

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08586

研究課題名(和文) LPIN1遺伝子に着目した高血圧の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathophysiology of hypertension with a focus on the LPIN1 gene.

研究代表者

藤原 亮 (FUJIWARA, AKIRA)

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・助教

研究者番号：20733447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはゲノムワイド関連解析によりLPIN1遺伝子が高血圧感受性遺伝子であることを報告した。そこでLPIN1遺伝子が実際に血圧に影響することを確認するために、LPIN1遺伝子欠損マウス(fldマウス)を用いて実験を行った。fldマウスは自由行動下24時間持続血圧測定において収縮期血圧と心拍数が有意に上昇しており、尿中カテコラミン排泄量が有意に増加していた。また中枢性交感神経抑制薬であるクロニジンに対する高い血圧応答を示した。これらの結果より、fldマウスの血圧上昇には交感神経系の活性亢進が関与していると考えられ、LPIN1遺伝子が本態性高血圧症の新たな標的遺伝子となることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国の高血圧者数は約4300万人と推定され、高血圧に起因する脳心血管病死亡者数は年間約10万人であり、脳心血管病死亡の最大の要因である。しかし、3種類以上の降圧薬を用いても血圧がコントロールできない治療抵抗性高血圧は、10%以上にも達すると報告されており、血圧のコントロールは喫緊の課題である。本研究は、LPIN1遺伝子が生体レベルでも血圧調節に重要な役割を果たしていることを示した初めての報告であり、本態性高血圧症の新しい治療薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We previously showed LPIN1 to be a candidate gene for essential hypertension by genome-wide association studies. However, little is known about the association between LPIN1 and blood pressure (BP). Therefore, we evaluated BP and mechanisms related BP in LPIN1-deficient [fatty liver dystrophy (fld)] mice. Fld mice had significantly elevated systolic BP and heart rate as measured by a radiotelemetric method. Fld mice showed elevated urinary catecholamine excretion and high BP response to clonidine (2-adrenergic receptor agonist). The elevated BP in fld mice may result from activation of the sympathetic nervous system. These results indicate that LPIN1 plays a crucial role in blood pressure regulation and that LPIN1 is a new target gene for essential hypertension.

研究分野：高血圧

キーワード：高血圧 LPIN1遺伝子 fld 交感神経 脂質代謝

## 1. 研究開始当初の背景

本邦の高血圧患者数はおよそ 4300 万人 (2010 年) と推定され、高血圧は心血管病の最大の危険因子である。しかし、3 種類以上の降圧薬を用いても血圧がコントロールできない治療抵抗性高血圧は、降圧治療中の患者の 10% 以上にも達すると報告されており、カルシウム拮抗薬、レニン・アンジオテンシン系 (RAS) 阻害薬、利尿薬、遮断薬、遮断薬などとは異なった種類の降圧薬の開発が望まれている。一方、遺伝子解析技術の進歩により、網羅的疾患感受性遺伝子解析 (GWAS: ゲノムワイド関連解析) が可能となり、高血圧の分野でも 2009 年頃から本格的に開始され、さまざまな国や地域でコンソーシアムベースの大規模 GWAS が行われ、200 を超える高血圧関連遺伝子座位が発見されている。

われわれの研究グループは他大学との共同研究により、ヒトの SNP (一塩基多型) を用いた解析で *ATP2B1* 遺伝子が高血圧に感受性を示す遺伝子であることを同定した。さらに、*ATP2B1* 遺伝子が生体に与える影響を確認するため、血圧上昇を示したヒト臍帯動脈の遺伝子多型と *ATP2B1* 遺伝子の mRNA の発現量を測定し、*ATP2B1* 遺伝子の発現低下と血圧上昇が関連することや *ATP2B1* 遺伝子ノックアウトマウスを用いて血圧が上昇することを明らかにしてきた。一方、マイクロサテライトマーカーを用いた解析においても、*LPIN1* 遺伝子が高血圧に感受性を示す遺伝子であることを同定した (Yatsu K et al, Hypertension 2007)。

## 2. 研究の目的

*LPIN1* 遺伝子は、脂肪萎縮症のモデルマウスである fatty liver dystrophy (fld) マウスの原因遺伝子として 2001 年に発見されており、fld マウス (fld/fld) では全身の脂肪組織が欠落し、糖尿病・インスリン抵抗性・高トリグリセリド血症の病態を示す。しかし、fld マウスの糖脂質代謝に関する研究は多数報告されているが、血圧に関する報告はほとんどなされていない。そこで本研究の目的は、*LPIN1* 遺伝子のノックアウトマウスである fld マウスにおいて、血圧が上昇すること、およびその機序を明らかにすることとした。血圧上昇のメカニズムの解明は新規降圧薬の創薬に結びつき、血圧上昇による心血管病を抑制し、ヒトでの生命予後の改善につながる可能性がある。

