

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 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：25461249

研究課題名(和文) 高血圧感受性遺伝子ATP2B1の血圧および臓器障害に与える影響に関する研究

研究課題名(英文) The effects of ATP2B1, a hypertension susceptibility gene, on blood pressure and organ injuries.

研究代表者

平和 伸仁 (Hirawa, Nobuhito)

横浜市立大学・大学病院・准教授

研究者番号：20315766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヒトの本態性高血圧感受性遺伝子を探索し、ATP2B1遺伝子を発見し、血管平滑筋細胞の同遺伝子発現を無くしたモデルを作成し血圧上昇との関連性を明らかにした。しかし、本態性高血圧では全身のATP2B1がある程度低下した状態の方が実際の病態に近い可能性がある。そこで、我々は全身のヘテロノックアウトマウスを作成してその意義を解析した。本モデルでは、各臓器のATP2B1発現が30%程度に低下するとともに、内皮eNOSのリン酸化の低下とともにNO産生が低下し、血管の収縮性亢進とともに血圧が上昇する事が明らかとなった。ATP2B1のユビキタスな発現低下が高血圧の発症と関係することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the 'Millennium Genome Project', we identified ATP2B1 as a gene responsible for hypertension through GWAS. However the role of the ATP2B1 gene in blood pressure homeostasis have not yet determined. Thus, we generated systemic heterozygous ATP2B1 null(ATP2B1+/-) mice. ATP2B1+/- mice revealed significantly higher SBP by a radio telemetric method. Phenylephrine-induced vasoconstriction was significantly increased in vascular rings from ATP2B1+/- mice, and the difference in this contraction disappeared in the presence of a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor. In cultured endothelial cells from ATP2B1+/- mice, the phosphorylation (Ser-1177) level of NOS protein had decreased, and the production of nitric oxide was lower compared to those of control mice. These results suggest that decreased ATP2B1 gene expression is associated with impaired endothelial NOS activity and nitric oxide production, and the ATP2B1 gene plays a crucial role in the regulation of blood pressure.

研究分野：高血圧学、腎臓内科学

キーワード：ATP2B1 hypertension nitric oxide GWAS mice knock out

1. 研究開始当初の背景

(1) 高血圧の約 90%は本態性高血圧であると考えられている。本態性高血圧は遺伝的要因と環境要因によりその発症に関与していることが知られている。同一家系内に高血圧が多発する事は遺伝的要因の存在する事を示唆するが、同一家系内では環境因子(食塩摂取量、肥満、運動など生活習慣)も共有する場合も多く、遺伝因子の証明をする事は簡単ではない。

高血圧の遺伝子に関しては、1990年代からリドル症候群などの先天性高血圧の遺伝的背景が明らかにされてきた。メンデル遺伝型高血圧は、そのタイプにおいても腎遠位尿管における Na 移動が直接的・間接的に影響する事が判明し、本態性高血圧における候補遺伝子として上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)、WNK キナーゼ、アルドステロン合成酵素(CYP11B2)などがあげられ探索されて来た。

(2) ヒト多因子疾患の疾患感受性遺伝子を探索する手法として、連鎖解析と関連解析がある。普遍的な関連遺伝子を発見するには、非血縁の患者群と健常対照群を対象とした関連解析を行なうが、GWAS では数十万以上の SNPs あるいは数万以上のマイクロサテライトマーカーを用いて、多数の症例で解析しないと探索する事が難しい。我々は、ミレニアムプロジェクトとして、多くの遺伝子が高血圧に関連する事を明らかにして来た (HT Res 2008)。さらに我々は、日本人の地域および職域コホート解析により、ATP2B1 が高血圧と強く関連する事を明らかにした (Hypertension 2010)。一方、ヨーロッパを起源とする人種や我々のサンプルを含めた日本、中国、韓国等の国際コンソーシアムにより、人種を超えて ATP2B1 遺伝子が高血圧感受性遺伝子ある事が確認された (Nature 2011)。

