

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤（C）
 研究期間：2007 年～2008 年
 課題番号：19590929
 研究課題名（和文）腎障害・心血管障害の分子機構における新しいホルモン／受容体系の役割の検討
 研究課題名（英文）Molecular mechanism of the novel hormone/receptor systems in renal and cardiovascular dysfunction
 研究代表者
 戸恒 和人（TOTSUNE KAZUHITO）
 東北大学・大学院薬学研究科・准教授
 研究者番号：10217515

研究成果の概要：最近発見されたホルモン／受容体系の腎障害・心血管障害における役割を検討した。腎不全・心不全動物モデルにて URP, AM2, (プロ) レニン受容体((P)RR)の発現が心臓または腎臓で変化すること、AM2 の遺伝子多型は 24hABP 及び慢性腎疾患に関係し、(P)RR の遺伝子多型が 24hABP、左室肥大、脳ラクナ梗塞と関連することを見いだした。これらホルモン／受容体系が実際に腎障害・心血管障害に関与していることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・臨床内科学

キーワード：遺伝子、循環器、高血圧、生理活性因子、発現・制御、腎障害

1. 研究開始当初の背景

慢性腎障害は何故進行するのか？これまでの研究で、腎障害の進行にはレニン・アンジオテンシン系（RAS）に加えて複数の生理活性物質が複雑に関わっていることが判明している。概して、血管収縮作用と細胞増殖促進作用を持つ物質は臓器障害性に働き、血管拡張作用と細胞増殖抑制因子作用を持つ物質は臓器保護性に働く傾向がある。最近新しい血管収縮性因子としてウロテンシン II（U II）及びその構造が U II と共通すると同時に U II と同じ受容体 GPR14 と結合する新しいホルモン、ウロテンシン II 関連ペプチド（URP）が発見され、また RAS の新しい構成

因子として（プロ）レニン受容体((P)RR)が同定された。これらはリガンド／受容体系として、腎障害及び心血管障害に深く関与しているものと予想された。

2. 研究の目的

本研究では、(1)その血管収縮性が A II や ET-1 よりも強力であるウロテンシン II（U II）とウロテンシン II 関連ペプチド（URP）、(2)最近その存在が証明されたがまだ病態生理学的意義が明らかとなっていない（プロ）レニン受容体((P)RR)、及び、(3)血管拡張性因子であり臓器保護作用が期待されるアドレノメデュリン II（AM2）/AM2 受容体系に着目

し、それぞれの作用とリガンド/受容体系としての腎障害及び心血管障害の分子機構における役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) 動物疾患モデルでの検討 (戸恒が担当)

5/6 腎摘腎不全モデル・心不全モデル・自然発症高血圧モデルを作成し、UII・URP/GPR14 系及び (プロ) レニン/(P)RR 系の腎障害・心血管障害・高血圧への関与を検討した。腎臓・心臓血管での (P)RR の発現の変化を競合的 RT-PCR 法、免疫染色、ウェスタンブロットにより調べた。対象遺伝子としては、臓器保護作用が期待される AM2/CRLR+RAMPs 系の各因子をも加えた。

(2) 抗 (プロ) レニン受容体抗体の作成 (戸恒、高橋が担当)

本研究では、市販の抗 (プロ) レニン受容体抗体を使用するとともに、独自に抗体を作成し、①動物疾患モデルでの心臓、腎臓組織での (P)RR 蛋白発現を免疫染色、ウェスタンブロットにより検討した。また、②血液中に (P)RR 可溶画分が存在するか否かを検討した。

(3) 大迫研究における遺伝子多型分析 (戸恒、今井が担当)

本研究では、UII/URP、(P)RR、AM2 の遺伝子多型を対象とする。大迫地域住民約 2500 名からインフォームドコンセントとともに提供された DNA を用いて遺伝子多型と表現系としての腎障害・心血管イベントの発症・血圧値との関わりを検討した。PCR-RFLP 法、TaqMan 法等を適宜用いた。

