

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17576

研究課題名(和文)腎尿細管における受容体随伴性プロレニン(RAP)系による循環調節の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the circulatory regulation by the receptor accompanying-related prorenin (RAP) system in renal tubules

研究代表者

木野 旅人(KINO, Tabito)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00829608

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)：心疾患と腎疾患には『心腎連関』と称する共通する病態があり、その制御による疾病の制圧、すなわち心疾患の制御は腎疾患の予後を改善し、腎疾患の制御は心疾患の予後を改善することが期待される。本研究では、近年明らかにされたRAP(Receptor Associated Prorenin:受容体随伴プロレニン)系に注目して、腎尿細管でのRAP系の機能、『心腎連関』の病態への関与を検討した。(プロ)レニン受容体((P)RR)を腎尿細管特異的に強制発現させた遺伝子改変マウスは血圧上昇を呈した。また、尿細管細胞に局在するレニンは腎尿細管では(P)RRのリガンドとして機能しRAP系に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心疾患と腎疾患には、共通する病態があり、『心腎連関』と呼ばれている。慢性腎臓病は心血管疾患の強いリスクであり、急性心不全には高頻度に急性腎障害を合併する。レニン・アンジオテンシン・アルドステロン(RAA)系や自律神経系が、この病態に深く関与しており、RA系阻害薬、アルドステロン拮抗薬、遮断薬が臨床応用されている。さらなる検討が必要ではあるが、本研究の腎尿細管における受容体随伴プロレニン系などの循環調節に関わる生体内システムの詳細を明らかにすることは、『心腎連関』の病態を分子レベルで理解するとともに、新規の創薬標的の解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cardiovascular and kidney disease have the common condition, "cardiorenal syndrome". The regulation of cardiovascular disease is expected to improve prognosis of renal disease while the regulation of kidney disease is expected to improve prognosis of cardiovascular disease. In late years, RAP (receptor associated prorenin) system has been identified. Therefore, we investigate to identify the function of RAP system and the participation of cardiorenal syndrome in renal tubules. We used transgenic mice which (P)RR ((pro) renin receptor) gene is overexpressed specifically in renal tubules, and they showed the elevation of blood pressure. In addition, we breed them with alternative renin (intracellular renin at connecting tubules) overexpressed mice. They showed the lethal renal tubular damage, suggesting that intracellular renin may be a ligand for (P)RR in tubules. Further investigations are warranted.

研究分野：高血圧症

キーワード：レニン・アンジオテンシン(RA)系 局所RA系 (プロ)レニン受容体((P)RR) 受容体随伴性プロレニン(RAP)系

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心疾患と腎疾患には、『心腎連関』の病態があり、その制御による疾病の制圧が期待されている。慢性腎臓病 (CKD) は、心血管疾患の強いリスクであり、急性心不全には、高頻度に急性腎障害 (AKI) を合併する。心疾患の制御は腎疾患の予後を改善し、腎疾患の制御は心疾患の予後を改善することが期待される。これまでの研究から、『心腎連関』の病態には、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン (RAA) 系や、自律神経系の異常が関与しているとされており、心腎領域では、RA 系阻害薬、アルドステロン拮抗薬、 $\beta$  遮断薬といった薬物が開発され、実際に臨床に応用され効果が認められている。しかしながら、『心腎連関』の病態の全貌は未だ明らかになっておらず、こうした循環調節に関わる生体内システムの詳細を明らかにすることは、『心腎連関』の病態を分子レベルで理解するとともに、新規の創薬標的の解明に繋がることを期待されることから重要である。心腎連関に関与すると考えられるのは、腎臓と循環系の両方に作用する因子であり、RAA 系である。近位尿細管 (PCT) には、固有のアンジオテンシノーゲンの発現・分泌が認められ、結合尿細管 (CNT) にレニンの発現が認められることから、腎臓においては全身性・局所性 RA 系とは独立した尿細管性 RA (Tubular RA) 系が存在し、Na 再吸収を制御することで体液の恒常性の維持、循環制御に働いていると考えられる [1]。

