

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15494

研究課題名(和文) 食塩感受性高血圧に関わる糖質・鉱質コルチコイド依存性ナトリウム輸送系の解明

研究課題名(英文) Exploration of gluco- and mineralocorticoid-dependent sodium transporter system involved in salt sensitive hypertension

研究代表者

藤田 敏郎 (Fujita, Toshiro)

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：10114125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：尿細管間細胞に発現するPendrinは、近年新たな高血圧と体液調節因子の治療標的として注目されている。本研究ではアンジオテンシンIIによるPendrinの調節機構を副腎摘出モデルとミネラルコルチコイド受容体(MR)欠損マウスを用いてアルドステロン-MR活性化によるPendrin調節を明らかにした。Apparent mineralocorticoid excess(APE)症候群はHSD11B2の遺伝子異常によって生じる高血圧を呈する遺伝病である。HSD11B2を腎臓特異的に欠損するマウスでは高血圧を呈することを示し、腎臓がAPE症候群の病態生理に深く関与する分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Pendrin is expressed in intercalated cells of the renal tubules and plays a pivotal role in maintenance of body fluid and blood pressure. The present study revealed the essential role of aldosterone-mineralocorticoid receptor (MR) pathway in the activation of pendrin by angiotensin II using adrenalectomy model and MR knockout mice, paving the way to the development of new therapy against salt-sensitive hypertension. Apparent mineralocorticoid excess (APE) is caused by mutations in the HSD11B2 gene, which lead to hypertension. To delineate the role of the kidney, we generated mice with kidney-specific deletion of HSD11B2. These mice developed hypertension, along with activation of epithelial sodium channel-Na⁺-Cl⁻ cotransporter activation. Mineralocorticoid receptor antagonist decreased blood pressure of the knockout mice. These results suggest the importance of 11β HSD2 expressed in the kidney in MR activation and development of hypertension in APE syndrome.

研究分野：腎臓内分泌内科

キーワード：食塩感受性高血圧 ミネラルコルチコイド

1. 研究開始当初の背景

高血圧、糖尿病、肥満など現代的な食生活に起因する生活習慣病は健康寿命を妨げる大きな問題であり、その予防・治療法の確立が望まれる。食塩感受性高血圧は特に食塩摂取量の多い日本において高血圧の主因である上、肥満とも密接に関連し心血管・腎疾患のリスクを増加させる。

血圧の食塩感受性は腎 Na 排泄が規定するが、特に遠位尿細管はその最終調整を司り、高血圧発症に密接に係る。同部の Na 制御機構は、遠位尿細管のナトリウムクロライド共輸送体 (NCC) や集合管主細胞の上皮性ナトリウムチャネル (ENaC)、最近発見された間在細胞における Pendrin/NDCBE 等の Na 輸送体や、これらの制御因子である Sgk1、WNKs、SPAK、Nedd4-2 等、さらに上流のレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系、腎交感神経まで数多くの研究がなされている。申請者も特にアルドステロン・鉱質コルチコイド受容体 (MR) 経路や腎交感神経・糖質コルチコイド受容体経路に着目し、その新規活性化機構や食塩感受性高血圧への関与につき究明してきた。

2. 研究の目的

本研究では各種遺伝子改変動物を用いて食塩感受性高血圧や肥満高血圧における遠位尿細管の部位・細胞特異的な解析を行い、新規の血圧決定因子の同定や、各部位・細胞の特異的な機能・応答の解明を目指す。本研究により、高血圧と体液保持の病態理解を深め、新たな治療・診断法の基盤を提示することを最終目的とした。

3. 研究の方法

1) MR 下流分子 Pendrin の調節機構 - 副腎摘出モデルでの検討

尿細管間在細胞に発現する Pendrin は NCC と協調して作用し、ナトリウムバランスと血圧調節に関わることが近年明らかになった。一方、間在細胞では MR がリガンド結合領域 (S843) でリン酸化をうけ (MRS843-P)、アンジオテンシン II により脱リン酸化して活性化することが示されている。アンジオテンシン II は MRS843-P の脱リン酸化を介して Pendrin を活性化するが、その過程にアルドステロンが必要かどうか不明であった。そこで、副腎摘出モデルを用いて、アンジオテンシンによる、MR の脱リン酸化と Pendrin の活性化を NCC 活性化と対比して検討した。

2) MR 下流分子 Pendrin の調節機構 - 間在細胞特異的 MR 欠損マウスの検討

間在細胞 MR の役割を調べるため間在細胞特異的 MR 欠損マウスを Atp6v1b1-Cre マウスを用いて作出して検討を進めた。アンジオテンシン II による刺激モデルとして、アンジオテンシン II を投与するモデルとともに、低食塩負荷を使用した。

3) 腎臓 11beta HSD2 の役割解明

アルドステロン作用部位では 11 HSD2 が糖質コルチコイドを分解して MR の活性化を防いでいるが、腎臓での 11 HSD2 の役割は不明であった。そこで腎臓特異的 11 HSD2 欠損マウスを作成して検討を進めた。

