

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460296

研究課題名(和文)新規cAMP標的分子 EPAC の高血圧発症における役割

研究課題名(英文)The role of EPAC in development of hypertension

研究代表者

藤田 孝之(FUJITA, Takayuki)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：40468202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はEpac1欠損マウスにおいて、食塩負荷時の血圧上昇が減弱していることや飲水量が増加していることを見出した。腎臓におけるアキアポリン2のmRNAの発現量を評価したところ、Epac1欠損マウスにおいては抑制されていることが明らかとなった。また腎臓におけるレニン・アンジオテンシン系の分子の発現量を評価したところ、血圧上昇に寄与するレニンの発現量がEpac1欠損マウスにおいて抑制されていることが認められた。これらの事から、Epac1は、血管の収縮、体液量制御の両者に関与し、血圧制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We found that the salt-sensitivity of blood pressure was attenuated in Epac1 deficient mice. In addition, the aquaporin 2 (AQP2) and renin mRNA levels in the kidney of EPAC1KO mice were significantly lower than that in wild type (WT) mice. Consistently, water consumption was increased in the mice compare to WT mice, indicating that water reabsorption through AQP2 may be inhibited by EPAC1 deficiency. These findings suggest that EPAC1 plays important role in maintaining the expression of renin and AQP2 in the kidney of mice. Through these mechanisms, Epac1 may be involved in the development of hypertension.

研究分野：循環器病学

キーワード：高血圧 EPAC cAMP

### 1. 研究開始当初の背景

cAMP は代表的なセカンドメッセンジャーであり、その作用機序は、古典的には protein kinase A (PKA) を介する。しかし近年、新規 cAMP 標的分子として Exchange proteins directly activated by cyclic AMP (Epac) が同定された。Epac は GTPase の一つである Rap の GTP 交換因子として働き、Rap を活性化するが、これは PKA に非依存的である。これまで PKA を介すると信じられてきた cAMP シグナルの様々な機能が、Epac を介する経路にも起因している可能性が高く、その詳細の解明は重要な意味を持つと考えられる。

我々はこれまでに、とくに Epac 1 の欠損による心血管系における形質変化を評価する事で、Epac の機能についての検討を行った。Epac 1 欠損マウスは、定常状態では心機能のごく僅かな低下を認めるだけであり、心肥大や血圧に大きな影響を及ぼさない。しかし慢性カテコラミン負荷や高圧負荷モデルにおいて、心筋細胞死の強い抑制とともに、心筋の線維化の抑制と心機能の維持が見られた。つまり Epac の欠損は、様々な外部からのストレスによる細胞死及び細胞機能障害に対して保護的に働いていることが示唆された(参考文献①) 特に、Epac 欠損は PKA と異なり、定常状態や非ストレス状態では大きな変化を及ぼさないが、外部ストレスが加わった時に重要となる。

### 2. 研究の目的

高血圧は、脳卒中、心筋梗塞等の重要な血管疾患の原因である動脈硬化の代表的な促進因子であり、そのコントロールの必要性は高い。

本研究では近年発見された cAMP の標的分子である Epac に着目し、cAMP が同タンパクを介して引き起こす機能を明らかにすることで、Epac が循環制御に果たす役割を検討する。これまでの我々の実験結果から、Epac の欠損あるいは過剰発現は、心血管機能に大きな変化を与えることが明らかになってきた。高血圧発症な重要なメカニズムである食塩感受性やレニン・アンジオテンシン系、体液制御に重要な役割を果たすアクアポリンなどに着目し、それらに対する Epac1 の関与を明らかにし、Epac を標的とした高血圧予防、治療の可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

Epac 1 欠損マウスに 8% 高塩分食と、通常食を摂取させ、それによる血圧の変化を野生型マウスのそれと比較する。

また、それぞれのマウスの飲水量を測定し比較検討を行う。

各マウスの腎臓組織を採取し、腎皮質、腎髄質等に分割しそれぞれの組織における各種 mRNA の発現量を RT-PCR 法にて評価する。血圧維持や、体内水分量コントロールに重要な役割を果たす、レニン・アンジオテンシン