RAA 系の新たな機構として RAP (Receptor Associated Prorenin: 受容体随伴プロレニン) 系が近年注目されている。その中核的な役割を担う (プロ) レニン受容体 (P)RR 遺伝子は、2002 年に Nguyen らによってクローニングされた [2]。その翻訳産物である全長型プロレニン受容体は 350 個のアミノ酸で構成された 1 回膜貫通型タンパクで、脳・心臓・腎臓など重要臓器に広く分布している。全長型プロレニン受容体は、Furin による切断を受けて、レニン・プロレニンと結合する可溶性 (プロ) レニン受容体と、膜貫通領域および C 末端領域を含む Atp6ap2 と同じ遺伝子配列をもつものに切断される [3]。(P)RR は、当初想定されたレニン・プロレニン受容体としての機能については否定的になっており、プロトンポンプ・V-ATPase としての機能が中核的であると考える考えが主になりつつある。

### 2. 研究の目的

本研究では、新規にクローニングした結合尿細管に局在するレニン (Alternative renin, ARen) を、上皮細胞に強制的に発現させたトランスジェニック・マウス (ARen2 TG)、RAP 系の主要分子であるプロレニン受容体 (P)RR を、尿細管特異的に強制発現させたトランスジェニック・マウス (Ksp1-(P)RR TG) を使って、尿細管 RA 系および RAP 系が循環調節に果たす役割を解明することを目的にしている。これまでに ARen と (P)RR の分子同士の連関ならびに生体での連関についての報告はなく、遺伝子改変動物を用いて RAP 系を生体レベルで解明することで、新規創薬さらには薬物治療の開発への展開が期待される。

### 3. 研究の方法

(1) 尿細管特異的 (P)RR トランスジェニック・マウス (Ksp1-(P)RR TG) の作製と表現型の解明  
Nguyen らによってクローニングされた (P)RR は、プロレニン・レニンをリガンドにして、糖尿病特異的な臓器障害 (糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症) をもたらず受容体随伴性プロレニン (RAP) 系として、新規の生体内循環調節システムとして注目されている。マウス (P)RR cDNA (AB192471.2) の配列をもとに、腎尿細管特異的ベクター (Ksp1) にクローニングし、腎尿細管特異的 (P)RR 発現マウス (Ksp1-(P)RR TG) を作製した。10 週齢の雄性マウス ( $n = 4-6$ ) を 10 日間代謝ケージで飼育し、体重と飲水量、尿量を計測した。尿は連日採取した。マウスは 6 群に分け、薬剤負荷試験を浸透圧ポンプを用いて行った (A 群: 野生型 (WT) C57B16/J、B 群: Ksp1-(P)RR TG、C 群: アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB; Olmesartan 3 mg/kg/day) 投与 Ksp1-(P)RR TG、D 群: 直接レニン阻害薬 (DRI; Aliskiren 25 mg/kg/day) 投与 Ksp1-(P)RR TG、E 群: V-ATPase 阻害薬 (Bafilomycin 0.03  $\mu$ g/g/day) 投与 WT、F 群: V-ATPase 阻害薬 (Bafilomycin 0.03  $\mu$ g/g/day) 投与 Ksp1-(P)RR TG)。尿検体を用いて、 $\text{Na}^+$ 濃度と浸透圧、pH を計測した。血圧は代謝ケージ飼育前 (Day 0) と飼育開始後 (Day 5 と Day 10) にテイルカフ法にて計測した。Day 11 に剖検し、血液と腎臓を採取した。腎組織は 4% パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋後に 4  $\mu$ m 厚の組織切片を作製した。組織切片に対して、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と Masson's trichrome 染色、(P)RR-FLAG に特異的な FLAG 抗体 (1:500) を用いて免疫組織染色を行った。レーザーマイクロダイセクション法を用いて、腎組織を皮質と腎髄質に分けて採取し、RNA 抽出し、遺伝子発現量を定量 RT-PCR で計測した。収縮期血圧は two-way ANOVA、その他の計測値は one-way ANOVA で統計解析を行った。数値は平均  $\pm$  標準誤差 (SE) で示す。

