

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 7 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860156

研究課題名(和文)(プロ)レニン受容体を介した脳・心血管・腎臓障害進展メカニズムの解明

研究課題名(英文)The roles of (pro)renin receptor in cerebral, cardiac and renal diseases

研究代表者

廣瀬 卓男(Hirose, Takuo)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20599302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では(プロ)レニン受容体を用いた脳・心血管・腎臓障害に対する新しい予防・治療戦略の基盤を構築するため、(1)動物疾患モデルを用いた実験、(2)全長型、可溶性型、膜貫通型(プロ)レニン受容体の機能解析、(3)血中・尿中濃度の測定を行った。
大脳皮質特異的(プロ)レニン受容体ノックアウトモデルは重度の脳萎縮を呈した。(プロ)レニン受容体は細胞小胞pHを制御すること、LC3B等のオートファジー関連タンパク質を制御していた。また、血漿可溶性(プロ)レニン受容体は血漿レニン活性等と独立しており、透析導入患者や腎炎患者、膵癌患者において上昇していた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the roles of (pro)renin receptor in cerebral, cardiac and renal diseases. We have generated mutant mice carrying a conditional deletion in brain cortex. The mutant mice displayed a flattened forehead corresponding with a lack of nearly their entire cortex. (pro)renin receptor regulate lysosomal pH via V-ATPase membrane assembly and relate to autophagy. We also showed that plasma concentration of soluble (pro)renin receptor is independent of plasma renin, prorenin and aldosterone concentrations and that plasma (pro)renin receptor concentration is increased in the patients of congestive heart failure, chronic renal failure and pancreatic cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：(プロ)レニン受容体 レニン・アンジオテンシン系 生理活性物質 発生 組織障害

1. 研究開始当初の背景

脳卒中、虚血性心疾患、慢性腎臓病等の脳・心血管・腎臓疾患における障害は長期入院・要介護・認知症・寝たきり・透析導入の主な原因であり、患者本人のみならず、医療経済・健康保険財政上、大きな負担を国民全体に強いている。しかしながら、脳・心血管・腎臓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。これら障害の予防は豊かで活力ある長寿社会の構築において重要であり、早急に予防策を見出し、高齢者の QOL 維持・向上を目指す必要がある。

レニン・アンジオテンシン系は血圧調節を担う主要なホルモン系であり、その過剰な活性化は様々な疾患の病因となっている。(プロ)レニン受容体は、このレニン・アンジオテンシン系の新規構成因子であり、フランスの Nguyen 博士により同定された。(プロ)レニン受容体は、(1)レニン前駆体であるプロレニン及びレニンと結合することでレニン活性を発現しアンジオテンシンⅠを産生する、(2)(プロ)レニン/(プロ)レニン受容体系による細胞内伝達系を介して組織障害に関与する、という2つの異なる作用機序を有し、脳・心血管・腎臓障害に深く関わっている。

申請者らはこれまでに、動物実験モデルを用いて(プロ)レニン受容体の mRNA 及びタンパク質発現が腎不全時の腎臓及び心不全時の心臓および腎臓で亢進していることを報告した。加えて、遺伝子多型解析により(プロ)レニン受容体遺伝子領域に存在する一塩基多型(SNP)がヒトの脳心血管障害に関与していることを報告した。また、最近、可溶性(プロ)レニン受容体が血中や尿中に存在すること、(プロ)レニン受容体が H⁺ポンプ(V-ATPase)に付随しその集合体形成に必須であること、細胞増殖に関与する Wnt/ カテニン系に関与することが明らかにされ、(プロ)レニン受容体研究は新たな局面を迎えている。このような(プロ)レニン受容体の複雑な機能を解明するには、動物実験や細胞培養系を用いた基礎的検討から、ヒト病態と血中・尿中濃度の関連解析や遺伝子多型解析といった臨床的検討を行い、それぞれの結果をフィードバックさせ、総合的な視点から研究を進展させていく必要がある。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、(プロ)レニン受容体の脳・心血管・腎臓障害の進行メカニズムにおける役割・作用機序を解明し、(プロ)レニン受容体を利用した新規診断方法や治療薬の開発のための強固なエビデンスを構築することである。(プロ)レニン受容体の脳・心血管・腎臓障害への関与とその作用機序を動物実験モデル及びヒトを対象として検証するために、動物疾患モデルを用いた実験、培養細胞を用いた全長型、可溶性型、膜貫通型(プロ)レニン受容体の機能解析、酵素結合

