

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791823

研究課題名(和文) 網膜疾患における受容体随伴プロレニン系と断片別(プロ)レニン受容体の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of receptor-associated prorenin system in the retina

研究代表者

神田 敦宏 (KANDA, Atsuhiko)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：80342707

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)：(プロ)レニン受容体は組織レニン-アンジオテンシン系(RAS)と受容体結合プロレニン系(RAPS)を介して、網膜疾患における病態形成などに深く関与している。一方、網膜における生理的なその機能はまだ十分に明らかにされていない。ヒト正常・病態組織やトランスジェニックマウスなどを用いて(プロ)レニン受容体の詳細な病理的・生理的機能を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：(Pro)renin receptor is known to regulate tissue RAS and RAPS, and involved in the pathogenesis of several ocular disorders. However, its physiological functions remain unclear. The goal of this study is to gain additional insights into the pathological and biological function of (pro)renin receptor using clinical samples and animal models.

研究分野：網膜細胞生物学

キーワード：(プロ)レニン受容体 プロレニン レニン・アンジオテンシン系 血管新生 網膜疾患

### 1. 研究開始当初の背景

レニン・アンジオテンシン系 (RAS) は、生物が海から陸へと進化する過程で塩分と水分を体内に保持するために発達した循環ホルモンシステム (循環 RAS) であるが、臓器局所では細胞の分化・増殖など組織修復などの役割を担っている (組織 RAS)。我々はこれまでに組織 RAS および組織 RAS の上流に位置する (プロ) レニン受容体が、眼組織における炎症・血管新生の上流で網膜疾患の分子病態を制御していることを動物モデルで示し、受容体結合プロレニン系 (receptor-associated prorenin system: RAPS) という新たな病態概念を提唱してきた。(プロ) レニン受容体によるこの 2 つの作用 (組織 RAS の活性化および RAS 非依存型細胞内シグナル活性化) は眼組織のみならず腎臓や心臓などの病態モデルにおいても認められる。さらに近年、(プロ) レニン受容体は、その膜貫通領域断片が ATP 依存プロトンポンプ Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) のアダプター蛋白 ATP6ap2 と同一分子であることが同定された。これにより (プロ) レニン受容体機能は、V-ATPase に関連した正常発生や炎症病態などに様々な作用を持つ Wnt シグナルにおいて、Wnt 受容体リン酸化に必須であることも明らかとなつて、V-ATPase に関連する多彩な生理機能にも関連している可能性も高い。

### 2. 研究の目的

本研究では、RAPS の鍵因子であるプロレニンと (プロ) レニン受容体の詳細な生理機能解析をはじめとして、生活習慣病発症における RAPS の分子機序および (プロ) レニン受容体の領域別機能を詳細に明らかにする [計画概要 網膜疾患ヒト組織における RAS・RAPS 関連分子の遺伝子発現・タンパク質局在解析、網膜発生におけるプロレニン・(プロ) レニン受容体の生理的機能の解明、成体網膜におけるプロレニン・(プロ) レニン受容体の生理的機能の解明]。RAS および RAPS は、網膜疾患のみならず腎臓や心臓血管など生活習慣病の標的臓器の炎症病態にも関与することが明らかになってきたため、本研究計画により幅広い分野の研究が活性化され、我が国の医学の発展に貢献することが予想される。

### 3. 研究の方法

糖尿病網膜症患者、結膜リンパ腫より手術中に採取される臨床検体を用いて、免疫組織染色、遺伝子発現解析を行った。視細胞特異的 (プロ) レニン受容体ノックアウトマウスを Cre-loxp システムを用いて作製した。そして、免疫組織染色、ウエスタンブロット法などを用いて解析をした。免疫沈降・質量分析法を用いて、(プロ) レニン受容体と会合するタンパク質の同定を行った。