(2) ARen2 TG と Ksp1-(P)RR TG との交配による DT (Double transgenic) マウスの作製と表現型の解明

(P)RR は細胞内小器官で発現していることが判明しており、我々が新規にクローニングした細胞内レニン (ARen) をリガンドとしている可能性がある。ARen2 TG と Ksp1-(P)RR TG とを交配し、DT マウスを作製した。致死率を計測し、腎組織に対しては HE 染色を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 尿細管特異的(P)RR トランスジェニック・マウス (Ksp1-(P)RR TG) の開発と表現型の解明  
 開発作製した Ksp1-(P)RR TG に対して、組織学的な検証を行った。まず、WT 群、(P)RR TG 群、(P)RR TG+ARB 群、(P)RR TG+DRI 群において、HE 染色と Masson's trichrome 染色を行ったが、(P)RR TG による腎尿細管の構造変化や線維化は認めなかった (図 1)。(P)RR-FLAG に対して免疫組織染色を行ったところ、(P)RR TG マウスにおいて (P)RR/Atp6ap2 は主に腎髄質に発現していることが判明した (図 2)。同様の結果は (P)RR の遺伝子発現量を定量 RT-PCR でも確認された (図 3)。これらの結果から、Ksp-Cadherin プロモーターを用いた導入遺伝子 (P)RR は腎尿細管で発現していたが、皮質尿細管よりも髄質尿細管で有意に活性化していることが示された。また、

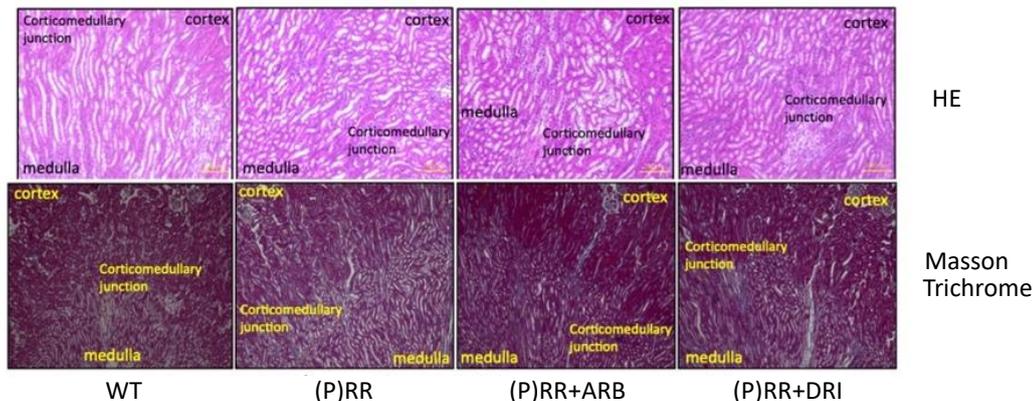


図 1. HE 染色 (上段) と Masson trichrome 染色 (下段) による組織学的検討 (100 倍率)。

WT; 野生型, ARB; アンジオテンシン II 受容体拮抗薬, DRI; 直接レニン阻害薬.

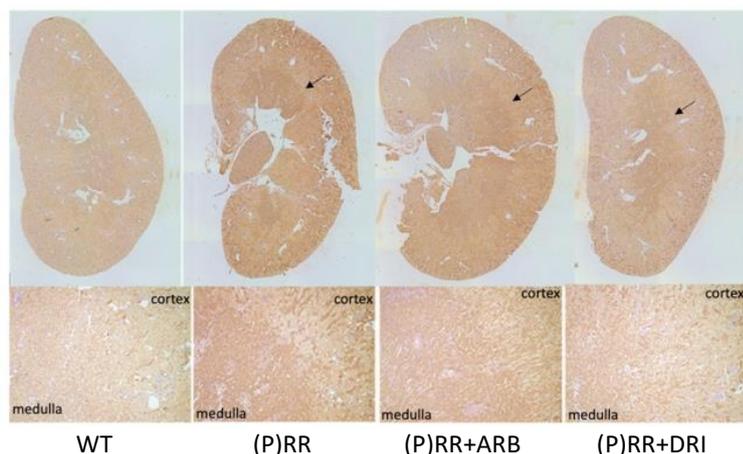


図 2. 免疫組織染色による (P)RR の局在 (上段: 4 倍率、下段: 100 倍率)

