

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890176
 研究課題名（和文） 腎障害増悪因子受容体への機能抑制性新規結合蛋白の腎での機能と発現調節に関する検討
 研究課題名（英文） Renal function and regulation of an inhibitory binding molecule of renal injury-promoting receptor
 研究代表者
 池谷 裕子（IKEYA YUKO）
 横浜市立大学・医学部・助教
 研究者番号：60453049

研究成果の概要：腎障害から腎不全へと至る過程においてレニン-アンジオテンシン系の AT1 受容体情報伝達系の腎局所での活性化は病態進展の中心的役割を演じている。AT1 受容体への新規直接結合性機能抑制因子として ATRAP (Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein) が報告されており、本研究課題では、この ATRAP について、高レベルの発現が認められる腎での発現調節と機能に焦点をあてて、培養細胞、実験動物を用いて細胞レベルおよび個体レベルでの総合的解析を行い、ATRAP の腎細胞での機能解析、および生体腎での詳細な発現分布と病態での発現調節について検討を加え、その結果組織局所における ATRAP 発現調節が腎傷害と密接に関連していることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：受容体, 腎障害, 生体分子, 高血圧, トランスレーショナルリサーチ.

1. 研究開始当初の背景

レニン-アンジオテンシン系の生理活性物質アンジオテンシン II は主要な受容体である AT1 受容体に作用して下流の情報伝達系を活性化することにより、高血圧、心肥大、心不全、動脈硬化、腎障害などの心血管病および腎不全の発症・進展に深くかかわっており、この系のより効率的な抑制によりこれら疾

患の予防および治療効果の向上を図ることは高齢化社会を迎えつつある日本にとって重要である。申請者の所属する研究室ではこれまで一貫してレニン-アンジオテンシン系遺伝子発現調節機構とアンジオテンシン情報伝達系のその病態生理学的意義に関する分子生物学的研究および発生工学的研究を行っており、レニンおよびアンジオテンシノ

ーゲン遺伝子の発現調節における近位プロモーター領域の重要性、心血管系細胞・組織における特異的なレニンおよびアンジオテンシノーゲン遺伝子の発現調節機構、およびアンジオテンシノーゲン遺伝子欠損マウス由来心筋細胞を用いた系での gp130 蛋白を介するサイトカイン経路の重要性などについて明らかにしてきた。最近ではレニン-アンジオテンシン系の新規活性制御因子の探索とその機能解析を行っており、レニン遺伝子発現活性化に核受容体の一種 LXR が関与することや(11)、AT1 受容体刺激による心血管系リモデリング促進遺伝子発現の増加に転写制御因子 AP1 が関与することを明らかにした。

研究代表者は、地域の中核病院の腎臓内科に4年間勤務して臨床高血圧腎臓病学を学んだ後に横浜市立大学大学院医学研究科に入学して、透析患者の閉塞性動脈硬化に対する LDL apheresis 療法の分子レベルでの作用機序についての研究、および AT1 受容体に直接結合してその機能を調節している可能性が高い新規因子として遺伝子クローニングされた ATRAP (Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein) に対する特異的抗体の作製と生体内組織分布解析の研究をおこなってきた。ATRAP の機能および病態生理学意義については不明な点が多いが、研究代表者らによる予備的研究では、ATRAP が心筋細胞においては AT1 受容体の internalization を促進して AT1 受容体を介する心肥大反応を抑制しうる可能性が明らかにされている。また、興味深いことに、申請者による予備的研究結果においては、生体では ATRAP の発現は特に腎において高く認められ、腎における ATRAP の機能は重要な役割を担っていると予想された。

2. 研究の目的

本研究では、ATRAP について、高レベルの発現が認められる腎での発現調節と機能に焦点をあてて、培養細胞、実験動物、およびヒト腎組織を用いて細胞レベルおよび個体レベルでの総合的解析を行い、ATRAP の腎細胞での機能解析、および生体腎での詳細な発現分布と病態での発現調節について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 正常血圧マウス腎での ATRAP の局所発現分布およびマウス腎での発現調節についての検討。