系に関わる分子群や、アクアポリン 2 (AQP2) の発現量について評価する。

### 4. 研究成果

我々は Epac1 欠損マウスにおいて、食塩負荷時の血圧上昇(食塩感受性高血圧)が有意に減弱していることを見出した。

通常食(Normal salt)と 8% 高塩分食(High salt)をそれぞれ野生型マウス(WT)と Epac1 欠損マウス(KO)に摂取させ、摂取開始 1 週間後に血圧測定を行った。以下の図 1, 2 に示すように、WT の血圧は High salt 投与によって有意に上昇したのに対し、Epac1 欠損マウスは有意な変化を示さず、High salt 食摂取群の血圧は WT マウスより Epac1 欠損マウスで有意に低かった。

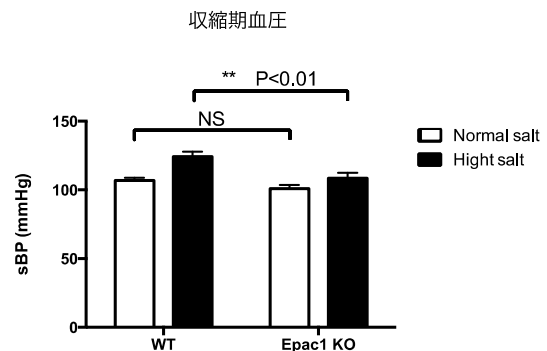


図 1

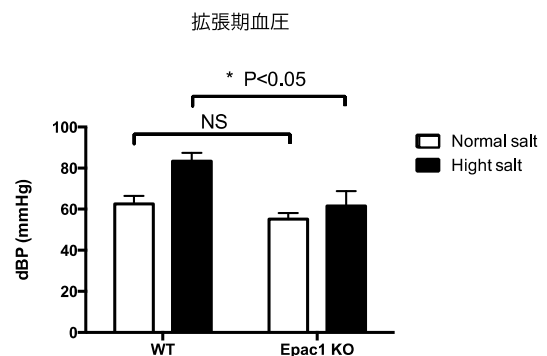


図 2

これらの結果から、Epac1 はマウスの食塩感受性、すなわち食塩過剰摂取による血圧上昇反応に関与している可能性が示唆された。

次に我々は Epac1 欠損マウスの水分摂取量を評価した。図 3 に示すとおり、Epac1 欠損マウスにおいては水分摂取量が有意に増加しており、これに対して体重に有意な差異が認められないことから尿量が増加していることが示唆された。

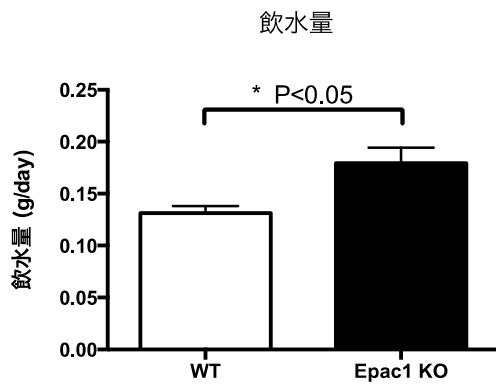


図 3

次にわれわれは、血圧や体液量の制御に関与する分子の腎臓における発現量を、Epac1 欠損マウスにおいて評価した。図 4 に示すように、AQP2 の mRNA 発現量が有意に低下していることが明らかとなった。