免疫吸着検定法(ELISA)を用いたヒト血中・尿中(プロ)レニン受容体濃度の測定を行った。

3. 研究の方法

(1) 動物実験：

脱水食負荷環境下での脳・心臓・腎臓における(プロ)レニン受容体の遺伝子発現、タンパク質発現を競合的 RT-PCR 法、免疫染色、ウェスタンブロットにより、血漿中可溶性(プロ)レニン受容体濃度を ELISA により検討した。加えて、大脳皮質特異的(プロ)レニン受容体ノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析した。

(2) 全長型、可溶性型、膜貫通型(プロ)レニン受容体の機能解析：

全長、可溶性、膜貫通型のそれぞれの機能を解析するため、(プロ)レニン受容体の全長型、可溶性型、膜貫通型、ヒトの遺伝子変異で過剰発現する exon4 が欠失した配列、Furin 切断部位に変異を入れた配列のプラスミド(pcDNA)を作製した。マウス(プロ)レニン受容体 floxed マウスから(プロ)レニン受容体 flox ES 細胞を確立し、TAT-Cre を感染させ(プロ)レニン受容体ノックアウト ES 細胞を作製した。この(プロ)レニン受容体ノックアウト ES 細胞に(プロ)レニン受容体の各配列及び定常活性化 カテニンの pcDNA を導入し、細胞の表現型や遺伝子発現・タンパク質発現を検討した。

血中(プロ)レニン受容体の分泌源の1つとして血中に存在する免疫担当細胞における(プロ)レニン受容体の発現を検討した。健常者の血液から分離した末梢血単核細胞(PBMC)を用いてリンパ球や単球といった免疫担当細胞に(プロ)レニン受容体が発現し機能していることを PCR、Flowcytometry、Western blot、免疫組織染色により検討した。

(3) ELISA を用いた血中・尿中ヒト可溶性(プロ)レニン受容体濃度測定：

健常者並びに病態におけるヒト可溶性(プロ)レニン受容体濃度を ELISA kit (IBL 社製)により測定し、各病態における可溶性(プロ)レニン受容体濃度の変化を検討した。病態として、透析導入患者や腎炎患者、膵癌患者を対象とした。

4. 研究成果

(1) 動物実験：

脱水食負荷により、腎臓の各セグメントにおける(プロ)レニン受容体のタンパク質発現が上昇していた。加えて、脱水食負荷マウスにおいて血漿中の可溶性(プロ)レニン受容体の上昇も認められ、(プロ)レニン受容体が腎臓における水分保持能力に関与している可能性が示唆された。

大脳皮質特異的(プロ)レニン受容体ノックアウトマウスは出生0日目で重度の脳萎縮を

呈していた(図 1)。 カテニン定常活性化マウスとのダブルトランスジェニックマウスでもこの脳萎縮は保持されており、Wnt/カテニン系では(プロ)レニン受容体ノックアウトの表現型を回復できなかった(図 1)。また、胎生 12 日目において(プロ)レニン受容体ノックアウトでは核近傍での肥大化したリソソームの集積、オートファジー関連タンパク質である LC3B、p62 の発現上昇が認められた。

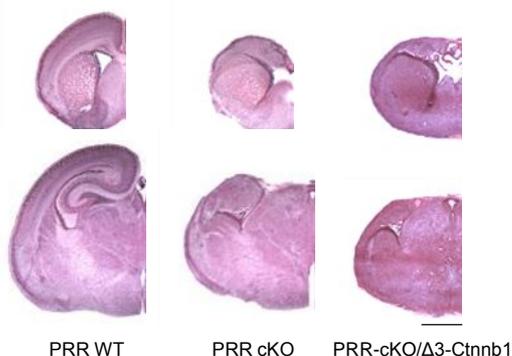


図1: 出生0日目におけるHematoxylin eosin染色。
PRR WT: (プロ)レニン受容体野生型マウス、PRR cKO: (プロ)レニン受容体ノックアウトマウス、PRR-cKO/ Δ 3-Ctnnb1: (プロ)レニン受容体ノックアウトマウス/カテニン定常活性化ダブルトランスジェニックマウス

(2) 全長型、可溶性型、膜貫通型(プロ)レニン受容体の機能解析:

(プロ)レニン受容体ノックアウト ES 細胞において、細胞小胞 pH の低下、オートファジー関連タンパク質である LC3B、p62 の発現上昇が認められた。全長型、可溶性型、膜貫通型を導入した(プロ)レニン受容体ノックアウト ES 細胞において、細胞小胞の pH は(プロ)レニン受容体野生型 ES 細胞と同程度に戻り、LC3B、p62 の発現上昇は消失した。しかしながら、ヒトの遺伝子変異で過剰発現する exon4 が欠失した配列、Furin 切断部位に変異を入れた配列、定常活性化 カテニンを導入した(プロ)レニン受容体ノックアウト ES 細胞においては、細胞小胞の pH は低下したままであり、LC3B、p62 の発現は上昇したままであった。これらの結果より、(プロ)レニン受容体が V-ATPase の構成因子として細胞小胞 pH を制御することで LC3B 等のオートファジー関連タンパク質を制御している可能性が示唆された。

健常者の PBMC において、(プロ)レニン受容体は各免疫担当細胞に発現していた(図 2)。この PBMC にレニンを負荷すると、ERK1/2 経路の活性化やサイトカイン分泌が認められた。(プロ)レニン受容体に対する siRNA により(プロ)レニン受容体の発現を抑制した PBMC においては、レニンによる ERK1/2 経路の活性化やサイトカイン分泌が抑制されており、(プロ)レニン/(プロ)レニン受容体系を介して免疫担当細胞で機能していることが明らかとなった。

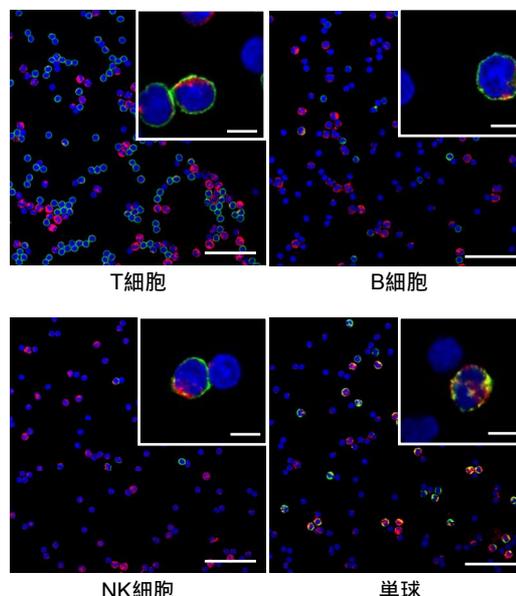


図2: 免疫担当細胞における(プロ)レニン受容体の発現。赤:(プロ)レニン受容体、緑:各免疫担当細胞特異的タンパク質(T細胞:CD3、B細胞:CD22、NK細胞:CD56、単球:CD68)

(3) ELISA を用いた血中・尿中ヒト可溶性(プロ)レニン受容体濃度測定:

可溶性(プロ)レニン受容体は血漿中に単量体で存在していた。また、可溶性(プロ)レニン受容体は血漿レニン活性等と独立していた(図 3)。透析導入患者や腎炎患者、膵癌患者において血漿可溶性(プロ)レニン受容体濃度が上昇していた。以上の結果より、血漿中(プロ)レニン受容体濃度が腎臓障害や癌のマーカーとなる可能性が示唆された。

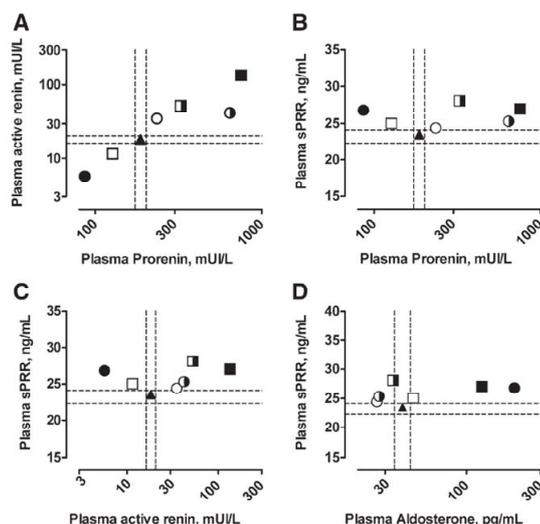


図3: 血漿(プロ)レニン受容体濃度と各レニン・アンジオテンシン系構成因子の血漿濃度の関連。

A: プロレニン-活性レニン、B: プロレニン-(プロ)レニン受容体、C: 活性レニン-(プロ)レニン受容体、D: アルドステロン-(プロ)レニン受容体

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5件)全て査読有り

Kaori Narumi ,Takuo Hirose ,Emiko Sato , Takefumi Mori ,Kiyomi Kisu ,Mayuko Ishikawa , Kazuhito Totsune ,Tomonori Ishii ,Atsuhiko Ichihara ,Genevieve Nguyen ,Hiroshi Sato , Sadayoshi Ito . Functional (pro)renin receptor is expressed in human lymphocytes and monocytes .Am J Physiol Renal Physiol . 308:F487-F499,2015. DOI: 10.1152/ajprenal.00206.2014

