

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591242

研究課題名(和文) 高血圧病態における補体C3の役割

研究課題名(英文) Role of complement 3 in the pathogenesis of hypertension

研究代表者

福田 昇 (Fukuda, Noboru)

日本大学・総合科学研究科・教授

研究者番号：40267050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：高血圧病態での補体C3の役割について、UUOモデルではEMTに伴いLXRの核内移動により、尿細管上皮が間葉化しレニンを産生し、腎内RA系の活性化と腎硬化症を認めたが、C3 KOマウスでは認めなかった。ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)法によるC3 KO SHRを作成した。血圧はC3 KO SHRではSHRに比較し、約30 mmHg程度低かった。WKY, SHR, C3 KO SHRの腎メサンジウム細胞の増殖はC3 KO SHRで低下していた。このようにC3は腎尿細管で脱分化、EMT、さらには腎内RA系の活性化を介して高血圧病態に関わっていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated role of C3 in phenotype of mesenchymal cells and renal RA in SHR in vitro and in vivo. We investigated expression of renal C3, renin, TGF- β 1 and LXR and generation of Ang II in kidney of UUO model that shows EMT in C3 KO mice. We knock outed C3 gene from SHR/1zm by the zinc-finger nucleaze method and investigated blood pressure and phenotype in SHR. In wild type mice, C3 and renin were strongly stained in the degenerated nephrotubulus at same localization with increases in expression of C3 renin with increases in blood pressure in UUO model. In C3 KO mice, the EMT phenomen was suppressed with no expression of renin in UUO model. Blood pressure and body weight were significantly lower in C3 KO SHR. C3 is involved in the cardiovascular and renal remodelings in hypertension. C3 induces EMT of nephrotubulus and activation of renal RA system. C3 is a primary factor to activate the renal RA systems to induce hypertension in SHR.

研究分野：高血圧学

キーワード：高血圧 補体 ジンクフィンガーヌクレアーゼ 高血圧自然発症ラット

1. 研究開始当初の背景

我々は高血圧性臓器障害の成因を明らかにする為、SHR および脳卒中易発症高血圧ラット(SHRSP)由来 VSMC やメサンジウム細胞(MC)の過剰増殖機序を検討してきた。SHR 由来 VSMC では WKY 由来 VSMC に比して TGF- β 1、PDGF-A 鎖、bFGF mRNA 発現が増加している事を認めた(Fukuda et al. *J Hypertens* 1997, Fukuda N et al. *Am J Hypertens* 1997, Hu, Fukuda et al. *J Hypertens* 2002)。SHR 由来 VSMC は WKY 由来 VSMC に比し、形質が合成型となり、カテプシン D、ACE 発現の亢進により単独細胞系で Ang II を産生し、過剰増殖を示す事を報告してきた(Fukuda et al. *ATVB* 1999)。SHR 由来 VSMC が合成型形質を示す機序を検討するため、我々は3週齢 WKY と SHR の大動脈中膜平滑筋でのマイクロアレイでの遺伝子発現を検討した結果、補体 3(C3)は、培養系でも SHR 由来 VSMC でのみ発現していた。さらに SHR 由来 VSMC で C3 に対するアンチセンス DNA で内因性 C3 を抑制すると、合成型形質が収縮型に向かう事を見出し、C3 が SHR 由来 VSMC でのみ発現し、形質を合成型にしていると考えられた(Lin, Fukuda et al. *Hypertension* 2004)。C3 が VSMC を合成型に形質変換する機序として外因性 C3a は ERK を介して転写因子 KLF-5 の発現を増加し、VSMC の形質を合成型にする事を見出した(Yao, Fukuda et al. *BBRC* 2008)。この様に、SHR 由来 VSMC や腎メサンジウム細胞など間葉系組織は、遺伝的に C3 を発現し、KLF-5 を介して、間葉系細胞を合成型にし、細胞内小器官が増生し、組織 Ang II を産生し、高血圧性血管腎臓のリモデリングに関わっていると考えられる。

2. 研究の目的

高血圧病態への C3 の関与を確認する目的で、1)SHR/Izm、SHRSP/Izm、WKY/Izm の3系統の全ゲノムシークエンスより C3 遺伝子構造の比較をし、3系統の間葉系組織での C3 プロモーターを含むエピジェネティクス解析を行う。2) C3 ノックアウトマウスに UUO モデルにより、腎尿細管上皮間葉化現象(EMT)を起こし、補体 C3 の腎内レニン・アンジオテンシン系への作用を検討する。3) ZF ヌクレアーゼ法により C3 ノックアウト SHR を作成し、SHR の血圧、表現系、心血管腎リモデリングを検討し、高血圧病態への C3 の関与を明確にする。