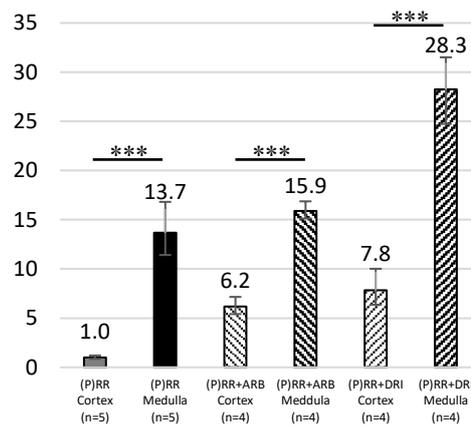


図 3. (P)RR 遺伝子の腎皮質 (Cortex) ・髄質 (Medulla) における発現量の比較

各群の計測値を one-way ANOVA で解析. \*\*\* p<0.001.

続いて、(P)RR TG マウスの生理学的変化や、薬剤負荷に対する変化を検証した。WT 群、(P)RR TG 群、(P)RR TG+ARB 群、(P)RR TG+DRI 群、WT+V-ATPase 阻害薬群、(P)RR TG+V-ATPase 阻害薬群の 6 群に対して、代謝ケージ飼育前後での体重、剖検時の腎重量を表 1 に示す。薬物負荷試験前後の体重や群間における体重、腎重量に有意な差は認めなかった。

0 日目、5 日目、10 日目でのテイルカフ法による血圧の値を図 4 に示す。10 日目において、収縮期血圧は (P)RR TG 群は WT 群と比較して有意に上昇を認めた ( $94.4 \pm 1.4$  mmHg vs.  $115.2 \pm 1.1$  mmHg,  $p < 0.001$ )。ARB と DRI 投与により、収縮期血圧は有意に低下した (ARB;  $115.2 \pm 1.1$  mmHg to  $86.3 \pm 1.1$  mmHg, DRI;  $115.2 \pm 1.1$  mmHg to  $84.5 \pm 1.4$  mmHg,  $p < 0.001$ )。収縮期血圧の上昇が (P)RR によるものか検証するため、V-ATPase 阻害薬である Bafilomycin を投与したが、血圧低下はみられなかった (Baf;  $116.9 \pm 2.0$  mmHg to  $115.2 \pm 1.1$  mmHg,  $p = \text{NS}$ )。飲水量の比較を図 5 に示す。飲水量は WT 群と比較して、(P)RR TG 群では有意に低下した ( $0.26 \pm 0.01$  g/BW · day vs.  $0.34 \pm 0.01$  g/BW · day,  $p < 0.001$ )。一方で、各薬剤負荷群 ((P)RR+ARB/DRI/Baf) と非負荷群 ((P)RR) 間には有意な変化は認めなかった ((P)RR;  $0.26 \pm 0.01$  g/BW · day, (P)RR+ARB;  $0.25 \pm 0.01$  g/BW · day, (P)RR+DRI;  $0.30 \pm 0.01$  g/BW · day, and (P)RR+Baf;  $0.28 \pm 0.01$  g/BW · day,  $p = \text{NS}$ )。各群における尿量の比較を図 6 に示す。WT 群と比較して、(P)RR TG 群で有意に上昇したが ( $39.5 \pm 2.5$  g/BW · day vs.  $51.5 \pm 2.5$  g/BW · day,  $p < 0.01$ )、(P)RR TG 群に ARB と DRI を負荷するとさらなる上昇を認め (ARB;  $63.2 \pm 3.6$  g/BW · day and DRI;  $58.4 \pm 4.5$  g/BW · day,  $p < 0.01$ )、V-ATPase 阻害薬により有意に減少した (Baf;  $42.1 \pm 3.2$  g/BW · day,  $p < 0.001$ )。WT 群においては、V-ATPase 阻害薬負荷により有意に尿量は増加した ( $54.3 \pm 3.2$  g/BW day vs.  $39.5 \pm 2.5$  g/BW day,  $p < 0.01$ )。

尿 pH の結果を図 7 に示す。WT 群と比較して、(P)RR TG 群では有意に上昇を認めたが ( $7.8 \pm 0.2$  vs.  $6.8 \pm 0.2$ ,  $p < 0.001$ )、ARB と DRI 負荷によるさらなる変化は認めなかった (ARB;  $7.8 \pm 0.2$  and DRI;  $7.7 \pm 0.2$ ,  $p = \text{NS}$ )。V-ATP 阻害薬によって、(P)RR TG 群で上昇した尿 pH は有意に減少し、中性化した (Baf;  $7.0 \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$ )。

各群における尿浸透圧の比較を図 8 に示す。WT 群と比較して、(P)RR TG 群では有意に低下を認めたが ( $2787.8 \pm 161.5$  mOsm/kg vs.  $4043.3 \pm 398.1$  mOsm/kg,  $p < 0.05$ )、(P)RR 群へ ARB や DRI、V-ATPase 阻害薬負荷による変化は認めなかった (ARB;  $2613.8 \pm 205.7$  mOsm/kg, DRI;  $2719.2 \pm 268.9$  mOsm/kg, and Baf;  $2839.4 \pm 268.9$  mOsm/kg,  $p = \text{NS}$ )。

尿中 Na<sup>+</sup>排泄の各群の比較を図 9 に示す。WT 群と比較して、(P)RR TG 群では尿中 Na<sup>+</sup>排泄は有意に低下を認めた ( $145.6 \pm 8.4$  mEq/L · day vs.  $199.4 \pm 25.0$  mEq/L · day,  $p < 0.05$ )。以上の変化は、ARB や DRI、V-ATPase 阻害薬を負荷しても変化しなかった (ARB;  $98.4 \pm 10.7$  mEq/L · day, DRI;  $118.8 \pm 13.6$  mEq/L · day, and Baf;  $149.0 \pm 14.5$  mEq/L · day,  $p = \text{NS}$ )。WT 群においては、V-ATPase 負荷により尿中 Na<sup>+</sup>排泄は有意に低下した ( $149.0 \pm 14.5$  mEq/L day vs.  $145.6 \pm 8.4$  mEq/L day,  $p < 0.05$ )。

また、血漿検体からレニン活性 (PRA) を計測したが、WT 群と (P)RR TG 群で有意な差は認めなかった (WT;  $9.80$  ng/mL/h vs. (P)RR-TG;  $20.70$  ng/mL/h,  $p = 0.096$ )。

表 1. 各群における体重、腎重量、飲水量、尿量および収縮期血圧。

		WT	(P)RR	(P)RR+ARB	(P)RR+DRI	WT+Baf	(P)RR+Baf	p
体重 [g]	Day 0	$20.6 \pm 1.5$	$26.0 \pm 1.5$	$26.0 \pm 1.4$	$23.7 \pm 2.4$	$22.2 \pm 1.2$	$24.9 \pm 0.5$	NS
	Day 10	$21.5 \pm 1.8$	$27.2 \pm 1.4$	$26.7 \pm 1.6$	$25.9 \pm 1.9$	$22.3 \pm 1.1$	$25.7 \pm 1.1$	NS
腎重量 [g]		$0.17 \pm 0.02$	$0.18 \pm 0.01$	$0.19 \pm 0.01$	$0.18 \pm 0.02$	$0.15 \pm 0.00$	$0.15 \pm 0.00$	NS

各群の計測値は one-way ANOVA で解析。WT: 野生型, ARB: アンジオテンシン II 受容体拮抗薬, DRI: 直接レニン阻害薬, Baf; V-ATPase 阻害薬(Bafilomycin), NS: non-significant.