### 4. 研究成果

糖尿病網膜症の網膜血管新生には、VEGF が主要な病態分子であることが知られている。まず我々は、ヒト網膜血管内皮細胞において、プロレニンによる (プロ) レニン受容体刺激で VEGF165 発現を促進していることを明らかにした (その VEGF 発現亢進は、プロレニンと (プロ) レニン受容体の結合を特異的に阻害するデコイペプチドや、細胞内シグナル ERK の阻害剤により抑制された)。実際、(プロ) レニン受容体は線維血管増殖組織の血管内皮細胞に発現しており VEGF との共局在を確認した。そして、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体における可溶性 (プロ) レニン受容体の発現量は、対照群に比べ有意に増加していた。また、可溶性 (プロ) レニン受容体の発現量は、硝子体中の VEGF 発現量さらには増殖組織での血管密度と正の相関が認められた。さらに硝子体中の活性型プロレニン量が VEGF 発現量と相関していたことから、眼内における組織 RAS も血管新生に関与していると考えられた。(プロ) レニン受容体は糖尿病網膜症における血管新生、つまり疾患の進行に関与する重要な分子であることが示唆される。

また、外科的に切除した結膜リンパ腫組織における RAS/RAPS 関連分子の発現を免疫組織染色法により検討した。結膜リンパ腫において、異型 B リンパ球で RAS/RAPS 関連分子の発現・局在が検出された。また IM-9 細胞へのプロレニンまたは Ang II 刺激は、線維芽細胞増殖因子-2 やマトリックスメタロプロテアーゼ 2 などの遺伝子発現を有意に増加させた。組織 RAS および RAPS が結膜リンパ腫の病態形成に関与する分子であることが示唆された。

コントロール (WT) マウスにおいて、(プロ) レニン受容体は網膜全体に発現局在しており、胎児期 (胎児期 12.5 日目) から成体期 (生後 2 ヶ月) に掛けて普遍的に発現していることがわかった。まず、WT および (プロ) レニン受容体-CKO マウス網膜の形態的解析を行ったところ、Cre の発現が認められる胎児期 12.5 日目では (プロ) レニン受容体-CKO マウスの網膜に顕著な変化は認められなかったが、14.5 日目には層構造の異常が認められ、網膜細胞の分化が完了する生後 14 日目の網膜では、視細胞を中心とした網膜の層構造が著明に障害され、偽ロゼット形成が認められた。また網膜電図における振幅低下が認められた。そこで、(プロ) レニン受容体遺伝子欠損が視細胞の分化に影響しているのではないかと考え、生後 14 日目の網膜を用い各細胞のマーカー抗体で免疫組織染色を行ったが、視細胞をはじめとする網膜細胞への分化に影響は認められなかった。一方、これまでの報告で網膜の層構造形成には、細胞間接着分子 (N-カドヘリン、 $\alpha$ -カテニンなど) や細胞極性分子 (Par3、aPKC など) が重要な役割を担っていることが明らかにされ

ている。そこで、胎児期 14.5 日目の網膜における(プロ)レニン受容体とそれら分子との局在を確認したところ、神経芽細胞層の頂端側での共局在が認められたが、(プロ)レニン受容体-CKO マウス網膜ではそれが損失していた。そして、ウエスタンブロット法で細胞間接着分子などの発現を確認したが、発現量に有意な差は認められなかったことより、(プロ)レニン受容体は神経芽細胞層の頂端側におけるそれら分子の局在に参与していると考えられた。さらに、マウス網膜や遺伝子導入細胞を用いた免疫沈降法を行った結果、(プロ)レニン受容体は細胞極性分子の Par3 と共役することが明らかとなった。これらのことより、(プロ)レニン受容体は網膜視細胞の発生期においては、Par3 と共役し細胞極性に参与していると考えられる。

(プロ)レニン受容体が、グルコース代謝経路で解糖系と TCA サイクルをつなぐ酵素の一つ、ピルビン酸脱水素酵素 E1 の サブユニット (PDHB) と会合していることを同定した。さらに、siRNA により(プロ)レニン受容体遺伝子をノックダウンした網膜色素上皮細胞では、PDHB タンパク質の安定性が低下し、それにより細胞内のピルビン酸脱水素酵素複合体の酵素活性やそれに続くアセチル-CoA 産生量が減少し、乳酸レベルが上昇することを明らかにした。また、これにより活性酸素の産生も抑制された。一方、腎臓由来の細胞で同様の実験を行ったが、同様な変化は認められなかった。網膜は体内の中で最も酸素・ATP 消費量が高く、エネルギー代謝が活発な組織である。そのため、他臓器に比べピルビン酸脱水素酵素複合体の酵素活性低下などのグルコース代謝経路の異常が顕著に表れたものと示唆される。

