

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26560229

研究課題名(和文) 生体内レニン活性の可視解析技術の開発と病態解析及び治療法開発への応用

研究課題名(英文) Development of a novel in vivo imaging technique to visualize renin activity and its application to explore the pathogenesis of hypertensive organ damages.

研究代表者

柏原 直樹 (KASHIHARA, NAOKI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：10233701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：レニン・アンジオテンシン系(RAS)は、内部環境恒常性維持に必須であると同時に各種疾患の病態形成に深く関与している。血管壁・腎組織に存在する“組織RAS”活性化が心血管病・腎臓病の病態に重要な役割を果たしていると思定されているが、その実態は不明である。蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理と多光子レーザー顕微鏡を駆使して、生体組織においてレニン活性を可視化し検出する、新規のin vivo imaging技術を開発した。本技術を応用して、組織RASの本態(活性化動態・部位)を検討し、組織RASの生理学的、病態形成上の役割、活性化制御機構を検討した。

研究成果の概要(英文)：The renin-angiotensin system (RAS) plays an important role in regulating blood volume and systemic vascular resistance. RAS is also deeply implicated in the pathogenesis of wide variety of cardio-vascular and renal diseases. In addition to this circulating RAS, the so-called tissue RAS can act locally as a paracrine and/or autocrine factor. The precise localization of tissue RAS and its regulatory mechanisms have not been fully elucidated. To address this issue, we have applied the technique of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and renin FRET peptide. We have successfully developed the technique to detect renin activity in the kidney of living animal. The combination of multiphoton fluorescence imaging of the living kidney with the FRET-based fluorogenic renin substrate provided a novel experimental approach for studying the localization and activity of renin in the intact kidney.

研究分野：腎臓病学

キーワード：慢性腎臓病 レニン FRET in vivoイメージング 多光子レーザー顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

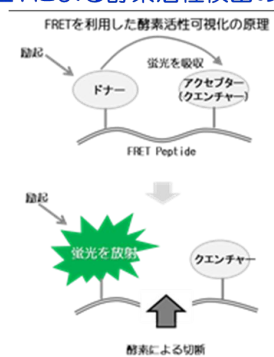
レニン・アンジオテンシン系 (RAS) は体液の恒常性維持、血圧調節、臓器微小循環調節に必須の役割を果たしている。同時に、脳卒中等の心血管病、腎臓病の病態形成に深く関与しており、RAS 阻害薬 (ACE 阻害薬等) は心血管病・腎臓病の発症・進展抑制作用を有している。RAS 活性化の律速酵素はレニンであるが、これらの病態において血漿レニン活性は必ずしも亢進していない。糖尿病ではむしろ低レニン状態であるにも関わらず、RAS 阻害薬が奏功する。その理由として、循環系 (systemic) RAS とは別個に血管壁、腎臓等の組織に存在する組織 (tissue, local) RAS の存在が想定されてきたが、組織 RAS の実態は不明であった。

レニン及び前駆体プロレニンと結合する (pro) renin 受容体 (PRR) が血管壁等に存在することが明らかとなった。プロレニン・レニンは PRR と結合し、局所でレニン活性を發揮し、同時に PRR から細胞内にシグナルが伝達される。本系路が長く不明であった組織 RAS の本態である可能性があるが、確証は得られていなかった。

蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer: FRET) は 2 つの蛍光分子が近接した場合に、一方の蛍光分子 (供与体: ドナー) から他方 (受容体: アクセプター) へ励起エネルギーが電子共鳴によって直接移動する現象である。FRET が生じるとドナーのエネルギーがアクセプターへ移動するために、ドナーの蛍光が消失 (減弱) し、逆にアクセプターから蛍光が放射される。アクセプター分子として光を吸収するが、蛍光を発しない物質 (クエンチャー) を用いることもできる (図)。