3. 研究の方法

1. SHR および WKY の間葉系組織での C3 の発現の差の原因の検討

1) 日本大学、SHR等疾患モデル共同研究会、EuraTransにて行っているSHR/Izm、

SHRSP/Izm、WKY/Izm 3系統の全ゲノムシークエンスより、C3の遺伝子転写調節領域を含めた系統間のC3遺伝子構造をTBA法(Blanchette et al. *Genome Res.* 2004)比較し、実際に配列構造異常を検討する。

2) プロモーターの DNA メチル化パターンの検討としてVSMC、MCからDNAを抽出する。抽出後、bisulfite 処理(kit を使用)を各 DNA に施し、補体 C3 の転写調節領域をカバーするように作製した bisulfite - PCR用のプライマーを用いてPCRにて増幅させる。増幅されたDNAをシーケンスにて配列解析する。

2. 補体 C3 の腎内 RA 系亢進への関与の検討

- 1) B6 マウス及び C3 KO マウスの基礎血圧を Tail cuff 法で測定した。
- 2) B6 及び C3 KO マウスの血中レニン、アルドステロンの測定した。
- 3) B6 及び C3 KO マウスに UUO 作成、1 側尿細管結紮し、2 週間経過を観た。
- 4) この間 B6 及び C3 KO マウスのある群に直接レニン阻害剤アリスキレン投与し、血圧をモニターした。
- 5) 腎内 Ang II 測定、組織 HE、Masson 染色、腎髄質レニン、E-カドヘリン、 α -SMA、LXR 免疫染色を行った。

3. ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)法による C3 KO SHR の血圧、心血管腎臓の評価

- 1) ZF ヌクレアーゼプラスミドを合成、精製した。
- 2) 京都大学附属動物実験施設で ZF ヌクレアーゼプラスミドから mRNA 精製し、ラット受精卵にマイクロインジェクションにより注入する。ZF ヌクレアーゼ注入ラット受精胚を偽妊娠雌に移植。出産個体の遺伝子診断により、遺伝子変異の同定をする。作成された C3 KO SHR の系統化を行った。
- 3) C3 KO SHR を、生体の特徴を確立するため、出生時の心臓、腎臓、大動脈、肝臓、副腎、肺、脂肪組織の重量と形成を SHR と比較する。C3 KO SHR が胎生致死であった場合には、胎生期の心臓、腎臓、大動脈、肝臓の重量と組織学的特徴を SHR と比較した。
- 4) SHR および C3 KO SHR の体重、血圧(Tail cuff 法)、尿量、尿蛋白、飲水量、摂餌量をモニタリングした。
- 5) WKY、SHR および C3 KO SHR での VSMC および MC の形質、増殖能の比較検討として、血圧上昇前 3 週齢雄性 WKY、SHR および C3 KO SHR の大動脈中膜をエクスポ

ラント法で VSMC を分離、継代培養する。また腎皮質よりシーピング法で、MC を分離、継代培養した。WKY、SHR および C3 KO SHR からの VSMC および MC での C3 発現を real time PCR、ウエスタンブロットで確認する。また合成形質マーカーである Osteopontin、MatrixGla mRNA 発現、収縮型形質マーカーである SM22a mRNA を Real time PCR で評価した。WKY、SHR および C3 KO SHR からの VSMC および MC の増殖能を BrDU の取り込みを評価した。WKY、SHR および C3 KO SHR からの VSMC および MC での Ang II の産生は、培養上澄を Sep-Pack カラムで分離し、Ang II を RIA にて測定した。

- 6) 高血圧性腎硬化症および腎内レニン・アンジオテンシン(RA)系における C3 の関りの検討として、WKY、SHR、C3 KO SHR に正常食塩食、食塩負荷を行い血圧測定、心臓、大動脈、腎臓での C3 発現を real time PCR および免疫染色で確認した。腎尿管での C3、レニン、LKRα 発現を検討した。

4. 研究成果

1. SHR および WKY の間葉系組織での C3 の発現の差の原因の検討

SHR/1zm では BN に比較して C3 遺伝子領域において 44 箇所の遺伝子変異を認め、うち 6 カ所が Exon に存在し、1 カ所でアミノ酸変異 (1332 番目のアミノ酸がアラニンからスレオニン) が検出された。この変異は WKY/1zm にも同じ変異が見られ、SHR/1zm に特徴的な変化とは関連していなかった。この部位は C3 の機能上重要な酵素切断部位などにはかかっていなかった。また、アミノ酸変異による電荷の変化が蛋白質の立体構造を変化させ、蛋白機能に障害をあたえることも考えられるが、1332 の変異については疎水アミノ酸同志の変化であった。

