

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06215・19K21318

研究課題名(和文) インスリン抵抗性を基盤とする心血管病における受容体結合因子の病態生理学的意義

研究課題名(英文) The pathophysiological significance of receptor-binding molecule in cardiovascular diseases based on insulin resistance

研究代表者

大城 光二 (Kohji, Ohki)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60828713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はアンジオテンシン依存性高血圧における腎近位尿細管ATRAPの機能的役割について検証をおこなった。PEPCKプロモーターによる発現制御を利用して、Cre/loxPシステムを用いて、近位尿細管特異的ATRAPノックアウトマウスを作成した。近位尿細管特異的ATRAPノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、近位尿細管におけるATRAP mRNA発現量が約80%減少している一方、遠位尿細管におけるATRAP mRNA発現量は同等であった。近位尿細管特異的ATRAPノックアウトマウスでは、アンジオテンシンII慢性持続投与による血圧上昇、心肥大反応は野生型マウスと同等であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の実験結果と我々の過去の報告を総合すると、アンジオテンシン依存性高血圧の病態形成に腎近位尿細管ATRAPが果たす役割は小さく、腎ATRAPは主に腎遠位尿細管ATRAPを介したメカニズムによりアンジオテンシン依存性高血圧を抑制すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The AT1 receptor (AT1R)-associated protein (ATRAP) is a molecule specifically interacting with the carboxyl-terminal domain of AT1R so as to inhibit hyperactivation of its downstream signaling. Although ATRAP expression is abundant in renal proximal tubules, little is known about the actual function of renal proximal tubule ATRAP in angiotensin II-mediated hypertension. We generated proximal tubule specific ATRAP knockout (PT-KO) mice using the Cre/loxP system with Pepck-Cre. ATRAP mRNA expression decreased by 80% in proximal regions of the nephron in PT-KO mice compared with wild-type (WT) mice. Blood pressure of PT-KO mice was comparable with that of WT mice at baseline. Moreover, no significant differences were noted in pressor response and cardiac hypertrophy to angiotensin II infusion between PT-KO and WT mice. The results indicate that renal proximal tubule ATRAP has a minor role in angiotensin II-mediated hypertension.

研究分野：腎臓学、高血圧学

キーワード：高血圧 アンジオテンシン受容体 尿細管 インスリン抵抗性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

種々の病的刺激の持続に対する生体の反応過程における内在性の要因による組織局所での慢性的な酸化ストレス増加や炎症反応亢進とそれらに伴う代謝系への悪影響によって、インスリン抵抗性が惹起され、高血圧症・脂質異常症・糖尿病へと進展し、最終的に心血管疾患や腎不全を発症する。特に病的刺激の持続による「組織局所における AT1 受容体情報伝達系の過剰活性化」がもたらす組織レニン-アンジオテンシン系 (R-A 系) の異常亢進状態が、病態悪化の一翼を担い悪循環を形成するとされる。AT1 受容体結合蛋白 (angiotensin II type 1 receptor-associated protein; ATRAP) は、病的な刺激下において AT1 受容体の細胞表面から細胞質内へ内在化を促進することで、受容体下流の病的なシグナル伝達を抑制する可能性がある。全身性 ATRAP ノックアウトマウスでは、アンジオテンシン II を投与すると腎尿細管の AT1 受容体の過剰活性化が生じ、アンジオテンシン依存性高血圧が増悪する。しかしながら、腎近位尿細管において ATRAP は豊富に発現しているが、アンジオテンシン依存性高血圧における、その病態生理学的意義についてはよく分かっていない。

2. 研究の目的

Cre/loxP システムを用いて、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスを作成し、アンジオテンシン依存性高血圧における腎近位尿細管 ATRAP の機能的役割について検証をおこなった。

3. 研究の方法

腎近位尿細管に発現特異性が高いと報告されている phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) プロモーターによる発現制御を利用して、Cre/loxP システムを用いて、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスを作成した。腎における ATRAP の発現を、免疫染色およびレーザーマイクロダイセクション法を用いて、野生型マウスと近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスとで比較検討を行った。次に、野生型マウスと近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスに浸透圧ポンプを用いてアンジオテンシン II (1000 ng/kg/min) 2 週間投与を行い、テイルカフ法にて両群の血圧を測定した。さらに詳細な検討を行うため、アンジオテンシン II 投与による心肥大の程度 (心体重比) の評価、アンジオテンシン II 投与中のテレメトリーシステムを用いた観血的な血圧測定および代謝ケージを用いたナトリウムバランスの評価を行った。また、野生型マウスと近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスに浸透圧ポンプを用いて、より低用量のアンジオテンシン II (600 ng/kg/min) 2 週間投与を行い、両群の血圧をテイルカフ法で測定した。

