

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 6 月 10 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590913

研究課題名（和文） 胚性幹細胞由来の腎遠位尿細管蛋白質リン酸化酵素の発現調節と機能についての検討

研究課題名（英文） Expression of MAK-V/Hunk in renal distal tubules and its possible involvement in proliferative suppression

研究代表者

金岡 知彦（KANAOKA TOMOHIKO）

横浜市立大学・附属病院・指導診療医

研究者番号：70551258

研究成果の概要（和文）：食塩感受性高血圧、腎障害における腎尿細管 MAK-V/Hunk の機能的意義についての生体レベルでの解析を行い、未知の部分が依然として多い MAK-V/Hunk の機能を探求した。MAK-V/Hunk 高発現トランスジェニックマウスを作成し、高食塩負荷による血圧上昇が野生型マウスに比較して抑制されていることを明らかにし、遠位尿細管から集合管にかけて多く分布している ENaC や NCC などの Na(+) transporter の発現の変化が関与することを報告した。また、ヒト腎組織での MAK-V/Hunk の発現分布および腎炎・糖尿病性腎症での発現調節についての検討を行い、遠位尿細管における MAK-V/Hunk 蛋白発現について詳細に明らかにした。

研究成果の概要（英文）： We demonstrated that high-salt loading suppressed renal MAK-V/Hunk mRNA levels in wild-type mice. To analyze the possible renal function of HUNK/MAK-V, we generated MAK-V/Hunk transgenic mice. The MAK-V/Hunk transgenic mice exhibited the suppression of high salt loading-mediated hypertension compared with wild-type mice. We also showed an altered renal distribution of HUNK/MAK-V in the diseased human kidney. Collectively, these results indicate a critical role of renal MAK-V/Hunk in the renal sodium handling and blood pressure regulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

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：遺伝子、細胞・組織、発生・文化、循環器・高血圧、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは新たな蛋白質リン酸化酵素の単離・同定を試みた。その際の着眼点としては、特に発生段階から成長後の長期にわたって腎臓に発現し続ける蛋白質

リン酸化酵素に焦点を当てた。出発点として、マウスの胎生幹細胞(ES細胞)の誘導分化早期に発現している蛋白質リン酸化酵素群の中から、PCRクローニング法にて種々の蛋白質リン酸化酵素をクローニングし、発生

段階からの発現を検討した結果、一つの蛋白質リン酸化酵素が、マウスの成長後も腎臓において豊富な発現を示していることを発見した。それは HUNK/MAK- と呼ばれ、2000 年に発見された比較的新しい遺伝子であった。

HUNK/MAK-V は、その遺伝子構造から SNF-1 ファミリー類似の構造を有し、そのファミリーの機能として、細胞周期の調節や、細胞分化・細胞極性などへの関与が推察されているが、腎臓における発現分布・発現時期、そしてこれら細胞周期調節・細胞分化との関連性については未だ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、胎生幹細胞由来の蛋白質リン酸化酵素である HUNK/MAK-V について、腎では遠位尿細管レベルの発現が認められる尿細管特異的な発現調節機構と腎障害や高血圧における病態生理学的意義に焦点をあてて、培養細胞、実験動物（高食塩・アンジオテンシン II 負荷高血圧マウス、Dahl 食塩感受性高血圧ラット、HUNK/MAK-V 過剰発現マウス）、およびヒト腎組織を用いて

細胞レベルおよび個体レベルでの総合的解析を行い、HUNK/MAK-V の腎細胞・腎組織での機能解析、および生体腎での詳細な発現分布と病態での発現調節について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