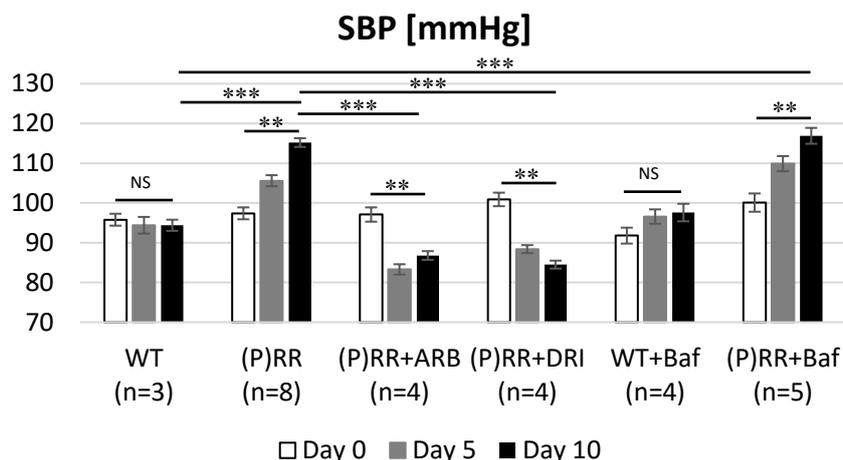


図 4. 各群における収縮期血圧 (SBP) の推移。

各群の計測値を two-way ANOVA で解析。\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

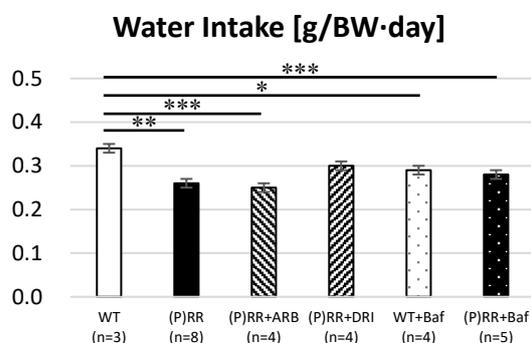


図 5. 各群における飲水量の比較。

各群の計測値を one-way ANOVA で解析。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

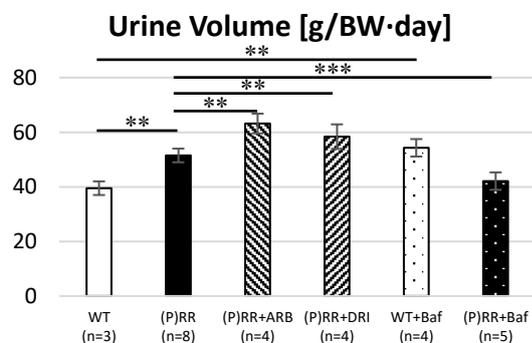


図 6. 各群における尿量の比較。

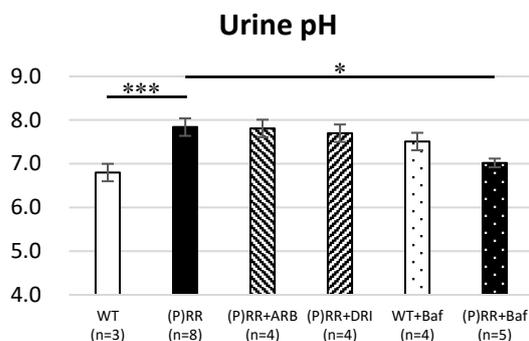


図 7. 各群における尿 pH の比較.

各群の計測値を one-way ANOVA で解析. \* p<0.05, \*\*\* p<0.001.

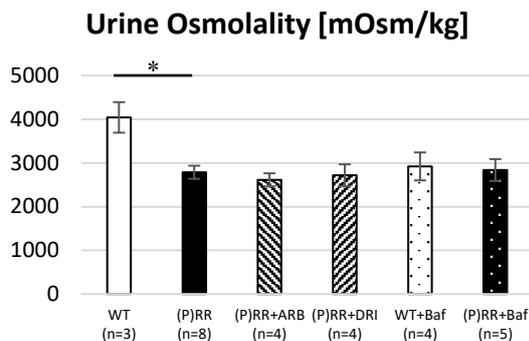


図 8. 各群における尿浸透圧の比較.

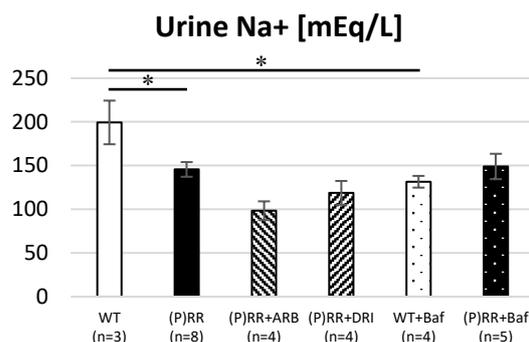


図 9. 各群における尿中 Na+排泄の比較.

各群の計測値を one-way ANOVA で解析. \* p<0.05.

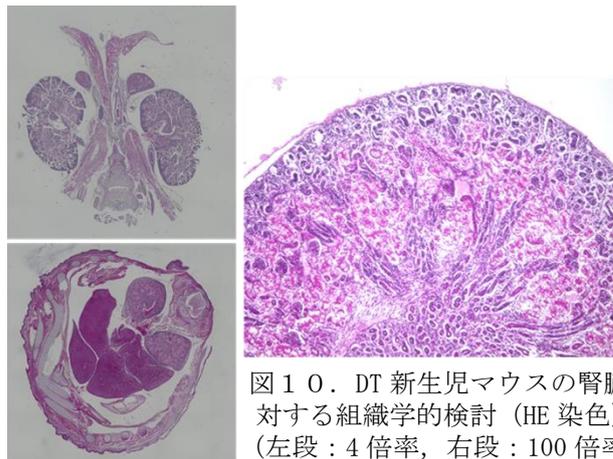


図 10. DT 新生児マウスの腎臓に対する組織学的検討 (HE 染色). (左段: 4 倍率, 右段: 100 倍率).

## (2) ARen2 TG と Ksp-1(P)RR TG との交配による DT マウスの作製と表現型の解明

(P)RR TG マウスと ARen2 TG マウスを交配し、DT マウスを作製した。出生成功後も、大多数の新生児マウスが死に至った (156/353 匹 (44.2%; 2019/4/1-12/31))。その死因を検証するため、新生児マウスの腎臓を摘出し、HE 染色を行った。その結果を図 10 に示す。腎尿細管の構造異常が皮髄境界に認められた。以上のことから、ARen2 と (P)RR はリガンド-受容体結合により、致死的な腎機能不全を来すことが示唆された。

以上のことから、我々の (P)RR TG マウスの検討では、腎尿細管特異的に (P)RR 発現を増加させることでレニン・アンジオテンシン系非依存性の血圧上昇を呈した。さらに、尿のアルカリ化、尿浸透圧や Na+濃度の低下は、Ramkumar らの報告と合致する [4, 5]。これらの結果は、(P)RR は単に腎尿細管で V-ATPase として機能するだけではないことを示唆するが、血圧上昇と (P)RR の関連は明らかにすることはできなかった。しかし、(P)RR と ARen2 の DT マウスは腎尿細管の構造異常を来し、高い確率で死に至るという我々の発見は、腎尿細管細胞内で (P)RR と ARen2 が結合して尿細管の構造異常に作用する可能性を示した。したがって、従来のレニン/プロレニンシグナルに加えて、細胞内レニンである ARen2 が (P)RR シグナルに関与していることが示唆された。(P)RR を含めた RAP 系が血圧上昇にどのように関わるかはさらなる検討が必要である。

## <引用文献>

- [1] Rohrwasser A, Morgan T, Dillon HF, et al. Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension*. 1999;34(6):1265-1274. doi:10.1161/01.hyp.34.6.1265
- [2] Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest*. 2002;109(11):1417-1427. doi:10.1172/JCI14276
- [3] Cousin C, Bracquart D, Contrepas A, et al. Soluble form of the (pro)renin receptor generated by intracellular cleavage by furin is secreted in plasma. *Hypertension*. 2009;53(6):1077-1082. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.127258
- [4] Ramkumar N, Stuart D, Calquin M, et al. Nephron-specific deletion of the prorenin receptor causes a urine concentration defect. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;309(1):F48-F56. doi:10.1152/ajprenal.00126.2015
- [5] Ramkumar N, Stuart D, Mironova E, et al. Renal tubular epithelial cell prorenin receptor regulates blood pressure and sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;311(1):F186-F194. doi:10.1152/ajprenal.00088.2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Saigo S, Kino T, Uchida K, et al	4. 巻 23
2. 論文標題 Blood Pressure Elevation of Tubular Specific (P)RR Transgenic Mice and Lethal Tubular Degeneration due to Possible Intracellular Interactions between (P)RR and Alternative Renin Products	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23010302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishigami T, Kino T, Minegishi S, et al.	4. 巻 21
2. 論文標題 Regulators of Epithelial Sodium Channels in Aldosterone-Sensitive Distal Nephrons (ASDN): Critical Roles of Nedd4L/Nedd4-2 and Salt-Sensitive Hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3871 ~ 3871
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21113871	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

〔図書〕 計1件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------