酵素活性を定量するために、FRET 技術の応用が可能である。すなわち基質となるペプチド (FRET ペプチド) の N 端にドナー分子を結合させ、C 端をアクセプター (クエンチャー) 分子で標識する。2 分子が近接状態ではドナー由来の蛍光はクエンチャーによって吸収されるため、蛍光を発しない。酵素により FRET ペプチドが切断されると、ドナーとクエンチャー間の距離が開大するため、ドナーの由来の蛍光が検出可能となり、蛍光強度を測定することで酵素活性が定量評価可能となる。

FRETによる酵素活性検出の原理



レニン活性の検出には、レニン FRET ペプチドとして、レニン基質ペプチドの両端に蛍光色素 5-FAM 及びクエンチャー分子 QXL™520 を結合した Renin FRET Substrate (5-FAM/QXL™520) を用いる。

本研究は、世界に先駆けて、この FRET 技術を in vivo imaging 法に応用し、生体における酵素活性の局在、動的变化、病態における活性変化の解明を目指すものであり、極めて先駆的である。

2. 研究の目的

FRET 技術と多光子レーザー - 顕微鏡を駆使して in vivo においてレニン酵素活性を可視化検出する in vivo imaging 技術開発とその応用を目的とした。具体的には、(1) FRET 技術を用いてレニン活性を可視化検出する in vivo imaging 技術を確立する、(2) PRR との結合を介したレニン活性化部位を特定し、組織 RAS の実態を明らかにする、(3) 腎内微小血流変化及び酸化ストレス、一酸化窒素 (NO) 産生変化を同時に評価し、組織レニン活性変化の生理的・病態形成上の意義を解明する、(4) 各種薬剤の組織レニン活性に与える影響を明らかにする。

レニン活性を組織において可視化検出した報告はない。長く不明であった組織 RAS の本態が明らかになる。レニン活性の局在を同定し、組織 RAS の生理的・病態形成における役割を包括的に評価することが可能となる。各種の治療薬の評価系としても有用性が高い。

3. 研究の方法

(1) 生体内レニン活性可視化 in vivo imaging 技術の確立: 単離系球体標品を用いた FRET 技術によるレニン活性検出系の構築

ラット及びマウスレニン FRET ペプチドとして、レニン基質ペプチドの両端に蛍光色素 5-FAM 及びクエンチャー分子 QXL™520 を結合したペプチド Renin FRET Substrate (5-FAM/QXL™520: AnaSpec 社) を用いる。本レニンペプチドは既に in vitro でのレニン活性測定系の中で利用されているものである。5-FAM は励起光 490nm、蛍光波長 520 nm で蛍光を発生し緑色蛍光として検出される。FRET ペプチド上では近傍に存在するクエンチャー分子に発生した蛍光が吸収されるために発光しない。レニン基質としての FRET ペプチドがレニンによって切断されると、5-FAM 由来の緑色蛍光を発生する。蛍光強度を測定することでレニン酵素活性を定量することが可能である。

レニンは傍系球体装置で産生される。傍系球体が付着した状態でラット系球体を単離し、培養する。培養液に FRET ペプチドを追加、1 agonist (isoproterenol) によりレニン産生・活性化を刺激し、蛍光強度を定量し、同時に培養液中のレニン活性を定量し、両者の相関を解析する。これにより本系の

validation が可能となる。

(2)生体ラットにおけるレニン活性の可視化を可能にする in vivo imaging 技術の確立

経静脈的にレニン FRET ペプチドを投与し、多光子レーザー顕微鏡でレニン活性を検出しうる事が予備実験において明らかとなった(前頁)。レニン阻害薬 (Aliskiren) 投与によりこの蛍光が強く抑制されることから、観察蛍光がレニン活性を示していることが支持される。食餌塩分摂取量(低塩でレニン活性化)を変化させ、血漿レニン活性を同時に測定し、蛍光強度との相関を解析し、レニン活性の定量的評価を可能にする条件を確定する。

