

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08640

研究課題名(和文)尿細管上皮のNaチャネル発現亢進を標的とした心腎連関に対する新規治療の確立

研究課題名(英文) Sodium transporters in renal proximal tubules: a novel therapeutic target of cardio-renal syndrome

研究代表者

草場 哲郎 (Kusaba, Tetsuro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60367365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、心腎連関の視点から新規心不全治療候補標的として腎尿細管NaチャネルのNaPi2aに注目し、その機能抑制による心保護効果をマウス心不全モデルで検討した。NaPi2a-KOマウスを用いて圧負荷心不全(TAC)モデルと尿毒症性心筋症モデルを作成し、その心機能保持効果を検討した。TACモデルではNaPi2a-KOマウスで左室駆出率(EF)が維持され、NaPi2aの抑制は圧負荷心不全の進行を抑制していた。一方、5/6腎摘モデルでは、心機能保護効果を認めなかった。その機序として、リン排泄に伴うFGF23の減少による心保護効果ではなく、Na排泄を介する体液量減少効果による機序が主因と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会を迎え、心不全、腎不全の患者数は増加しており、新たな治療補の開発が望まれています。そこで今回我々は、近位尿細管で発現し、ナトリウムとリンを再吸収する輸送体であるNaPi2aに注目し、その機能を抑制することにより心不全が改善するかを検討しました。心不全を合併したNaPi2aの機能喪失マウスでは、通常心不全マウスに比し体外へのナトリウムの排泄が促され、結果としてマウス心不全モデルの心機能を保持できることが示されました。このことから、今後は同分子の抑制薬は新規の心不全治療薬になる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：Given the success of SGLT2 inhibitors for improving the prognosis of kidney disease and heart failure (HF) patients, the sodium transporters in proximal tubules are attractive therapeutic targets. In this study, we focused on NaPi2a, a renal tubular sodium channel, as a novel candidate therapeutic target for (HF), and investigated the cardioprotective effect of its functional suppression in HF mouse model. In the TAC model, a model of pressure-overload HF, left ventricular ejection fraction was maintained, and an increase in HF markers such as ANP and BNP was suppressed in NaPi2a-KO mice. In contrast, NaPi2a suppression exhibited the no cardioprotective effects in the 5/6 nephrectomy model, a model of uremic cardiomyopathy. The mechanisms of cardioprotective effect of NaPi2a suppression in pressure-overload HF might be primarily due to a fluid volume reduction effect mediated by Na excretion, rather than due to a decrease in FGF23 associated with phosphorus excretion.

研究分野：腎臓病学

キーワード：うっ血性心不全 近位尿細管 Naチャネル

## 1. 研究開始当初の背景

平均寿命の延長に伴いわが国では今後 15 年間は心不全患者の増加が見込まれており、経済的および人的医療資源への負担増加が危惧されている(心不全パンデミック)。心不全患者が増加していることは、既存の治療法では抑制効果が不十分であることを意味し、特にうっ血性心不全と慢性腎不全の間では、各々の発症および増悪を互いに助長する悪性サイクルが存在する。このような『心腎連関』と呼ばれる病態に対しては、それぞれの臓器固有の治療でなく、組織横断的な治療アプローチが望まれる。

心不全治療薬に利尿薬は中心的に用いられているが、同薬に対する治療抵抗性の患者をしばしば経験する。その病態の一つに、心不全患者では Na チャネルの尿細管上皮細胞上での発現亢進が想定されている(ネフロンリモデリング)。SGLT2 は腎臓の近位尿細管上皮細胞に発現し、糖と Na を尿から再吸収するチャネルであるが、近年報告された SGLT2 阻害による非糖尿病心不全患者の予後改善効果は、近位尿細管 Na チャネルの阻害が心不全治療に有用である可能性を示唆している。

我々は予備実験で、下大静脈縮窄により腎うっ血を誘導したマウスの腎臓の遺伝子発現を RNA seq により網羅的に解析し、うっ血腎において、近位尿細管 Na チャネル、特に Na とリンの共輸送体である NaPi2a が過剰に発現していることを見出している。今まで SGLT2 阻害薬以外で近位尿細管 Na チャネルを標的にした心不全治療薬はなく、腎 Na チャネルの機能亢進による心不全の悪化および治療抵抗性のメカニズムを明らかにするとともに、同分子の抑制による治療への応用可能性を検討することは、新たな治療標的を探る上で有用と考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、各種マウスの心不全モデルにおいて、NaPi2a の機能抑制が心不全の進展を抑制することを示し、その分子機序を明らかにすることにより、新規心不全治療薬として同分子の機能抑制の臨床応用可能性を検討することである。そこで NaPi2a-KO マウスに対して、圧負荷心不全モデルである横行大動脈縮窄モデルを誘導し、心不全改善効果を検討した。

## 3. 研究の方法

本研究は、心不全状態において近位尿細管での Na チャネルの一つである NaPi2a の遺伝子改変による機能抑制による心不全改善効果を検討した。

### NaPi2a-KO マウスによる圧負荷心不全モデル、尿毒症性心不全モデルの作成

既報ではリン利尿ホルモンである FGF23 が腎不全における左室心筋肥大を増悪させるという報告がある。そのため、近位尿細管でのリンと Na の再吸収を抑制し、低リン血症からの FGF23 の低下、および体外への Na 排泄効果を期待して、NaPi2a の機能抑制による心不全改善効果を検討した。本研究では申請者が作成した NaPi2a をコードする SLC34a1 遺伝子を改変し、その機能を喪失させた NaPi2a-KO マウスを使用した。

圧負荷心不全マウスモデルに関して、同遺伝子改変マウスに対して、横行大動脈縮窄モデル(TACモデル)を導入する。TACモデルの作成は気管内挿管のうえ人工呼吸管理とし、イソフルランによる全身麻酔下に左胸部から開胸する。7-0 ナイロン糸を胸骨動脈と左総頸動脈の間に通し、28 ゲージの針とともに大動脈を結紮した。結紮後、針を素早く抜き取り、閉創した。Sham 手術は、糸を結紮しないこと以外は同様に施行した。

TAC 手術の 28 日後に代謝ケージによる蓄尿検査を行い、24 時間尿を採取した。その後 1 日間の回復期間を待って、マウスをイソフルランで麻酔して安楽死させ、その後、下大静脈から血液試料を採取した。腎臓と心臓の重量を測定し、脛骨の長さを測定した後、さらなる分析のために腎臓と心臓をサンプルに切り分けた。すべての実験は、京都府立医科大学実験動物委員会の承認を得て、施設指針および日本学術会議動物実験適正化指針、ARRIVE ガイドラインに準拠して実施した。

### 循環動態の把握と心エコーによる心機能の評価

経胸壁心エコー検査は 1.0% イソフルラン吸入による鎮静下で、18-38MHz プローブを装備した VisualSonics Vevo 2100 システム (VisualSonics 社、トロント、ON、カナダ) を用いて実施した。左心室は、傍胸骨短軸像で評価した。収縮末期は左心室(LV)面積が最も小さい相と定義し、拡張末期は LV 面積が最も大きい相と定義した。拡張期 LV 内径、収縮期 LV 内径、拡張期 LV 後壁厚、拡張期心室中隔厚は、乳頭筋レベルでの LV M モードトレースで測定した。心エコーは TAC モデル、5/6 腎摘モデルとも、術後 2 週および 4 週で実施した。

### 免疫染色、qPCR による分子メカニズム

心組織は Masson Trichrome 染色、および Sirius red 染色により、組織線維化を評価した。また心筋の DNA 損傷が心不全の進行に重要であることから H2AX の免疫染色により定量的に評価する。またより定量的な分子メカニズムの評価のために、組織から RNA を抽出し、炎症、線維化、心筋障害マーカーに関して、qPCR を行った。

#### 統計解析

統計解析は、2 群間の比較では unpaired t-test を、他群間の比較では Tukey post hoc test を用いて行った。P 値 < 0.05 を統計的に有意であると判断した。

#### 4. 研究成果

NaPi2a-K0 に対して TAC モデルを誘導した。心エコーでの観察では、術後 4 週での左室の収縮能は NaPi2a-K0 マウスで WT に比し保持されていた。また左室径も NaPi2a-K0 マウスで低く維持されていた。組織学的検討では間質の線維化は軽度 NaPi2a-K0 マウスで軽減していた。心筋横断面積では両者に差を認めなかった。

血液検査の結果では、Na や Ca は WT と NaPi2a-K0 マウスの間に差を認めなかった。血清リン値は NaPi2a-K0 マウスで著明に低下しており、それに伴って血清 FGF23 も著明に低値であった。FGF23 値は血清リン値と強い相関を認めたが、心重量と FGF23 の間には相関を認めなかった。

qPCR による遺伝子発現の検討では、fgf23 遺伝子の発現は心臓ではほとんど認めず、TAC の誘導により上昇も認めなかった。心不全マーカーである Nppa、Nppb、Myh7 は NaPi2a-K0 マウスで低値であった。また線維化マーカーである Col1a1 や Fn1 も NaPi2a-K0 群で低値であった。

圧負荷心不全の発症に心筋の DNA 損傷が重要であるため、H2AX の免疫染色を行った。すると、WT の TAC モデルでは散在性に同分子陽性心筋細胞を認めたが、NaPi2a-K0 マウスではその低下を認めた。

考察 本研究では近位尿細管上皮細胞に発現する Na、リン共輸送体の機能抑制が、圧負荷心不全モデルにおいて心筋の DNA 損傷とそれに引き続く心組織線維化を軽減し、心収縮能低下を抑制したことを示した。

当初は NaPi2a の抑制により、血中のリン濃度の低下とそれに引き続く FGF23 の低下、尿中 Na 排泄の亢進による体液量の減少、の 2 つの機序による心保護効果を想定していた。NaPi2a-K0 マウスでは、低リン血症から血清 FGF23 の低下を認めたが、FGF23 値と心筋肥大の間に相関は認めず、前者による臓器保護効果は否定的であった。一方で、左室拡張末期径の増大の抑制の結果、左室収縮能が維持され、ANP、BNP をコードする遺伝子の上昇も抑制していたことから、NaPi2a の機能抑制による尿中への Na 排泄促進が循環血液量の低下を来し、容量負荷の抑制から心保護に働いたと考えられた。また容量負荷の低下から心筋細胞の DNA 損傷を低下させ、結果として圧負荷心不全モデルにおける心筋障害の抑制、組織線維化の抑制を生じたと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Komaki Kazumi, Shiotsu Yayoi, Adachi Hiroya, Urata Noriko, Hara Masayuki, Nakayama Mayuka, Kusaba Tetsuro, Masuzawa Naoko, Konishi Eiichi, Oda Takashi, Tamagaki Keiichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Nephritis-associated plasmin receptor (NAP1r)-positive glomerulonephritis in a case of ANCA-negative small vessel vasculitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 90 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-021-00635-5	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 -
1. 著者名 Yamashita Noriyuki, Nakai Kunihiro, Nakata Tomohiro, Nakamura Itaru, Kirita Yuhei, Matoba Satoaki, Humphreys Benjamin D., Tamagaki Keiichi, Kusaba Tetsuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Cumulative DNA damage by repeated low-dose cisplatin injection promotes the transition of acute to chronic kidney injury in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00392-6	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 Kitani Takashi, Kidokoro Kengo, Nakata Tomohiro, Kirita Yuhei, Nakamura Itaru, Nakai Kunihiro, Yagi-Tomita Aya, Ida Tomoharu, Uehara-Watanabe Noriko, Ikeda Kisho, Yamashita Noriyuki, Humphreys Benjamin D., Kashihara Naoki, Matoba Satoaki, Tamagaki Keiichi, Kusaba Tetsuro	4. 巻 101
2. 論文標題 Kidney vascular congestion exacerbates acute kidney injury in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 551 ~ 562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2021.11.015	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 該当する
1. 著者名 Uehara-Watanabe Noriko, Okuno-Ozeki Natsuko, Minamida Atsushi, Nakamura Itaru, Nakata Tomohiro, Nakai Kunihiro, Yagi-Tomita Aya, Ida Tomoharu, Ikeda Kisho, Kitani Takashi, Yamashita Noriyuki, Kamezaki Michitsugu, Kirita Yuhei, Matoba Satoaki, Tamagaki Keiichi, Kusaba Tetsuro	4. 巻 12
2. 論文標題 Direct evidence of proximal tubular proliferation in early diabetic nephropathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-04880-1	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 -

1. 著者名 Tanimura Keiko, Yamada Tadaaki, Nakai Kunihiro, Matoba Satoaki, Sakai Toshiyuki, Uehara Hisanori, Yano Seiji, Kusaba Tetsuro, Katayama Ryohei, Takayama Koichi	4. 巻 6
2. 論文標題 HER3 activation contributes toward the emergence of ALK inhibitor-tolerant cells in ALK-rearranged lung cancer with mesenchymal features	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Precision Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41698-021-00250-8	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 -

1. 著者名 Hara Masayuki, Kusaba Tetsuro, Ono Kenshi, Masuzawa Naoko, Nakamura Itaru, Urata Noriko, Shiraishi Hirokazu, Hara Shigeo, Konishi Eiichi, Matoba Satoaki, Shiotsu Yayoi, Tamagaki Keiichi	4. 巻 1
2. 論文標題 Extraglomerular Vascular Involvement of Glomerulopathy with Fibronectin Deposits	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.6558-20	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 -

1. 著者名 Yamashita Noriyuki, Kusaba Tetsuro, Nakata Tomohiro, Tomita Aya, Ida Tomoharu, Watanabe-Uehara Noriko, Ikeda Kisho, Kitani Takashi, Uehara Masahiro, Kirita Yuhei, Matoba Satoaki, Humphreys Benjamin D., Tamagaki Keiichi	4. 巻 319
2. 論文標題 Intratubular epithelial-mesenchymal transition and tubular atrophy after kidney injury in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F579 ~ F591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00108.2020	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 該当する

1. 著者名 Ikeda Kisho, Kusaba Tetsuro, Tomita Aya, Watanabe-Uehara Noriko, Ida Tomoharu, Kitani Takashi, Yamashita Noriyuki, Uehara Masahiro, Matoba Satoaki, Yamada Tadaaki, Tamagaki Keiichi	4. 巻 144
2. 論文標題 Diverse Receptor Tyrosine Kinase Phosphorylation in Urine-Derived Tubular Epithelial Cells from Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nephron	6. 最初と最後の頁 525 ~ 536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000509419	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 -

1. 著者名 Uehara Masahiro, Kusaba Tetsuro, Ida Tomoharu, Nakai Kunihiro, Nakata Tomohiro, Tomita Aya, Watanabe-Uehara Noriko, Ikeda Kisho, Kitani Takashi, Yamashita Noriyuki, Kirita Yuhei, Matoba Satoaki, Humphreys Benjamin D., Tamagaki Keiichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Pharmacological inhibition of ataxia-telangiectasia mutated exacerbates acute kidney injury by activating p53 signaling in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61456-7	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 Segawa Yuka, Ishida Ryo, Kanehisa Fuminao, Nakai Kunihiro, Morimoto Mari, Seno Masafumi, Nakayama Mayuka, Kusaba Tetsuro, Katoh Norito, Tamagaki Keiichi	4. 巻 21
2. 論文標題 IgA nephropathy in a patient receiving infliximab for generalized pustular psoriasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Nephrology	6. 最初と最後の頁 366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12882-020-02015-0	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 -

1. 著者名 Shoji Keisuke, Zen Kan, Shiotsu Yayoi, Nakamura Tsukasa, Yanishi Kenji, Ushigome Hidetaka, Kusaba Tetsuro, Tamagaki Keiichi, Matoba Satoaki	4. 巻 20
2. 論文標題 Successful Endovascular Treatment for Very-Late-Onset and Acute Progressive Multiple Transplant Renal Segmental Artery Stenoses: A?Case Report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 S0041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2020.09.022	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5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 草場哲郎
2. 発表標題 シンポジウム「糖尿病性腎臓病の克服を目指して」 DKD治療におけるSGLT2阻害薬への期待
3. 学会等名 第35回日本糖尿病合併症学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 草場哲郎
2. 発表標題 ワークショップ DNA損傷応答と急性腎障害の進展
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 草場哲郎
2. 発表標題 シンポジウム14 新規解析手法とTargetでAKIに挑む、新規マウスモデルによるうっ血によるAKI増悪機序の解明
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 草場哲郎
2. 発表標題 イブニングセミナー5 基礎研究及び臨床研究から明らかとなったSGLT2阻害薬への期待
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 草場哲郎
2. 発表標題 パネルディスカッション2 心不全時の各臓器での代謝 新規マウスモデルを用いたうっ血に伴う腎障害機序の解明
3. 学会等名 第26回日本心不全学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔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 分担 者	的場 聖明  (Matoba Satoaki)  (10305576)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授    (24303)	

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