

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390261

研究課題名（和文） 鉱質コルチコイド受容体をターゲットとした慢性腎臓病克服に向けた
ストラテジー研究課題名（英文） Strategy for overcoming chronic kidney disease, focusing on
mineralocorticoid receptor

研究代表者

長瀬 美樹（NAGASE MIKI）

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：60302733

研究成果の概要（和文）：我々は、アルドステロンの受容体である鉱質コルチコイド受容体(MR)の過剰活性化が腎障害の重要なトリガーとなること、MR活性はリガンド以外に低分子量G蛋白 Rac1 によっても制御されることを報告してきた。本研究で我々は、『Rac1によるMR活性化』機構がアンジオテンシンII・食塩過剰モデル、肥満糖尿病モデルの腎障害に寄与すること、食塩感受性高血圧の規定要因でもあること、一部腎障害の炎症機転を担うことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that overactivation of the mineralocorticoid receptor (MR), a receptor for aldosterone, plays a crucial role in the progression of chronic kidney disease, and identified a novel mechanism of MR activation by the small G protein Rac1. In this study, we showed that 'MR activation by Rac1' participates in the renal damage of angiotensin II and salt excess model, obese diabetes model, as well as in salt-sensitive hypertension. We also demonstrated that 'Rac1-mediated MR activation' contributes to the inflammatory mechanism of kidney impairment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病・生活習慣病・糸球体足細胞障害・アルドステロン・Rac1

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームや糖尿病、高血圧といった生活習慣病より慢性腎臓病(CKD)に至る分子機序は十分解明されていない。近年、心腎血管系臓器障害のメディエーターとしてアルドステロンが注目されているが、我々は、アルドステロンの受容体である鉱質コルチコイド受容体(MR)の過度の活性化が足細胞障害、蛋白尿、腎障害の重要なトリガ

ーとなること、MR活性はアルドステロン以外の因子によっても制御されることを報告してきた。そしてアルドステロン非依存性の新たなMR活性化因子として低分子量G蛋白 Rac1 を同定した。

2. 研究の目的

本研究では、上記研究成果をさらに発展させるべく、(1) 一般的な動物モデルで『Rac1

による MR 活性化』が腎障害に関与する例を探索する、(2) Rac1 から MR 活性化、MR 活性化から腎障害にいたる未同定のカスケードを明らかにする、(3) Rac1 以外の因子による MR 活性化機構を解明する、(4) CKD 患者の腎生検サンプルを用いて、『Rac1 による MR 活性化』が関与する病態を臨床例で探索する、ことを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 肥満・糖尿病・高血圧・メタボリックシンドロームなど生活習慣病関連腎障害モデルを作製し、『Rac1-MR 活性化』の関与を検討する。当該モデルにおいて腎障害(アルブミン尿、腎病理組織像、電子顕微鏡像、腎障害関連因子の qPCR や免疫組織染色)、メタボリック指標、血中アルドステロン濃度、副腎摘、腎臓の Rac1 活性、MR 活性、Rac 阻害薬(NSC23766 や EHT1864)、MR 拮抗薬の効果を検討する。
- (2) 培養細胞系における Rac1 活性化刺激の探索。培養足細胞やメサングウム細胞に高血糖、酸化ストレス、アンジオテンシン(Ang) II、アルドステロン、サイトカイン、伸展刺激などの刺激を負荷した際の Rac1 の活性変化を解析するとともに、Rac1 の活性化にどのような GEF が関与するか、あるいはどのようなメディエーターが介在するか検討する。
- (3) Rac1 から MR 活性化、MR 活性化から腎障害にいたるカスケードの解明。特に、腎臓のどの細胞における Rac1-MR 系がどのような腎障害に関与するか、につき細胞特異的遺伝子改変マウスを作製して解析する。
- (4) Rac1 以外の MR 活性制御因子の探索。MR 核移行や転写活性の制御に関わる新たなシグナル分子を探索し、in vivo 病態モデルにおける関与の可能性を検討する。
- (5) 『Rac1 による MR 活性化』が関与する臨床病態の探索。腎臓における Rac1, MR 活性の簡便な評価法を確立し、腎生検材料を用いた臨床研究を行う。

4. 研究成果

- (1) 『Rac1-MR 系』が腎障害に関与する病態モデルの探索

①Ang II・食塩過剰腎障害モデル

Ang II は腎障害の中心的プレーヤーであり、腎細胞に発現する AT1 受容体に作用して腎障害作用を発揮すると考えられているが、一部のモデルでは Ang II によって産生されるアルドステロンの寄与も示されている。Ang II による腎障害は食塩過剰状態で増悪しやすいことが知られているが、食塩が AT1 受容体シグナルを増強するのか、あるいは MR カスケードを活性化するのか不明であった。

我々は、ヒトレニン遺伝子、ヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子のダブルトランスジ

ェニックマウスで、Ang II を恒常的に過剰産生するつくば高血圧マウスを用いて、Ang II・食塩過剰による腎障害機序を検討した。

まず、つくば高血圧マウスを厳しい減塩食(0.05%食塩食)で飼育すると、Ang II が過剰に存在するにもかかわらず高血圧や腎障害を発症しなかった。一方、食塩を過剰摂取させると、アルブミン尿、糸球体硬化、尿細管間質障害、細動脈病変、炎症細胞の浸潤など、多彩な腎障害が出現した。すなわち、Ang II 過剰モデルの腎障害は食塩依存性であることが示された。