研究代表者らによる現在までの予備的実験結果から、MAK-V/Hunk は腎で高発現を呈し、免疫組織では、太い上行脚 (TAL) と遠位曲尿細管 (DCT) に限局した発現を示すこと、低塩食により腎での MAK-V/Hunk mRNA 発現量の有意な増加がみられること、さらにアデノベクターによって mDCT 細胞に MAK-V/Hunk が AT1 受容体活性化による c-fos 遺伝子発現を有意に抑制することが明らかになっている。それらを踏まえ本研究においては、腎細胞レベル（特に遠位尿細管細胞）、食塩感受性高血圧モデル動物レベル（高食塩・アンジオテンシン II 負荷高血圧マウス、Dahl 食塩感受性高血圧ラット）、MAK-V/Hunk 過剰発現トランスジェニックマウスレベル、およびヒト腎組織レベルにおける MAK-V/Hunk についての統合的解析をおこなうことにより、MAK-V/Hunk について、細胞レベルでの Na 再吸収機構に対する機能、生体レベルでの生理機能と血圧循環調節および水電解質代謝調節への関与および食塩感受性高血圧における病態生理学的意義を明らかにする。

まず、本研究の1年目は、研究分担者の

田村、金岡とともに、主に MAK-V/Hunk の遠位尿細管細胞の Na(+) transporter などの Na 再吸収機構における機能、そして食塩感受性高血圧モデル動物における MAK-V/Hunk 発現調節と高血圧、腎障害との関係および降圧薬投与の影響について検討した。

本研究の2年目以降は、『腎尿細管 HUNK/MAK-V 発現量 /AT1 受容体発現量の増加 → 腎尿細管での HUNK/MAK-V 発現上昇による相対的な AT1 受容体情報伝達系活性の低下 → 食塩感受性高血圧や腎障害の抑制』という仮説の検証のために、gain-of-function in vivo strategy により、HUNK/MAK-V 機能を生体レベルで解明すべく、研究分担者の田村とともに、発生工学的手法により得られた HUNK/MAK-V 過剰発現マウスを用いて、食塩感受性高血圧、腎障害における HUNK/MAK-V の機能的意義についての生体レベルでの解析を行い、未知の部分が依然として多い HUNK/MAK-V の機能を検討した。さらに、研究分担者の田村、金岡とともに、食塩感受性高血圧を呈するとされる慢性腎臓病合併高血圧患者の腎生検標本を用いてヒト腎組織における HUNK/MAK-V 発現の局在性の検討、および HUNK/MAK-V と AT1 受容体の発現量バランスの解析を行った。

4. 研究成果

2010 年度は、MAK-V/Hunk の遠位尿細管細胞での AT1 受容体系および Na 再吸収系に対する抑制機序の解析をおこなった。

まず、通常型の MAK-V/Hunk 発現ベクターに加えて、アデノウイルス発現ベクターを用いて高効率 MAK-V/Hunk 発現ベクターの作製した。また、内在性 MAK-V/Hunk 遺伝子発現をノックダウンさせる siRNA-MAK-V/Hunk の配列決定をおこなった。そして、MAK-V/Hunk の局所発現解析実験において MAK-V/Hunk の内在性発現が認められた細胞のうち、特に高発現が認められた遠位尿細管細胞の腎細胞培養系において、wild type MAK-V/Hunk を過剰発現、および siRNA-MAK-V/Hunk を遺伝子導入することにより細胞内での MAK-V/Hunk 発現を増加あるいは減少させて、AT1 受容体発現量への影響や同受容体との結合性を調べるとともに、同受容体下流の情報伝達系活性を解析して、MAK-V/Hunk による具体的な AT1 受容体抑制機序について検討した。また、同時に細胞免疫染色法、蛋白質リン酸化酵素活性測定、epithelial Na(+) channel (ENaC) や Na(+) -Cl(-) cotransporter (NCC) などの Na(+) transporter 活性および発現解析 (mRNA, 蛋白)、パッチクランプ法による Na(+) current 測定などを行い、細胞培養液への Na(+) 負荷刺激、アンジオテンシン II 刺激、あるいは生体での圧負荷を細胞レベルで simulate する

