

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293198

研究課題名(和文)(プロ)レニン受容体分子構造における慢性腎臓病治療標的部位の同定

研究課題名(英文) Identification of target regions for CKD therapy among the molecular structure of (pro)renin receptor.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：(P)RR欠損MEF細胞内における(P)RR遺伝子の全長/部分断片によるレスキュー実験により、(P)RR細胞外ドメインがV-ATPaseによる細胞生命維持機構に必須であった。しかし、V-ATPaseが一旦形成されてしまえば、細胞外ドメインが全長型より切断されなくても影響されなかった。そこで、(P)RR細胞外ドメインのみを高発現する可溶性(P)RR過剰発現マウスを作成したが、異常な表現型を認めなかった。一方、全長型(P)RR過剰発現マウスは、ヒトのサルコペニアに類似した速筋優位な骨格筋萎縮を示した。その機序にAutophagy, Wntシグナル, Sirt1に関連する分子の関与が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Rescue experiments using fragments of the (P)RR gene in (P)RR-deficient MEF showed the essential role of the (P)RR extracellular domain in maintenance of cell life. However, once V-ATPase is constructed, processing of the full length (P)RR to the extracellular (P)RR domain is not always necessary for the construction of V-ATPase. In addition, the mice overexpressed soluble (P)RR, that is almost extracellular domain of (P)RR, had no abnormal phenotype. Whereas, the mice overexpressed full-length (P)RR had fast muscle-dominant muscle atrophy mimicked human sarcopenia. The mechanism involved molecules contributing to autophagy, Wnt signals, and Sirt1.

研究分野：高血圧、内分泌、腎臓

キーワード：慢性腎臓病 老化 骨格筋 サルコペニア

1. 研究開始当初の背景

(プロ)レニン受容体は、全身の細胞に存在する1回膜貫通型受容体蛋白であり、プロレニンが結合するとプロレニンがレニンと同等の酵素活性を発揮し、局所でのアンジオテンシンペプチド合成を促進して組織レニン-アンジオテンシン (RA) 系を活性化する。また、プロレニンとの結合によって生じる(プロ)レニン受容体細胞内シグナルも臓器障害の病態生理に関与する。さらに、我々は世界に先駆けて、(プロ)レニン受容体を細胞特異的に欠損させるマウス[Floxed(P)RR]の作成に成功し、心筋細胞および腎糸球体上皮細胞で(プロ)レニン受容体を欠損させた。その結果、(プロ)レニン受容体は、その第3の機能として Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase)の形成と機能に必須な因子であり、(プロ)レニン受容体が欠損すると、細胞内リサイクル機構である Autophagy が障害されることを解明した。すなわち、(プロ)レニン受容体は、生理的に V-ATPase を介して細胞内リサイクル機構を維持して、細胞の老化に対抗する。

(プロ)レニン受容体は、その一部が細胞内ゴルジ体の furin で切断され、可溶性(プロ)レニン受容体[s(P)RR]と ATP6AP2 に分離する。s(P)RR はプロレニン結合部位を含み細胞外へ放出され、ATP6AP2 は膜上で V-ATPase と接合する。細胞特異的欠損マウスで得た知見、すなわち(プロ)レニン受容体の第3の機能—Autophagy 消化過程維持機能—に、(1) ATP6AP2 のみで十分か？(2)全長型(プロ)レニン受容体が必要か？(3)プロレニン結合部位は影響するか？という疑問が生じる。さらに最近、我々はヒトの血漿中で s(P)RR 濃度を測定できる ELISA キットを開発した。妊娠初期の s(P)RR 濃度高値は妊娠中後期の血圧上昇を予測し、本態性高血圧患者の s(P)RR 濃度は eGFR と有意な負の相関関係を示した。また、DOCA 食塩ラットにおいて、中枢神経系特異的に(プロ)レニン受容体を欠損させると

