

平成30年6月19日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09300

研究課題名(和文) 補体C3による組織レニン・アンジオテンシン系の活性化から高血圧病態形成

研究課題名(英文) Involvement of C3 in the pathogenesis of hypertension with an activation of tissue renin-angiotensin system

研究代表者

福田 昇 (FUKUDA, Noboru)

日本大学・総合科学研究所・教授

研究者番号：40267050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集ZFN法でC3 KO SHRを樹立し、血圧、腎内RA系を検討した。SHRでは塩分感受性高血圧を示したが、C3 KO SHRでは認めなかった。SHRの腎髄質でレニン、KLF-5発現が亢進し、E-カドヘリン発現が低下し、腎尿細管で上皮間葉化(EMT)が起こっていたが、C3 KO SHRでは抑制されていた。C3 KOマウス由来MSCからVSMCへの分化過程でC3に依存したレニン発現を認めた。腎内Ang IIはSHRの塩分負荷で増加したが、C3 KO SHRでは抑制されていた。補体C3はSHRで腎尿細管上皮のEMTによる腎内RA系を亢進し、SHRの塩分感受性高血圧に關与している事が示された。

研究成果の概要(英文)：We established C3 KO SHR by the gene editing technology ZFN method and investigated blood pressure, histological changes and gene expression in kidney and renal RA systems. SHR showed salt-sensitive hypertension that was abolished in C3 KO SHR. Expression of E-cadherin was suppressed in renal medulla from SHR indicating EMT phenom that was not observed in kidney from C3 KO SHR. Intrarenal Ang II was increased with a salt-loading in SHR, which was suppressed in C3 KO SHR. During the differentiation of C3 KO mouse-derived mesenchymal stem cells to vascular smooth muscle cells, renin was transiently expressed with C3, KLF-5 and LXRα. These findings indicate that complement 3 induces EMT phenom of nephrotubulus and enhances the intrarenal RA system to induce the salt-sensitive hypertension.

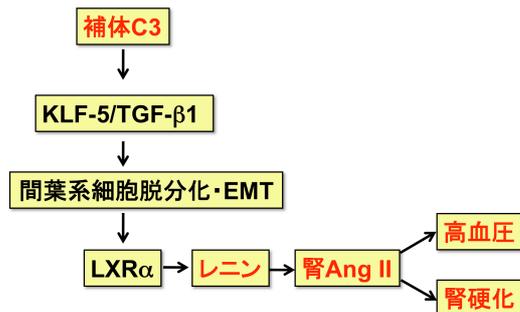
研究分野：高血圧学

キーワード：高血圧 補体 ゲノム編集 高血圧自然発症ラット 形質変換

1. 研究開始当初の背景

本態性高血圧の明確な成因は未だ不明である。その成因の解明のため、遺伝的高血圧モデルである高血圧自然発症ラット(SHR)を用いた研究が行われている。高血圧自然発症ラット(SHR)は正常血圧 WKY ラットに比し、生直後から心肥大を呈し、SHR 由来血管平滑筋細胞(VSMC)は血圧系の無い培養系で過剰増殖を呈する。我々は SHR 由来 VSMC が合成型形質を示す事を認めた。3 週齢 WKY と SHR の大動脈中膜平滑筋でのマイクロアレイで補体 C3 は、培養系でも SHR 由来 VSMC でのみ発現していた。さらに SHR 由来 VSMC で C3 に対するアンチセンスオリゴで内因性 C3 を抑制すると、合成型形質が収縮型に向かう事を見出し、C3 が SHR 由来 VSMC でのみ発現し、形質を合成型にしていると考えた (Lin, Fukuda et al. *Hypertension* 2004)。C3 が VSMC を合成型に形質変換する機序として外因性 C3a は ERK を介して転写因子 KLF-5 の発現を増加し、VSMC の形質を合成型にする事を見出した (Yao, Fukuda et al. *BBRC* 2008)。

我々は、補体 C3 は心血管腎系では間葉系組織の脱分化、腎尿細管上皮で EMT を起こし、脱分化間葉系組織でのレニン産生による RA 系活性化を介して高血圧と高血圧性臓器障害に関わっていると考えられた (Zhou, Fukuda et al. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013)。