周期的伸展刺激が遠位尿細管細胞に与える影響に対する MAK-V/Hunk の作用について検討を加えた。

2011年度は、食塩感受性高血圧モデル動物における腎尿細管 MAK-V/Hunk 発現調節と食塩感受性高血圧・腎障害との関係および降圧薬投与の影響についての検討を行った。

食塩感受性高血圧モデル動物における腎尿細管 MAK-V/Hunk 発現調節と AT1 受容体発現との関連について検討する。具体的には、食塩感受性高血圧モデル動物（高食塩・アンジオテンシン II 負荷高血圧マウス、Dahl 食塩感受性高血圧ラット）における高血圧、および腎障害の進行にともなう腎尿細管 MAK-V/Hunk の発現調節を real-time PCR 法や Western blot 法により検討する。また、これら食塩感受性高血圧モデル動物に対して AT1 受容体拮抗薬をはじめとする各種降圧薬を投与し、これら降圧薬の降圧効果と腎障害の改善度について、腎機能、腎での Na(+)排泄能、腎尿細管での MAK-V/Hunk および AT1 受容体、そして ENaC、NCC などの Na(+) transporter などの発現 (mRNA, 蛋白)、および腎線維化に関与する細胞外基質遺伝子 (TGF- β , collagen など) の発現の変化と関連づけて、さらには降圧薬間に効果の相違があるか否かも含めて検討を加えた。

2012年度は、『腎尿細管 HUNK/MAK-V 発現量 /AT1 受容体発現量の増加 → 腎尿細管での HUNK/MAK-V 発現上昇による相対的な AT1 受容体情報伝達系活性の低下 → 食塩感受性高血圧や腎障害の抑制』という仮説の検証のために、gain-of-function in vivo strategy により、HUNK/MAK-V 機能を生体レベルで解明すべく、HUNK/MAK-V 過剰発現マウスを用いて、食塩感受性高血圧、腎障害における HUNK/MAK-V の機能的意義についての生体レベルでの解析を行い、未知の部分が依然として多い HUNK/MAK-V の機能を探求した。さらに、ヒト腎生検標本を用いてヒト腎組織における HUNK/MAK-V 発現の局在性の検討、および HUNK/MAK-V と AT1 受容体の発現量バランスの解析を行った。1. HUNK/MAK-V 高発現トランスジェニックマウスの作製と機能解析。HUNK/MAK-V 過剰発現マウスについて血圧測定、水電解質代謝測定を行うとともに、食塩摂取量の変化にともなう血圧変動や腎機能、水電解質代謝の変化について、調達済みの代謝ケージを用いて検討するとともに、遠位尿細管細胞から集合管にかけて多く分布している ENaC や NCC などの Na(+) transporter の発現の変化について明らかにした。2. ヒト腎組織での

HUNK/MAK-V の発現分布および腎炎・糖尿病性腎症での発現調節についての検討。ポリクローナル抗ヒト HUNK/MAK-V 抗体を用いて腎生検時に得られる腎組織における内在性 HUNK/MAK-V の局所発現解析を行い、遠位尿細管における HUNK/MAK-V 蛋白発現について詳細に明らかにした。

以上の成果を要約すると、食塩感受性高血圧、腎障害における腎尿細管 HUNK/MAK-V の機能的意義についての生体レベルでの解析を行い、未知の部分が依然として多い HUNK/MAK-V の機能を探求した。さらに、ヒト腎生検標本を用いてヒト腎組織における HUNK/MAK-V 発現の局在性の検討、および HUNK/MAK-V と AT1 受容体の発現量バランスの解析を行った。その結果、1) HUNK/MAK-V 高発現トランスジェニックマウスの作製と機能解析においては、HUNK/MAK-V 過剰発現マウスについて血圧測定、水電解質代謝測定を行うとともに、食塩摂取量の変化にともなう血圧変動や腎機能、水電解質代謝の変化について、調達済みの代謝ケージを用いて検討するとともに、遠位尿細管細胞から集合管にかけて多く分布している ENaC や NCC などの Na(+) transporter の発現の変化について明らかにした。また、2) ヒト腎組織での HUNK/MAK-V の発現分布および腎炎・糖尿病性腎症での発現調節についての検討においては、ポリクローナル抗ヒト HUNK/MAK-V 抗体を用いて腎生検時に得られる腎組織における内在性 HUNK/MAK-V の局所発現解析を行い、遠位尿細管における HUNK/MAK-V 蛋白発現について詳細に明らかにした。