## 3. 研究の方法

fld (fld/fld) マウスおよび対照群マウスを用いて以下の実験を実施した。

### (1) fld マウスの血圧および基礎データの解析

テイルカフ法による血圧測定の先行実験では、fld マウスは対照群マウスと比較して血圧・脈拍が有意に上昇していることが明らかになっている。そこで、代謝ケージ飼育下でラジオテレメトリー法 (自由行動下 24 時間持続血圧測定法) を用いて一日の血圧・脈拍・行動を測定し、血圧の変動性や脈拍数との関連について解析を行った。実験は 8~12 週齢のオスマウスを用いて行い、n=7~9 とした。測定には DSI (Data Sciences International) 社のソフトウェアを使用し、解析には GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc.) の 2way ANOVA 法を使用した。また、代謝ケージ飼育下で蓄尿検体を採取し、基礎データおよび尿中カテコールアミン排泄量、尿中 NOx (窒素酸化物) 排泄量を測定し、最終日には血液・生化学検査および血中カテコールアミンや RAS 系の内分泌ホルモン検査を行った。その他、腎臓や肝臓でのレニン、アンジオテンシノーゲンの mRNA の発現量の測定や副腎組織切片を作成し顕微鏡レベルでの副腎の変化の観察を行った。

### (2) fld マウスに対する薬剤 (降圧薬) 投与試験

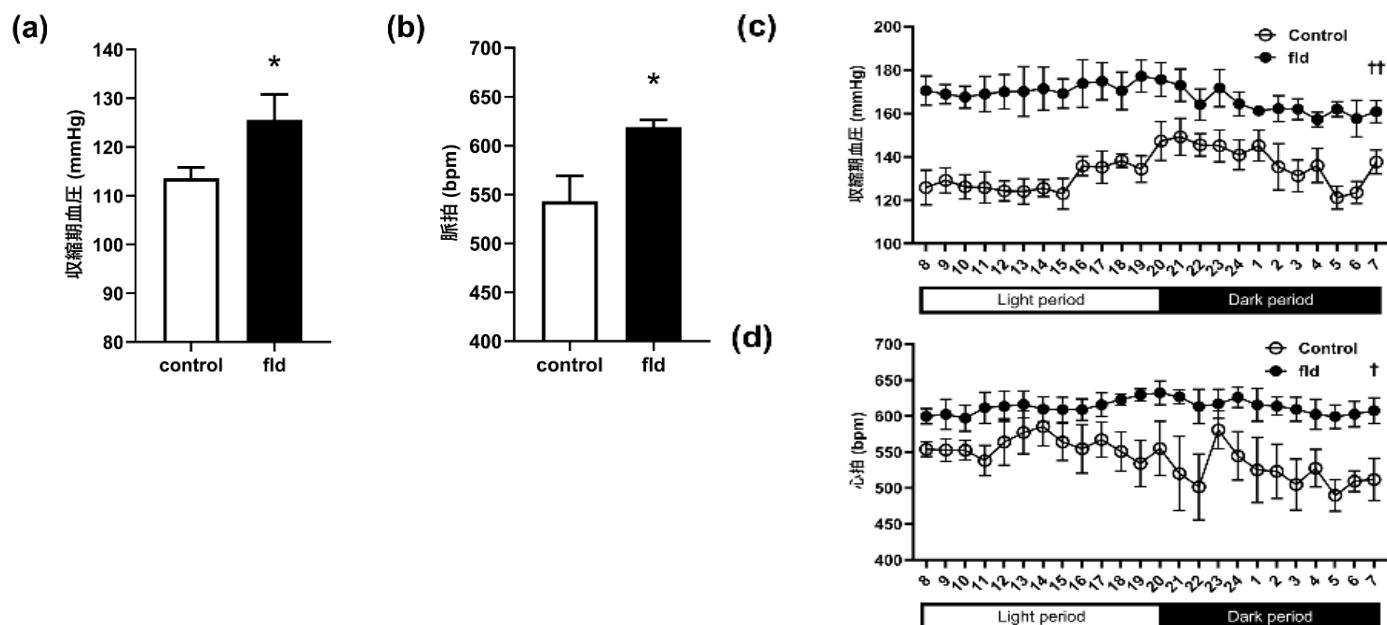
fld マウスでは、脈拍や尿中カテコールアミンの排泄量が増加していることが明らかになった。そこで、fld マウスにおける血圧上昇にカテコールアミンの増加が関与することを明らかにするために、fld マウスおよび対照群マウスに対して選択的  $\alpha_2$  受容体遮断薬であるクロニジン (100 $\mu$ g/kg)、およびカルシウム拮抗薬であるニカルジピン (300 $\mu$ g/kg) の腹腔内投与を行い、30 分後・60 分後にテイルカフ法で血圧・脈拍を測定し、降圧の程度を確認し、交感神経の活性化について検討を行った。

### (3) fld マウスに対する脂肪移植実験

fld マウスの血圧の変化に糖脂質代謝異常が与える影響を確認し、血圧上昇の成因を検討するため、脂肪移植実験を行った。これまでの脂肪組織と血圧の関連を示した報告によると、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカイン (レプチンやアディポネクチンなど) の低下が交感神経系を活性化し、血圧を上昇させる可能性が考えられる。そこで fld マウスの同腹子の野生型マウスから脂肪組織を採取し、fld マウスに脂肪を移植 (500mg) した群と sham 手術を施行した群とを比較した。移植 4 週後、移植 8 週後に血圧測定、脈拍測定、体重、尿量、尿生化学検査などの基礎データの採取を行った後、アディポカインやレプチンを含めた脂質代謝マーカーの測定および臓器採取・組織染色を行った。

#### 4. 研究成果

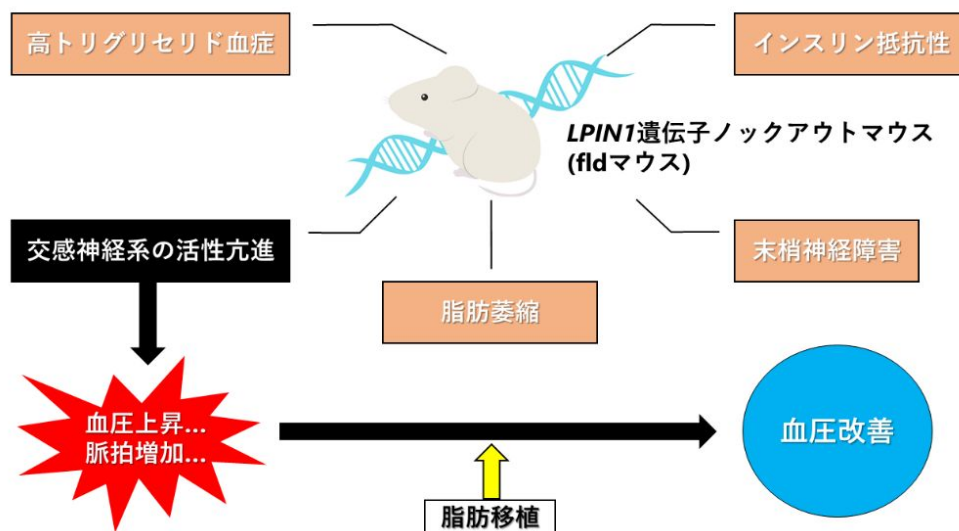
テイルカフ法およびラジオテレメトリー法を用いた血圧測定では、対照群マウスと比較して fld マウス群の収縮期血圧と脈拍・心拍数が 24 時間持続して上昇しており、日内変動が消失していた (図 a~d)。



また、fld マウスでは尿中アドレナリンおよびノルアドレナリンの排泄量が増加していた。さらに、血圧上昇に他の機序が関与している可能性を考慮し、尿中 NOx (窒素酸化物) 排泄量や腎臓や肝臓でのレニン、アンジオテンシノーゲンの mRNA の発現量を検討したが、有意な差は認められなかった。副腎の組織切片でも同様に明らかな変化は認められなかった。

次に、薬剤 (降圧薬) 投与試験を実施したところ、対照群マウスと比較して fld マウス群でクロニジン (中枢性交感神経抑制薬) に対する降圧反応が増強されていた。一方、カルシウム拮抗薬に対する反応は同等であった。さらに、脂肪移植実験では sham 手術群と比較して脂肪移植群で 8 週間後に収縮期血圧が有意に低下 (改善) していた。

これらの結果より、fld マウスは高血圧を呈し、そのメカニズムとして交感神経系の活性亢進の関与が考えられた。さらに脂肪移植実験から、fld マウスの交感神経系の活性亢進にアディポサイトカインの低下が関与している可能性が考えられた。よって、GWAS で検出された高血圧感受性遺伝子である *LPIN1* 遺伝子は血圧調節に重要な役割を果たし、本態性高血圧症の新たな標的遺伝子となり、新しい治療薬の開発につながる可能性がある。今後、ヒトにおける *LPIN1* 遺伝子の働きをより詳細に明らかにする必要がある。



本研究成果は国際高血圧学会 (International Society of Hypertension 2020 Scientific Meeting) にて発表予定であったが、COVID-19 感染症の流行により演題を取り下げた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujiwara Akira, Ozawa Moe, Sumida Koichiro, Hirawa Nobuhito, Yatsu Keisuke, Ichihara Nao, Haze Tatsuya, Komiya Shiro, Ohki Yuki, Kobayashi Yusuke, Wakui Hiromichi, Tamura Kouichi	4. 巻 40(3)
2. 論文標題 LPIN1 is a new target gene for essential hypertension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Hypertension	6. 最初と最後の頁 536-543
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/HJH.0000000000003046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原 亮
2. 発表標題 本態性高血圧症の新しい候補遺伝子LPIN1の研究
3. 学会等名 日本高血圧学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 藤原亮	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ライフサイエンス	5. 総ページ数 不明
3. 書名 Progress in Medicine 高血圧医療のニューノーマル ゲノム情報を活用した高血圧のリスク予測 - 遺伝および環境因子 -	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	平和 伸仁  (HIRAWA NOBUHITO)  (20315766)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授    (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------