2. 補体 C3 の UUO での EMT、腎内 RA 系亢進への関与の検討

B6 野生型マウスの UUO 腎尿管では E-カドヘリン発現が低下し、 α -SMA、TGF- β 1 染色および mRNA 発現が増加し EMT が確認された。C3 とレニン mRNA 発現が増加し、同じ局在で強く染色された。UUO 腎尿管では UUO の EMT 尿管細胞の核にて LXR の染色が増加していた。しかし C3 KO マウス UUO にて HE、Masson 染色では尿管の CAST formation や間質の線維化など EMT 現象が起こらず、E-カドヘリン発現が低下せず、 α -SMA の増加がなく、尿管でのレニンの産生も認めなかった。

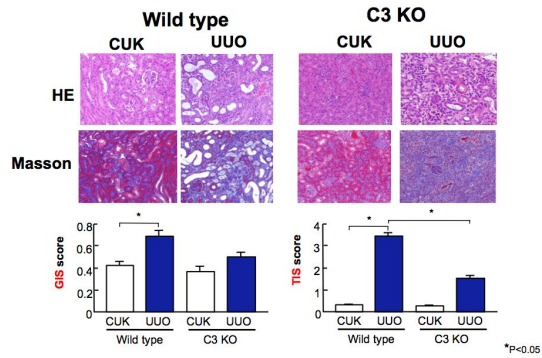


図 1. 野生型、C3 KO マウス UUO での腎臓の組織変化

野生型マウスの収縮期血圧は UUO 作成により 109 ± 3 (SD) から 122 ± 9 mmHg に増加したが、C3KO マウスでは 104 ± 5 から 102 ± 5 mmHg と血圧の変化は認めなかった。野生型マウス UUO では腎内 Ang II が著明に増加し、直接レニン阻害剤アリスキレン同時投与にて腎内 Ang II 増加が抑制されたが、C3KO マウスでは UUO による腎内 Ang II の増加は無かった。

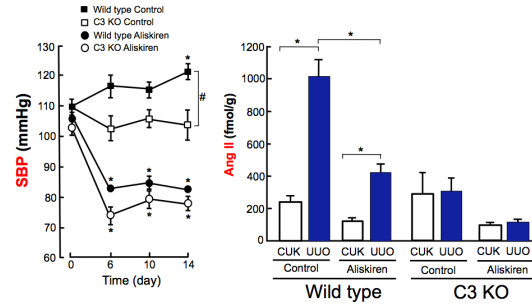


図 2. 野生型、C3 KO マウス UUO での血圧と腎内 Ang II

これらの事は UUO では尿管上皮が EMT を起こし、腎臓でレニンが産生され、Ang II を増加し、血圧上昇に関与しており、C3 はこの EMT から腎内 RA 活性、高血圧に関与している事が分かった。

3. SHR、C3 KO SHR の病態の比較検討

C3 KO SHR の腎臓の Western blot では C3 蛋白発現の消失が確認された。SHR では補体活性としての血清 CH50 が増加していたが、C3 KO SHR では低下した。4 から 16 週齢の C3 KO SHR の収縮期血圧は、同週齢 SHR より約 30 mmHg 低かった。

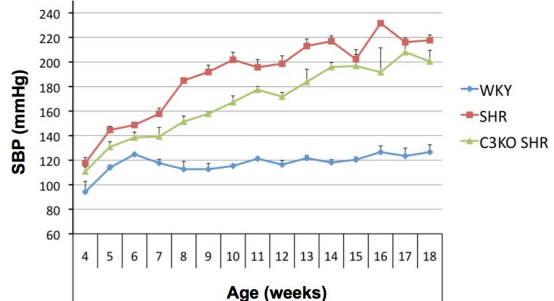


図 3. WKY, SHR, C3 KO SHR の血圧の変化

また C3 KO SHR の体重は SHR に比し低下していた。生直後の SMemb 染色は SHR で亢進し、C3 KO SHR で抑制されていた。SHR の腎髄質でレニン、KLF-5 mRNA 発現が亢進し、C3 KO SHR では低下していた。また SHR の腎髄質では E-カドヘリン mRNA 発現が低下し、尿管上皮間葉化(EMT)が起こっていたが、C3 KO SHR では E-カドヘリン mRNA 発現低下はなく EMT は抑制されていた。培養系で SHR 由来メサンジウム細胞の細胞増殖は WKY に比し亢進し、C3 KO SHR の MC では増殖が抑制されていた。以上、SHR と C3 KO SHR の比較では、SHR の腎髄質は補体 C3 により、EMT を起こしており、腎内レニンを増加させることにより高血圧を起していると考えられた。

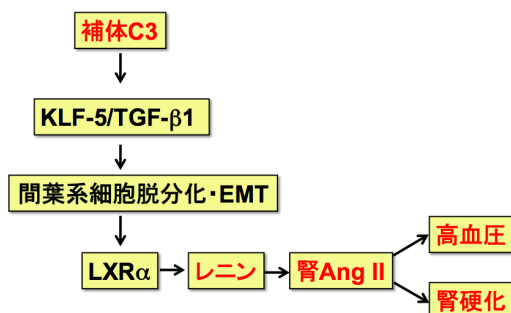


図4. 補体 C3 の高血圧、腎硬化症への関わり

以上より補体 C3 は間葉系組織を合成型形質に変換し、また尿管上皮間葉化により腎内レニン発現を亢進し、高血圧病態に伴う心血管リモデリング、腎硬化症に関与し、補体 C3 は SHR の高血圧の発症、病態の一義的因子であると考えられた。

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. Zhou X, Fukuda N, Matsuda H, Endo M, Wang X, Saito K, Ueno T, Matsumoto T, Matsumoto K, Soma M, Kobayashi N, Nishiyama A. Complement 3 activates the renal renin-angiotensin system by induction of epithelial-to-mesenchymal transition of the nephrotubulus in mice. *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 305(7): F957-F967, 2013. 10.
2. Ikeda K, Fukuda N, Ueno T, Endo M, Kobayashi N, Soma M, Matsumoto K. Role of complement 3a in the growth of mesangial cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Hypertension*. 36(1):58-63, 2014, 1.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Zhou Xueli, 福田 昇, 上野高浩, 相馬正義, 西山 成. 腎尿細管上皮間葉化に

よる腎臓内レニン・アンジオテンシン系の亢進. 第 86 回 日本内分泌学会, 仙台, 2013.04. ポスター

2. 福田 昇, 上野高浩, 遠藤守人, 松本統一, 相馬正義, 西山 成. 補体 C3 は上皮間葉化(EMT)により腎尿細管でのレニン-アンジオテンシン(RA)系を活性化. 第 56 回 日本腎臓学会, 東京, 2013.05.
3. Zhou Xueli, 福田 昇, 上野高浩, 遠藤守人, 相馬正義, 西山 成. 補体 C3 は腎髄質上皮間葉化現象(EMT)により腎内レニン・アンジオテンシン(RA)系を活性化し高血圧および腎硬化症を引き起こす. 第 49 回高血圧関連疾患モデル学会, 東京, 2013.09.
4. Eriko Negishi, Noboru Fukuda, Takahiro Ueno, Masayoshi Soma. Complement 3 is involved in hypertension by activation of renal RA systems in SHR. The 16th International SHR Symposium, Rome, 2014.6
5. Noboru Fukuda. Mesenchymal tissue dedifferentiation activating the local RAS in SHR. The 16th International SHR Symposium, Rome, 2014.6. Symposium
6. 根岸英理子, 福田 昇, 片川まゆみ, 上野高浩, 小松一俊, 相馬正義, 真下知士. 高血圧自然発症ラット(SHR)の高血圧発症および病態における補体 C3 の役割. 第 37 回 日本高血圧学会, 横浜, 2014.10. 口演
7. 根岸英理子, 福田 昇, 片川まゆみ, 上野高浩, 相馬正義. 補体 C3 は高血圧自然発症ラット(SHR)の間葉系組織を脱分化し組織 RA 系を介して高血圧を引き起こす. 第 18 回 日本心血管内分泌代謝学会, 横浜, 2014.11. 口演
8. 根岸英理子, 福田 昇, 片川まゆみ, 上野高浩, 相馬正義, 真下知士. SHR/Izm 全ゲノムシーケンスでの補体 C3 構造とジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)法による C3 ノックアウト SHR/Izm の病態解析. 第 50 回 高血圧関連疾患モデル学会, 和歌山, 2014.12. 口演

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福田 昇 (FUKUDA Noboru)
日本大学総合科学研究科・教授
研究者番号： 40267050

(2)研究分担者

上野高浩 (UENO Takahiro)
日本大学医学部・准教授
研究者番号： 40386008

(3)連携研究者

西山 成 (NISHIYAMA Akira)
香川大学医学部・教授
研究者番号： 10325334

真下知士 (MASHIMO Tomoji)
京都大学医歯学系・准教授
研究者番号： 80397554