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 15 件)

- 1 Matsuda M, Tamura K, Wakui H, Maeda A, Ohsawa M, Kanaoka T, Azushima K, Uneda K, Haku S, Tsurumi-Ikeya Y, Toya Y, Maeshima Y, Yamashita A, Umemura S. Upstream stimulatory factors 1 and 2 mediate the transcription of angiotensin II binding and inhibitory protein. J Biol Chem. May 7, 2013. [Epub ahead of print]. 査読有
- 2 Tamura K, Tsurumi-Ikeya Y, Wakui H, Maeda A, Ohsawa M, Azushima K, Kanaoka T, Uneda K, Haku S, Azuma K, Mitsuhashi H, Tamura N, Toya Y, Tokita Y, Kokuho T, Umemura S. Therapeutic potential of low-density lipoprotein apheresis in the management of peripheral artery disease in patients with chronic kidney

- disease. *Ther Apher Dial.* 17(2): 185-192, 2013. 査読有
- 3 Wakui H, Tamura K, Masuda S, Tsurumi-Ikeya Y, Fujita M, Maeda A, Ohsawa M, Azushima K, Uneda K, Matsuda M, Kitamura K, Uchida S, Toya Y, Kobori H, Nagahama K, Yamashita A, Umemura S. Enhanced Ang receptor-associated protein in renal tubule suppresses Ang-dependent hypertension. *Hypertension.* 61(6): 1203-1210, 2013. 査読有
- 4 Tamura K, Wakui H, Maeda A, Dejima T, Ohsawa M, Azushima K, Kanaoka T, Haku S, Uneda K, Masuda S, Azuma K, Shigenaga A, Koide Y, Tsurumi-Ikeya Y, Matsuda M, Toya Y, Tokita Y, Yamashita A, Umemura S. The physiology and pathophysiology of a novel angiotensin receptor-binding protein ATRAP/Agtrap. *Curr Pharm Des.* 19(17): 3043-3048, 2013. 査読有
- 5 Yanagi M, Tamura K, Fujikawa T, Wakui H, Kanaoka T, Ohsawa M, Azushima K, Maeda A, Kobori H, Umemura S. The angiotensin II type 1 receptor blocker olmesartan preferentially improves nocturnal hypertension and proteinuria in chronic kidney disease. *Hypertens Res.* 36(3): 262-269, 2013. 査読有
- 6 Kanaoka T, Tamura K, Ohsawa M, Wakui H, Maeda A, Dejima T, Azushima K, Haku S, Mitsuhashi H, Yanagi M, Oshikawa J, Uneda K, Aoki K, Fujikawa T, Toya Y, Uchino K, Umemura S. Effects of aliskiren-based therapy on ambulatory blood pressure profile, central hemodynamics, and arterial stiffness in nondiabetic mild to moderate hypertensive patients. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 14(8): 522-529, 2012. 査読有
- 7 Kanaoka T, Tamura K, Ohsawa M, Yanagi M, Haku S, Wakui H, Maeda A, Dejima T, Azushima K, Mitsuhashi H, Okano Y, Fujikawa T, Toya Y, Mizushima S, Tochikubo O, Umemura S. Relationship of ambulatory blood pressure and the heart rate profile with renal function parameters in hypertensive patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Hypertens.* 34(4): 264-269, 2012. 査読有
- 8 Maeda A, Tamura K, Kanaoka T, Ohsawa M, Haku S, Azushima K, Dejima T, Wakui H, Yanagi M, Okano Y, Fujikawa T, Toya Y, Mizushima S, Tochikubo O, Umemura S. Combination therapy of angiotensin II receptor blocker and calcium channel blocker exerts pleiotropic therapeutic effects in addition to blood pressure lowering: amlodipine and candesartan trial in Yokohama (ACTY). *Clin Exp Hypertens.* 34(4): 249-257, 2012. 査読有
