

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461205

研究課題名(和文)腎臓障害・心血管障害における(プロ)レニン受容体の機能解明と臨床応用

研究課題名(英文)(Pro)renin receptor in renal and cardiovascular injuries.

## 研究代表者

戸恒 和人(TOTSUNE, Kazuhito)

東北大学・薬学研究科(研究院)・客員教授

研究者番号：10217515

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)：(プロ)レニン受容体((P)RR)の腎臓障害・心血管障害・その他の疾患における役割を検討した。ヒト血中に可溶性(P)RRが存在することを証明し、原発性アルドステロン症、ギッテルマン症候群で血中濃度が上昇していることを見出し報告した。ラットにおいて、高食塩負荷及び脱水負荷が腎臓組織内(P)RRの発現を亢進させることを見出し報告した。また、癌の発生・増殖との関係について検討し、(P)RRは乳癌及び膀胱癌において、その増殖メカニズムに関与していることを見出し報告した。更に、血中の可溶性(P)RR濃度が脳の発達・萎縮退化に関与する因子であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Pathophysiological roles of (pro)renin receptor ((P)RR) were investigated in renal and cardiovascular injuries and cancers. This research project revealed that (1) soluble type (P)RR (sPRR) is present in human plasma and sPRR levels were elevated in patients with primary aldosteronism and Gittelman syndrome, (2) high sodium intake or dehydration induced (P)RR expression in rat kidneys, (3) (P)RR was associated with cancer proliferation, and (4) sPRR levels have an association with brain atrophy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：遺伝子 循環器・高血圧 生理活性 発現・制御 腎臓障害 プロレニン受容体 悪性腫瘍 脳萎縮

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓障害・心血管障害は何故進行するのか？その機序の詳細は今も完全には解明されていない。慢性透析患者数は年々増加し、2011年末時点で30万人を超えている。また、近年、欧米に比べ著しく低かった虚血性心疾患の有病率が次第に増加している。これらは、現在の薬物療法や生活習慣への介入のみでは腎臓障害・心血管障害の進展・予防に限界があることを示唆している。

プロレニン受容体((P)RR)は、レニン・アンジオテンシン系の新規構成因子であり、腎臓障害・心血管障害に深く関わっていることが報告されている。また、最近、(P)RRの発見者である Nguyen 博士らや他のグループにより、全長型(P)RR から酵素切断的に可溶性(P)RR と膜貫通型(P)RR が産生されること、膜貫通型(P)RR が液胞系の多彩なオルガネラの内部の酸性化に関与している H<sup>+</sup>ポンプ(V-ATPase)に付随し、その集合体形成に必須のタンパク質であること、Wnt シグナル系を介し組織の発生・再生に関与すること等が報告され、(P)RR 研究は新たな局面を迎えている。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに、(P)RRが腎臓障害・心血管障害に深く関わっていることを示してきた。

本研究では、(1)酵素免疫測定法(ELISA)を用いた血中・尿中可溶性(P)RR 濃度の測定、(2)組織特異的ノックアウトモデル及び動物疾患モデルを用いたインターベンション実験、(3)(P)RR<sup>-/-</sup> ES細胞を用いた全長型、可溶性型、膜貫通型(P)RR の機能解析、を行い、(P)RR の腎臓・心血管障害への関与とその作用機序を検討する。即ち、腎臓疾患・心血管疾患における(P)RR の病態生理学的役割を解明し、(P)RR による臓器障害という観点からの新しい予防・治療戦略の基盤を構築する。

## 3. 研究の方法

(1) 酵素免疫法(ELISA)を用いた血中・尿中プロレニン受容体((P)RR)濃度の測定

独自に作成した抗(プロ)レニン受容体抗体を用いて自作のELISAを開発するとともに、市販のキットを用いて、正常者及び腎不全患者の血液を対象として可溶性(P)RR がヒト血中に実在するかを検討した。また、健常者を含む腎臓・心血管障害に関連する各種疾患患者230名(フランス人)にて血中可溶性(P)RR 濃度を測定し、各種病態との関連を検討した。

(2) 腎臓・副腎・その他の組織、細胞における(P)RR発現の検討(戸恒、高橋が担当)

独自に作成した抗(プロ)レニン受容体抗体を用いて、動物疾患モデルでの心臓、腎臓組織での(P)RR 蛋白発現、ヒト疾患での脳、副腎、腎臓組織での(P)RR 蛋白発現、を

