

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461257

研究課題名(和文)尿細管性機序に基づく食塩感受性・高血圧症の分子病態の解明と展開

研究課題名(英文)Elucidation and Expansion of Molecular Physiology of Salt Sensitivity and Hypertension Based on Tubular Mechanism.

研究代表者

石上 友章 (ISHIGAMI, Tomoaki)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：50264651

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)：遺伝性家族性高血圧症の遺伝子解析によって、腎尿細管におけるナトリウム再吸収機構に高血圧症の一次的な異常が存在する可能性が示唆された。研究代表者はアルドステロン感受性遠位尿細管上皮細胞(ASDN)の上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)に特異的なユビキチン化酵素であるNedd4L/Nedd4-2に着目して、本態性高血圧症・食塩感受性の成因を解明してきた。Nedd4L/Nedd4-2によるENaCの制御機構に着目した分子病態モデルの解析により、緻密班以後のASDNのナトリウムチャンネルであるENaCにより、Na再吸収を食塩感受性に亢進に至らしめる、逆説的な分子病態があることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：According to molecular genetic analyses of both familial and hereditary hypertension by R.C.Lifton and J.M.Lalouel, impairments of sodium reabsorption along tubules are primarily responsible for hypertension. Principal investigator performed molecular pathophysiological analyses of salt sensitivity and hypertension focusing on epithelial sodium channels and their characteristic ubiquitinating enzyme, Nedd4-2/L. We developed Nedd4-2 C2 KO mice and our analyses revealed aberrant ENaC gene activations with enhanced sodium reabsorption are basically pivotal for progression and promotion of salt sensitivity and hypertension.

研究分野：高血圧・食塩感受性

キーワード：食塩感受性 高血圧 上皮性ナトリウムチャンネル ユビキチン化

### 1. 研究開始当初の背景

R.C.Lifton, J.M.Lalouel らの遺伝性家族性高血圧症の遺伝子解析によって、腎尿細管におけるナトリウム再吸収機構に高血圧症の一次的な異常が存在する可能性が示唆された。従来より、研究代表者はアルドステロン感受性遠位尿細管上皮細胞(ASDN)の上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)に特異的なユビキチン化酵素である Nedd4L(ヒト・ラット)/Nedd4-2(マウス)に着目して、本態性高血圧症・食塩感受性の成因を解明してきた。Nedd4LによるENaCの制御機構に着目した分子病態モデルにおいては、遺伝性、家族性に乏しいと考えられる本態性高血圧においても、緻密班以後のASDNの主要なナトリウムチャンネルであるENaCによるNa再吸収を食塩感受性に亢進に至らしめる分子病態があり、ユビキチン化を介するENaCのproteasomeでの分解を通じて、細胞膜での発現を制御するNedd4Lが重要な役割を果たしていると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでに研究代表者が進めてきた『高血圧症の食塩感受性をもたらす尿細管性機序の分子病態』を明らかにする研究の成果に基づき、尿細管レニン・アンジオテンシン系と遠位尿細管細胞における上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)、その特異的制御因子Nedd4Lに着目した食塩感受性・高血圧症の制圧にある。ヒトゲノムの解析(Ishigami T et al. 1997, 1999, Hypertension, 2002, J Hum Genet.)から、遺伝子改変動物(Nedd4L, ARen2)を解析した高血圧発症分子病態モデルの機作を精査するとともにヒトへの応用を行い、ヒト尿細管に着目した高血圧症・食塩感受性の疾病・病態の克服を目指す。

### 3. 研究の方法

#### **Nedd4L C2 ドメイン isoform の臓器特異的ノックアウトマウスの作製と表現型の解析**

Nedd4L C2 ドメイン isoform の systemic knock-out mice による検討からは、Nedd4L C2 ドメイン isoform が、食塩摂取量に依存したナトリウム再吸収の調整に critical な役割を果たしており、高血圧症の食塩感受性をもたらす尿細管性機序の分子病態に中核的な役割を果たしていることが明らかになった。ENaC-Nedd4L系は、brain, lung, colon にも存在し、局所での水分代謝やナトリウム代謝に関与しているといわれている。特に brain では、choroid plexus における Na sensor としての役割があり、交感神経系を介する、ナトリウム代謝における中枢性の機序を担っている。臓器特異的ノックアウトマウスを作製し、表現型を解析することで、Nedd4L C2 ドメイン isoform の各臓器での役割を、さらに特定することが可能になると考えられる。

#### **ヒト近位尿細管細胞、結合尿細管細胞の不活化と、AGT in PT, Renin in CNT の制御機構の解明**

尿細管RA系 ENaC/Nedd4L系による、ナトリウム再吸収機構を制御する上で、AGT in PT および、Renin in CNT の発現・分泌機序を明らかにすることで、尿細管での angiotensin II の産生を抑制することが可能になると考えられる。すでに、正常ヒト近位尿細管上皮細胞(CLCC-2553, LONZA Japan)に対して、pLenti6\_TERT、pLenti6\_E7、pLenti6\_p16sh\_TERTの3種類のLentiウィルスベクターによる遺伝子導入によって、不活化した近位尿細管細胞(immortalized Renal Proximal Tubular Epithelial Cells:RPTEC)の樹立に成功している。平成26年度は、immortalized RPTEC を使って、細胞特異的分子である E-Cadherin, Megalin, Angiotensinogen などの発現を確認し、characterization を確立する。

### 4. 研究成果

in silico に、マウス Nedd4-2 遺伝子の分子多様性を明らかにし、Nedd4-2 C2 ドメインをコードする新規エクソンの発見に成功し、Nedd4-2 C2 ドメイン特異的な K0 マウスを作製し表現型を解析した。(Minegishi S, Ishigami T, et al. Scientific Reports, 2016)本研究では、代謝ケージを使った観察によって、正常食塩食下では K0 マウスと野生型マウスは、尿中ナトリウム排泄量・尿浸透圧・尿量・飲水量がすべて同等の変化を示すのに対して、高食塩食下において K0 マウスでは、食塩感受性に血圧上昇を来すとともに、尿中ナトリウム排泄・尿浸透圧の低下が先行する形で、尿量・飲水量が増加していく病態が明らかになった。さらに Nedd4-2 C2 K0 マウスの ASDN 細胞における ENaC の発現を検討した結果、食塩感受性かつ、線形性に ENaC の発現が増強することを明らかにしただけでなく、遺伝子発現が、amiloride 投与によって正常にまで抑制されることが判明した。

マウスレニン遺伝子の Ren1C Ren1D, Ren2 遺伝子の intron 1 に転写開始点を持った exon 1a を発見し、それぞれのレニン遺伝子に由来する第二のレニンの存在を明らかにし、(Alternative Renin, ARen) ARen1C は、in situ hybridization 法により結合尿細管(CNT)・皮質集合管(CCD)に発現していることを明らかにした。(Ishigami T, et al. Hypertension, 2014)興味深いことに、利尿性薬剤に対する腎臓レニン(ARen, CRen)遺伝子発現の応答性を解析したところ、尿細管 Na トランスポーターがナトリウム・センサーとしての働きを示唆する結果を得ることができた。

尿細管RA系 ENaC-Nedd4L/Nedd4-2系による、ナトリウム再吸収機構の制御へむけて、近位尿細管 AGT の発現・分泌機序を明らかにすることで、尿細管腔での angiotensin II の産生を制御することが可能になると考えられる。すでに、正常ヒト近位尿細管上皮細胞(CLCC-2553, LONZA Japan)に対して、

pLenti6\_TERT、pLenti6\_E7、pLenti6\_p16sh\_TERTの3種類のLentiウイルスベクターによる遺伝子導入によって不活化した近位尿細管細胞(immortalized Renal Proxymal Tubular Epithelial Cells:RPTEC)の樹立に成功している。樹立したimmortalized RPTECを使って、細胞特異的分子であるE-Cadherin, Megalin, Angiotensinogenなどの発現を確認し characterization を確立した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

2016以降

1, Chen L, Ishigami T(corresponding author), Sasaki-Nakashima R, Kino T, Doi H, Minegishi S, Umemura S. Commensal Microbe-specific Activation of B2 Cell Subsets Contributes to Atherosclerosis Development Independently of Lipid Metabolism. EBioMedicine, 2016, in press.(査読あり)

2, Yutaka Hatori, Hiroyuki Sakai, Tomoyuki Kunishima, Nobuo Hatori, Lin Chen, Tomoaki Ishigami(corresponding author), Naoki Satoh, on Behalf of the ASSAF-K Investigators. Rationale and design of ASSAF-K (A study of the safety and efficacy of anticoagulant therapy in the treatment of atrial fibrillation in Kanagawa) Journal of Arrhythmia, 2016 in press (査読あり)

3, Kiyokuni M, Konishi M, Sakamaki K, Kawashima C, Narikawa M, Doi H, Iwata K, Tomari S, Nakayama N, Komura N, Mitsunashi T, Yano H, Sugano T, Ishigami T, Endo T, Ishikawa T, Yamanaka T, Kimura K. Beneficial effect of early infusion of landiolol, a very short-acting beta-1 adrenergic receptor blocker, on reperfusion

status in acute myocardial infarction. Int J Cardiol. 2016 Oct 15;221:321-6.(査読あり)

4, Sasaki-Nakashima R, Kino T, Chen L, Doi H, Minegishi S, Abe K, Sugano T, Taguri M, Ishigami T.(corresponding author) Successful prediction of cardiovascular risk by new non-invasive vascular indexes using suprasystolic cuff oscillometric waveform analysis. J Cardiol. 2016 Aug 31.(査読あり)

5, Kamimura D, Uchino K, Ishigami T, Hall ME, Umemura S. Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor Prevents Development of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction; Inhibition of Wnt- $\beta$ -catenin Signaling as a Possible Mechanism. J Cardiovasc Pharmacol. 2016 Aug;68(2):155-61.(査読あり)

6, Minegishi S, Ishigami T(corresponding author), Kino T, Chen L, Nakashima-Sasaki R, Araki N, Yatsu K, Fujita M, Umemura S.

An isoform of Nedd4-2 is critically involved in the renal adaptation to high salt intake in mice. Sci Rep. 2016 Jun 3;6:27137. (査読あり) 2015

7, Hosoda J, Ishikawa T, Sumita S, Matsushita K, Matsumoto K, Kimura Y, Ogino Y,

Taguchi Y, Matsushita H, Nakagawa T, Sugano T, Ishigami T, Kimura K, Umemura S. Development of Atrioventricular Block and Diagnostic Value of Stored Electrograms in Patients With Sick Sinus Syndrome and Implanted Pacemaker. Circ J. 2015;79(6):1263-8.(査読あり)

8, Ichihara N, Ishigami T, Umemura S. Effect of impaired renal function on the maintenance dose of warfarin in Japanese patients. J Cardiol. 2015 Mar;65(3):178-84.(査読あり) 2014

9, Ishigami T(corresponding author), Kino T, Chen L, Minegishi S, Araki N, Umemura M, Abe K, Sasaki R, Yamana H, Umemura S. Identification of Bona Fide Alternative Renin Transcripts Expressed Along Cortical Tubules and Potential Roles in Promoting Insulin Resistance In Vivo Without Significant Plasma Renin Activity Elevation. Hypertension. 2014, Jul;64(1):125-33 (査読あり)

10, Ishigami T(corresponding author), Araki N, Minegishi S, Umemura M, Umemura S. Genetic variation in NEDD4L, salt sensitivity, and hypertension: human NEDD4L rs4149601 G allele generates evolutionary new isoform I with C2 domain. Journal of Hypertension, 2014,19, p1905 (査読あり)

〔学会発表〕(計8件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 抗動脈硬化剤および、動脈硬化の病態判定方法

発明者: 陳琳、石上友章

権利者: 公立大学法人横浜市立大学

種類:

番号: 特願 2016-204783

出願年月日: 平成28年10月19日

国内外の別: 国内

取得状況(計2件)

名称: 自己免疫疾患に關与するタンパク質の解析方法及び該疾患の検査方法

発明者: 遠藤弥重太、澤崎達也、青木一郎、石上友章

権利者: 国立大学法人愛媛大学、公立大学法人横浜市立大学

種類:

番号: 特許第 5904553 号

取得年月日：2016年3月25日  
国内外の別：国内  
名称：自己免疫疾患に関するタンパク質の  
解析方法及び該疾患の検査方法  
発明者：遠藤弥重太、澤崎達也、青木一郎、  
石上友章  
権利者：国立大学法人愛媛大学、公立大学法  
人横浜市立大学  
種類：  
番号：US 9,310,380 B2  
取得年月日：2016/4/12  
国内外の別：米国  
〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/res/ishigami\\_2016\\_06.html](http://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/res/ishigami_2016_06.html)  
<http://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/news/20161111.html>  
6．研究組織

- (1) 研究代表者 石上 友章 (ISHIGAMI Tomoaki)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号：50264651