一方、補体 C3 と幹細胞性、神経堤細胞遊走、細胞脱分化の報告として、間葉系幹細胞 (MSC) は成人では間葉系組織修復に働いているが、C3a 受容体が MSC に存在し、C3a は MSC で ERK1/2 のリン酸化を長時間おこし、MSC の脱分化を維持して、組織修復を促すと報告され (Schraufstatter et al. *J Immunol*, 2009, 182: 3827) た。

2. 研究の目的

今回、組織 RA 系の活性化から高血圧病態形

成に於ける補体 C3 の関与の機序を明らかにする目的で、WKY/Izm, SHR/Izm, C3 KO SHR/Izm において、心臓、血管、腎臓の間葉性組織傷害と分化度を検討する。組織 RA 系の検討として、in vitro では各系統ラットの培養メサンジウム細胞、培養 VSMC のアンジオテンシン (Ang) II 産生を測定。In vivo では腎内レニン、Ang II を測定する。さらに野生型および C3 KO マウス由来間葉系幹細胞から血管平滑筋細胞分化に於ける KLF-5 および LXRα または miRNA143, miRNA145 を介したレニン発現、組織 RA 系の活性化の検討を行う。

3. 研究の方法

1) WKY, SHR, C3 KO SHR 由来培養 VSMC および腎 MC の形質発現、増殖能評価の in vitro 実験: SHR で増加している合成形質マーカーである Osteopontin, MatrixGla mRNA 発現、低下している収縮型形質マーカーである SM22α mRNA 発現を real time PCR で評価する。

2) WKY, SHR, C3 KO SHR の心血管腎臓系の組織傷害と病態の in vivo での評価: 出生 1 日目から WKY, SHR, C3 KO SHR の腎臓、大動脈を摘出し、重量と形体を比較する。大動脈平滑筋の形質として SM1/2, SMemb の免疫染色を行う。

3) 4 週齢 WKY/Izm, SHR/Izm, C3 KO SHR/Izm 各 6 頭、週 1 回体重測定、血圧測定 (Tail cuff 法) を行う。継続的に採尿を行い、血圧・尿量・尿蛋白を調べ、また飲水量、摂餌量をモニタリングする。

4) テレメトリーでの血圧測定

5) WKY, SHR, C3 KO SHR の in vivo で腎臓内 RA 活性の評価: 8 週令 WKY, SHR, C3 KO SHR を、断頭して、腎臓摘出後凍結し Ang II を RIA にて測定。

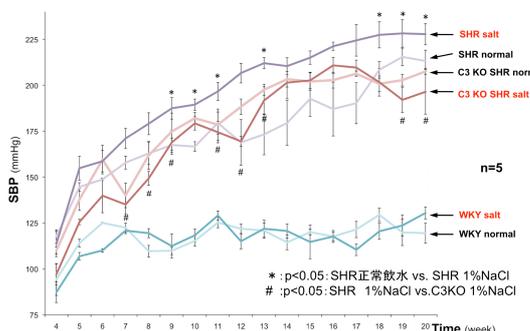
6) C3 KO マウス由来 MSC の VSMC へ分化過程に於けるレニン発現、形質変化への C3 の関与の検討: 7 日毎にレニンと LXRα を免疫染色し、特に LXRα の核への移行を検討する。形質発現の変化を h-caldesmon, osteopontin, MatrixGla mRNA を real time PCR で評価。

4. 研究成果

C3 KO SHR での C3a 鎖の消失と血清 CH50 の低下を確認した。WKY, SHR, C3 KO SHR の血圧を Tail cuff 法とテレメトリー法で測定したところ、SHR では食塩負荷にて血圧が上昇したが、C3 KO SHR では血圧が上昇せず、SHR の食塩感受性高血圧に補体 C3 が腎

臓内 RA 系の活性化を介して関与している事が判明した。

正塩、高塩負荷のTail cuff法によるWKY、SHR C3 KO SHRにおけるSBPの変化



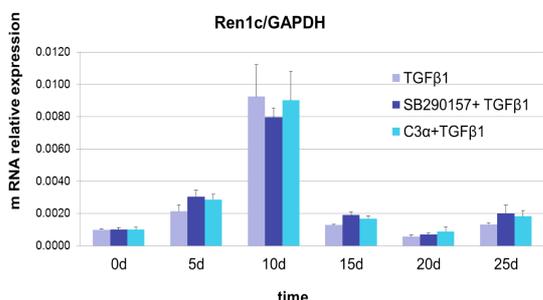
出生 1 日目、8 週目、20 週目の腎臓の HE 染色では糸球体傷害係数(GIS)、尿管傷害係数(TIS)はいずれも SHR で WKY より高く、C3 KO SHR で低下していた。

大動脈中膜の脱分化マーカー SM emb 染色は生直後から 20 週齢まで SHR で高発現していたが、C3 KO SHR では発現が減弱していた。腎髄質のレニン発現は SHR で高発現し、C3 KO SHR では発現が減弱していた。腎髄質の E カドヘリン発現は SHR で発現が低下し、C3 KO SHR では発現が保たれていた。

SHR 腎髄質の RA 系活性化は補体 C3 が腎尿管上皮を間葉化(EMT)を起こしていることによると考えられた。Real time PCR による腎髄質の 1-カルデスモン、KLF-5、レニン発現は SHR で高発現で、C3 KO SHR で低下していた。

In vitro で糸球体 MC は SHR でオステオポンチンを高発現し、C3 KO SHR で低下し、補体 C3 は SHR のメサンジウム細胞を脱分化していると考えられた。

マウス MSC の TGF-β1 による VSMC への分化実験では、レニン発現は VSMC の分化過程で発現し、完全に分化すると低減した。この現象は KLF-5 と C3 発現を伴い、LXR α の核への移行を伴っていた。



このように SHR では補体 C3 が高発現する事により、WKY ラットに比較して間葉系組織が脱分化しており、血管平滑筋細胞やメサンジウム細胞の増殖が亢進し、さらに補体 C3 は腎尿管上皮を EMT により間葉化して、腎内レニンの発現亢進から Ang II を産生し RA 系の活性化をおこし、求心交感神経系活性を刺激し、塩分感受性高血圧を起こし、

心血管リモデリングおよび腎硬化症に引き起こしていると考えられた。

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)

1. Kitai M, Fukuda N, Ueno T, Endo M, Maruyama T, Abe M, Okada K, Soma M, Matsumoto K. The effects of a spleen tyrosine kinase inhibitor on the progression of lupus nephritis in mice. *Journal of Pharmacological Sciences* 134: 29-36, 2017, 5. (査読あり)

[学会発表] (計 17 件)

1. 根岸英理子、福田 昇、小松一俊、片川まゆみ、遠藤守人、阿部雅紀、西山 成. SHR の塩分感受性高血圧は補体 C3 発現亢進による腎内 RA 系活性化に基づく. 第 53 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、九州大学医学部百年講堂 (福岡市) 2017.10.24

2. Chen L, 福田 昇. 間葉系間細胞から血管平滑筋細胞への分化によるレニン発現に於ける補体 C3 の関与. 第 53 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、九州大学医学部百年講堂 (福岡市) 2017.10.24

3. Chen L, Fukuda N, Negishi E, Katakawa M, Tsunemi A, Saito K, Fujiwara K, Hagikura K, Endo M, Abe M. Role of C3 in Renin Expression by Mesenchymal Stem Cells Differentiating Into VSMCs. 第 40 回日本高血圧学会総会、ひめぎんホール (愛媛県松山市) 2017.10.20

4. 福田 昇、西山 成. SHR は補体 C3 の高発現が間葉組織脱分化から局所 RAAS 亢進による高血圧病態を形成している. 第 40 回日本高血圧学会総会、ひめぎんホール (愛媛県松山市) 2017.10.20

5. 根岸英理子、福田 昇、遠藤守人、岡田一義、阿部雅紀. SHR において補体 C3 は腎尿管上皮間葉化による組織 RA 系の活性化から塩分感受性高血圧を引き起こす. 第 60 回日本腎臓学会学術総会、仙台国際センター (宮城県仙台市) 2017.5.26

6. Chen L, Fukuda N, Negishi E, Matsumoto T. Role of C3 in renin expression by mesenchymal stem cells differentiating into VSMCs 第 16 回日本再生医療学会、仙台国際センター (宮城県仙台市) 2017.3.

7. 根岸英理子、福田 昇、上野高浩、遠藤守

人、阿部雅紀. 高血圧自然発症ラット(SHR)での塩分感受性高血圧への補体 C3 の関与. 第 20 回心血管内分泌代謝学会 (東京コンベンションホール) 東京、2016. 12.

8. Fukuda N. Role of complement 3 in development of hypertension. 17th International SHR Symposium. 秋葉原 UDX ギャラリー (東京) 2016. 9.

9. Negishi E, Fukuda N., Ueno T., Endo M, Komatsu K., Katakawa M, Tsunemi A, Abe M, Soma M. Complement 3 induces the salt-sensitive hypertension by induction of dedifferentiation of mesenchymal tissues with activation of renal RA system in SHR. 17th International SHR Symposium. 秋葉原 UDX ギャラリー (東京) 2016. 9.

10. Chen L, Fukuda N., Negishi E, Katakawa M, Tsunemi A, Abe M, Soma M. The role of C3 in renin expression during the process of mesenchymal stem cell differentiating into vascular smooth muscle cell. 17th International SHR Symposium. 秋葉原 UDX ギャラリー (東京) 2016. 9.

11. 根岸英理子、福田 昇、上野高浩、遠藤守人、岡田一義、阿部雅紀、相馬正義. 補体 C3 は SHR で腎尿細管上皮間葉化(EMT)により腎内 RA 系を活性化し塩分感受性高血圧を起こしている. 第 39 回日本高血圧学会総会、仙台国際センター (宮城県仙台市) 2016. 9.

12. 根岸英理子、福田 昇、上野高浩、阿部雅紀、岡田一義、相馬正義. 補体 C3 は腎尿細管上皮間葉化による組織 RA 系の活性化から SHR の高血圧発症因子である. 第 59 回日本腎臓学会総会、パシフィコ横浜 (横浜市)、2016.6.

13. 福田 昇、根岸英理子、片川まゆみ、上野高浩、松本太郎. 補体 C3 は間葉系細胞脱分化および上皮間葉化現象(EMT)により心血管腎リモデリングを起こす. 第 15 回日本再生医療学会、大阪国際会議場 (大阪市) 2016.3.

14. 根岸英理子、福田 昇、片川まゆみ、常見明子、上野高浩、遠藤守人、相馬正義. 補体 C3 は腎髄質 EMT による組織 RA 系の活性化から高血圧病態を形成する. 第 19 回日本心血管内分泌代謝学会、神戸国際会議場 (神戸市)、2015.11.

15. 根岸英理子、福田 昇、遠藤守人、片川まゆみ、常見明子、渡辺めぐみ、上野高浩、相馬正義. 補体 C3 による SHR の腎レニン・アンジオテンシン系の活性化から高血圧病態形成. 第 51 回高血圧関連疾患モデル学

会、千里ライフサイエンスセンター (大阪市) 2015.10.

16. 根岸英理子、福田 昇、片川まゆみ、上野高浩、阿部雅紀、岡田一義、遠藤守人、松本紘一、相馬正義. 補体 C3 による組織レニン・アンジオテンシン系の活性化から高血圧病態形成. 第 38 回日本高血圧学会、ひめぎんホール、(愛媛県松山市) 2015.10.

17. Noboru Fukuda, Eriko Negishi, Mayumi Katakawa, Akiko Tsunemi, Tahahiro Ueno, Morito Endo, Masayoshi Soma. Complement 3 Involved in the Hypertensive Endorgan Damaages Through Activation of RAS and Dedifferentiation of Mesenchymal Tissues. 第 38 回日本高血圧学会、ひめぎんホール、(愛媛県松山市) 2015.10.

[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 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 昇 (FUKUDA, Noboru)

日本大学・総合科学研究所・教授

研究者番号: 40267050

(2) 研究分担者

上野 高浩 (UENO, Takahiro)

日本大学・医学部・兼任講師

研究者番号: 40386008

(3) 連携研究者

小松 一俊 (KOMATSU, Kazutoshi)

日本大学・医学部・客員教授

研究者番号: 50297800