

令和元年5月23日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05316

研究課題名(和文)慢性腎臓病で増加する可溶性(プロ)レニン受容体の病態意義の解明と分子標的療法開発

研究課題名(英文)Roles of soluble (pro)renin receptor in chronic kidney disease

研究代表者

市原 淳弘 (Ichihara, Atsuhiko)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：60203105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：可溶性(P)RR過剰発現マウスをプロレニン過剰発現マウスと交配させ、可溶性(P)RRのリガンドであるプロレニンを外因性に増加させた可溶性(P)RR過剰発現マウス[Prorenin/s(P)RR-dTG]を作成し、血圧とは独立して腎障害を発症し進展することを観察した。可溶性(プロ)レニン受容体は、(プロ)レニン受容体のN末端フラグメントであり、組織液や血液中に放出されることが知られているが、血液中あるいは組織のプロレニンとの結合によって、おそらくパラクラインとして腎障害を惹起する可能性が示唆された。今後は、メカニズムの詳細の解明と腎障害の発症と進展を抑制する分子標的療法の開発を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病患者に合併する非感染性疾患(Non-Communicable Disease; NCDs)は、個人及び社会の大きな問題であるため、発症機序の解明と治療法開発は重要である。本研究は、慢性腎臓病で増加する(プロ)レニン受容体[(P)RR]の可溶性部分に着目し、NCDsにおける病態生理学的意義を解明することを目的として実行され、可溶性(P)RRはプロレニンの協力を得て腎障害を発症しNCDs発症に関与することが実証された。本成果により慢性腎臓病の発症と進展に寄与する機構の一部が解明され、可溶性(P)RRを標的とした治療が慢性腎臓病に合併するNCDsへの対策として有効であることが証明された。

研究成果の概要(英文)：Double transgenic mice overexpressing soluble (pro)renin receptor and prorenin have been developed mating mice overexpressing soluble (pro)renin receptor and prorenin-overexpressing mice. In the mice, nephropathy is developed and progressed independently their blood pressure. Since soluble (pro)renin receptor is the N-terminal fragment of (pro)renin receptor and releases into the tissue and blood, where the soluble (pro)renin receptor binds prorenin to contribute with the development of nephropathy as a paracrine system. In the near future, new therapy targeting soluble (pro)renin receptor will be developed to inhibit the pathogenesis of chronic kidney diseases.

研究分野：高血圧・内分泌

キーワード：循環器・高血圧 トランスレーショナルリサーチ 内科 生体分子 老化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病患者に脳心血管疾患が高頻度に合併することは周知の事実であるが、腎機能低下の進行に伴って、膵臓癌をはじめとする悪性腫瘍の合併が増加したり、骨格筋萎縮が進行しサルコペニアを合併したりすることが報告されている。その原因に、尿毒物質の蓄積や抗老化遺伝子の発現低下等の関与が検討されているが、それら慢性腎臓病に合併する非感染性疾患(Non-Communicable Disease; NCDs)の発症を説明できる明確な機序は解明されていない。

近年ヒト腎臓から分離同定された(プロ)レニン受容体[(P)RR]は、プロレニンと結合して組織レニン-アンジオテンシン系(RAS)を調節する重要な因子であり、慢性腎臓病における脳心血管疾患の発症と進展に重要な役割を担うことが動物研究で解明された(Ichihara, *J Clin Invest* 2004)。細胞内で産生された(P)RRの一部(プロレニン結合部位を含む細胞外ドメイン)は細胞外に分泌されるため、可溶性(P)RRと呼ばれヒト血液中での測定が可能になった(Maruyama, Ichihara, *Front Biosci*, 2012)。慢性腎臓病患者(Hamada, Ichihara, *Clin Exp Nephrol*, 2013)や本態性高血圧患者(Morimoto, Ichihara, *Hypertens Res*, 2014)において、血中可溶性(P)RR濃度はeGFRと有意な負の相関関係を示した。さらに、尿中可溶性(P)RR排泄はeGFRと相関しなかったことから、腎機能低下と共に増加する血中可溶性(P)RRの増加は尿への排泄量低下ではなく、可溶性(P)RR産生あるいは(P)RRの増加に起因すると考えられた。一方、膵臓癌の発症や悪性度に組織(P)RR発現が関与し、血中可溶性(P)RR濃度と正相関することが報告され(Shibayama, Ichihara, *Sci Rep*, 2015)、マウス(P)RRを過剰発現させたマウス(mPRR-Tg)ではヒトのサルコペニアに類似した速筋優位な骨格筋萎縮が発症することが明らかになった。したがって、腎機能低下と共に増加する(P)RRが、慢性腎臓病患者に合併するNCDsの発症に関与する可能性が考えられる。その機序として、以下に示す現在までに明らかにされている(P)RRの機能の関与が想定される。