(3) ATP2B1 を全身でノックアウト (KO) すると、胎生致死となるため、その役割を解析するために血管平滑筋特異的マウスを作成し、高血圧を呈する事を証明した (Hypertension 2012)。

2. 研究の目的

(1) 血管平滑筋の特異的な ATP2B1 の KO マウスは、血管壁のみでの遺伝子発現を無くしたマウスであり、本態性高血圧のモデルとしては病態の解明に不十分である。そこで、本研究では、本態性高血圧のように、全身での ATP2B1 発現を低下させ、より生体での ATP2B1 の役割について解析しやすいモデルである全身のヘテロ KO マウスを作成し、ATP2B1 の役割を明らかにすることを目的とした。

(2) さらに、今後の創薬にも寄与できる様に、平滑筋特異的 ATP2B1KO マウスに対する各種

降圧薬の作用の検討を行うとともに、内皮細胞特異的 KO マウスや尿管特異的 KO マウスの作成に加え、ATP2B1 の過剰発現マウスの作成に着手することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 全身ヘテロノックアウトマウス

ATP2B1 の systemic KO マウスは、胎生致死となる事が知られており、ヘテロ KO マウスを解析する。非観血的血圧測定および観血的血圧測定、血管リング標本による収縮力解析、培養細胞による Ca²⁺濃度の変化、さらに血管収縮、弛緩に関するメカニズムの解析を行う。

(2) 血管壁特異的 ATP2B1KO マウス

以前の解析では、コントロールマウスの遺伝的背景が KO と一部異なっていたため、black6 系に統一させるため、再度、本系統マウスを作成する。その後、血圧や mRNA などの解析を行い、各種降圧薬の効果を確認する。

尿管特異的 KO マウス

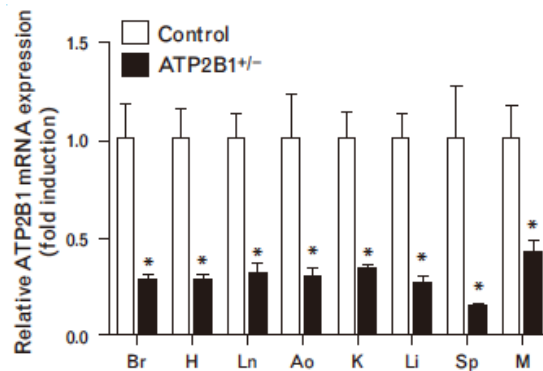
ksp-Cre を用いた尿管特異的 ATP2B1KO マウスを作成する。また、血圧に与える影響などを調べ、さらなる ATP2B1 の意義に関して検討する。