Yuki Shibayama , Takyuki Fujimori , Genevieve Nguyen , Takuo Hirose , Kazuhito Totsune ,Atsuhiko Ichihara ,Kento Kitada , Daisuke Nakano , Hiroyuki Kobori , Masakazu Kohno , Tsutomu Masaki , Yasuyuki Suzuki , Shinichi Yachida , Akira Nishiyama .(Pro) renin receptor is crucial for Wnt/ -catenin-dependent genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma . Sci Rep . 5:8854,2015. DOI: 10.1038/srep08854

Michihiro Satoh , Kikuya Masahiro , Miki Hosaka , Kei Asayama , Ryusuke Inoue , Hirohito Metoki , Megumi T. Utsugi , Azusa Hara , Takuo Hirose , Taku Obara , Takefumi Mori , Kazuhito Totsune , Haruhisa Hoshi , Nariyasu Mano , Yutaka Imai . Association of aldosterone-to-renin ratio with hypertension differs by sodium intake: the Ohasama study . Am J Hypertens . 28:208-215,2015. DOI: 10.1093/ajh/hpu115

Koji Ohba , Takashi Suzuki , Hiroshi Nishiyama , Kiriko Kaneko , Takuo Hirose , Kazuhito Totsune , Hironobu Sasano , Kazuhiro Takahashi . Expression of (pro)renin receptor in breast cancers and its effect on cancer cell proliferation . Biomed Res . 35:117-126,2014. DOI: 10.2220/biomedres.35.117

Genevieve Nguyen , Anne Blanchard , Emmanuel Curis , Damien Bergetor , Yann Chambon , Takuo Hirose ,Aurore Caumont-Prim , Sylvie Brailly Tabard , Stephanie Baron , Michael Frank , Kazuhito Totsune , Michel Azizi . Plasma soluble (pro)renin receptor is independent of plasma renin, prorenin and aldosterone concentrations but is affected by ethnicity . Hypertension . 63:297-302,2014. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02217

〔学会発表〕(計5件)

廣瀬卓男 , Alfredo Cabrera-Soccoro , 金子桐子 , Jeanne d'Arc Al Bacha , Oliver Feraud , Annelise Bennaceur-Griscelli , Charles E. Schwartz , 伊藤貞嘉 , Matthias Groszer , Genevieve Nguyen . 中枢における(プロ)レニン受容体の機能解析 . 第88回日本内

分泌学会学術総会 . 2015年4月24日 . ホテルニューオータニ東京(東京都千代田区) . 口演 .

Takuo Hirose , Alfredo Cabrera Soccoro , David Chitayat , Kaneko Kiriko , Jeann d'Arc Al Bacha , Oliver Feraud , Annelise Bennaceur-Griscelli , Charles E. Schwartz , Matthias Groszer , Genevieve Nguyen . The (pro)renin receptor and brain development . Gordon Research Conference Angiotensin . 2014年3月3日 . Lucca (Italy) . 口演・ポスター .

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 . 2013年11月23日 . 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市) . ポスター .

Alfred Cabrera Soccoro , Takuo Hirose , Oliver Feraud , Carmen Cifuentes-Diaz , David Chitayat , Annelise Bennaceur-Griscelli , Charles E Schwartz , Genevieve Nguyen , Matthias Groszer . Functional Characterization of a Novel Candidate Gene for X-linked Intellectual Disability . Neuroscience 2013 . 2013年11月11日 . San Diego (USA) . ポスター .

廣瀬卓男 , Genevieve Nguyen . (プロ)レニン受容体とWntシグナル . 第86回日本内分泌学会学術総会 . 2013年4月26日 . 川内国際センター(宮城県仙台市) . 招待講演 .

〔図書〕(計1件)

廣瀬卓男 , 大久保孝義 . 南江堂 . 実はすごい! ACE阻害薬~エキスパートからの50のアドバイス~ 1-1. レニン アンジオテンシン(RA)系とアンジオテンシン1変換酵素(ACE)にかんしてわかりやすく説明して下さい . 2-6 . 2015 .

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.int2.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 卓男 (HIROSE TAKUO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 20599302

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し

(4)研究協力者

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

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

高橋 和広 (TAKAHASHI KAZUHIRO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80241628

森 建文 (MORI TAKEFUMI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40375001

GENEVIEVE NGUYEN

College de France・Center for

Interdisciplinary Research in Biology・

Director