正常血圧マウス (c57BL6) の腎における内在性 ATRAP の局所発現解析のために、腎血管壁、糸球体、尿細管各セグメントにおける発現レベルについて、ATRAP mRNA については *in situ hybridization* 法により、また ATRAP 蛋白についてはポリクローナル抗 ATRAP 抗体を用いて免疫組織染色法により詳細に検討するとともに、AT1 受容体発現部位との共局在性についても比較検討した。

(2) 高食塩負荷、Ang II 負荷、および遺伝性高血圧ラットの腎における ATRAP の発現調節の検討。

腎レニン-アンジオテンシン系は腎の発生・形態形成にも関与しているために、腎の発生段階における ATRAP の局所発現分布・変動と腎の形態形成との関連性について調べる。また、生体の塩分摂取量の変動や循環レニン-アンジオテンシン系の活性状態に応じて、腎での AT1 受容体の発現が変化して腎の循環生理作用や水電解質代謝機能を制御することが明らかにされているために、成体マウスに対して塩分負荷あるいは塩分制限をした場合、および皮下の浸透圧ポンプにて持続的にアンジオテンシン II を投与した場合の、腎での ATRAP の局所発現分布・変動および AT1 受容体の発現調節との比較検討を行った。

また、遺伝性高血圧ラットにおける高血圧および腎病変の進行にともなう腎 ATRAP の発現調節を、Northern blot 法、Real-time PCT 法、Western blot 法、および免疫組織法により検討する。また、これら遺伝性高血圧ラットに対して AT1 受容体拮抗薬 (ARB) をはじめとする各種降圧薬を投与し、これら降圧薬の降圧効果と腎硬化病変改善度について、腎での ATRAP および AT1 受容体、Na⁺トランスポーターや Na⁺チャンネル、および腎線維化に関与する細胞外基質遺伝子 (TGFβ, collagen など) の一連の発現の変化と関連づけて検討した。

4. 研究成果

(1) 特異的にATRAP蛋白を認識するポリクローナル抗マウスATRAP抗体を作製し、この抗体を用いて正常血圧マウス (c57BL6) の腎における内在性ATRAPの局所発現解析をおこない、腎血管壁、糸球体、尿細管各セグメントにおける発現レベルについて解析した。同時に ATRAP mRNA について in situ hybridization法により検討した。これらの解析結果からはATRAPとAT1受容体発現部位との高い共局在性についても明らかになった。

(2) 腎における ATRAP の発現は塩分摂取量やアンジオテンシン II 投与によってその発現量が増加し、腎における相対的な ATRAP/AT1 受容体発現量比が腎における Na⁺再吸収や血圧制御に関与している可能性が明らかになった。また、遺伝性高血圧ラットにおいても高血圧の進展にともない腎 ATRAP の発現低下がみられ、AT1 受容体拮抗薬投与によって回復がみられたため、組織局所における ATRAP 発現調節が腎傷害と密接に関連していることが明らかになった。

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)

- 1 Mitsuhashi H, Tamura K, Yamauchi J, Ozawa M, Yanagi M, Dejima T, Wakui H, Ohsawa M, Maeda A, Tsurumi-Ikeya Y, Okano Y, Ishigami T, Toya Y, Tokita Y, Ohnishi T, Umemura S. Effect of losartan on ambulatory short-term blood pressure variability and cardiovascular remodeling in hypertensive patients on hemodialysis. **Atherosclerosis**, in press. (査読有)
- 2 Shigenaga A, Tamura K, Dejima T, Ozawa M, Wakui H, Masuda S, Azuma K, Tsurumi-Ikeya Y, Mitsuhashi H, Okano Y, Kokuho T, Sugano T, Ishigami T, Toya Y,