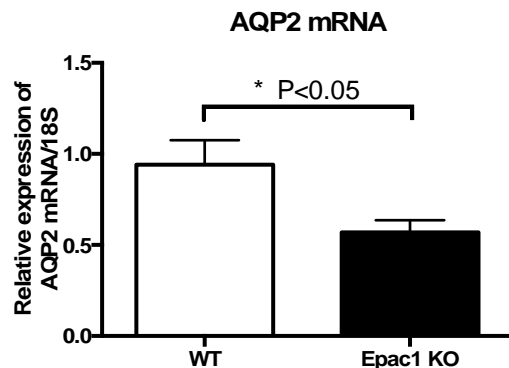


図 4

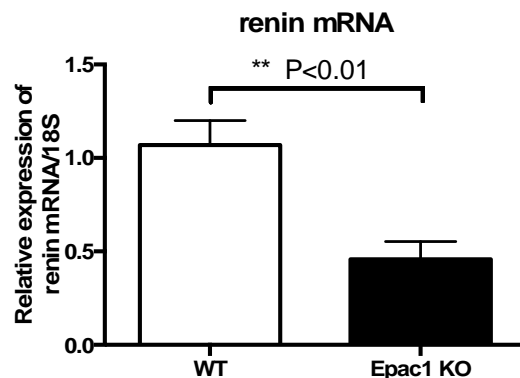


図 5

また、図 5 に示すとおり、腎皮質におけるレニンの mRNA 発現量が、Epac1 欠損マウスにおいて有意に低下していることが明らかとなった。

この結果から、Epac1 欠損マウスの腎臓において、レニン・アンジオテンシン系が抑制されている可能性が示唆された。

以上の様に、今回我々は Epac1 欠損マウスを用いて、Epac1 の血圧制御への関与についての検討を行った。

まず Epac1 欠損マウスは食塩摂取による血圧上昇が抑制されており、Epac1 は食塩感受性に重要な役割を果たしていることが示唆された。食塩感受性のメカニズムとしては、交感神経活性化の関与が報告されている(参考文献)。交感神経シグナルにおいて cAMP は極めて重要なセカンドメッセンジャーであり、Epac1 がそのシグナル伝達に関与している可能性が考えられた。

加えて cAMP は腎臓における AQP2 の発現量、機能制御に極めて重要な役割を果たしている。AQP2 は水の再吸収制御によって体液量の制御を荷っており血圧の維持にも影響する。我々の検討から、Epac1 欠損マウスは野生型マウスと比較して腎臓髄質における AQP2 の mRNA の発現が抑制されていることが示唆された。加えて Epac1 欠損マウスは野生型マウスと比較して体重は変わらないが、飲水量が有意に多く、尿量が多いことが示唆された。Epac1 を介する情報伝達系が AQP2 の発現誘導し、それによって水分再吸収を促進し体液量を保っている可能性があると考えられた。

さらに我々は Epac1 欠損マウスにおいて、腎皮質におけるレニンの mRNA 発現量が野生型マウスと比較して有意に低いことを見出した。レニン・アンジオテンシン系は、血管抵抗、循環血液量の両者の制御に関与し血圧上昇に重要な役割を果たす。上記の本研究で明らかになった所見から、Epac1 は、血管の収縮、体液量の維持の両者に働きかけて、血圧制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

#### <引用文献>

① S. Okumura et al. Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses, *J Clin Invest* 124 (2014) 2785-2801.

M. Nishimoto et al. Renal mechanisms of salt-sensitive hypertension: contribution of two steroid receptor-associated pathways, *Am J Physiol Renal Physiol* 308 (2015) F377-387.

#### 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)

[学会発表](計 2 件)

①Huilin Jin, Takayuki Fujita, Wenqian Cai, Yuko Hidaka, Shugo Sagara, Kenji Suita, Yoshihiro Ishikawa. EPAC1 plays an important role in regulation of renin and AQP2 expression in the kidney of mice. ESC (European Society of Cardiology) Congress

2014. 2014/8/30~9/3. Barcelona (Spain)

金慧玲, 藤田孝之, 蔡文倩, 日高祐子,  
相楽周吾, 吹田憲治, 石川義弘. 体液量調節  
における EPAC1 の役割についての検討. 第 57  
回日本腎臓学会学術総会 2014/7/4~7/6. パ  
シフィコ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 孝之 (FUJITA, Takayuki)  
横浜市立大学・医学部・講師  
研究者番号: 40468202