4. 研究成果

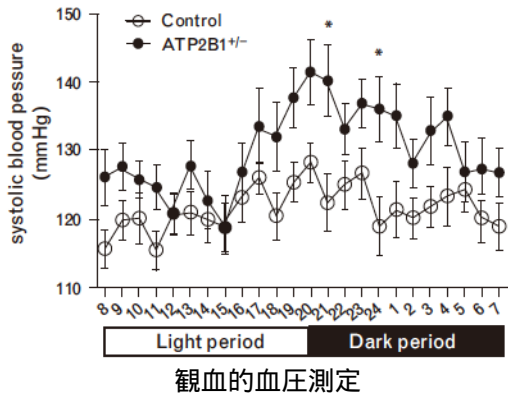
(1) 全身ヘテロノックアウトマウス

全身のヘテロ KO マウスは、コントロールマウスと比較して、体重の増加に有意な差を認めなかった。

一方、下図のようにさまざまな臓器において、ATP2B1 の発現が低下していた。

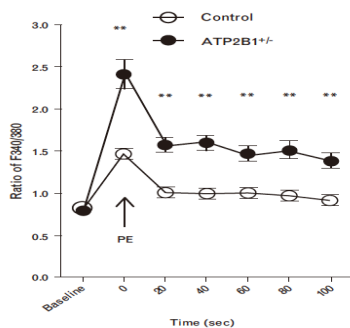


昼間の時間帯に非観血的に測定した収縮期血圧は、KO マウスで有意な変化を示さなかった。一方で、テレメトリー法を用い観血的な血圧測定(次ページ)では、夜間帯(活動期)に KO マウスで有意な血圧の上昇を認めた。さらに、3ヶ月令で KO マウスでは、すでに心筋重量が有意に増大していたが、脈拍数は昼間も、夜間も有意な差を認めなかった。



ATP2B1 の発現低下にもかかわらず、ATP2B4 や NCX などの Ca^{2+} 代謝に関連するチャネルの発現に有意な変化を認めなかった。

培養平滑筋細胞では、血管平滑筋細胞特異的 KO マウスの細胞と同様に、フェニレフリン刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇するとともに、高い濃度が長時間維持されていた。



さらに、血管リング標本を用いた収縮実験では、フェニレフリン刺激によるヘテロ KO マウスの収縮力は、コントロールよりも有意に亢進していたが、L-NAME 存在下ではコントロールと同等の収縮力であった。一方、アセチルコリンによる拡張力は、KO マウスで低下していたが、ニトロプルシドを用いると同等であった。これらの結果から KO マウス血管内皮からの NO 産生が低下しており、それが血管収縮に関連している可能性が考えられた。

さらに、内皮細胞および血管壁からの NO 産生は、KO マウス低下し、また eNOS のリン酸化が有意に低下していた。

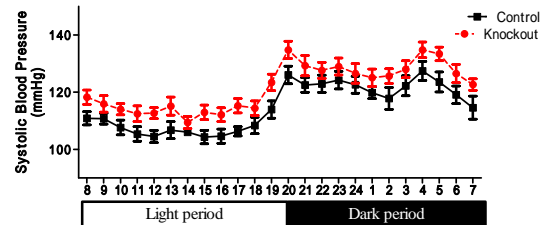
以上から、ATP2B1 の発現を全身で低下させた際の血圧上昇には、血管内 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴う血管収縮力の増加に加えて、内皮細胞における NO 産生系の機能低下も関連することが明らかとなった。

(2) 血管壁特異的 ATP2B1KO マウス

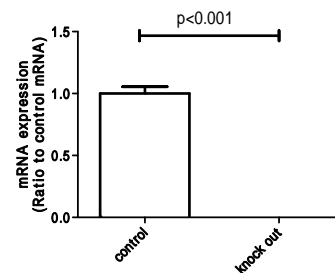
ATP2B1 の血管壁特異的 KO マウスを再度、black6 をベースとして交配し作成した。

このマウスは、以前報告したマウスと同様に、テレメトリー法にて血圧が有意に高値を

示した(図)。本マウスにおいては、血管壁においてほとんど ATP2B1 発現が認められない。そこで、テレメトリー法を用いて、各種降圧薬の効果を検討したが、短時間投与での有意な反応性の違いは認めなかった。このため、現在、長期投与による血圧反応性を検討中である。



ATP2B1

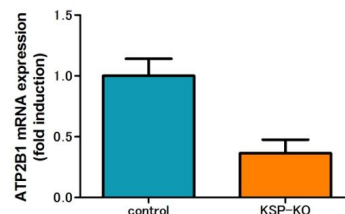


培養血管平滑筋細胞での ATP2B1 発現

(3) 尿細管特異的 KO マウス

尿細管特異的 KO マウスも breed に問題なく繁殖可能であった。

下図のように腎皮質に限らず、髓質においても ATP2B1 の発現が低下していた。



この、マウスでは、体重の変化や腎重量にコントロールと差は認めなかった。血圧についても観血的、非観血的測定でも有意な差を認めなかった。一方で、尿量や Ca^{2+} 排泄に変化を認めており、今後、これらの意義の解明が必要であった。