- Uchino K, Tokita Y, Umemura S. Effects of Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker on Blood Pressure Variability and Cardiovascular Remodeling in Hypertensive Patients on Chronic Peritoneal Dialysis. **Nephron Clin Pract** 112: c31-c40, 2009. (査読有)
- 3 Tsurumi-Ikeya Y, Tamura K, Azuma K, Wakui H, Masuda S, Ozawa M, Shigenaga A, Yabana M, Toya Y, Ohnishi T, Umemura S. Effect of LDL Apheresis on Atherosclerosis is beyond Its Cholesterol Lowering in Hemodialysis Patients: A Pilot Study. **Jpn J Apheresis**, 27: 231-235, 2008. (査読有)
 - 4 Shigenaga A, Tamura K, Wakui H, Masuda S, Azuma K, Tsurumi-Ikeya Y, Ozawa M, Mogi M, Matsuda M, Uchino K, Kimura K, Horiuchi M, Umemura S. Effect of olmesartan on tissue expression balance between angiotensin II receptor and its inhibitory binding molecule. **Hypertension**, 52: 672-678, 2008. (査読有)
 - 5 Ozawa M, Tamura K, Iwatsubo K, Matsushita K, Sakai M, Tsurumi-Ikeya Y, Azuma K, Shigenaga A, Okano Y, Masuda S, Wakui H, Ishigami T, Ishikawa T, Umemura S. Ambulatory blood pressure variability is increased in diabetic hypertensives. **Clin Exp Hypertens. Clin Exp Hypertens.** 30:213-224, 2008. (査読有)
 - 6 Tamura K, Yamauchi J, Tsurumi-Ikeya Y, Sakai M, Ozawa M, Shigenaga A, Azuma K, Okano Y, Ishigami T, Toya Y, Yabana M, Tokita Y, Ohnishi T, Umemura S. Ambulatory blood pressure and heart rate in hypertensives with renal failure: comparison between diabetic nephropathy and non-diabetic

- glomerulopathy. **Clin Exp Hypertens.** 30: 33-43, 2008. (査読有)
- 7 Sakai M, Tamura K, Tsurumi Y, Tanaka Y, Koide Y, Matsuda M, Ishigami T, Yabana M, Tokita Y, Hiroi Y, Komuro I, Umemura S. Expression of MAK-V/Hunk in renal distal tubules and its possible involvement in proliferative suppression. **Am J Physiol Renal Physiol.** 292:F1526-F1536, 2007. (査読有)
- 8 Azuma K, Tamura K, Shigenaga A, Wakui H, Masuda S, Tsurumi-Ikeya Y, Tanaka Y, Sakai M, Matsuda M, Hashimoto T, Ishigami T, Lopez-Illasaca M, Umemura S. Novel regulatory effect of angiotensin II type 1 receptor-interacting molecule on vascular smooth muscle cells. **Hypertension.** 50:926-932, 2007. (査読有)
- 9 Tamura K, Tanaka Y, Tsurumi Y, Azuma K, Shigenaga A, Wakui H, Masuda S, Matsuda M. The role of angiotensin AT1 receptor-associated protein in renin-angiotensin system regulation and function. **Curr Hypertens Rep.** 9:121-127, 2007. (査読有)
- 10 Tamura K, Tsurumi Y, Sakai M, Tanaka Y, Okano Y, Yamauchi J, Ishigami T, Kihara M, Hirawa N, Toya Y, Yabana M, Tokita Y, Ohnishi T, Umemura S. A possible relationship of nocturnal blood pressure variability with coronary artery disease in diabetic nephropathy. **Clin Exp Hypertens.** 29:31-42, 2007. (査読有)

[学会発表] (計2件)

- 1 Ikeya Y, Tamura K, Azuma K, Masuda S,

- Wakui H, Ozawa M, Kanaoka T, Miyamoto K, Mitsunashi M, Toya T, Umemura S. Low Density Lipoprotein Apheresis Inhibits Oxidative Stress and Improves Endothelial Cell Function in Patients with Peripheral Arterial Disease and End-Stage Renal Disease. Renal Week 2008. 42nd Annual Meeting & Scientific Exposition of American Society of Nephrology (Philadelphia, PA), Nov 4-9, 2008.
- 2 Wakui H, Tamura K, Matsuda M, Shigenaga A, Masuda S, Azuma K, Tsurumi-Ikeya Y, Ozawa M, Okano Y, Toya Y, Minamisawa S, Umemura S. Tissue-specific regulation of angiotensin II type 1 receptor-interacting molecule ATRAP expression in angiotensin II-induced hypertension. Oral Session VIII: New Faces of the Renin-Angiotensin System. 61st Annual High Blood Pressure Research Conference 2007 (Tucson, AZ) . Sep 26-29, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池谷 裕子 (IKEYA YUKO)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：60453049

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし