

2. 研究の目的

そこでこの組織発現をより詳細に評価し、また血中の濃度測定法を開発し、疾患進展における役割を明らかとした上で、さらにバイオマーカーや治療ターゲットとしての可能性を評価します。

3. 研究の方法

腎生検標本皮質のごく一部から RNA を抽出し cDNA に逆転写する。DNA チップを用いたトランスクリプトームの網羅的解析により、高血圧や糖尿病に特異的な遺伝子群をクラスタリング法で抽出します。さらに、LightCycler (Roche 社)を用いた real-time PCR 法でより定量的に評価し、臨床組織学的成績との関連を解析する。18 例の解析からすでに抽出されている AT4/IRAP について ELISA による測定系を確立し、臨床症例での病態における意義を解析します。

4. 研究成果

腎組織 RNA を用い、55,000 遺伝子転写物の網羅的解析により、生活習慣病・腎尿路系疾患で特異的に変動するクラスターを抽出しました。特異的な発現変化を示す遺伝子クラスター No 11 の Gene Ontology 解析と Pathway 解析により C9orf3、ACE2、IRAP/AT4 などが抽出されました (図 1)。

正常腎と糖尿病/高血圧腎のクラスター解析

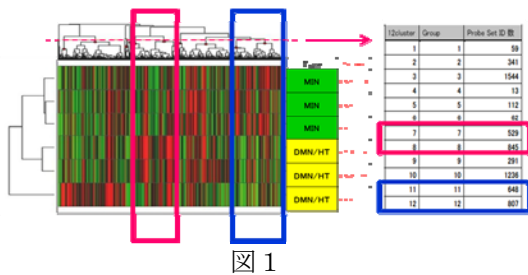


図 1

抽出された個別の遺伝子について RT-PCR 法を確立し評価し、糖尿病/高血圧において IRAP/AT4 (LNPEP) の発現変化が示唆されました (図 2)。

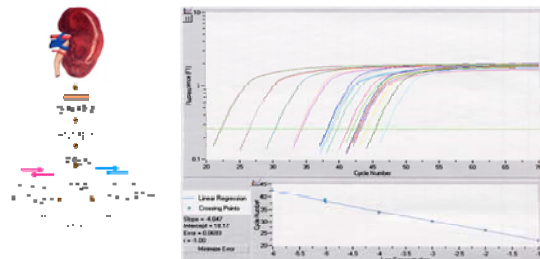


図 2

この IRAP/AT4 は受容体型酵素であり、構造から Phe154 と Ala155 の間で分解され、約 800 アミノ酸配列分が Soluble Form となると想定されました (図 3)。

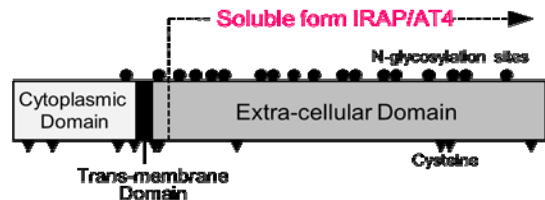


図 3

可溶性部分のアミノ酸配列 3 か所の抗体作製用イデオタイプ部位を各 19 残基で設定し、家兔を免疫し、3 イデオタイプの抗体を作成しました (図 4)。

LNPEP(IRAP/AT4)の抗体作製部位

```
1 MPPVIRKLI LIRKRLRIRI HLLPFWYV AGLPCLRLI HIRVYVFRIG IRELLVRSK  
2 *HALLLRLRIF LSRRLRLRS IIRKRCRIRI SAIVFVRSPI LACVRFIRKI LPPVCAVWV  
3 IRVAVRIRIF LKICLVKICG QKAGRCRCL IIPVATKGL PPVRCRRLPT RPPVLRVLS  
4 LNVELRIRIF RGVVIRDA LKVVVRLP IGVVRSKY IIRVRSRDA QKELRIRI  
5 GQVAVRVA ILIRVYIR EYVAVRIS YVQVQVPI DRIRKIRVA AIVPVAAR  
6 IAPVRCVRA RAVVIR RQCVVIRSL VPKVRSVLD QKQRCVRS SVRIRVYVA  
7 PRCVAVRIS QVAVRIR RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
8 RPPVIRIRI RGVVIRDA LKVVVRLP IGVVRSKY IIRVRSRDA QKELRIRI  
9 RAVVIR RQCVVIRSL VPKVRSVLD QKQRCVRS SVRIRVYVA  
10 LKVVVRFI QVAVKGLV  
11 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
12 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
13 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
14 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
15 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
16 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
17 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
18 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
19 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
20 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
21 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
22 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
23 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
24 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
25 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
26 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
27 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
28 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
29 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
30 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
31 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
32 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
33 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
34 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
35 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
36 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
37 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
38 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
39 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
40 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
41 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
42 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
43 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
44 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
45 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
46 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
47 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
48 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
49 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
50 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
51 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
52 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
53 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
54 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
55 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
56 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
57 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
58 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
59 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
60 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
61 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
62 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
63 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
64 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
65 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
66 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
67 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
68 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
69 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
70 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
71 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
72 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
73 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
74 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
75 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
76 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
77 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
78 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
79 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
80 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
81 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
82 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
83 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
84 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
85 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
86 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
87 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
88 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
89 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
90 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
91 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
92 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
93 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
94 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
95 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
96 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
97 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
98 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
99 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV  
100 RYVRCVIRI PVALVIRL LKVVVRFI QVAVKGLV
```

図 4

作製した抗体を用い、標準品による検量線の作製を試みたところ、ペプチド 276 と 611 の組み合わせで ELISA の測定系が成立することが期待されました。そこでキットを作成し、測定条件を適正化しました。

二抗体法による ELISA の測定系としてのキットが作製されました。実際の測定では左端列を検量線用標準品の希釈段階とし有効な発色が確認されました (図 5)。

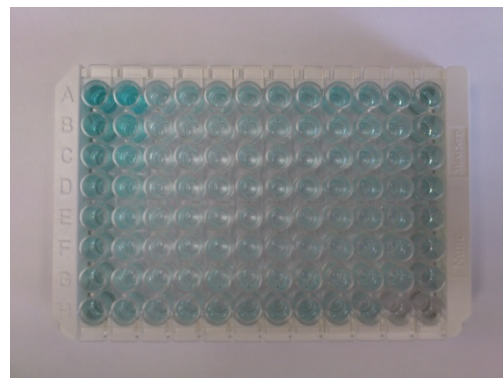


図 5

プレートリーダーによる測定で、極めて精度の高い測定が可能であることが確認され

ました (図6)。

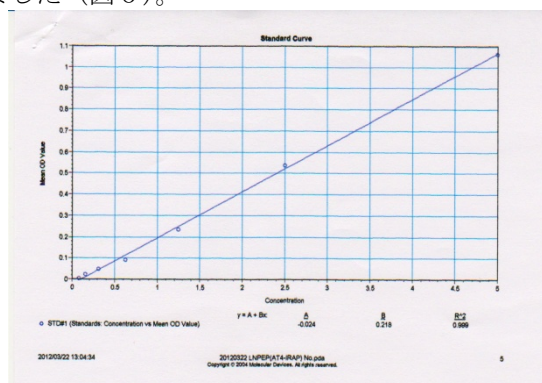


図6

また duplicate sample での CV 値も低く、測定感度にかかる検体での測定間の相関も悪くないと考えられました。測定法の適正化を進め感度 0.01nmol/ml レベルの測定系を確立しました。

連続症例 652 例の血漿濃度を測定し、93 例 (14.3%) で感度以上の値が得られ (陽性群)、高血圧など各種生活習慣病関連指標や内分泌代謝系検査値等との解析を行いました。陰性群と陽性群の分散分析による比較では、BMI : 24.0 ± 3.9 vs 23.1 ± 3.7 ($p=0.042$)、Angiotensin I (対数変換値) : 1.84 ± 0.67 vs 1.57 ± 0.84 ($p=0.001$) などの有意差が得られました。すなわち陽性群で有意に BMI が低値であり、かつ有意にアンジオテンシン I が低値であるとの成績が得られました。生物学的な解釈としても整合性のある成績と考えられます。

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 9 件)

①Konoshita T, Makino Y, Kimura T, Fujii M, Morikawa N, Wakahara S, Arakawa K, Inoki I, Nakamura H, Miyamori I and the Genomic Disease Outcome Consortium (G-DOC) Study Investigators, A crossover comparison of urinary albumin excretion as a new surrogate marker for cardiovascular disease among 4 types calcium channel blockers. *Int J Cardiol* 166: 488-452, 2013, doi:10.1016/j.ijcard.2011.10.133

②Honma T, Hatta K, Hitomi Y, Kambayashi Y, Hibino Y, Konoshita T, Nakamura H, Increased systemic inflammatory interleukin-1 β and interleukin-6 during agitation as predictors of Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 28:

233-241, 2013

doi: 10.1002/gps.3816.

③Onoe T, Konoshita T, Tsuneyama K, Hamano R, Mizushima I, Kakuchi Y, Yamada K, Hayashi K, Kuroda M, Kagitani S, Nomura H, Yamagishi M, Kawano M, Situs inversus and cystic kidney disease: Two adult patients with this heterogeneous syndrome. *Am J Case Rep* 14: 20-25, 2013

doi: 10.12659/AJCR.883751.

④Inagawa T, Hamagishi T, Takaso Y, Hitomi Y, Kambayashi Y, Hibino Y, Shibata A, Ngoc NT, Okochi J, Hatta K, Takamuku K, Konoshita T, Nakamura H, Decreased activity of daily living produced by the combination of Alzheimer's disease and lower limb fracture in elderly requiring nursing care. *Environ Health Prev Med* 18: 16-23, 2013

doi: 10.1007/s12199-012-0283-9.

⑤Kimura T, Suzuki J, Ichikawa M, I, magawa M, Sato S, Fujii M, Zenimaru Y, Inaba S, Takahashi S, Konoshita T, Miyamori I, Differential effects of α -glucosidase inhibitors on postprandial plasma glucose and lipid profile in patients with type 2 diabetes under control with insulin lispro mix 50/50. *Diabetes Technol Ther* 14: 545-551, 2012

doi: 10.1089/dia.2012.0015.

⑥Fujii M, Inoki I, Saga M, Morikawa N, Arakawa KI, Inaba S, Yoshioka K, Konoshita T, Miyamori I, Aldosterone inhibits endothelial morphogenesis and angiogenesis through the downregulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 expression subsequent to peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 129: 145-152, 2012

doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.12.014.

⑦Konoshita T, Makino Y, Kimura T, Fujii M, Wakahara S, Arakawa K, Inoki I, Nakamura H, Miyamori I and the Genomic Disease Outcome Consortium (G-DOC) Study Investigators, A new generation N/L type calcium channel blocker leads to less activation of the renin-angiotensin system compared with conventional L type calcium channel blocker. *J Hypertens* 28: 2156-2160, 2010

doi:10.1097/HJH.0b013e32833d01dd

[学会発表] (計 21 件)

①Konoshita T, Ichikawa M, Kimura T, Sato S, Fujii M, Makino Y, Wakahara S, Miyamori I, Systemic transcriptome analysis for

extraction of specific gene clusters in diabetic nephropathy-reduced expression of insulin regulated aminopeptidase angiotensin IV receptor (AT4/IRAP) in diabetic renal tissue-. 49th Congress of European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association, Paris, May 24-27, 2012, France

②Konoshita T, Kimura T, Fujii M, Makino Y, Wakahara S, Miyamori I, Kato N, A systematic review of pharmacogenetics in the renin angiotensin system - The genetic variants and inter-individual variation in blood pressure response to the blocking agents. 22nd European Meeting on Hypertension, London, April 26-29, 2012, UK

③此下忠志, 加藤規弘, 宮森 勇, 網羅的発現遺伝子解析により抽出された高血圧特異的遺伝子クラスター-高血圧とアンジオテンシン II 消去系遺伝子群発現低下との関連-, 第 34 回日本高血圧学会, 平成 23 年 10 月 22 日, 宇都宮

④ Konoshita T, Makino Y, Kimura T, Wakahara S, Miyamori I, A proximal direct repeat motif characterized as a negative regulatory element in the human renin gene. 21th European Meeting on Hypertension, Milan, June 17-20, 2011, Italy

⑤此下忠志, 加藤規弘, 宮森 勇, 網羅的解析による高血圧特異的発現遺伝子の抽出-RAS 抑制系遺伝子群の意義-, 第 84 回日本内分泌学会学術総会, 平成 23 年 4 月 23 日, 神戸

⑥ Konoshita T, Takahashi Y, Mizuno S, Kimura T, Fujii M, Makino Y, Wakahara S, Arakawa K, Inoki I, Miyamori I, Systemic transcriptome analysis for extraction of specific gene clusters in diabetic nephropathy-reduced expression of insulin regulated aminopeptidase angiotensin IV receptor (IRAP/AT4) in diabetic renal tissue-, 43th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Denver, November 18-21, 2010, USA

⑦此下忠志, 木村朋子, 藤井美紀, 牧野耕和, 荒川健一郎, 若原成行, 居軒 功, 宮森 勇, メタボリックシンドロームにおけるレニン-アンジオテンシン系亢進-転写調節因子 CREB, COUPTFII の意義-, 第 33 回日本高血圧学会総会, 平成 22 年 10 月 15 日, 福岡

⑧Konoshita T, Kato N, Takahashi Y, Mizuno S, Kimura T, Fujii M, Makino Y, Wakahara S, Arakawa K, Inoki I, Miyamori I, The insulin regulated aminopeptidase/angiotensin IV receptor (IRAP/AT4) gene expression is downregulated in human

kidneys with diabetic nephropathy. American Diabetes Association 69th scientific sessions, Orlando, June 25-29, 2010, USA

⑨Konoshita T, Makino Y, Kimura T, Fujii M, Wakahara S, Arakawa K, Inoki I, Miyamori I, the Genomic Disease Outcome Consortium (G-DOC) Study Investigators, A cross-over comparison of anti-albuminuric effects among 4 types calcium channel blockers on chronic kidney disease. 20th European Meeting on Hypertension, Oslo, June 18-21, 2010, Norway

⑩此下忠志, 加藤規弘, 高橋芳徳, 水野真一, 木村朋子, 藤井美紀, 牧野耕和, 荒川健一郎, 若原成行, 居軒 功, 宮森 勇, G-DOC Study Investigators, 網羅的解析による糖尿病腎症特異的発現遺伝子の抽出-Insulin Regulated Aminopeptidase (IRAP/AT4) の発現低下-, 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会, 平成 22 年 5 月 29 日, 岡山

⑪Konoshita T, Kimura T, Makino Y, Fujii M, Wakahara S, Arakawa K, Inoki I, Miyamori I, the Genomic Disease Outcome Consortium (G-DOC) Study Investigators, N/L type calcium channel blocker, cilnidipine, leads to less activation of the renin-angiotensin system compared with L type calcium channel blocker, amlodipine besilate. International Society of Nephrology NEXUS Symposium, Kyoto, April 15-18, 2010

〔図書〕(計 3 件)

①此下忠志, 佐藤さつき, 第 5 章 腎症の治療・管理・対策とそのエビデンス 血圧管理 (1), ヴィジュアル 糖尿病臨床のすべて ⑧糖尿病腎症のすべて, 古家大祐編, 中山書店, 東京, p113-116, 2012 年 10 月 25 日

②此下忠志, 藤井美紀, 第 5 章 腎症の治療・管理・対策とそのエビデンス 糖尿病合併高血圧はなぜ RAS 阻害薬が第一選択か? 【エビデンスの扉】, ヴィジュアル 糖尿病臨床のすべて ⑧糖尿病腎症のすべて, 古家大祐編, 中山書店, 東京, p117-120, 2012 年 10 月 25 日

③此下忠志, 10. 「腎硬化症」について, ガイドライン/ガイダンス CKD, 木村健二郎編, 日本医事新報社, 東京, p54-57, 2011 年 2 月 3 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

此下 忠志 (KONOSHITA TADASHI)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号: 40270954

研究協力者

鈴木 仁弥 (SUZUKI JINYA)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：20293417

荒川 健一郎 (ARAKAWA KENICHIRO)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：80401967

銭丸 康夫 (ZENIMARU YASUO)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20397269

藤井 美紀 (FUJII MIKI)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10401978

今川 美智子 (IMAGAWA MICHIKO)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70464055

市川 麻衣 (ICHIKAWA MAI)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30646659

山田 実夏 (YAMADA MIKA)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90646655

牧野 耕和 (MAKINO YASUKAZU)

福井大学・医学部・大学院生