高血圧の発症が抑制された。以上の研究結果より、高血圧病態においてプロレニン結合部位を含む s(P)RR が、RA 系に依存しない機序—細胞内シグナルあるいは V-ATPase 依存性第3の機能—を介して重要に関与する可能性が強く示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、プロレニン結合部位を含む s(P)RR が V-ATPase 関連細胞生命維持機能に関与するという仮説を立て、3年の研究期間内にそれを証明する。そのために、(1) Floxed(P)RR マウス胎児から線維芽細胞 (MEF) を分離培養し、Cre 発現アデノウイルス感染によって(プロ)レニン受容体をノックアウトして V-ATPase サブユニット発現と細胞内 pH 変化で評価する。その後(プロ)レニン受容体遺伝子の全長あるいは部分断片 (研究計画の項参照、一部仮説を支持する結果あり) を導入しレスキューの有無を評価する。レスキュー実験結果を踏まえ、(2)組み換え型プロレニン蛋白負荷が V-ATPase サブユニット発現と細胞内 pH 変化に与える影響を検討する。MEF にストレス (高血糖、過伸展、H₂O₂ 負荷) 負荷し、上清中 s(P)RR、細胞 (P)RR mRNA 発現、細胞 furin mRNA 発現を検討する。(3) (プロ)レニン受容体遺伝子の全長あるいは部分断片を高発現させたマウスを作成し、Floxed(P)RR マウスと交配させる。両遺伝子を有する産仔を得て、さらに Podocin-Cre マウスと交配し腎糸球体上皮細胞特異的レスキューマウスを作成し実験に供する。

3. 研究の方法

(1) Floxed(P)RR マウス胎児由来の MEF を分離培養し、Cre 発現アデノウイルス感染によって(プロ)レニン受容体をノックアウトした PRR-null MEF に、(プロ)レニン受容体遺伝子の全長と部分断片を過剰発現して V-ATPase サブユニット発現と細胞内 pH を評価し、『プロレニン結合部位を含む s(P)RR 領域が

V-ATPase 機能に重要に関与する』という仮説を証明し、その影響と機序を探索する。

(2) プロレニン負荷が s(P)RR 領域を介して V-ATPase 機能に与える影響を検討するとともに、各種病態ストレス負荷時に起きる(プロ)レニン受容体のプロセッシングを *in vitro* で検討し、各種病態の臨床研究における s(P)RR 測定結果の意義について考察する。さらに、新たな高血圧・慢性腎臓病診療創出のため、(プロ)レニン受容体遺伝子の全長と部分断片を細胞特異的に過剰発現するマウスを作成し、(プロ)レニン受容体分子の中での治療標的を *in vivo* で明確化する。

4. 研究成果

(1) Floxed(P)RR マウス胎児由来の MEF を分離培養し、Cre 発現アデノウイルス感染によって(プロ)レニン受容体をノックアウトした PRR-null MEF に、(プロ)レニン受容体遺伝子の全長と部分断片を過剰発現したところ、①(プロ)レニン受容体細胞外ドメインが V-ATPase 形成と機能維持に必須であること、②furin の変異による(プロ)レニン受容体から可溶性(プロ)レニン受容体へのプロセッシングは、(プロ)レニン受容体による V-ATPase 形成と機能維持に影響を与えないこと、③(プロ)レニン受容体遺伝子 Exon4 変異も(プロ)レニン受容体による V-ATPase 形成と機能維持に影響を与えないこと、が明らかになった。

(2) s(P)RR 過剰発現マウスを作成したところ、異常な表現型を認めなかったが、全長型(P)RR 過剰発現マウスを作成したところ、速筋優位な骨格筋萎縮を認めた。このマウスは、ヒトサルコペニアに類似する世界初のマウスと考えられた。

(3) 全長型(P)RR 過剰発現マウスで認められた速筋優位な骨格筋萎縮の細胞内メカニズムとして、活性化 Autophagy, 過剰な Wnt シグナル、Sirt1 発現亢進が関与して筋破壊と筋再生障害が起きることが示された。

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 17 件)

1: Ramkumar N, Stuart D, Mironova E, Bugay V, Wang S, Abraham N, Ichihara A, Stockand JD, Kohan DE. Renal tubular epithelial cell prorenin receptor regulates blood pressure and sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016 Apr 6;ajprenal.00088.2016. [Epub ahead of print]

2: Wang F, Lu X, Peng K, Fang H, Zhou L, Su J, Nau A, Yang KT, Ichihara A, Lu A, Zhou SF, Yang T. Antidiuretic Action of Collecting Duct (Pro)Renin Receptor Downstream of Vasopressin and PGE2 Receptor EP4. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Mar 21. pii: ASN.2015050592. [Epub ahead of print]

3: Nartita T, Ichihara A, Matsuoka K, Takai Y, Bokuda K, Morimoto S, Itoh H, Seki H. Placental (pro)renin receptor expression and plasma soluble (pro)renin receptor levels in preeclampsia. *Placenta*. 2016 Jan;37:72-8.

4: Ramkumar N, Stuart D, Calquin M, Quadri S, Wang S, Van Hoek AN, Siragy HM, Ichihara A, Kohan DE. Nephron-specific deletion of the prorenin receptor causes a urine concentration defect. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015 Jul 1;309(1):F48-56.

5: Ishii K, Takeuchi H, Fukunaga K, Hirano Y, Suda K, Hagiwara T, Miyasho T, Yamada S, Nakamura R, Takahashi T, Wada N, Kawakubo H, Saikawa Y, Omori T, Betsuyaku T, Ichihara A, Kitagawa Y. Attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury after (pro)renin receptor blockade.

- Exp Lung Res. 2015 May;41(4):199-207.
- 6: Shibayama Y, Fujimori T, Nguyen G, Hirose T, Totsune K, Ichihara A, Kitada K, Nakano D, Kobori H, Kohno M, Masaki T, Suzuki Y, Yachida S, Nishiyama A. (Pro)renin receptor is crucial for Wnt/ β -catenin-dependent genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep.* 2015 Mar 9;5:8854. doi: 10.1038/srep08854.
- 7: Narumi K, Hirose T, Sato E, Mori T, Kisu K, Ishikawa M, Totsune K, Ishii T, Ichihara A, Nguyen G, Sato H, Ito S. A functional (pro)renin receptor is expressed in human lymphocytes and monocytes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015 Mar 1;308(5):F487-99.
- 8: Kurauchi-Mito A, Ichihara A, Bokuda K, Sakoda M, Kinouchi K, Yaguchi T, Yamada T, Sun-Wada GH, Wada Y, Itoh H. Significant roles of the (pro)renin receptor in integrity of vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res.* 2014 Sep;37(9):830-5.
- 9: Morimoto S, Ando T, Niiyama M, Seki Y, Yoshida N, Watanabe D, Kawakami-Mori F, Kobori H, Nishiyama A, Ichihara A. Serum soluble (pro)renin receptor levels in patients with essential hypertension. *Hypertens Res.* 2014 Jul;37(7):642-8.
- 10: Li W, Peng H, Mehaffey EP, Kimball CD, Grobe JL, van Gool JM, Sullivan MN, Earley S, Danser AH, Ichihara A, Feng Y. Neuron-specific (pro)renin receptor knockout prevents the development of salt-sensitive hypertension. *Hypertension.* 2014 Feb;63(2):316-23.
- 11: Hirano Y, Takeuchi H, Suda K, Hagiwara T, Miyasho T, Kawamura Y, Yamada S, Oyama T, Takahashi T, Wada N, Saikawa Y, Ichihara A, Kitagawa Y. (Pro)renin receptor blocker improves survival of rats with sepsis. *J Surg Res.* 2014 Jan;186(1):269-77.
- 12: 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.* 2013 Dec 4;33(49):19341-51.
- 13: Hamada K, Taniguchi Y, Shimamura Y, Inoue K, Ogata K, Ishihara M, Horino T, Fujimoto S, Ohguro T, Yoshimoto Y, Ikebe M, Yuasa K, Hoshino E, Iiyama T, Ichihara A, Terada Y. Serum level of soluble (pro)renin receptor is modulated in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 2013 Dec;17(6):848-56.
- 14: Kinouchi K, Ichihara A, Sano M, Sun-Wada GH, Wada Y, Ochi H, Fukuda T, Bokuda K, Kurosawa H, Yoshida N, Takeda S, Fukuda K, Itoh H. The role of individual domains and the significance of shedding of ATP6AP2/(pro)renin receptor in vacuolar H(+)-ATPase biogenesis. *PLoS One.* 2013 Nov 4;8(11):e78603.
- 15: Watanabe N, Morimoto S, Fujiwara T, Suzuki T, Taniguchi K, Mori F, Ando T, Watanabe D, Kimura T, Sago H, Ichihara A. Prediction of gestational diabetes mellitus by soluble (pro)renin receptor during the first trimester. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Jun;98(6):2528-35.
- 16: Song R, Preston G, Ichihara A, Yosypiv IV. Deletion of the prorenin

receptor from the ureteric bud causes renal hypodysplasia. PLoS One. 2013 May 21;8(5):e63835.

17: Watanabe N, Morimoto S, Fujiwara T, Suzuki T, Taniguchi K, Ando T, Kimura T, Sago H, Ichihara A. Association between soluble (Pro)renin receptor concentration in cord blood and small for gestational age birth: a cross-sectional study. PLoS One. 2013;8(3):e60036.

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