(3)組織レニン活性化部位の特定

組織 RAS の存在が想定されているが、その実体の詳細は不明である。循環中のプロレニン、レニンは、血管壁・腎等に存在する (pro) renin 受容体(PRR)に結合し、レニン活性を發揮すると同時に PRR は細胞内にシグナルを伝達(MAP キナーゼ活性化等)することが判明している。(2)で得たレニン活性部位と免疫組織染色で解析した PRR との局在の一致を検討する。

4. 研究成果

(1)生体内レニン活性可視化 in vivo imaging 技術の確立

レニン基質ペプチドの両端に蛍光色素 5-FM 及びクエンチャー分子 QXL™520 を結合したレニン FRET ペプチド (5-FAM/QXL™520) と多光子レーザー顕微鏡を用いて、生体ラットにおいてレニン活性を検出し、その活性化動態を評価しうる新規 in vivo imaging 技術を開発しえた(図 1)

腎系球体及び腎内小血管壁にレニン活性を認めた。レニン阻害薬 (アリスキレン) 投与により蛍光が減弱し、低食塩食 (レニン活性化刺激) により蛍光が増強し、蛍光がレニン活性を反映すること示された(図 1) 生体腎臓においてレニン活性を可視化することに成功した。レニン FRET ペプチドを投与し、腎内微小血流変化を観察しながら、レニン活性化の動態を評価することが可能となった。レニンの主要な産生部位(傍系球体装置)以外に、尿細管、系球体構成細胞の一部にもレニン活性化部位を検出した。

また血漿レニン活性 (PPR) と蛍光強度との間にも相関を認めた。

(2)病態腎におけるレニン活性変化

57BL/6 マウス、2 型糖尿病モデルである KKAY マウスを用いた。レニン活性は交感神経系によっても調節される。2 種の Ca 拮抗薬の効果を比較検討した。長時間作用型 Ca 拮抗薬である Azelnidipine は中枢的に交感神経系活性化抑制作用を有し、腎保護においても有用であることを私共は既に報告している

(Nephrol Dial Transplant. 2009、Hypertens Res. 2012)。糖尿病モデルである KKAY マウスを、Azelnidipine (Azelnidipine) 投与群、Nifedipine (Nife: 1mg/kg/day, 4 週間) 投与群、および非投与群に分け、比較検討した。

BL/6 群に比し、KKAY 群、KKAY + 薬剤投与群では血糖の有意な増加を認めたと、群間に差はなかった。血圧も、KKAY 群、KKAY + 薬剤投与群では有意な上昇を認めたと、群間に差はなかった。腎組織は PAS 染色し、糸球体形態変化を比較した。メサンギウム陽性面積は、BL/6 群に比し、KKAY 群で増大がみられたが、KKAY+Azelnidipine 群では有意に増大が抑制された。尿中アルブミン排泄量、及び血漿レニン活性は BL/6 群に比較し、KKAY 群で増加がみられた。これらは KKAY+Azelnidipine 群で有意に抑制されたが、KKAY+Nife 群では改善が軽度にとどまった(図 2)。Renin FRET ペプチドを用いた in vivo imaging 法による腎内レニン活性解析でも、KKAY 群と KKAY+Nife 群での活性亢進と KKAY+Azelnidipine 群でのレニン活性抑制が認められた(図 3)。Azelnidipine は、腎内レニン活性を抑制し腎保護作用を發揮した。

