

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860546

研究課題名(和文)心不全におけるRac1を介した新たなMR活性化機構の解明

研究課題名(英文)Role of Rac1-mediated activation of mineralocorticoid receptor in heart failure

研究代表者

鮎澤 信宏 (Ayuzawa, Nobuhiro)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号：50459517

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)：ミネラルコルチコイド受容体(MR)の活性化は心不全形成に深く関与することが知られ、MR拮抗薬は有用な心不全治療薬の一つとなった。しかし、心不全病態におけるMR活性化機構は未だ不明な点が多い。最近、低分子G蛋白Rac1が新規MR活性化因子として腎障害の形成に関わることが示された。本研究では、心臓でもRac1がMR活性化に関わることをマウス圧負荷性心不全モデルを用いて示し、そしてこのRac1-MR経路の活性化が酸化ストレス産生の亢進を介して心不全病態の形成に関与することを解明した。

研究成果の概要(英文)：Activation of mineralocorticoid receptor (MR) is closely involved in the development of heart failure, and MR blockade is now an important strategy in the treatment of heart failure. However, the mechanism of MR activation in heart failure is still unclear. Recently, a small GTPase Rac1 was identified as a novel factor that is involved in MR activation in kidney diseases. In the present study, we demonstrated that Rac1 mediates MR activation in the heart using a mice model of pressure overload-induced heart failure, and that the activation of Rac1-MR pathway leads to cardiac dysfunction through induction of oxidative stress.

研究分野：腎臓内科学、高血圧学

キーワード：高血圧 心不全 低分子量G蛋白質 鉱質コルチコイド受容体

1. 研究開始当初の背景

心不全による死亡数は現在なお増加の一途をたどり大きな医療問題となっている。昨今、大規模臨床試験や基礎研究によりミネラルコルチコイド受容体 (MR) の活性化が心不全の病態において重要な役割を果たすことが示されたが、その活性化機構については未だ不明な点が多い。

最近我々は腎臓において低分子 G 蛋白 Rac1 が MR 活性化を引き起こすことを発見し、そしてこの Rac1-MR 経路の活性化が腎系球体足細胞障害・蛋白尿・腎障害の形成に関わることを報告した。さらに本研究の開始前には、培養心筋細胞において Rac1 が MR 活性化を起こし得ることも報告し、心不全においても Rac1-MR 経路が関与する可能性を示した。

2. 研究の目的

本研究では、マウスの心不全モデルを用いて、生体の心臓においても Rac1 が新たな MR 活性化機構として機能し、Rac1-MR 経路の活性化が心不全形成に関わることを示す。さらに Rac1-MR 経路が心不全を起こす機序の解明に取り組む。

3. 研究の方法

(1) マウスを用いて弓部大動脈縮窄術による圧負荷性心不全モデルを作成し、心臓における Rac1 および MR の活性化につき評価する。

(2) マウス圧負荷性心不全モデルにおいて Rac1 および MR に対する薬理的・遺伝学的介入を行い、Rac1 および MR 活性の変化、および心不全表現型に対する効果の評価を行う。また、Rac1-MR 経路の下流の障害形成機序を探索する。

(3) 心臓に恒常活性型 Rac1 を過剰発現する遺伝子改変マウスを作成し、心臓における Rac1 活性の評価、心不全発症の確認、MR 拮抗薬による介入効果の検討、(2)の結果との照合などを行う。

(4) (2)や(3)で得られた結果をもとに、培養心筋細胞を用いて Rac1-MR 経路の活性化刺激の探索などを行う。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスに弓部大動脈縮窄術を行い圧負荷性心不全モデルを作成した。同モデルでは病的な心肥大とともに左室収縮機能の低下など心不全が進行することが知られ、我々の実験でも確認された。GST pull down assay による活性型 Rac1 蛋白量の評価を行ったところ、同モデルでは心臓において Rac1 活性化が起きていることが示された。また、核内受容体である MR の活性化の指標として核内 MR 蛋白量や、心筋における MR 標的遺伝子 (Serpina3n 等) の評価を行ったところ、これらも増加していることが明らかとなった。以上から圧負荷心では Rac1 および MR の活性化が起こることが示された。

(2) 次に、圧負荷性心不全モデルマウスにおいて Rac1 阻害薬 (NSC23766) および MR 拮抗薬 (Eplerenone) を投与して解析を行っ

た。Rac1 阻害薬の投与により圧負荷心における Rac1 活性化は阻害され、さらに MR 核内集積や MR 標的遺伝子発現の増加といった MR 活性化所見も MR 拮抗薬投与時と同様に抑制され、本モデルにおいて Rac1 が MR 活性化に寄与することが示された。そして Rac1 阻害薬や MR 拮抗薬による Rac1-MR 経路の遮断の元では、本モデルにおける病的な心肥大や左室収縮機能低下が有意に抑制されており、Rac1-MR 経路が圧負荷性心不全の病態形成に関与することが示された。

さらに心筋細胞特異的 Rac1 遺伝子ヘテロ欠損マウスを作成し、心筋細胞特異的に Rac1-MR 経路に介入を行った。本欠損マウスでは野生型同胞に比べて心筋細胞における Rac1 発現が半減しており、圧負荷性心不全モデルを適用した際の MR 核内集積や MR 標的遺伝子発現の増加が有意に抑制された。そして、本欠損マウスでは病的な心肥大や左室収縮機能低下が有意に抑制されており、心筋細胞における Rac1-MR 経路が圧負荷性心不全の病態形成に関与することが明らかとなった。

なお、心不全の形成には酸化ストレスの増加が寄与することが知られるが、複数の研究において MR が酸化ストレス亢進に寄与する可能性が報告されている。そこで、我々は Rac1-MR 経路の活性化から心不全にいたる機序に酸化ストレス亢進が関与する可能性を考え検討を行った。圧負荷性心不全モデルにおいては NADPH oxidase 4 (Nox4) 遺伝子の発現亢進による活性酸素種の産生増加が病態形成に関与することが昨今報告されたが、我々の実験系でも圧負荷心では Nox4 発現亢進と活性酸素種の増加が見られた。そして、上述の Rac1 阻害薬、MR 拮抗薬、心筋特異的 Rac1 遺伝子ヘテロ欠損いずれの介入によっても、圧負荷による Nox4 発現亢進と活性酸素種の増加は有意に抑制されることが明らかとなった。以上から心筋における Rac1-MR 経路の活性化が Nox4 遺伝子発現制御による酸化ストレス亢進の亢進を介して心不全形成に関与することが示された。

(3) さらに Rac1-MR 経路の心不全における役割を詳細に解明するため、心筋特異的に恒常活性型 Rac1 を過剰発現する遺伝子改変マウスを設計した。すなわち心筋特異的に発現する α MHC 遺伝子プロモーター制御下に恒常活性型変異 Rac1 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの系統を作成した。しかし、作出したすべての系統において恒常活性型 Rac1 の発現が蛋白レベルではほとんど検出されず、本系統を用いた実験は断念した。

(4) また初代培養心筋細胞を用いた実験系において、マウスの実験で見出した Rac1-MR-Nox4 経路につき詳細の解明に取り組んだ。まず幼若ラットの心筋細胞の初代培養系を確立し、Rac1、MR および Nox4 の発現が保たれていることを確認した。圧負荷性心不全においては機械的進展刺激の他、複

数の生化学的刺激も加わることが報告されている。そこで、機械的進展刺激や生化学的刺激を培養心筋に与えて Nox4 遺伝子の発現変化を解析したところ、TGF β 等の投与時に Nox4 遺伝子の発現が増加することが明らかとなった。TGF β シグナルは圧負荷心で亢進することが知られており、昨今では心筋細胞特異的 TGF β 受容体欠損マウスにおいて圧負荷性心不全が改善することが報告された。他方、TGF β 刺激は Rac1 活性化を介したシグナル伝達経路を有することが報告されている。そこで培養心筋に TGF β 投与を行う実験系において、選択的 Rac1 阻害薬による介入を行ったところ、Nox4 遺伝子発現の増加が抑制され、本系における Rac1 の関与が示された。今後、MR 活性の解析や MR 遺伝子ノックダウン等を用いて、本系における MR の関与についても検討する。

(5) これまでに得られた Rac1 や MR に関する解析手法を生かし、他臓器における Rac1 および他の因子による MR 活性化機構と、その病的意義の解明にも取り組んでいる。まず腎尿細管における Rac1-MR 経路の解明のため、遠位尿細管特異的 Rac1 欠損マウスを作成し、解析が進行中である。また、新規の MR 活性化機構及びその生理・病理学的意義の解明のため、最近注目を集めている腎尿細管間在細胞における MR 活性化機構についての研究も開始した。本細胞における MR 活性化は特異的リン酸化制御を介して行われるもので、同細胞に存在する NaCl 再吸収調節因子である Pendrin の制御と密接に関連し、体液恒常性維持や食塩感受性に関与することがこれまでに示された。今後さらに詳細な解析を行う予定である。

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6件)

Marumo T, Yagi S, Kawarazaki W, Nishimoto M, Ayuzawa N, Watanabe A, Ueda K, Hirahashi J, Hishikawa K, Sakurai H, Shiota K, Fujita T. Diabetes Induces Aberrant DNA Methylation in the Proximal Tubules of the Kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(10):2388-97. 査読あり