(1) 組織 RAS 活性化：(P)RRの細胞外ドメインに結合したプロレニンが、その立体構造を変化させることにより酵素活性中心が露出しアンジオテンシノーゲンからアンジオテンシン(Ang)Iを切り出す酵素活性を獲得する(Ichihara, *J Clin Invest* 2004)。

(2) オートファジー維持：(P)RRの細胞内ドメインは液胞型プロトン ATPase (V-ATPase)の産生と機能に必須な因子であり、V-ATPaseはオートファゴソーム内のpHを低下させることにより分解酵素活性を上昇させオートファジーの消化過程を維持する(Kinouchi, Ichihara, *Circ Res*, 2010)。

(3) Wnt シグナル促進：(P)RRはWnt受容体とV-ATPaseとのアダプタ蛋白であり、Wntの受容体への結合を細胞内にシグナルとして伝達するために必要不可欠な因子である(Cruciat, *Science*, 2010)。

(4) 好気性糖代謝促進による活性酸素種産生増加：網膜色素上皮細胞を用いた実験において、(P)RRの細胞外ドメインはミトコンドリア膜に存在するピルビン酸脱水素酵素B(PDHB)と結合し、その酵素を安定化させることによって糖代謝の好気性経路を促進し、TCAサイクルが回転する結果、活性酸素種(ROS)の産生を増加させる(Kanda, *J Biol Chem*, 2015)。

以上より、(P)RRの細胞内ドメインは、V-ATPaseやWntシグナルを介して細胞生命維持や成長・発達に関与すると考えられ、一方、細胞外ドメインは、組織RAS活性化や好気性糖代謝が介在するROS産生に関与すると考えられる。したがって、細胞内ドメインを含む(P)RR全長を標的とした治療は、負の結果をもたらす可能性があり、(P)RRの細胞外ドメ

インのみあるいは細胞外ドメインを含む可溶性(P)RR を標的とした治療は、安全性に優れた治療法となる可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究では、(P)RR の細胞外ドメインを含む可溶性(P)RR の病態生理学的意義を解明し、可溶性(P)RR を分子標的とした治療法の有効性と安全性を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 可溶性(P)RR 過剰発現マウスにおいて、受容体リガンドであるプロレニンを生体内に増加させる。具体的には、プロレニン濃度が生理条件に比べ数十倍に増加する糖尿病を誘導する。また、プロレニン濃度が数百倍に増加する妊娠で検討する。

(2) 可溶性(P)RR 過剰発現マウスを作成し、外因性プロレニンを増加させる。具体的には、プロレニン過剰発現マウスと交配させる。

(3) (1)(2)モデルマウスに、可溶性(P)RR mRNA を標的とした shRNA(あるいは siRNA)を発現するアデノウイルスを感染させる。また、(P)RR 細胞外ドメインへのプロレニン結合を阻害するハンドドメインペプチド(HRP)を慢性持続投与する。以上を用いて、慢性腎臓病合併 NCDs (心血管疾患、糖尿病、悪性腫瘍、サルコペニア、骨粗鬆症)のアウトカム(血圧・心腎機能・臓器 AngII・耐糖能・糖代謝・悪性腫瘍合併・筋と骨の組織・運動能)を評価する。

## 4. 研究成果

可溶性(プロ)レニン受容体のヘテロマウス自体には外見上は野生型と変化が無く、各種臓器における組織や生理機能およびテレメトリー血圧にも特段の異常が無いことを確認した。そのため、可溶性(プロ)レニン受容体のホモマウスを作成し、可溶性(プロ)レニン受容体のホモマウスとヘテロマウスを識別するジェノタイピング法を開発した。しかし、可溶性(プロ)レニン受容体ホモマウスも、外見上は野生型と変化が無く、各種臓器における組織や生理機能やテレメトリー血圧にも特段の異常が無いことを確認した。また、可溶性(プロ)レニン受容体のホモマウスにストレプトゾトシン負荷を行い、糖尿病モデルの心臓、腎臓、血管など各種臓器における検討をしたが、血糖上昇による腎臓障害の発症に耐性を示した。そこで、プロレニンが可溶性(プロ)レニン受容体のリガンドであり、糖尿病腎症や妊娠高血圧症候群で増加することが知られているため、可溶性(プロ)レニン受容体のホモマウスとプロレニン過剰発現マウスとの交配によるダブルトランスジェニックマウスを作成することを計画した。可溶性(P)RR過剰発現マウスをプロレニン過剰発現マウスと交配させた可溶性(P)RRXプロレニン過剰発現マウス[Prorenin/s(P)RR-dTG]においては、テレメトリー法による血圧測定において、野生型マウスとの比較で血圧に有意な差は無いものの、経時的に尿蛋白が発現し増悪することを確認した。現在、腎組織における変化の状態と腎障害が発症し進展する細胞内メカニズムの機序を解析中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

(1) Prediction of response to medical therapy by serum soluble (pro)renin receptor levels in Graves' disease. Mizuguchi Y, Morimoto S, Kimura S, Takano N, Yamashita K, Seki Y, Bokuda K, Yatabe M, Yatabe J, Watanabe D, Ando T, **Ichihara A**. PLoS One. 2018 Apr 5;13(4):e0195464.

(2) Greater reductions in plasma aldosterone with aliskiren in hypertensive patients with higher soluble (Pro)renin receptor level. Bokuda K, Morimoto S, Seki Y, Yatabe M,

Watanabe D, Yatabe J, Ando T, Shimizu S, Itoh H, **Ichihara A**. Hypertens Res. 2018 Jun;41(6):435-443.

(3) Elevated (Pro)**renin** Receptor Expression Contributes to Maintaining Aerobic Metabolism in Growth Hormone Deficiency. Seki Y, Yatabe M, Suda C, Morimoto S, **Ichihara A**. J Endocr Soc. 2018 Feb 9;2(3):252-265.

(4) Buffering roles of (pro)**renin** receptor in starvation-induced autophagy of skeletal muscles. Mizuguchi Y, Yatabe M, Morishima N, Morimoto S, **Ichihara A**. Physiol Rep. 2018 Mar;6(5). doi: 10.14814/phy2.13587.

(5) Collecting duct **prorenin** receptor knockout reduces renal function, increases sodium excretion, and mitigates renal responses in ANG II-induced hypertensive mice. Prieto MC, Reverte V, Mamenko M, Kuczeriszka M, Veiras LC, Rosales CB, McLellan M, Gentile O, Jensen VB, **Ichihara A**, McDonough AA, Pochynyuk OM, Gonzalez AA. Am J Physiol Renal Physiol. 2017 Dec 1;313(6):F1243-F1253.

(6) Serum Soluble (Pro)**Renin** Receptor Levels in Maintenance Hemodialysis Patients. Amari Y, Morimoto S, Nakajima F, Ando T, **Ichihara A**. PLoS One. 2016 Jul 1;11(7):e0158068.

(7) Renal tubular epithelial cell **prorenin** receptor regulates blood pressure and sodium transport. Ramkumar N, Stuart D, Mironova E, Bugay V, Wang S, Abraham N, **Ichihara A**, Stockand JD, Kohan DE. Am J Physiol Renal Physiol. 2016 Jul 1;311(1):F186-94.

(8) Antidiuretic Action of Collecting Duct (Pro)**Renin** Receptor Downstream of Vasopressin and PGE2 Receptor EP4. Wang F, Lu X, Peng K, Fang H, Zhou L, Su J, Nau A, Yang KT, **Ichihara A**, Lu A, Zhou SF, Yang T. J Am Soc Nephrol. 2016 Oct;27(10):3022-3034.

(9) Placental (pro)**renin** receptor expression and plasma soluble (pro)**renin** receptor levels in preeclampsia. Narita T, **Ichihara A**, Matsuoka K, Takai Y, Bokuda K, Morimoto S, Itoh H, Seki H. Placenta. 2016 Jan;37:72-8.

〔学会発表〕（計 25 件）

(1) 吉田尚弘、遠藤仁、森本聡、木内謙一郎、林地のぞみ、樋口逸郎、高嶋博、福田恵一、佐野元昭、市原淳弘。サルコペニアにおける(プロ)レニン受容体-Wnt シグナルを介した新規分子機構。第 26 回臨床内分泌代謝 Update. 2016-10

(2) 森本聡、木田可奈子、谷田部緑、谷田部淳一、市原淳弘。尿中可溶性(プロ)レニン受容体排泄量と尿 pH との関連。第 60 回日本腎臓学会学術総会。2017-05

(3) 須田睦仁、谷田部淳一、谷田部緑、遣田美貴、市原淳弘。胎盤栄養膜細胞における低酸素刺激による(プロ)レニン受容体の発現調節。第 40 回日本高血圧学会総会。2017-10

(4) 森嶋紀子、森本聡、木田可奈子、谷田部緑、谷田部淳一、渡辺大輔、加藤陽一郎、澤田達男、柴田亮行、市原淳弘。ヒト心筋における(プロ)レニン受容体発現と心筋肥大との関連。第 22 回日本心血管内分泌代謝学会学術集会。2018-04

など。

〔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〕

なし

6. 研究組織

研究代表者単独での研究。