図 1 FRET法による腎組織におけるレニン活性の検出

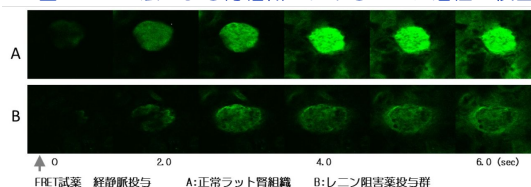


図 2 糖尿病モデル動物におけるレニン活性変化

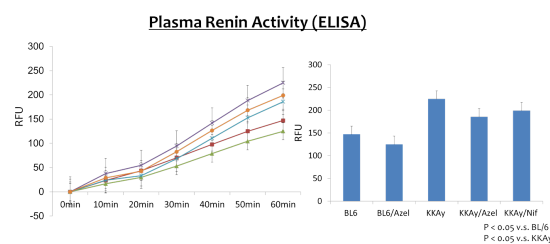
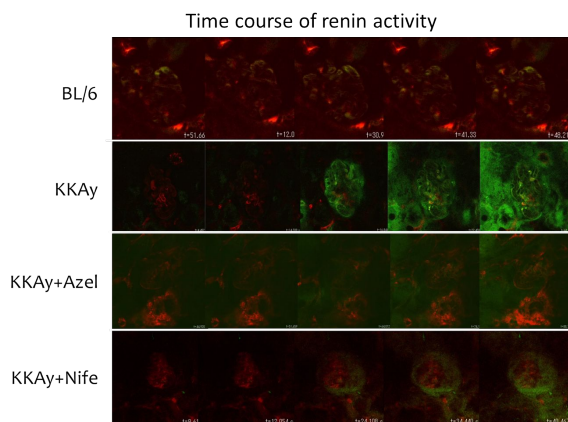


図 3 FRET法による糖尿病腎組織におけるレニン活性変化



これまでレニン活性を組織において可視化検出し得た報告はない。本技術を活用する

ことで、長く不明であった組織 RAS の本態の詳細が解明可能であると期待できる。レニン活性の局在を同定し、さらに微小血流変化、酸化ストレス生成状態を評価することで、組織 RAS の生理的・病態形成における役割を包括的に評価することも可能となる。各種の治療薬の評価系としても有用性が高い。

これまでも酵素蛋白の発現を蛋白、遺伝子レベルで検討することは可能であったが、“酵素活性”自体を直接、しかも *in vivo* で可視化検出する技術は開発されていなかった。本技術は医学・生物学研究に広く応用可能なものであり、生理学的、疾患病態学上の多くの新知見の獲得が期待できる。

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)

Hiroyuki Kadoya, Minoru Satoh, Hajime Nagasu, Tamaki Sasaki, Naoki Kashihara. Deficiency of endothelial nitric oxide signaling pathway exacerbates peritoneal fibrosis in mice. Clin Exp Nephrol. 2014 Sep 13. [Epub ahead of print] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=25216785> 査読あり

[学会発表](計5件)

板野 精之、佐藤 稔、角谷 裕之、庵谷 千恵子、桑原 篤憲、藤本 壮八、駒井 則夫、佐々木環、柏原 直樹. Development of a Novel In Vivo-Imaging Technique to Detect Renin-Activity in an Attempt to Elucidate Reno-Protective Effects of Calcium-Channel Blocker. 第37回日本高血圧学会総会 2014年10月17日 パシフィコ横浜(横浜市)

Minoru Satoh, Kengo Kidokoro, Naoki Kashihara. Development of a Novel Technique to Visualize in Vivo Renin Activity and Assess its Use in the Study of the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. HBPR 2014, 2014 Sep 9, Hilton San Francisco Union Square (San Francisco, USA)

板野 精之、佐藤 稔、城所 研吾、駒井 則夫、佐々木 環、柏原 直樹. 糖尿病性腎症における Azelnidipine の組織/血漿レニン活性に及ぼす影響の検討. 第57回日本腎臓学会学術総会 2014年7月4日 パシフィコ横浜(横浜市)

佐藤稔、柏原直樹. 二光子レーザー顕微鏡による腎微小循環、濾過状態の可視化. 第57回日本腎臓学会学術総会 2014年7月6日 パシフィコ横浜(横浜市)

Seiji Itano, Kengo Kidokoro, Minoru Satoh, Norio Komai, Tamaki Sasaki, Naoki Kashihara. The effect of Azelnidipine on tissue/plasma renin activity in mice with diabetic nephropathy. 51th ERA-EDTA Congress, 2014 June 1, Amsterdam RAI (Amsterdam, Netherlands)

[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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ:
<http://www.kawasaki-jinzo.net/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
柏原 直樹 (KASHIHARA NAOKI)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10233701

(2) 研究分担者
佐藤 稔 (SATO MINORU)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 70449891