Ayuzawa N, Fujita T. Activation of mineralocorticoid receptor in salt-sensitive hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2015;17(6):552. 査読あり

Ayuzawa N, Nagase M, Ueda K, Nishimoto M, Kawarazaki W, Marumo T, Aiba A, Sakurai T, Shindo T, Fujita T. Rac1-Mediated Activation of Mineralocorticoid Receptor in Pressure Overload-Induced Cardiac Injury. *Hypertension*. 2016;67(1):99-106. 査読あり

Ueda K, Nishimoto M, Hirohama D,

Ayuzawa N, Kawarazaki W, Watanabe A, Shimosawa T, Loffing J, Zhang MZ, Marumo T, Fujita T. Renal Dysfunction Induced by Kidney-Specific Gene Deletion of Hsd11b2 as a Primary Cause of Salt-Dependent Hypertension.

Hypertension. 2017;70(1):111-118. 査読あり

Hirohama D, Ayuzawa N, Ueda K, Nishimoto M, Kawarazaki W, Watanabe A, Shimosawa T, Marumo T, Shibata S, Fujita T. Aldosterone Is Essential for Angiotensin II-Induced Upregulation of Pendrin. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(1):57-68. 査読あり

Watanabe A, Marumo T, Kawarazaki W, Nishimoto M, Ayuzawa N, Ueda K, Hirohama D, Tanaka T, Yagi S, Ota S, Nagae G, Aburatani H, Kumagai H, Fujita T. Aberrant DNA methylation of pregnane X receptor underlies metabolic gene alterations in the diabetic kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*.

2018;314(4):F551-F560. 査読あり

[学会発表](計8件)

Ayuzawa N. Activation of Rac1-MR pathway in heart failure (oral). The 8th International Aldosterone Forum in Japan. May 30, 2015. Tokyo conference center shinagawa, Tokyo.

鮎澤信宏、上田浩平、広浜大五郎、西本光宏、河原崎和歌子、渡邊篤史、丸茂丈史、藤田敏郎. 遠位ネフロン特異的 Rac1 欠損マウスを用いた Rac1-ミネラルコルチコイド受容体(MR)経路の解析(口演). 第58回日本腎臓学会学術総会. 2015年6月6日. 名古屋国際会議場 愛知.

鮎澤信宏、長瀬美樹、上田浩平、西本光宏、河原崎和歌子、丸茂丈史、桜井敬之、新藤隆行、藤田敏郎. 圧負荷性心不全における Rac1-MR 経路の解析(口演). Vascular Biology Innovation に関する研究助成 第10回研究発表会(VBIC) 2015年8月23日 ホテル椿山荘東京 東京.

鮎澤信宏、上田浩平、広浜大五郎、西本光宏、河原崎和歌子、渡邊篤史、丸茂丈史、藤田敏郎. 間在細胞 EGFP 標識マウスを用いた間在細胞分取・解析法の確立(ポスター). 第59回日本腎臓学会学術総会. 2016年6月18日 パシフィコ横浜 神奈川.

Ayuzawa N, Hirohama D, Ueda K, Nishimoto M, Kawarazaki W, Watanabe A, Marumo T, Fujita T. The role of mineralocorticoid receptor in angiotensin II-induced Pendrin expression at renal β -intercalated cells (oral). RAAS 2016 (ISH 2106 satellite symposium). September 23-24, 2016. Congress Square Nihonbashi, Tokyo.

鮎澤 信宏、上田 浩平、広浜 大五郎、西

本 光宏、河原崎 和歌子、渡邊 篤史、丸茂 丈史、藤田 敏郎. 腎間在細胞ミネラルコルチコイド受容体欠損マウスを用いた Pendrin 制御機構の解析(口演). 第 60 回 日本腎臓学会学術総会. 2017年 5月26日 仙台国際センター 宮城.

鮎澤信宏、西本光宏、広浜大五郎、上田浩平、河原崎和歌子、渡邊篤史、下澤達雄、丸茂丈史、藤田敏郎. RAAS 活性化における間在細胞 MR 依存性および非依存性の Pendrin 制御機構(口演). 第 12 回 Vascular Biology Innovation に関する研究助成 第 12 回研究発表会 (VBIC). 2017年 8月20日 ホテル椿山荘東京 東京.

Ayuzawa N, Nishimoto M, Hirohama D, Ueda K, Kawarazaki W, Shimosawa T, Marumo T, Fujita T. Mineralocorticoid receptor in renal intercalated cells mediates pendrin regulation by renin-angiotensin-aldosterone system to maintain fluid homeostasis. (oral/poster). Gordon Research Seminar/Conference, Angiotensin, February 17-23, 2018, Four Points Sheraton/Holiday Inn Express Ventura, CA, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.c-epi.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鮎澤信宏 (AYUZAWA, Nobuhiro)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号：50459517