免疫染色、ウェスタンブロットにより検討した。また、ヒトの糸球体腎炎では、リンパ球、単球が重要な役割を果たしており、RAS系は炎症を強調していると考えられていることから、リンパ球及び単球での(P)RRの発現を、免疫染色法、Western Blot法、RT-PCR法、フローサイトメトリー法により調べ、(P)RRが炎症においても関連を持つかを検討した。

(3) 悪性腫瘍細胞における(P)RR発現と細胞増殖との関係の検討

最近の研究でプロレニン受容体((P)RR)はWnt/ $\beta$ -cateninシグナル伝達系に関与していることが分かってきている。一方で、Wnt/ $\beta$ -catenin伝達系は膵管癌(PDAC)の増殖に関与していることが知られている。そこで、(P)RRと膵癌発症との関係、膵癌培養細胞系での細胞増殖との関係を検討した。また、乳癌においても同様に検討した。

(4) 大迫研究における血中可溶性(P)RR濃度と各種病態との関連の検討

大迫研究の保存血液検体中の可溶性PRR濃度をELISAを用いて定量し、各種病態との関連を検討した。

(5) 組織特異的ノックアウトモデルを用いた検討

尿管管特異的(P)RRノックアウトマウスを作成し、5/6腎摘腎不全モデルを作製し、レニン・アンジオテンシン系阻害薬を用いた組織保護効果や脳・心血管・腎臓における組織障害の進展との関連の検討を行う。

(6) (P)RR<sup>-/-</sup> ES細胞を用いた全長型、可溶性型、膜貫通型(P)RRの機能解析

(P)RR floxedマウスより(P)RR<sup>flox/flox</sup> ES細胞系を確立し、この細胞にアデノウイルス-Creを感染させ、(P)RR<sup>-/-</sup> ES細胞を作製する。このES細胞に可溶性(P)RR及び膜貫通型(P)RR、全長型(P)RR、それぞれのpcDNAを導入し、(P)RRの3形態の内の1つを発現するES細胞系を確立する。

## 4. 研究成果

(1) 酵素免疫法(ELISA)を用いた血中・尿中プロレニン受容体((P)RR)濃度の測定

独自に作成した抗(プロ)レニン受容体抗体を用いた自作のELISAとともに、市販のキットを用いて、正常者及び腎不全患者の血液にて可溶性(P)RR がヒト血中に実在するかを検討した。クロマトグラフィーによる解析にて、ヒト血中には Nguyen 博士が予言した可溶性(P)RR が予想通りの分子量で存在することを見出した。尿中には更に小分子量の(P)RR 様免疫活性体を検出した。本成果は第17回日本心血管内分泌代謝学会にて発表した。

健常者を含む腎臓・心血管障害に関連する各種疾患患者 230 名（フランス人）にて血中可溶性(P)RR 濃度を測定し、レニン-アルドステロン系阻害薬を服用している患者、原発性アルドステロン症患者、ギッテルマン症候群患者では血中可溶性(P)RR 濃度が上昇していることを見出し、学術誌に発表した(Hypertension 2014, 63:297-302)。

#### (2) 腎臓・副腎・その他の組織、細胞における(P)RR 発現の検討

腎臓での(P)RR 発現をラットで検討した。結果、高食塩負荷にて腎臓での発現が亢進することを見出し、学術誌に発表した(Peptides 2015, 63:156-162)。

ヒト血中には可溶性の Pro レニン受容体(sPRR)が存在する。sPRR は細胞内で全長型 PRR として合成され furin により切断されて血中に放出される。一方、脱水負荷はレニン・アルドステロン系を刺激することが知られている。そこで、ラットに脱水負荷をかけ、血中 sPRR 濃度レベルと、腎組織内 PRR 発現レベルの変化を検討した。結果、72Hr の脱水負荷により血中 sPRR レベルは低下し、腎組織内全長型 PRR の発現レベルは上昇していることを見出した。即ち、脱水負荷は全長型 PRR の発現を亢進するが、血中への放出は低下させることが示唆された。(本研究は Tohoku J of Exp Med に投稿し、accept 中である。)

(P)RR はプロレニンと結合して RAS 系を活性化するとともに細胞に直接働き臓器障害を起こすと考えられる。高血圧と臓器障害をもたらすアルドステロン産生副腎腫瘍組織での(P)RR の発現を、免疫染色法、Western Blot 法、定量的 RT-PCR 法により調べ、その他の副腎主要組織での発現と比較検討した。結果、(P)RR の発現は、アルドステロン産生副腎腫瘍組織で亢進していることを見出し、報告した(Peptides 2013, 49:68-73)。

レニン-アンジオテンシン系は炎症と深い関わりを持つことが知られている。一方、ヒトのリンパ球と単球は AT 受容体を発現している。ヒトの糸球体腎炎では、リンパ球、単球が重要な役割を果たしており、RAS 系は炎症を強調していると考えられている。そこで、リンパ球及び単球での(P)RR の発現を、免疫染色法、Western Blot 法、RT-PCR 法、フローサイトメトリー法により調べ、(P)RR が炎症において作用を持つかを検討した。結果、(P)RR は単球に強く発現しており、ANCA-関連糸球体腎炎では糸球体近傍に浸潤したリンパ球及びマクロファージに発現していることを見出した。siRNA 投与により U937 細胞系での ERK1/2 の抑制が見られ、(P)RR は ANCA-関連糸球体腎炎の炎症反応に関与していることが示唆された。本結果を学術誌に発表した(Am J Physiol Renal Physiol 2015, 308:F487-F489)。

#### (3) 悪性腫瘍細胞における(P)RR 発現と細胞

#### 増殖との関係

ヒト癌由来細胞における(P)RR 発現と細胞増殖との関係を検討した。siRNA 投与により、乳癌細胞の増殖が抑制されることを見出し、報告した(第 17 回心血管内分泌代謝学会)。

Wnt/  $\beta$ -catenin 伝達系は膵管癌(PDAC)の増殖に関与していることが知られている。そこで、(P)RR と膵癌発症との関係を検討した。結果、膵癌患者の血中(P)RR 濃度は正常人に比して有意に高値であることを見出した。また、PDAC 細胞に(P)RR の siRNA を作用させると Wnt/  $\beta$ -catenin 伝達系は抑制され、PDAC 細胞の増殖も抑制されることを見出し、(P)RR は膵管癌の腫瘍化メカニズムに関与していることが示唆された。本結果を学術誌に発表した(Scientific Reports 2015, 5:8854)。

(P)RR と乳癌の細胞増殖機構との関係を更に検討し、インスリンによる(P)RR を介した増殖メカニズムが存在することを見出し報告した。(第 89 回日本内分泌学会総会学術総会 2016 年 4 月)

#### (4) 大迫研究：血中可溶性(P)RR 濃度と各種病態との関連の検討

大迫研究の保存血液検体中の可溶性(P)RR 濃度を ELISA を用いて定量し、各種病態との関連を検討した。結果、対象者 350 名において血中 sPRR 濃度は大脳皮質の表面積と負の相関を有することを見出した。sPRR 濃度と、腎臓・心血管障害に関わる表現型や他のレニン・アンジオテンシン系のマーカーとの相関は認められず、(P)RR は脳の発達・萎縮退化に関与する因子であることが示唆された。(本研究結果は 2016 年ヨーロッパ高血圧学会(6 月パリ市)での報告が決定している。)

#### (5) 組織特異的ノックアウトモデルを用いた検討

尿管管特異的(P)RR ノックアウトマウスの作成を試みたが、胎生致死であり実験は成功しなかった。

(6) (P)RR<sup>-/-</sup> ES 細胞を用いた全長型、可溶性型、膜貫通型(P)RR の機能解析  
(P)RR<sup>-/-</sup> ES 細胞の作製を試みたが、成功せず研究は中止された。

#### 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 7 件)

Hosaka M, Metoki H, Satoh M, Ohkubo T, Asayama K, Kikuya M, Inoue R, Obara T, Hirose T, Imai Y; J-HOME-CARD Study Group. Randomized trial comparing the velocities of the antihypertensive effects on home blood pressure of candesartan and candesartan with hydrochlorothiazide. Hypertens Res.