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 1 件)

1) Fujiwara, A, Hirawa, N, Fujita, M, Kobayashi, Y, Okuyama, Y, Yatsu, K, Katsumata, M, Yamamoto, Y, Ichihara, N, Saka, S, Toya, Y, Yasuda, G, Goshima, Y, Tabara, Y, Miki, T, Ueshima, H, Ishikawa, Y, Umemura, S: Impaired nitric oxide

production and increased blood pressure in systemic heterozygous ATP2B1 null mice. *J Hypertens*, 32:1415-1423, 2014.

〔学会発表〕(計 13 件)

1) 平和伸仁、小林雄祐、藤原亮、藤田恵美、奥山由紀、坂早苗、谷津圭介、梅村敏。ヒトゲノムワイド解析の成果を遺伝子改変動物を用いて証明・発展させる。シンポジウム II: 高血圧ゲノム研究のヒトへの展開。第 49 回高血圧疾患モデル学会学術総会 東京 2013 年 9 月

2) 平和伸仁、小林雄祐、藤原亮、藤田恵美、奥山由紀、勝又真理、坂早苗、山本有一郎、谷津圭介、戸谷義幸、安田元、梅村敏。ゲノムワイド解析による高血圧遺伝子 ATP2B1 の発見と遺伝子改変マウスを用いた機能解析。パネルディスカッション: 高血圧遺伝子研究の最先端。第 36 回日本高血圧学会総会 大阪 2013 年 10 月

3) 藤原亮、平和伸仁、奥山由紀、藤田恵美、小林雄祐、谷津圭介、戸谷義幸、梅村敏。ATP2B1 遺伝子の全身ヘテロノックアウトマウスにおける血圧上昇と NO 産生の低下。第 36 回日本高血圧学会総会 大阪 2013 年 10 月

4) 平和伸仁。本態性高血圧の成因における遺伝子変異。GWASの意義とATP2B1の働き。第37回日本高血圧学会総会 横浜 2014年10月

5) 谷津圭介、平和伸仁、奥山由紀、江原洋介、藤田恵美、藤原亮、小林雄祐、坂早苗、戸谷義幸、梅村敏。遺伝子解析からモデル動物での機能解析への戦略: ATP2B1遺伝子欠損マウス。第37回日本高血圧学会総会 横浜 2014年10月

6) 藤原亮、平和伸仁、江原洋介、奥山由紀、藤田恵美、勝又真理、小林雄祐、坂早苗、谷津圭介、戸谷義幸、梅村敏。ATP2B1遺伝子

の全身ヘテロノックアウトマウスにおける臓器障害とカルシウム代謝。第37回日本高血圧学会総会 横浜 2014年10月

7) 江原洋介、藤田恵美、平和伸仁、奥山由紀、勝又真理、藤原亮、坂早苗、小林雄祐、谷津圭介、戸谷義幸、安田元、梅村敏。遠位尿細管特異的ATP2B1欠損マウスの食塩負荷による血圧変動について。第37回日本高血圧学会総会 横浜 2014年10月

8) 谷津圭介、神出計、平和伸仁、奥山由紀、江原洋介、藤田恵美、藤原亮、小林雄祐、坂早苗、戸谷義幸、花田裕典、宮田敏行、河野雄平、梅村敏。Ca transporter (PMCA1) をコードするATP2B1のSNAP多型を用いたテーラーメード医療の可能性 GEANE研究サブスタディー。第37回日本高血圧学会総会 横浜 2014年10月

9) 藤田恵美、平和伸仁、江原洋介、奥山由紀、勝又真理、藤原亮、小林雄祐、涌井広道、坂早苗、谷津圭介、橋本達夫、戸谷義幸、梅村敏。高血圧感受性遺伝子ATP2B1遠位尿細管特異的欠損マウスの解析。第37回日本高血圧学会総会 横浜 2014年10月

10) 奥山由紀、藤原亮、平和伸仁、鍵本美奈子、江原洋介、勝又真理、藤田恵美、小林雄祐、坂早苗、谷津圭介、戸谷義幸、梅村敏。ATP2B1 の血管内皮における血圧への影響: 血管内皮特異的ノックアウトマウスを用いた検討。日本臨床分子医学会, 京都府, 2015, 4.

11) 奥山由紀、平和伸仁、鍵本美奈子、江原洋介、勝又真理、藤田恵美、藤原亮、小林雄祐、坂早苗、谷津圭介、戸谷義幸、梅村敏。高血圧感受性遺伝子 ATP2B1 の血管平滑筋における役割～血管平滑筋特異的 ATP2B1KO マウスを用いた降圧薬の効果比較～。高血圧関

連疾患モデル学会,大阪府,2015,10.

12) 江原洋介, 藤原亮, 平和伸仁, 角田剛一郎, 奥山由紀, 藤田恵美, 勝又真理, 小林雄祐, 坂早苗, 谷津圭介, 戸谷義幸, 安田元, 梅村敏: 全身ヘテロ ATP2B1 欠損マウスにおける高血圧と低 Ca 血症について. 第 51 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 大阪府豊中市新千里東町 1-4-2 (千里ライフサイエンスセンター), 2015 年, 10 月 30 日~31 日

13) 藤田恵美, 平和伸仁, 江原洋介, 奥山由紀, 谷津圭介, 梅村敏 遠位尿細管特異的 ATP2B1 欠損マウスは食塩感受性高血圧を呈する, 第 51 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 大阪, 2015 年 10 月.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 6 件)

名称: 高血圧感受性遺伝子群の同定
発明者: 三木哲郎、平和伸仁他
権利者: 愛媛大学、横浜市大他
種類: 韓国特許
番号: 第 10-1263622 号
取得年月日: 平成 25 年 5 月 6 日
国内外の別: 国外

名称: Identification of hypertension susceptibility gene group.
発明者: 三木哲郎、平和伸仁他
権利者: 愛媛大学、横浜市大他
種類: 中国特許
番号: ZL 200980114066.0 号
取得年月日: 平成 25 年 11 月 27 日
国内外の別: 国外

名称: 高血圧感受性遺伝子群の同定
発明者: 三木哲郎、平和伸仁他
権利者: 愛媛大学、横浜市大他
種類: 特許
番号: 5608944 号
取得年月日: 平成 26 年 9 月 12 日
国内外の別: 国内

名称: 高血圧感受性遺伝子群の同定
発明者: 三木哲郎、平和伸仁他
権利者: 愛媛大学、横浜市大他
種類: 韓国特許
番号: 第 10-1458730 号
取得年月日: 平成 26 年 10 月 30 日
国内外の別: 国外

名称: 高血圧感受性遺伝子群の同定
発明者: 三木哲郎、平和伸仁他
権利者: 愛媛大学、横浜市大他
種類: EU (ヨーロッパ) 特許
番号: 第 2256193 号
取得年月日: 平成 27 年 12 月 16 日
国内外の別: 国外

名称: 高血圧感受性遺伝子群の同定
発明者: 三木哲郎、平和伸仁他
権利者: 愛媛大学、横浜市大他
種類: 中国特許
番号: ZL 201310537931.0 号
取得年月日: 平成 28 年 3 月 30 日
国内外の別: 国外

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
平和 伸仁 (HIRAWA, Nobuhito)
横浜市立大学・
附属市民総合医療センター・准教授
研究者番号: 20315766

(2) 研究分担者
梅村 敏 (UMEMURA, Satoshi)
横浜市立大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 00128589

(3) 連携研究者
谷津 圭介 (YATSU, Keisuke)
横浜市立大学・附属病院・助教
研究者番号: 10457856

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)