

令和元年6月16日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16075

研究課題名(和文)糖質コルチコイドによる腎尿細管を介した血圧日内変動制御の検討

研究課題名(英文)The role of glucocorticoid in renal tubules modulating diurnal change in blood pressure

研究代表者

西本 光宏(Nishimoto, Mitsuhiro)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教

研究者番号：90646572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：心血管イベントの重要な危険因子である夜間の降圧不良の要因としてストレスホルモンの一つであるコルチゾールの低下不良が報告されている。コルチゾールは生理的濃度内の変動であっても腎での時計遺伝子の調節異常をきたし、尿細管遠位部のNa再吸収を担う分子の発現亢進、活性化をきたし、結果として夜間睡眠時の血圧上昇の要因となりうることをマウスモデルを用いて見出した。コルチゾールの作用機序として従来想定されていた鉱質コルチコイド受容体のみでなく、機能の不明であった糖質コルチコイド受容体の関与が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

夜間睡眠時には通常血圧が低下するが、この夜間血圧低下が減弱すると心臓病や脳血管障害発症につながると考えられている。この原因の一つとしてストレスホルモンの一種コルチゾールの低下不良が想定されているが、このコルチゾールが日中と同程度まで上昇するだけで血圧上昇を引き起こしうることを見出した。またこの機序として腎臓での食塩再吸収異常が起こることを示し、さらに新しい分子の関与が明らかになった。今回の知見は夜間血圧低下不良に対する新たな治療アプローチの開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The lack of nocturnal drop in blood pressure is one of the risk factors for cardiovascular events. One of the mechanism is the insufficient suppression of corticosteroids in nocturnal period. We found through the observation of mice models, that the rise in corticosterone levels, even within the range of physiological change, causes the dysregulation of several clock genes in the kidneys, and the increase in the gene expression of sodium transporters in distal renal tubules. As a result, corticosterone can induce the increase in the expression and the activity of sodium transporters, followed by the rise in blood pressure in inactivate periods. In addition, corticosterone activate sodium transporters not only through mineralocorticoid receptor, but through glucocorticoid receptor in renal tubules.

研究分野：高血圧

キーワード：血圧 日内変動 糖質コルチコイド ナトリウム輸送体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 夜間降圧不良のリスクと治療可能性

健康なヒトにおいては血圧は早朝起床時をピーク、夜間睡眠中をトラフとする日内変動を示す。夜間の降圧を来さない集団は non-dipper と呼ばれ、外来血圧あるいは 24 時間平均血圧が正常であっても心臓、腎臓、血管障害のリスク要因となることが知られている。non-dipper は血圧制御機構破綻の結果と考えられるが、夜間のみ降圧の達成によって心血管病リスクを低下させることが報告されており(Hermidaら JACC 2011)、心血管病の増悪因子として治療の対象となる。

夜間降圧不良時の要因は明らかではないが、いくつか特徴的な現象が観察されている。糖質コルチコイドであるコルチコステロイド(CS、ヒトでは主にコルチゾール、げっ歯類ではコルチコステロン)もその一つである。CS はストレスに反応して上昇するホルモンの一つであり、本来夜間に低下するが、non-dipper の代表的な病態である肥満、とくに睡眠時無呼吸症候群を合併するような場合には十分に低下しないことが報告されている。

#### (2) 血圧日内変動の制御因子—CS の日内変動

血圧日内変動は心血管機能調節に加えて、腎尿細管でのナトリウム(Na<sup>+</sup>)再吸収調節によって作り出される。CS、アルドステロン(Aldo)は早朝をピークとする日内変動を示すステロイドホルモンであり、いずれも食塩再吸収を制御する。代表的な鉱質コルチコイドである Aldo に対して糖質コルチコイドである CS の生体における鉱質コルチコイド作用は弱いとされているが、後述のように生理的濃度の範囲で血圧制御に寄与している可能性が考えられた。

#### (3) Aldo・CS による鉱質コルチコイド受容体を介した腎 Na<sup>+</sup>再吸収制御

Na<sup>+</sup>の再吸収は遠位ネフロンである遠位尿細管(DCT)/接合尿細管(CNT)/集合管(CD)で微調節が行われ、生理的な血圧調節に大きく影響する。DCT では Na-Cl 共輸送体(NCC)が、CNT/CD では上皮性 Na チャネル(ENaC)が主要な Na<sup>+</sup>再吸収機構として機能する。ENaC は主に鉱質コルチコイド受容体(MR)による転写や活性化酵素誘導を介して調節を受ける。近年 NCC も鉱質コルチコイドの調節をうける可能性が指摘されているが NCC 活性調節は MR の転写を介したのではなく、その詳細な機序は不明であった。

#### (4) CS は尿細管に作用しうるか

CS の MR への結合能は Aldo と同等であり、血中濃度は CS が数百～数千倍に及ぶ。腎尿細管に特異的に発現する 11βHSD2 と呼ばれる代謝酵素によって CS は不活性されるため MR(および糖質コルチコイド受容体(GR))はこの部位では CS から"保護"されていると考えられている。しかし、11βHSD2 の発現は CNT/CD では高度であるが、DCT では限定的であり、DCT 近位側ではほぼ完全に欠損している。しかし不活化に十分な 11βHSD2 の発現量については不明であり、生理的な濃度の CS が DCT や CNT/CD にどの程度作用するかは不明であった(図 1)。

報告者らが作出した遠位ネフロン特異的 11βHSD2 欠損マウスでは ENaC のみならず、NCC の著明な発現増加を認め、この部位で 11βHSD2 が機能している可能性が示唆された(日本腎臓学会、横浜 2016, RAAS2016, 東京 2016)。このとき CS 濃度の非活動期(マウスでは日中)の CS 濃度の低下が縮小していることも観察された。すなわち日内変動の範囲で CS は NCC, ENaC いずれの制御にも寄与しうるが、睡眠時の濃度低下時には 11βHSD2 の影響により濃度の低下分以上に効果を減弱する可能性があると考えられた(図 1)。

#### (5) GR による Na<sup>+</sup>再吸収調節の可能性

CS の生理的受容体である GR は尿細管全長にわたって発現しているが、その機能はほとんど解明されていない(図 1)。GR の結合配列(GRE)は MRE と相同であり、GR は MR と同じ標的遺伝子を活性化しうる。実際 MR 欠損マウスにおいて 11βHSD2 によって不活性化されない合成糖質コルチコイドの投与は ENaC の転写を介して ENaC を活性化することが報告されており(Schulz-Baldesら, Pflugers Arch 2001)。予備検討においても MR 拮抗薬投与下で合成糖質コルチコステロイド投与は活性化 ENaC を増加させた(図 2)。一方、報告者らは交感神経の活性化がエピジェネティックに GR シグナルを増強し、NCC が活性化される経路を報告した(Muら, Nat Med 2011)。すなわち NCC 制御についても GR の関与が考えられ、特に交感神経の睡眠時の異常な活性化は CS—GR 経路を促進し、NCC の夜間の活性化を引き起こす可能性が考えられた。

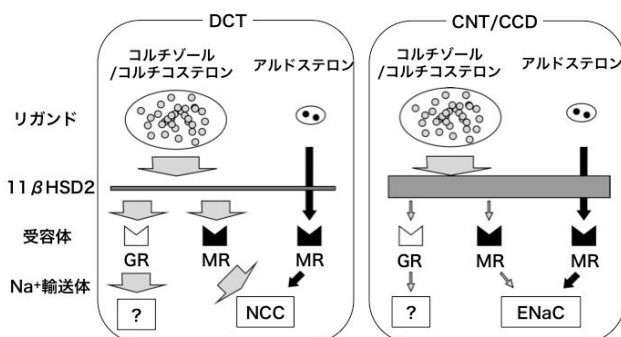


図1. 遠位ネフロンにおけるコルチコステロイドと受容体、標的遺伝子の関係  
コルチゾール/コルチコステロンはMRに対してアルドステロンと同等の結合能を持ち、顕著に血中濃度が高い。古典的には11βHSD2の発現量に応じてMRの生理的リガンドは選択されるとされる。しかし、濃度によっては11βHSD2の働きを超えてコルチゾール/コルチコステロンがMRに作用する可能性がある。またNCCが生理的にコルチゾール・コルチコステロンの調節をうけているかどうかは不明である。  
一方、尿細管に広く発現するGRの機能は全く不明である。

## 2. 研究の目的

腎尿細管において CS-GR/MR 経路による Na 再吸収制御機構を解明し、CS の異常を介した血圧に日内変動を介した血圧調節機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 生理的コルチコステロン負荷モデルマウスの解析

野生型マウスに生理的濃度のコルチコステロン (15.8  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{day}$ ) を Osmotic mini pump (Alzet 社) または徐放剤ペレット (Innovation Research America 社) で 1 週間皮下投与して血圧 (telemetry 法)、日中 (11 時から 14 時) にイソフルラン麻酔下で採血および腎サンプルを採取し、安楽死処置を行った。血清 Na, K 濃度、腎における Na<sup>+</sup>輸送体発現 (qRT-PCR 法による遺伝子発現解析および Western blotting 法によるタンパク発現解析) を行った。アルドステロンの影響を低下させるため食塩負荷 (8%NaCl 添加食) 下で検討した。さらに GR 拮抗薬 (GRA) である RU486, MR 拮抗薬 (MRA) である Spironolactone の徐放製剤を皮下投与し、効果を検討した。

### (2) デキサメタゾン負荷モデルマウスの解析

GR の影響を明らかにするため MR への結合能を持たない合成糖質コルチコイドであるデキサメタゾンを投与するモデル (11  $\mu\text{g}$  もしくは 800  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{day}$ ) を方法 (1) と同様に作成し、血清 Na, K 濃度、腎における Na<sup>+</sup>輸送体発現について解析した。

### (3) 組織特異的 MR, GR 欠損マウスの作出

GR, MR 両方に結合する CS の効果を分離するため薬剤誘導性腎尿細管特異的 GR, MR 欠損マウスを C57/BL6 系統を背景にそれぞれ作出した。具体的には Pax8 プロモータ下で rtTA を発現するトランスジェニックマウス、rtTA との結合で発現が誘導される tetO promoter 下で Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスを交配して Pax8rtTA: tetOCre マウス系統を作成し、これと GR, MR のそれぞれの遺伝子を loxP 配列でトラップした Flox マウスを交配して、rtTAPax8: tetOCre:MR flox マウス (Pax8MR) と rtTAPax8: tetOCre:GR flox マウス (Pax8GR) を作出した。これらのマウスに Doxycycline 0.1% 濃度で混じた飼料を 2 週間与えて腎尿細管でノックアウトを誘導した。さらに腎遠位尿細管に特異的に発現する KSP の promoter 下に Cre recombinase を発現するマウスと GR flox マウスを交配して KSPCre:GR flox (KSPGR KO) を作出した。

### (4) 組織特異的 GR 欠損マウスの解析

方法 (3) でノックアウトを誘導した GR マウスの発現解析を mRNA, 免疫蛍光染色によって行った。デキサメタゾン投与および高食塩食投与を行い、血圧、Na<sup>+</sup>輸送体発現解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 生理的濃度 CS 投与による変化

#### 電解質変化

マウスを含むげっ歯類はコルチゾール合成酵素を欠いており、コルチコステロンが主な糖質コルチコイドとなっているためこれを野生型マウスに投与した。さらに鉱質コルチコイドであるアルドステロンの影響を除外するため高食塩食負荷下で検討した。アルドステロン濃度は測定感度以下に抑制された (50pg/ml 以下)。予備検討時には血圧の日内変動の縮小 (日中非活動期に限局した血圧上昇) が認められていたが、Osmotic mini pump を用いた皮下持続投与では安定した結果が得られなかったため徐放剤の皮下投与に変更した。1 週間の投与では有意な血中 Na, K の変化は認めなかった。

#### 腎での遺伝子発現変化

##### ・時計遺伝子の発現変化

Cry1, Cry2, Per1, Per2, Bmal, Clock について腎における遺伝子発現の変化を検討したところ、高食塩食下生理的濃度 CS 投与によって Per1/Per2, Cry2 遺伝子の発現低下を認めた。Cry1, Bmal, Clock については上昇傾向を認めた (図 2)。

##### ・GR/MR の下流遺伝子

GR, MR は転写因子として作用するがその下流遺伝子として知られる Fkbp5, Atp1a1 遺伝子は日中では生理的濃度の CS によって腎での発現増加を認めた。一方、同様に GR/MR の下流遺伝子として知られる Sgk1, Gilz に関しては再現性のある変化を認めなかった。

##### ・遠位ネフロン発現 Na 輸送体遺伝子発現

遠位尿細管で主な Na<sup>+</sup>輸送を担う Na-Cl 共輸送体 (Na-Cl Co-transporter, NCC) をコードする Slc12A13 は mRNA は変化しなかった。一方、結合尿細管・集合管での Na 再吸収に主に働

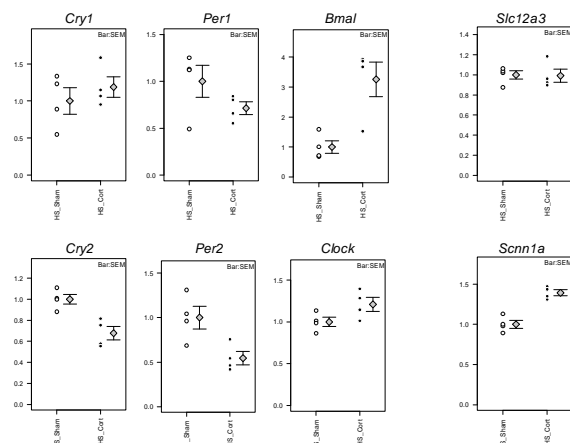


図2. 高食塩食下での生理的濃度コルチコステロン投与による遺伝子変化

く表皮 Na チャネル (Epithelial Na Channel, ENaC) のサブユニットをコードする Scnn1a 遺伝子発現は増加を認めた (図 2)。

Na 輸送体発現・活性化の変化 mRNA 量に変化がなかったにもかかわらず NCC 発現は増加し、活性化の指標である膜分画中発現およびリン酸化 NCC 発現も増加していた。ENaC についても発現が増加した。GRA 投与は NCC の活性化を抑制した。一方、ENaC に関しては発現自体は抑制したが、活性型 ENaC の量は抑制しなかった。MRA 投与はいずれも抑制した (図 3)。NCC の活性化の経路の上流として SPAK/OXSRI のリン酸化の増加も認め、GRA, MRA いずれによっても抑制された)。

血圧変化  
高食塩食下でコルチコステロンを投与すると野生型マウスで日中非活動期に局限した血圧上昇を認めた。GRA 投与に関しては期間中十分な個体数で実験することができなかったが、preliminary な結果として GRA 投与により日中の血圧低下の傾向を認めた。

(2) デキサメタゾン投与の影響  
より GR への影響を明確にするため MR に作用しない合成コルチコイドであるデキサメタゾン効果を検討した。コルチコステロンの当量のデキサメタゾンについては既知のデータが存在しないため、2 つの用量での検討を行った。血中電解質濃度は変化しなかった。

腎での遺伝子発現変化  
・ GR/MR 下流遺伝子での検討  
高用量では Sgk1, Gilz, Fkbp5, Atp1a1 の上昇を認めた。一方低用量では Gilz, Atp1a1 で上昇傾向を認めるのみで Sgk1, Fkbp5 については変化を認めなかった。  
・ Na 輸送体遺伝子の検討  
Slc12a3 (NCC) についてはいずれの濃度でも上昇を認めなかった。一方、拡大像 Scnn1a (ENaC) については濃度依存的に上昇が認められた。

Na 輸送体発現・活性化の変化  
高用量では NCC の発現、活性化ともに変化を認めなかった。低用量では発現は変化しなかったが、活性化が増加した。ENaC は高用量・低用量とも発現増加を認めたが、いずれも活性化は認めなかった。

(3) 組織特異的 MR, GR 欠損マウスの作出と解析  
Pax8MR, Pax8GR ともメンデル比に従って該当ジェノタイプが得られた。ドキシサイクリン 2 週間投与により遺伝子発現、免疫蛍光染色により汎尿管での抑制が確認できた (図 5)。Pax8GR では電解質異常、血圧異常は認められなかった。高用量デキサメタゾン投与による Sgk1, Gilz,

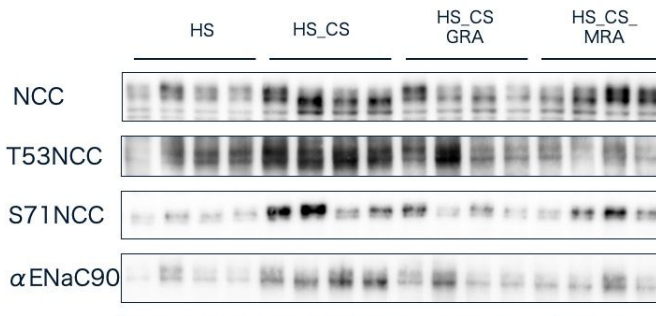


図3. CSによる遠位ネフロンNa輸送体の変化  
NCCとENaC  $\alpha$  subunit ( $\alpha$ ENaC) の膜分画での発現。HS: 高食塩食、CS (コルチコステロン)、GRA: GR拮抗薬RU486、MRA: MR拮抗薬Spironolactone、T53NCC, S71NCC: リン酸化NCC (活性型)、 $\alpha$ ENaC90: full size  $\alpha$ ENaC、 $\alpha$ ENaC30: cleaved  $\alpha$ ENaC (活性型)

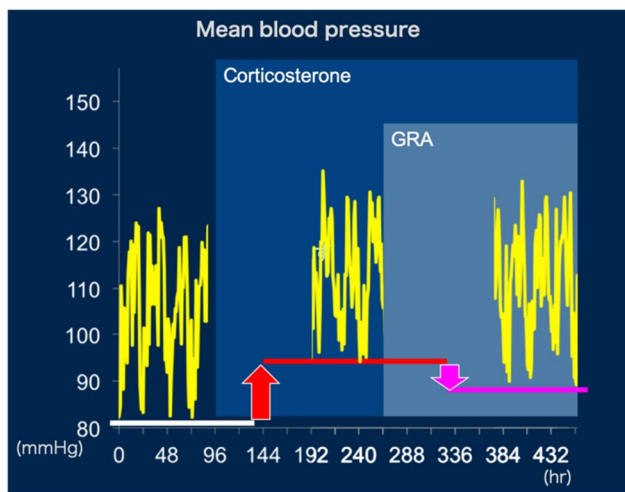


図4. 生理的濃度コルチコステロンによる血圧変化

野生型マウスに生理的濃度のコルチコステロンを投与した際の血圧の代表的な変化を示す。横線であらわす日中の血圧低下はCS投与で上昇する一方、GRA投与で低下した。夜間の血圧上昇は認めなかった。

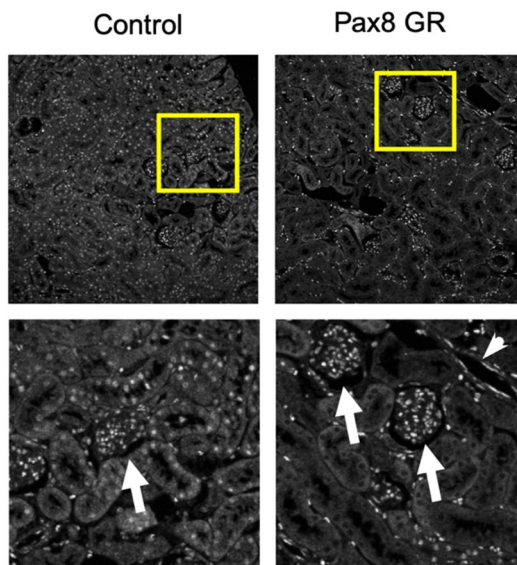


図5. 汎尿管特異的GR欠損マウスのGR発現

0.1%ドキシサイクリン食2週間投与後のGR発現を免疫蛍光染色で確認した。Pax8 GRマウスの腎組織では糸球体 (矢印)、血管構成細胞 (矢頭) にはGR発現が確認されるが、尿管ではGRの発現が欠損していた。下は上図の黄枠部分の拡大像。

Fkbp5, Atp1a1 の上昇は抑制された。ENaC の遺伝子発現上昇も抑制された。また ENaC の発現上昇は抑制された (図 6)。

$\alpha$ ENaC  
90kDa



図6. デキサメタゾンによるENaC発現

デキサメタゾンによりfull length  $\alpha$ ENaCの発現が増加するが、Pax8 GRではこの反応が消失する。Ctr: Controlマウス, KO: Pax8 GR, Dexa:高用量デキサメタゾン

## まとめ

生理的用量の範囲でも CS の投与は NCC、ENaC の活性化に十分な上昇をきたし、睡眠時の CS の不適切な上昇が夜間の降圧不良をきたす可能性が見出された。この作用は主に MR を介していると考えられてきており、実際報告者の結果からも MR が主要な作用を果たしていることが確認できた。一方、これまで機能のあきらかであった尿細管 GR が遠位尿細管での NCC の活性化、結合尿細管・集合管での ENaC の発現調節に低濃度の CS、デキサメタゾンでも作用しうる可能性が見出された。組織特異的 MR、GR 欠損マウスの繁殖が十分に行えなかったため詳細な機序の解明にはいたらなかったが、作出したマウス系統を用いて今後より詳細な解析を進める展望が得られた。

## 5 . 主な発表論文等

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。