Vol.38:701-707, 2015. 査読有,  
DOI:10.1038/hr.2015.64.  
Sato M, Hosaka M, Asayama K, Kikuya M,  
Inoue R, Metoki H, Tsubota-Utsugi M,  
Hara A, Hirose T, Obara T, Totsune K,  
Hoshi H, Mano N, Node K, Imai Y, Ohkubo  
T. Association between N-terminal pro  
B-type natriuretic peptide and  
day-to-day blood pressure and heart  
rate variability in a general  
population: the Ohasama study. J  
Hypertens. Vol.33:1536-1541, 2015. 査  
読有,  
DOI:10.1097/HJH.0000000000000570.  
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/  $\beta$ -catenin-dependent genesis of  
pancreatic ductal adenocarcinoma. Sci  
Rep. Vol. 5:8854, 2015. 査読有,  
DOI:10.1038/srep08854.  
Rong R, Ito O, Mori N, Muroya Y, Tamura  
Y, Mori T, Ito S, Takahashi K, Totsune  
K, Kohzuki M. Expression of (pro)renin  
receptor and its upregulation by high  
salt intake in the rat nephron. Peptides.  
Vol.63:156-162, 2015. 査読有,  
DOI:10.1016/j.peptides.2014.12.007.  
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.  
Vol.308:F487-499, 2015. 査読有,  
DOI:10.1152/ajprenal.00206.2014.  
Nguyen G, Blanchard A, Curis E,  
Bergerot D, Chambon Y, Hirose T,  
Caumont-Prim A, Tabard SB, Baron S,  
Frank M, Totsune K, Azizi M. Plasma  
soluble (pro)renin receptor is  
independent of plasma renin, prorenin,  
and aldosterone concentrations but is  
affected by ethnicity. Hypertension.  
Vol.63:297-302, 2014. 査読有,  
DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02217  
.  
Yamamoto H, Kaneko K, Ohba K, Morimoto  
R, Hirose T, Sato F, Totsune K,  
Takahashi K. Increased expression of  
(pro)renin receptor in  
aldosterone-producing adenomas.  
Peptides. Vol.49:68-73, 2013. 査読有,  
DOI:10.1016/j.peptides.2013.08.022.

[学会発表](計 8 件)

山村 直、大場浩史、田島一基、戸恒和  
人、上月正博、高橋和広。インスリンの(プ

ロ)レニン受容体を介した乳癌の細胞増殖  
機構の解明。第 89 回日本内分泌学会学術  
総会、2016.4.21.京都

山越聖子、伊藤 修、戎 栄、大崎雄介、  
森 建文、伊藤貞嘉、高橋和広、戸恒和人、  
上月正博。Dahl 食塩感受性ラットの腎に  
おける高食塩摂取によるプロレニン受容  
体発現の増加。第 20 回特定非営利活動法  
人東北内分泌研究会、第 32 回日本内分  
泌学会東北地方会。2016.4.9.仙台

田島 一基、大場浩史、山村 直、西島 嗣  
生、櫻井 滋、戸恒和人、高橋和広。睡眠  
時無呼吸症候群における血中可溶性(プ  
ロ)レニン受容体濃度は重症度に相関する。  
第42回日本神経内分泌学会 第23回日本  
行動神経内分泌研究会 合同学術集会。  
2015.9.18.仙台

睡眠時無呼吸症候群における血中可溶性  
(プロ)レニン受容体の検討: 重症度との  
相関。田島一基、西島嗣生、櫻井滋、大場  
浩史、金子桐子、戸恒和人、高橋和広。第  
18 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、  
2014.11.21.横浜

ヒト腎臓および副腎における(プロ)レニ  
ン受容体の発現の検討。山本 肇、金子桐  
子、大場浩史、森本玲、廣瀬卓男、佐藤文  
俊、戸恒和人、高橋和広。第 54 回 日本臨  
床化学会年次学術集会、2014.9.5.東京

アルドステロン産生副腎皮質腺腫におけ  
る(プロ)レニン受容体の発現増加。高橋  
和広、山本肇、金子桐子、大場浩史、森本  
玲、佐藤文俊、戸恒和人。第 111 回日本内  
科学会講演会、2014.4.11.東京

戸恒和人、廣瀬卓男、藤原正子、関野宏、  
佐藤博、高橋和広、今井潤。ヒト血中プロ  
レニン受容体様免疫活性物質の検討。第  
17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会  
2013.11.22. 豊中

大場浩史、西山浩史、金子桐子、廣瀬卓  
男、戸恒和人、笹野公伸、鈴木貴、高橋和  
広。レニン・アンジオテンシン系の新規因  
子、プロレニン受容体の乳癌における発現  
と腫瘍病態への関与の検討。第 17 回日本  
心血管内分泌代謝学会学術総会  
2013.11.22. 豊中

[図書](計 0 件)

[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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

戸恒 和人 (TOTSUNE, Kazuhito)  
東北大学・大学院薬学研究科・客員教授  
研究者番号：10217515

### (2) 研究分担者

高橋 和広 (TAKAHASI, Kazuhiro)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：80241628

今井 潤 (IMAI, Yutaka)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：40133946

### (3) 連携研究者

廣瀬 卓男 (HIROSE, Takuo)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：20599302

高橋 信行 (TAKAHASI, Nobuyuki)  
東北大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：40588456