4. 研究成果

1) MR 下流分子 Pendrin の調節機構 - 副腎摘出モデルでの検討

アンジオテンシン II 負荷ならびに低食塩食は、膜分画での NCC ならびに Pendrin を増加させ、MR のリン酸化を抑制した。低食塩食は wild type のマウスでは血圧を変化させなかったが、Pendrin KO マウスでは血圧を低下させることから、Pendrin が食塩保持に重要な役割を果たすことが明らかになった。

つぎに副腎摘出モデルで検討したところ、アンジオテンシン II 負荷では NCC の活性化ならびに間在細胞での MR 脱リン酸化は生じるにも関わらず、Pendrin の活性化は生じなかった。この結果から Pendrin の活性化にアルドステロンが必要であることが明らかになった。さらに、アンジオテンシン II とアルドステロン同時投与による Pendrin 上昇は、ENaC 阻害薬である Amiloride により抑制されたことから、Pendrin 発現はアルドステロンに加え K 濃度でも制御されることが明らかとなった (Hirohama et al. J Am Soc Nephrol 2018)。

2) MR 下流分子 Pendrin の調節機構 - 間在細胞特異的 MR 欠損マウスの検討

本マウスではアンジオテンシン II 投与による Pendrin 蛋白の発現増加が有意に抑制され、間在細胞 MR が Pendrin の活性化に必要なことが明らかになった。また、低食塩食下では MR を介した Pendrin の誘導が抑制される結果、食塩保持機構が障害され体重の減少がみられた。この作用は NCC の抑制をするとさらに増強した。これらの結果から、間在細胞 MR を介する Pendrin 活性化が体液保持機構に重要な役割を果たすことが示された (Gordon Research Conference 2018 発表)。

3) 腎臓 11beta HSD2 の役割解明

作成した腎臓特異的 HSD11B2 欠損マウスは食塩感受性高血圧を来し腎臓 11beta HSD2 による糖質コルチコイドの分解が血圧調節に重要な役割を果たすことが明らかになった。HSD11B2 欠損マウスでは ENaC と NCC の活性化が見られたが、アミロライドならびに高カリウム食によって高血圧と NCC のリン酸化が抑制されたため、ENaC の活性化が 11beta HSD2 欠損のフェノタイプ発現に重要であると思われた。

さらに、NCC 阻害薬は KO マウスの高血圧を抑制したため、ENaC 活性化による低カリウム血症が NCC 活性化を介して高血圧に関わると

思われた。また、MR 阻害薬が KO マウスの高血圧を抑制したことから、腎臓 HSD11B2 欠損による糖質コルチコイド過剰は MR を介して血圧を上昇させていると思われた (Ueda et al. Hypertension 2017)。以上の結果から apparent mineralocorticoid excess 症候群による高血圧関わる腎臓での分子機構を明らかにすることができた。

4) 核内受容体 PXR の糖尿病性腎症での増加
腎臓の核内受容体の検討の過程で、糖尿病性腎症で核内受容体 PXR が増加していることを見出した。PXR は近位尿細管で特異的に発現しており、糖尿病マウス db/db で増加していた。さらにソートした近位尿細管分画では db/db マウスでントロールマウスに比して PXR の DNA 脱メチル化が認められた。さらに、DNA メチル化阻害薬は培養尿細管細胞の PXR 発現を上昇させたことから、糖尿病による PXR の発現上昇には DNA の脱メチル化が関与していると思われた。

腎臓での PXR の作用は知られていなかったが、本研究により、糖新生酵素 PCK1 および線維化因子 RGC32 を増加させる作用があることが明らかになった。また慢性腎臓病患者では PXR の発現が上昇しており、尿細管障害に PXR が関わることを示唆された (Watanabe et al. Am J Physiol 2018)。PXR に対しては糖質コルチコイドも作用することが知られており、糖質コルチコイド過剰状態で PXR が何等かの役割を果たしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

- 1) 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** 29:57-68, 2018, 査読あり
doi: 10.1681/ASN.2017030243
- 2) 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** 314: F551-60, 2018, 査読あり
doi: 10.1152/ajprenal.00390.2017.
- 3) 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** 70: 111-8, 2017, 査読あり

doi:

10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08966.

- 4) Xu N, Hirohama D, Ishizawa K, Chang WX, Shimosawa T, Fujita T, Uchida S, Shibata S: Hypokalemia and pendrin induction by aldosterone. **Hypertension** 69:855-62,2017, 査読あり
doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08519

- 5) Ishizawa K, Xu N, Loffing J, Lifton RP, Fujita T, Uchida S, Shibata S. Potassium depletion stimulates Na-Cl cotransporter via phosphorylation and inactivation of the ubiquitin ligase Kelch-like 3. **Biochem Biophys Res Commun.** 480: 745-751, 2016, 査読あり
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.127.

[学会発表](計13件)

- 1) Daigoro Hirohama, Nobuhiro Ayuzawa, Kohei Ueda, Mitsuhiro Nishimoto, Wakako Kawarazaki, Tatsuo Shimosawa, Takeshi Marumo, Shigeru Shibata, Toshiro Fujita: Aldosterone is essential for angiotensin II-induced upregulation of pendrin International Aldosterone Conference, Chicago,USA, 2018年3月
- 2) Nobuhiro Ayuzawa, Mitsuhiro Nishimoto, Daigoro Hirohama, Kohei Ueda, Wakako Kawarazaki, Tatsuo Shimosawa, Takeshi Marumo, Toshiro Fujita: Mineralocorticoid receptor in renal intercalated cells mediates pendrin regulation by renin-angiotensin-aldosterone system to maintain fluid homeostasis Gordon Research Conference, Ventura, CA, USA, 2018年2月
- 3) 広浜 大五郎, 鮎澤 信宏, 上田 浩平, 西本 光宏, 河原崎 和歌子, 渡邊 篤史, 下澤 達雄, 丸茂 丈史, 柴田 茂, 藤田 敏郎: 腎 pendrin の発現機構と血圧調節における役割の解明 第21回心血管内分泌代謝学会学術総会 大阪, 2017年12月
- 4) Toshiro Fujita, Lecture at the symposium, "Activation of mineralocorticoid receptor in CKD and salt-sensitive hypertension" American Society of Nephrology (ASN), New Orleans, USA, November 2-5, 2017

- 5) Daigoro Hirohama, Nobuhiro Ayuzawa, Kohei Ueda, Mitsuhiro Nishimoto, Wakako Kawarazaki, Atsushi Watanabe, Tatsuo Shimosawa, Takeshi Marumo, Shigeru Shibata, Toshiro Fujita: Aldosterone is essential for angiotensin II-induced upregulation of pendrin American Society of Nephrology Kidney Week 2017, New Orleans, USA, 2017年11月
- 6) 上田浩平、西本光宏、広浜大五郎、鮎澤 信宏、河原崎和歌子、渡邊篤史、下澤達雄、丸茂 丈史、藤田 敏郎: 腎臓特異的な11βHSD2活性低下による高血圧発症機序の解析 第40回日本高血圧学会総会シンポジウム 2017年10月22日 松山
- 7) Kohei Ueda, Mitsuhiro Nishimoto, Daigoro Hirohama, Nobuhiro Ayuzawa, Wakako Kawarazaki, Atsushi Watanabe, Tatsuo Shimosawa, Johannes Loffing, Ming-Zhi Zhang, Takeshi Marumo, Toshiro Fujita: Systemic effect of renal 11β-HSD2 deficiency on blood pressure regulation AHA Council on Hypertension American Society of Hypertension Joint Scientific Sessions, September 2017, San Francisco, USA
- 8) 渡邊篤史 丸茂 丈史 河原崎和歌子 西本光宏 鮎澤 信宏 広浜大五郎 上田浩平 熊谷裕生 藤田 敏郎: 糖尿病性腎症でエピソード異常をきたす核内受容体 PXR は腎糖新生を調整する 第60回日本腎臓学会学術総会, 仙台、2017年5月28日
- 9) 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 第60回日本腎臓学会学術総会、仙台、2017年5月26日
- 10) 広浜 大五郎、柴田 茂、上田 浩平、鮎澤 信宏、西本 光宏、河原崎 和歌子、渡邊 篤史、下澤 達雄、丸茂 丈史、藤田 敏郎: PendrinとNCC発現調節におけるアンジオテンシンIIとアルドステロンの異なる役割 第60回日本腎臓学会学術総会、仙台、2017年5月
- 11) 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。第59回日本腎臓学会学術総会、2016年6月18日、横浜
- 12) 渡邊篤史、丸茂 丈史、河原崎和歌子、西

本光宏、鮎澤 信宏、広浜大五郎、上田浩平、熊谷裕生、藤田 敏郎: 糖尿病性腎症で核内受容体 PXR はエピソード異常をきたし線維化因子 RGC32 を増加させる。第59回日本腎臓学会学術総会、2016年6月17日、横浜

- 13) 広浜大五郎、柴田茂、上田浩平、鮎澤 信宏、西本光宏、河原崎和歌子、渡邊篤史、丸茂 丈史、藤田 敏郎: PendrinとNCC発現調節におけるアンジオテンシンIIとアルドステロンの異なる役割。第59回日本腎臓学会学術総会、2016年6月16日、横浜

〔図書〕(計1件)

Shibata S, Fujita T
Hypertension: A Companion to Braunwald's Heart Disease, 3rd Edition, Edited by George L. Bakris, Matthew Sorrentino (ELSEVIER) Chapter 24 "Renin Angiotensin Aldosterone System Blockers" Page 230-241

〔産業財産権〕なし

〔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

藤田 敏郎 (FUJITA, Toshiro)
東京大学・先端科学技術研究センター・
名誉教授
研究者番号: 10114125

(2) 研究分担者

丸茂 丈史 (MARUMO, Takeshi)
東京大学・先端科学技術研究センター・
特任准教授
研究者番号: 70265817

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