#### 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 26 件)

1. Kanda A, Noda K, Ishida S. ATP6AP2/(pro)renin receptor contributes to glucose metabolism via stabilizing the pyruvate dehydrogenase E1 b- subunit. *J Biol Chem*. 査読有, 290巻, 2015, 9690-9700, DOI:10.1074/jbc.M114.626713.
2. Ishizuka ET, Kanda A, Kase S, Noda K, Ishida S. Involvement of the Receptor-Associated Prorenin System in the Pathogenesis of Human Conjunctival Lymphoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有, 56巻, 2015, 74-78, DOI: 10.1167/ iovs.14- 15743.
3. Kinoshita S, Noda K, Tagawa Y, Inafuku S, Dong Y, Fukuhara J, Dong Z, Ando R, Kanda A, Ishida S. Genistein Attenuates Choroidal Neovascularization. *J Nutr Biochem*. 査読有. 25巻, 2015,1177-1182, DOI:10.1016/j.jnutbio.2014.06.004.
4. Inafuku S, Noda K, Amano M, Ohashi, Yoshizawa C, Saito W, Kanda A, Nishimura S, Ishida S. A comparison of N- glycan profiles in human plasma and vitreous fluid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 査読有. 252巻, 2014, 1235- 1243, DOI:10.1007/ s00417- 014- 2671- x.
5. Dong Z, Iwata D, Kitaichi N, Takeuchi M, Sato M, Endo N, Iwabuchi K, Ando R, Fukuhara J, Kinoshita S, Lennikov A, Kitamura M, Mizuuchi K, Kanda A, Noda K, Namba K, Yamagishi S, Ohno S, Ishida S. Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis by inhibition of glyceraldehyde derived-advanced glycation end product formation. *J Leukoc Biol*. 査読有. 96巻, 2014, 1077- 1085, DOI:10.1189/ jlb.3A0513- 288RRR.
6. Ando R, Noda K, Tomaru U, Kamoshita M, Ozawa Y, Notomi S, Hisatomi T, Noda M, Kanda A, Ishibashi T, Kasahara M, Ishida S. Decreased Proteasomal Activity Causes Photoreceptor Degeneration in Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有. 55巻, 2014, 4682- 4690, DOI:10.1167/ iovs.13- 13272.
7. Ando R, Noda K, Namba S, Saito W, Kanda A, Ishida S. Aqueous humor levels of placental growth factor in diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*. 査読有. 92巻, 2014, 245- 246, DOI:10.1111/ aos.12251.
8. Saito M, Saito W, Kanda A, Ohguro H, Ishida S. A case of paraneoplastic optic neuropathy and outer retinitis positive for autoantibodies against collapsin response mediator protein-5, recoverin, and - enolase. *BMC Ophthalmol*. 査読有. 14巻, 2014, 5, DOI: 10.1186/ 1471- 2415- 14- 5.