4. 研究成果

近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスの作成

アンジオテンシン依存性高血圧における近位尿細管の病態生理学的役割を検討するため、Pepck-Cre を用いて Cre/loxP システムにより、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスを作成した。この近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスの腎臓における ATRAP 蛋白の発現および分布を確認するため、抗 ATRAP 抗体と特異的なネフロンマーカーを使用して免疫組織化学染色を行った。特異的ネフロンマーカーとして、主に遠位尿細管に発現しているカルシウム結合蛋白であるカルビンディン D に対するモノクローナル抗体と、近位尿細管管腔側に特異的に発現しているメガリンに対するモノクローナル抗体を用いた。これらの抗体で連続切片を免疫染色したところ、野生型マウスと比較して近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスの腎近位尿細管において特異的に ATRAP の免疫染色の減衰を認めた。

次に、より厳密に近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスの近位尿細管における ATRAP の減少率を評価するため、レーザーマイクロダイセクション法を用いて、野生型マウスと近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスの近位尿細管および遠位尿細管における ATRAP 発現を比較した。近位尿細管に認めるブラッシュボーダーを形態学的基準として、近位尿細管と遠位尿細管を区別した。その結果、ATRAP の mRNA は野生型マウスと比較し近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスの近位尿細管で約 80% 減少していた。反対に遠位尿細管における ATRAP mRNA 発現量は近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスとで同等であった。

アンジオテンシン II が近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスの非観血的血圧、心拍数、体重に及ぼす影響

アンジオテンシン依存性高血圧における近位尿細管 ATRAP の病態生理学的役割について検証するため、アンジオテンシン II を投与した時の血圧を、テイルカフ法を用いて測定し、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスとで比較した。週齢を合わせた近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスを次の 4 つのグループに振り分けた。(1) 近位

尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスにヴィーグルを投与した群、(2)近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスにアンジオテンシン II (1000 ng/kg/min) を投与した群、(3)野生型マウスにヴィーグルを投与した群、(4)野生型マウスにアンジオテンシン II (1000 ng/kg/min) を投与した群。ベースラインにおける近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスの収縮期血圧は野生型マウスと同等であった。また、アンジオテンシン II を2週間投与すると、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスで有意かつ同程度に収縮期血圧が増加した。その一方で、4群間で心拍数に違いは認めなかった。アンジオテンシン II を2週間投与すると、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスで同程度に投与期間中の体重増加が抑制された。

より低用量のアンジオテンシン II が野生型マウスと近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスの血圧に及ぼす影響

アンジオテンシン依存性高血圧における近位尿細管 ATRAP の病態生理学的役割をさらに検証するため、より低用量のアンジオテンシン II (600 ng/kg/min) を用いて追加の実験を行った。アンジオテンシン II (600 ng/kg/min) を投与した時の近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスの血圧をテイルカフ法で測定し、比較した。アンジオテンシン II (600 ng/kg/min) を2週間投与すると、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスで有意かつ同程度に収縮期血圧が増加した。

アンジオテンシン II の近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスの心肥大に及ぼす影響

心肥大は血圧上昇と密接な関係にあるため、我々はさらに近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスの心体重比について検証をおこなった。アンジオテンシン II (1000 ng/kg/min) を2週間投与すると、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスとで有意かつ同程度に心体重比が増加した。この結果は、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスとでアンジオテンシン II を投与した時の血圧上昇が同程度であることを支持する結果である。

アンジオテンシン II 投与が近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスの観血的血圧に及ぼす影響

我々は、テレメトリーシステムを用いて近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスにおけるアンジオテンシン II 投与の観血的な血圧に及ぼす影響を厳格に比較検討した。24時間平均収縮期および拡張期血圧は、アンジオテンシン II (1000 ng/kg/min) を2週間投与すると、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスとで有意かつ同程度に増加した。また、アンジオテンシン II (1000 mg/kg/min) を2週間投与すると平均収縮期および拡張期血圧は日中だけでなく、夜間も近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスとで有意かつ同程度に増加した。

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 1件）

1. 著者名 Ohki Kohji, Wakui Hiromichi, Kishio Nozomu, Azushima Kengo, Uneda Kazushi, Haku Sona, Kobayashi Ryu, Haruhara Kotaro, Kinguchi Sho, Yamaji Takahiro, Yamada Takayuki, Minegishi Shintaro, Ishigami Tomoaki, Toya Yoshiyuki, Yamashita Akio, Imajo Kento, Nakajima Atsushi, Kato Ikuma, Ohashi Kenichi, Tamura Kouichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Angiotensin II Type 1 Receptor-associated Protein Inhibits Angiotensin II-induced Insulin Resistance with Suppression of Oxidative Stress in Skeletal Muscle Tissue	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-21270-8	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0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
研究協力者	涌井 広道 (Wakui Hiromichi) (10587330)	横浜市立大学・医学部・講師 (22701)	