- 9 Yasuda N, Akazawa H, Ito K, Shimizu I, Kudo-Sakamoto Y, Yabumoto C, Yano M, Yamamoto R, Ozasa Y, Minamino T, Naito A, Oka T, Shiojima I, Tamura K, Umemura S, Paradis P, Nemer M, Komuro I. Agonist-independent constitutive activity of angiotensin II receptor promotes cardiac remodeling in mice. *Hypertension.* 59 (3): 627-633, 2012. 査読有
- 10 Tamura K, Kanaoka T, Ohsawa M, Haku S, Azushima K, Maeda A, Dejima T, Wakui H, Ozawa M, Shigenaga A, Umemura S. Emerging concept of anti-hypertensive therapy based on ambulatory blood pressure profile in chronic kidney disease. *Am J Cardiovasc Dis.* 1 (3): 236-243, 2011. 査読有
- 11 Dejima T, Tamura K, Wakui H, Maeda A, Ohsawa M, Kanaoka T, Haku S, Azushima K, Masuda S, Shigenaga A, Azuma K, Matsuda M, Yabana M, Hirose T, Uchino K, Kimura K, Nagashima Y, Umemura S. Prepubertal angiotensin blockade exerts long-term therapeutic effect through sustained ATRAP activation in salt-sensitive hypertensive rats. *J Hypertens.* 29 (10): 1919-1929, 2011. 査読有
- 12 Kanaoka T, Tamura K, Moriya T, Tanaka K, Koono Y, Kondoh S, Toyoda M, Umezono T, Fujikawa T, Ohsawa M, Dejima T, Maeda A, Wakui H, Haku S, Yanagi M, Mitsuhashi H, Ozawa M, Okano Y, Ogawa N, Yamakawa T, Mizushima S, Suzuki D, Umemura S. Effects of multiple factorial intervention on ambulatory BP profile and renal function in hypertensive type 2 diabetic patients with overt nephropathy - A pilot study. *Clin Exp Hypertens.* 33 (4): 255-263, 2011. 査読有
- 13 Matsuda M, Tamura K, Wakui H, Dejima T, Maeda A, Ohsawa M, Kanaoka T, Haku S, Azushima K, Yamasaki H, Saito D, Hirose T, Maeshima Y, Nagashima Y, Umemura S. Involvement of Runx3 in the basal transcriptional activation of the mouse angiotensin II type 1 receptor-associated protein gene.

Physiol Genomics. 43 (14): 884-894, 2011. 査読有

- 14 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. 299(5): F991-F1003, 2010. 査読有
- 15 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. 299(4):F720-F731, 2010. 査読有

[学会発表] (計1件)

- 1 Kanaoka T, Tamura K, et al. Relationship of ambulatory blood pressure and heart rate profile with renal function parameters in hypertensive patients with chronic kidney disease. 第22回欧州高血圧学会 The 22nd European Meeting on Hypertension and Cardiovascular protection. 2012年04月26日~2012年04月29日. London, UK.

[図書] (計1件)

- 1 田村功一, 前田晃延, 金岡知彦. CKD診療ガイド2012 Q&A. 診断と治療社(東京), 181ページ, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金岡 知彦 (KANAOKA TOMOHIKO)
横浜市立大学・附属病院・指導診療医
研究者番号：70551258

(2) 研究分担者

田村 功一 (TAMURA KOUICHI)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：40285143

(3) 連携研究者

()

研究者番号：