9. Kinoshita S, Kase S, Ando R, Dong Z, Fukuhara J, Dong Y, Takashina S, Noda K, Noda M, Kanda A, Ishida S. Expression of vascular endothelial growth factor in human ocular adnexal lymphoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有. 55巻, 2014, 3461-3467, DOI:10.1167/ iovs.13- 13510.
10. Saito M, Saito W, Kanda A, Ohguro H, Ishida S. A case of paraneoplastic optic neuropathy and outer retinitis positive for autoantibodies against collapsin response mediator protein-5, recoverin, and - enolase. *BMC Ophthalmol*. 査読有. 14巻, 2014, 5, DOI : 10.1186/ 1471- 2415- 14- 5.
11. 神田敦宏. 増殖糖尿病網膜症の病態形成における(プロ)レニン受容体. *日本眼科学会雑誌*. 査読有. 118巻, 2014, 916-926
12. 神田敦宏, 石田 晋. 糖尿病網膜症とRAS. *Angiotensin Research*. 査読有. 11巻, 2014, 190-193
13. Kase S, Rao NA, Yoshikawa H, Fukuhara J, Noda K, Kanda A, Ishida S. Expression of vascular endothelial growth factor in eyes with Coats disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有. 54巻, 2013, 57-62, DOI : 10.1167/ iovs.12- 10613
14. Fukuhara J, Noda K, Murata M, Namba S, Kinoshita S, Dong Z, Ando R, Lennikov A, Kanda A, Ishida S. Tissue kallikrein attenuates choroidal neovascularization via cleavage of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有. 54巻, 2013, 274-279, DOI : 10.1167/ iovs.12- 10512
15. Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. Vitreous renin activity correlates with vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 査読有. 97巻, 2013, 666-668, DOI : 10.1136/ bjophthalmol- 2012- 302680
16. Fukuhara J, Kase S, Ohashi T, Ando R, Dong Z, Noda K, Ohguchi T, Kanda A, Ishida S. Expression of vascular endothelial growth factor C in human pterygium. *Histochem Cell Biol*. 査読有. 139巻, 2013, 381-389, DOI : 10.1007/ s00418- 012- 1019- z
17. Kanda A, Ishida S. Vitreous renin-angiotensin system is mediated by soluble (pro)renin receptor in diabetic retinopathy: new implication of receptor- associated prorenin system. *Tw J Ophthalmol*. 査読有. 3巻, 2013, 51-53
18. Kanda A, Noda K, Yuki K, Ozawa Y, Furukawa T, Ichihara A, Ishida S. Atp6ap2/ (pro)renin receptor interacts with Par3 as a cell polarity determinant required for laminar formation during retinal development in mice. *J Neurosci*. 査読有. 33巻, 2013, 19341-19351, DOI:10.1523/ JNEUROSCI.1362- 13.2013
19. Dong Z, Noda K, Kanda A, Fukuhara J, Ando R, Murata M, Saito W, Hagiwara M, Ishida S. Specific inhibition of serine/ arginine- rich protein kinase attenuates choroidal neovascularization. *Mol Vis*. 査読有. 19巻, 2013, 536-543
20. Dong Z, Kase S, Ando R, Fukuhara J, Kinoshita S, Dong Y, Takashina S, Kanda A, Noda M, Noda K, Ishida S. Expression of alphaB- crystallin and vascular endothelial growth factor in conjunctival squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 査読有. 33巻, 2013, 3745-3751
21. Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H, Okumura F, Takeuchi A, Horiuchi K, Kano T, Kanda A, Saito W, Matsumoto M, Nakayama K, Hatakeyama S, Sasaki H. Identification of anti- Sez612 antibody in a patient with cerebellar ataxia and retinopathy. *J Neurol*. 査読有. 261巻, 2013, 224-226, DOI : 10.1007/ s00415- 013- 7134- 5
22. Ando R, Noda K, Namba S, Saito W, Kanda A, Ishida S. Aqueous humor levels of placental growth factor in diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*. 査読有. 92巻, 2013, 245-246, DOI : 10.1111/ aos.12251

23. Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. Vitreous renin activity correlates with vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 査読有. 97巻, 2013, 666-668, DOI: 10.1136/bjophthalmol-2012-302680
24. Kanda A, Noda K, Oike Y, Ishida S. Angiotensin-like protein 2 mediates endotoxin-induced acute inflammation in the eye. *Lab Invest*. 査読有. 92巻, 2012, 1553-1563
25. Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. (Pro)renin receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 査読有. 55巻, 2012, 3104-3113
26. Satofuka S, Kanda A, Ishida S. Receptor-associated prorenin system in the pathogenesis of retinal diseases. *Front Biosci*. 査読有. 4巻, 2012, 1449-1460
- [学会発表](計 19件)
1. Kanda A, Noda K, Ishida S. Identification of (pro)renin receptor/ Atp6ap2-binding proteins in the retina of adult mice. Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2015年05月04日-2015年05月08日, Denver (USA)
2. Kanda A. Atp6ap2/ (pro)renin receptor is associated with cell polarity required for lamellar formation during retinal development in mice. Asia-ARVO 2015(招待講演), 2015年02月16日-2015年02月19日, Pacifico Yokohama(Kanagawa, Yokohama)
3. Kanda A, Noda K, Ishida S. ATP6AP2/(pro)renin receptor contributes to glucose metabolism via stabilizing the E1 subunit of pyruvate dehydrogenase complex. Asia-ARVO 2015, 2015年02月16日-2015年02月19日, Pacifico Yokohama(Kanagawa, Yokohama)
4. Kanda A. Atp6ap2/ (pro)renin receptor is associated with cell polarity required for lamellar formation during retinal development in mouse. 9th Japan- Korea International Symposium in Ophthalmology, 2014年12月01日, Hokkaido University(Hokkaido, Sapporo)
5. Kanda A, Yuki K, Furukawa T, Ichihara A, Ishida S. Atp6ap2/ (pro)renin receptor interacts with Par3 as a cell polarity determinant required for lamellar formation during retinal development in mice. World Ophthalmology Congress 2014 Tokyo, 2014年04月02日-2014年04月04日, Tokyo International Forum (Tokyo, Chiyoda)
6. Kanda A. Atp6ap2/ (pro)renin receptor is associated with cell polarity required for lamellar formation during retinal development in mouse. 2015 Meeting with Hokkaido University & Chang Gung Memorial Hospitals, 2015年01月31日, Taipei (Taiwan)
7. 神田敦宏. (プロ)レニン受容体と糖代謝. 第7回(プロ)レニン受容体フォーラム, 2015年03月21日, 熊本大学(熊本県、熊本市)
8. 神田敦宏. 網膜におけるレニン・アンジオテンシン系. 第1回眼科基礎研究の会, 2014年08月23日, ホテル三浦華園(北海道、滝川市)
9. 神田敦宏. (Pro)renin receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy. 第118回日本眼科学会総会, 2014年04月02日-2014年04月04日, 東京国際フォーラム(東京都、千代田区)
10. Kanda A, Noda K, Yuki K, Ozawa Y, Furukawa T, Ichihara A, Ishida S. Functional analysis of (pro)renin receptor in mouse retinal development. The 11th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care. 2013年08月01日-2013年08月02日, Hokkaido University(Sapporo, Japan)
11. Kanda A, Noda K, Yuki K, Ozawa Y, Fukuhara T, Ichihara A, Ishida S. Functional analysis of (pro)renin receptor in mouse retinal development. Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2013年

- 05月05日-2013年05月09日,  
Seattle(USA)
12. 神田敦宏、野田航介、結城賢弥、小沢洋子、古川貴久、市原淳弘、石田 晋. マウス網膜発生における(プロ)レニン受容体の生理的機能解析. 第117回日本眼科学会総会, 2013年04月04日-2013年04月07日, 東京国際フォーラム(東京都, 千代田区)
  13. Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. (Pro)renin receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy. 10th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care. 2012年10月02日-2012年10月03日, Hokkaido University(Sapporo, Japan)
  14. Boulton M, Qi X, Kanda A, Nellissery J, Mitter S, Grant M, Swaroop A. ARMS2 Association with the Mitochondrial Outer Membrane is Reduced in RPE Cells Exposed to Oxidative Stress and in AMD. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, 2012年05月06日-2012年05月10日, Fort Lauderdale (USA)
  15. Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. (Pro)renin receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, 2012年05月06日-2012年05月10日, Fort Lauderdale (USA)
  16. Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. (Pro)renin receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy. Seoul National University - Hokkaido University Joint Symposium in Ophthalmology, 2012年11月19日, Hokkaido University(Sapporo, Japan)
  17. 神田敦宏、野田航介、結城賢弥、小沢洋子、古川 貴久、市原淳弘、石田 晋. マウス網膜発生における(プロ)レニン受容体の機能解析. 第35回日本分子生物学会, 2012年12月11日-2012年12月14日, 福岡国際会議場(福岡県, 福岡市)

18. 神田敦宏、野田航介、齋藤 航、結城賢弥、小沢洋子、古川貴久、市原淳弘、石田 晋. 網膜疾患および発生における(プロ)レニン受容体の機能解析. 第2回わかもと先進医療研究会, 2012年07月20日, ロイヤルパークホテル(東京都, 中央区)

19. 神田敦宏、野田航介、齋藤 航、石田 晋. (プロ)レニン受容体の増殖糖尿病網膜症組織検体における血管新生活動性への関与. 第116回日本眼科学会総会, 2012年04月05日-2012年04月08日, 東京国際フォーラム(東京都, 千代田区)

〔図書〕(計 1件)

1. Kanda A, Ishida S. Springer. Roles of the retinal pigment epithelium in neuroprotection. Neuroprotection and Regeneration for Retinal Diseases.2014, 341

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://eye.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織  
(1)研究代表者

神田 敦宏 (KANDA ATSUHIRO)

北海道大学大学院医学研究科 眼科学分野 特任講師

研究者番号: 80342707