4. 研究成果

(1) 動物疾患モデルでの検討

① UII・URP/GPR14 系の腎障害・心血管障害・高血圧への関与を検討するため、5/6 腎摘腎不全モデル・心不全モデルを作成し、腎臓・心臓血管での mRNA の発現の変化を競合的 RT-PCR 法、免疫染色法により調べた。結果、URP mRNA が心不全心臓で発現が増加しており (Peptides 2008, 21:801-808)、また、URP mRNA が腎不全及び高血圧モデルの腎臓で発現が増加していることを見出し、報告した (Peptides 2009, 22:294-299)。本結果は UII・URP の拮抗薬が腎障害・心血管障害・高血圧の治療薬として有効であることを示唆している。UII・URP の拮抗薬は現在第 II 相の治験段階にあり、ヒトでもこの薬の有効性が証明されることが期待される。

② アドレノメデュリン 2 (AM2) はアドレノメデュリンと同様に血管拡張作用を有し、血圧との関連に加えて心臓保護作用を有するこ

とが指摘されている。AM2 の mRNA 発現を心不全ラットモデルで検討した結果、心不全の心臓で発現が増加していることを見出し、報告した (図 1) (第 11 回心血管内分泌代謝学会にて発表、Eur J Heart Fail 2008, 10:840-849、及び第 81 回日本高血圧学会にて発表)。本結果は AM2 のアゴニストまたは AM2 受容体の賦活薬が腎障害・心血管障害・高血圧の治療薬として有効であることを強く示唆した世界で最初の成果である。今後このような薬が開発されることを期待する。

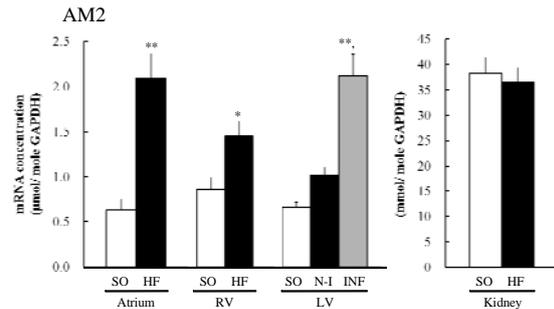


図 1 心不全ラットの心臓及び腎臓における AM2 mRNA の発現。SO:Sham operated rat, HF:heart failure rat, RV:右室, LV:左室, N-I:not infarcted part of LV, INF:infarcted part of LV.

③ (プロ) レニン/(プロ) レニン受容体系の腎障害・心血管障害・高血圧への関与を検討するため、5/6 腎摘腎不全モデル・心不全モデル・自然発症高血圧モデルの腎臓・心臓血管での (プロ) レニン受容体の発現の変化を競合的 RT-PCR 法、Western Blot 法、免疫染色法により調べた。結果、(プロ) レニン受容体の mRNA は心不全の心臓及び腎不全の腎臓で発現が増加していることを見出し、報告した (図 2) (第 30 回日本高血圧学会及び第 40 回米国腎臓学会にて発表)。

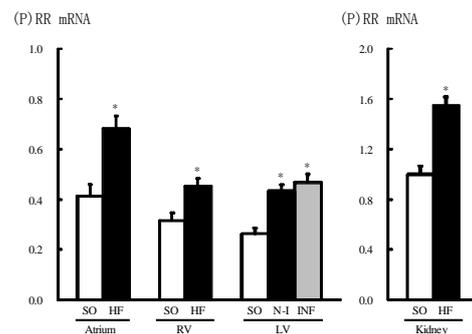


図 2 心不全ラットの心臓及び腎臓における (プロ) レニン受容体の mRNA の発現。SO:Sham operated rat, HF:heart failure rat, RV:右室, LV:左室, N-I:not infarcted part of LV, INF:infarcted part of LV.

また、(プロ) レニン受容体の mRNA は高血圧モデルの心臓及び腎臓で発現が増加してい

ることを見出し、報告した（第 51 回日本腎臓学会にて発表）。

（プロ）レニン受容体の研究はまだ始まったばかりであり、各種病態での（プロ）レニン受容体の発現変化については報告が少なく、本研究結果は主要な疾患である腎障害・心血管障害・高血圧において（プロ）レニン受容体の発現が増加していることを世界に先駆けて見いだしたものである。即ち、本結果はこれら疾患の治療薬として（プロ）レニン受容体の阻害薬を開発するための端緒となる成果であった。

(2) 抗（プロ）レニン受容体抗体の作成と応用

当初、市販の抗（プロ）レニン受容体抗体を購入し免疫染色を試みたが、4種類全てで染色が出来なかった。そこで(P)RR のほぼ中央に近い部位を選択して部分ペプチドを合成し、ウサギに免疫して抗体を得た。本抗体を用いて心臓組織、腎臓組織の染色を行い、良好な結果を得た（図 3）。また、心臓組織、腎臓組織の Western blot を行い、39 kDa に陽性バンドを得た。

本抗体を用いて今後ラジオイムノアッセイまたは ELISA を開発することにより、腎障害・心血管障害における(P)RR の発現度合いを蛋白レベルで定量することが可能となり、これら疾患の病態解明と治療薬の開発に役立つものと期待される。

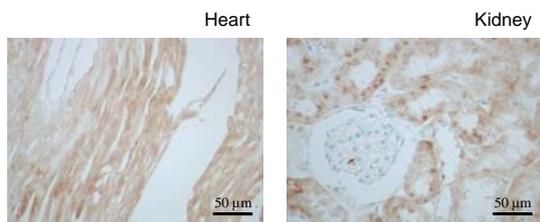


図 3 心臓及び腎臓における（プロ）レニン受容体の発現：抗（プロ）レニン受容体抗体により、心臓（左）では心筋細胞が強く染色され、腎臓（右）では近位尿管が強く染色された。

(3) 大迫研究における遺伝子多型分析

① AM2 の遺伝子多型と血圧との関連を検討した。結果、AM2 rs3840963 I/D 多型にて DD 群は II+ID 群と比較して 24 時間自由行動下血圧の上昇が見られた（第 11 回心血管内分分泌代謝学会にて発表）。

また、AM2 の遺伝子多型と腎機能及び慢性腎臓病(CKD)との関連を検討した。結果、AM2 rs3840963 I/D 多型にて DD 群は II+ID 群と比較して腎機能が有意に低下していることが認められた（第 41 回米国腎臓学会にて発表）。

この遺伝子多型では AM2 の 3 つの isoform の

うち最も強い効果を持つ AM2-53 が欠損し、臓器保護作用が減弱すると考えられた。これらの結果から、AM2 の腎保護作用、特に AM2-53 が腎臓障害の進行防止に有用である可能性が示唆された。

② （プロ）レニン受容体の遺伝子多型と血圧、心血管障害との関連を検討した。まず、（プロ）レニン受容体のプロモーターとエクソン領域のシーケンス解析を行い、11 種の一塩基多型、SNP を同定した（図 4）。これらの SNP は 3 つの完全に連鎖した領域を成していた。よって、遺伝子多型は、3 つの SNP (rs2968915A>G, rs5918007C>T, rs6609080A>G) を(P)RR 遺伝子上の連鎖不平衡領域からそれぞれ選出し遺伝子型を決定した。

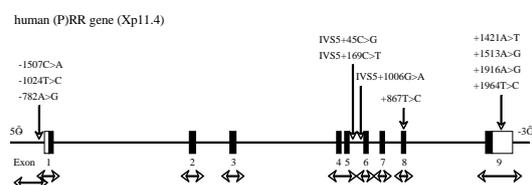


図 4 ヒト（プロ）レニン受容体遺伝子の構造。11 個の一塩基多型 (SNP) が存在し、3 つの完全に連鎖した領域を成していた。

結果、（プロ）レニン受容体の遺伝子多型が日本人男性において 24h 血圧と関連し（第 30 回日本高血圧学会にて発表、Am J Hypertens 2009;22:294-299）、また日本人女性では rs6609080A>G は、左室肥大を有する割合 (AA 群 8.3%、AG 群 16.3%、GG 群 26.7%、P=0.01) 及びラクナ梗塞を有する割合 (AA 群 23.9%、AG 群 25.5%、GG 群 60.0%、P=0.008) と有意に関連した。また、多重ロジスティック回帰分析において、AA 群と比較して、AG 群では左室肥大を有するオッズ比が 2.4 (95%CI: 1.2-4.7)、ラクナ梗塞を有するオッズ比が 1.1 (95%CI: 0.6-1.8) であり、GG 群では左室肥大を有するオッズ比が 3.1 (95%CI: 0.7-11.0)、ラクナ梗塞を有するオッズ比が 4.8 (95%CI: 1.5-17.1) であった。一方、男性、rs2968915A>G, rs5918007C>T、脳白質病変については有意な関連が認められないことを認め、報告した（第 31 回日本高血圧学会にて発表、第 82 回日本内分泌学会シンポジウムにて発表）。

この様に（プロ）レニン受容体はヒトでも実際に心血管・腎臓疾患の発症・進展に深く関与している可能性が高いことを明らかにした。

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 10 件）全て査読有。

- ① Hirose T, Hashimoto M, Totsune K, Metoki H, Asayama K, Kikuya M, Sugimoto K, Katsuya T, Ohkubo T, Hashimoto J, Rakugi H, Takahashi K, Imai Y. Association of (pro)renin receptor gene polymorphism with blood pressure in Japanese men: the Ohasama study. *Am J Hypertens*. 22: 294-299, 2009.
- ② Mori N, Hirose T, Nakayama T, Ito O, Kanazawa M, Imai Y, Kohzuki M, Takahashi K, Totsune K. Increased expression of urotensin II-related peptide and its receptor in kidney with hypertension or renal failure. *Peptides*. 30:400-408, 2009.
- ③ Kikuya M, Ohkubo T, Metoki H, Asayama K, Hara A, Obara T, Inoue R, Hoshi H, Hashimoto J, Totsune K, Satoh H, Imai Y. Day-by-day variability of blood pressure and heart rate at home as a novel predictor of prognosis: the Ohasama study. *Hypertension*. 52:1045-1050, 2008.
- ④ Hirose T, Totsune K, Mori N, Morimoto R, Hashimoto M, Nakashige Y, Metoki H, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Hashimoto J, Sasano H, Kohzuki M, Takahashi K, Imai Y. Increased expression of adrenomedullin 2/intermedin in rat hearts with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail*. 10:840-849, 2008.
- ⑤ Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Totsune K, Saruta M, Suzuki T, Sasano H, Ito S, Takahashi K. Expression of peptide YY in human brain and pituitary tissues. *Nutrition*. 24:878-884, 2008.
- ⑥ Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Hirose T, Totsune K, Imai Y, Arai Y, Suzuki T, Sasano H, Ito S, Takahashi K. Expression of adrenomedullin 2/intermedin in human adrenal tumors and attached non-neoplastic adrenal tissues. *J Endocrinol*. 198:175-183, 2008.
- ⑦ Ishikawa T, Hashimoto J, Morito RH, Hanazawa T, Aikawa T, Hara A, Shintani Y, Metoki H, Inoue R, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Totsune K, Hoshi H, Satoh H, Imai Y. Association of microalbuminuria with brachial-ankle pulse wave velocity: the Ohasama study. *Am J Hypertens*. 21:413-418, 2008.
- ⑧ Nakayama T, Hirose T, Totsune K, Mori N, Maruyama Y, Maejima T, Minagawa K, Morimoto R, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Hashimoto J, Kohzuki M, Takahashi K,

Imai Y. Increased gene expression of urotensin II-related peptide in the hearts of rats with congestive heart failure. *Peptides*. 29:801-808, 2008.

- ⑨ Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Totsune K, Arai Y, Suzuki T, Sasano H, Ito S, Takahashi K. Immunolocalization of urotensin II and its receptor in human adrenal tumors and attached non-neoplastic adrenal tissues. *Peptides*. 29:873-880, 2008.
- ⑩ Nakayama M, Metoki H, Terawaki H, Ohkubo T, Kikuya M, Sato T, Nakayama K, Asayama K, Inoue R, Hashimoto J, Totsune K, Hoshi H, Ito S, Imai Y. Kidney dysfunction as a risk factor for first symptomatic stroke events in a general Japanese population—the Ohasama study. *Nephrol Dial Transplant*. 22:1910-1915, 2007.

[学会発表] (計 17 件)

- ① Totsune K, Hirose T, Mori N, Metoki H, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Hashimoto J, Takahashi K, Imai Y. Decreased expression of adrenomedullin 2 in the kidney of rats with hypertension or chronic renal failure. The American Society of Nephrology, 41st Annual Meeting, 2008. 11.8, Philadelphia, USA.
- ② Totsune K, Hirose T, Nakashige Y, Metoki H, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Hashimoto J, Takahashi K, Imai Y. Adrenomedullin 2 gene I/D polymorphism is associated with blood pressure, renal function, and proteinuria in a Japanese general population: the Ohasama study. The American Society of Nephrology, 41st Annual Meeting, 2008. 11.6, Philadelphia, USA.
- ③ 森本玲、佐藤文俊、村上治、戸恒和人、荒井陽一、鈴木貴、笹野公伸、伊藤貞嘉、高橋和広。ヒト副腎腫瘍における Adrenomedullin 2/ Intermedin の発現。第 31 回日本高血圧学会総会、2008. 10. 9. 札幌
- ④ 廣瀬卓男、橋本和啓、戸恒和人、川村卓也、目時弘仁、浅山敬、菊谷昌浩、大久保孝義、橋本潤一郎、高橋和広、今井潤。(プロ) レニン受容体遺伝子多型と高血圧性臓器障害との関連の検討: 大迫研究。第 31 回日本高血圧学会総会、2008. 10. 9. 札幌
- ⑤ Totsune K, Hirose T, Takahashi K, Imai Y. Adrenomedullin 2 and cardiovascular and renal systems. First meeting of the

Japan Branch of the International Neuropeptide Society, and Tohoku University 21st Century COE Symposium (CRESCENDO). 2008. 9. 1. 仙台

- ⑥ 戸恒和人、廣瀬卓男、中繁由紀子、浅山敬、丸山穰、藤原正子、竹内和久、菊谷昌浩、大久保孝義、橋本潤一郎、高橋和広、今井潤. CKDにおけるAM2 遺伝子多型の関与. 第53回(社)日本透析医学会学術集会・総会. 2008. 6. 20. 神戸
- ⑦ 廣瀬卓男、戸恒和人、森信芳、橋本和啓、中繁由紀子、丸山穰、浅山敬、菊谷昌浩、大久保孝義、橋本潤一郎、高橋和広、今井潤. ラット腎臓におけるレニン受容体及びレニンの遺伝子発現: WKY及びSHRでの検討. 第51回日本腎臓学会学術総会. 2008. 6. 1. 福岡
- ⑧ 戸恒和人、廣瀬卓男、中繁由紀子、橋本和啓、浅山敬、菊谷昌浩、大久保孝義、橋本潤一郎、高橋和広、今井潤. Adrenomedullin2 遺伝子多型とCKDとの関連の検討. 第51回日本腎臓学会学術総会. 2008. 6. 1. 福岡
- ⑨ 戸恒和人、廣瀬卓男、森信芳、橋本和啓、中繁由紀子、浅山敬、菊谷昌浩、大久保孝義、橋本潤一郎、高橋和広、今井潤. 自然発症高血圧ラットの心臓・腎臓におけるウロテンシンII、ウロテンシンII関連ペプチド、ウロテンシンII受容体の遺伝子発現. 第81回日本内分泌学会学術総会. 2008. 5. 16. 青森
- ⑩ 廣瀬卓男、戸恒和人、森信芳、中繁由紀子、橋本和啓、浅山敬、菊谷昌浩、大久保孝義、橋本潤一郎、高橋和広、今井潤. 心臓におけるAdrenomedullin 2 の発現変化: 心不全ラットでの検討. 第81回日本内分泌学会学術総会. 2008. 5. 16. 青森
- ⑪ Takahashi K, Zhang Y, Li Y. Ap 1 and AP-2a synergistically activate the gene promoter of human adrenomedullin, a potent vasodilator peptide. 22nd Scientific Meeting of International Society of Hypertension. Hypertension Berlin 2008. 2008. 5. 15. Berlin, Germany
- ⑫ Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Hirose T, Totsune K, Imai Y, Arai Y, Suzuki T, Sasano H, Ito S, Takahashi K. Expression of adrenomedullin 2/intermedin in human adrenal tumors and attached non-neoplastic adrenal tissues. 22nd Scientific Meeting of International Society of Hypertension Berlin 2008. 2008. 5. 14, Berlin, Germany
- ⑬ 中繁由起子、戸恒和人、廣瀬卓男、橋本和啓、浅山敬、菊谷昌浩、大久保孝義、

橋本潤一郎、高橋和広、今井潤. Adrenomedullin 2/Intermedin (AM2/IMD) 遺伝子多型と高血圧症との関連の検討. 第11回日本心血管内分泌代謝学会. 2007. 11. 17. 東京

- ⑭ 廣瀬卓男、戸恒和人、森信芳、中繁由起子、橋本和啓、菊谷昌浩、大久保孝義、橋本潤一郎、高橋和広、今井潤. 心不全ラット心臓におけるAdrenomedullin 2/Intermedinの遺伝子発現. 第11回日本心血管内分泌代謝学会. 2007. 11. 17. 東京
- ⑮ Totsune K, Hirose T, Maejima T, Mori N, Maruyama Y, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Hashimoto J, Takahashi K, Imai Y. Renal gene expression of (pro)renin receptor: Upregulation in rats with chronic renal failure. The American Society of Nephrology, 40th Annual Meeting. 2007. 11. 3. San Francisco, USA
- ⑯ 廣瀬卓男、戸恒和人、森信芳、前嶋隆弘、橋本和啓、中繁由起子、目時弘仁、原梓、森戸里衣子、浅山敬、菊谷昌浩、大久保孝義、橋本潤一郎、上月正博、高橋和広、今井潤. 心不全ラットの心臓・腎臓における(プロ)レニン受容体の遺伝子発現. 第30回日本高血圧学会総会. 2007. 10. 25. 沖縄
- ⑰ 橋本和啓、戸恒和人、廣瀬卓男、目時弘仁、渡邊悠美子、中繁由起子、井上隆輔、浅山敬、菊谷昌浩、大久保孝義、橋本潤一郎、高橋和広、今井潤. (プロ)レニン受容体遺伝子多型と高血圧症との関連の検討: 大迫研究. 第30回日本高血圧学会総会. 2007. 10. 25. 沖縄

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸恒 和人 (TOTSUNE KAZUHIITO)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号: 10217515

(2) 研究分担者

高橋 和広 (TAKAHASHI KAZUHIRO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 80241628

今井 潤 (IMAI YUTAKA)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 40133946

(3) 連携研究者