次に、食塩負荷つくば高血圧マウスに副腎摘を施してアルドステロンを除去したところ、腎障害は消失し、アルドステロンを補充すると障害が再現した。実際に腎臓では MR カスケードが亢進していた。副腎摘を行っても Ang II・食塩は過剰に存在するわけで、本モデルの食塩による腎障害増悪には腎のアルドステロン/MR シグナルが深く関与することが示唆された。

ところが、つくば高血圧マウスに食塩を負荷すると血中アルドステロン濃度は低下しており、アルドステロンの存在は必要であるが、アルドステロン以外の要因が MR を活性化している可能性が推察された。そこで『Rac1-MR 系』の関与を検討したところ、本モデルでは食塩により腎の Rac1 活性が増強し、Rac 阻害薬や MR 拮抗薬にて Rac1-MR 系を抑制すると MR 活性が抑制され腎障害は改善した。一方、Rac1 や MR 活性に影響を与えないヒドララジン投与では腎障害は改善しなかった。

このように、Ang II 亢進が関与する腎障害は食塩過剰摂取により増悪しやすく、食塩は腎の AT1 受容体シグナリングを増強するのではなく、Rac1-MR 系活性化を介して腎障害を促進すること、こうした病態には Rac1 阻害、MR 阻害が有用と考えられることが示された。

②食塩感受性高血圧と『Rac1-MR 系』

我々はまた、『Rac1-MR 系』が食塩感受性高血圧の発症要因ともなっていることを示した。食塩負荷により食塩感受性 Dahl-S ラットでは血圧が上昇するのに対し、食塩非感受性 Dahl-R ラットでは血圧は変わらない。両ラットとも食塩により血中アルドステロン濃度は低下したが、前者では腎で Rac1 活性化、MR 活性化が生じたのに対し、後者では Rac1 活性、MR シグナリングは抑制されていた。そして食塩負荷 Dahl-S ラットに Rac 阻害薬や MR 拮抗薬を投与すると、食塩による血圧上昇が抑制された。それでは Rac1 活性化の違いは何によって引き起こされるか、ということになるが、Dahl-S ラットにおける食塩による Rac1 活性化には TIAM1 という GDP-GTP 交換因子(GEF)が関与することが示されている。

③糖尿病腎症、メタボリックシンドローム腎症、急性腎障害モデル

我々は、肥満糖尿病 KK-Ay マウス、LPS 誘発性急性腎障害モデルにおいても『Rac1-MR 系』が関与する知見を得ており、詳細なメカニズムの解析を進めている。

(2) Rac1 活性化因子の探索

培養ポドサイト、メサングウム細胞、心筋細胞において、Rac1 活性化因子の探索を進め、高血糖、酸化ストレスなどの刺激が Rac1 活性化を引き起こすことを見出した。現在関与する GEF・GAP の同定を進めている。

(3) 細胞特異的遺伝子改変マウスを用いた、Rac1 から MR 活性化、腎障害にいたるカスケードの解明。

①マクロファージ特異的 MR ノックアウトマウスを用いた検討で、マクロファージに発現する MR がマクロファージの M1/M2 極性制御を介して、炎症性サイトカイン産生、腎障害に関わること、マクロファージにおいても Rac1 が MR 活性調節に関わっており、マクロファージを介する炎症機転の制御が Rac 阻害薬による臓器保護作用の重要な局面を担っていることが示された。

②糸球体足細胞特異的遺伝子改変マウスの作製・解析については現在進行中である。

(4) MR 活性制御因子の探索

①酸化ストレス

酸化ストレス誘発因子として buthionine sulfoximine (BSO)を用いて、心筋細胞において酸化ストレスが MR 活性化を引き起こすメカニズムを検討した。BSO 負荷はグルタチオン欠乏、NADPH oxidase 活性化を介して酸化ストレスを増大させ、MR 依存性転写活性を亢進させた。当初、酸化ストレスが Rac1 とは独立に MR 活性を制御する可能性を考えたが、BSO は Rac1 を活性化し、Rac 阻害薬は MR 転写活性を著明に抑制したことから、酸化ストレスによる MR 活性化にも Rac1 が介在するものと考えられた。さらに、BSO により MR 核移行が増強し、Rac 阻害薬は核 MR を著しく減少させたことから、酸化ストレスの作用機序として、MR の核-細胞質シャトリングへの影響が示唆された。

②Ca 拮抗薬アゼルニジピンのリガンド非依存的 MR 活性抑制作用

最近、一部の Ca 拮抗薬が MR のリガンド結合部位に作用して MR 活性を抑制することが報告されている。我々は、そうした機序に加え、Ca 拮抗薬アゼルニジピンがリガンド非依存的機序で MR 活性を低下させること、そのメカニズムに MR 核移行抑制が関与していることを示した。

(5) 臨床研究

腎臓における Rac1・MR 活性の簡便な評価法の確立に難航している間に、RhoGDI α や Rac1 活性制御因子のひとつ Arhgap24 の遺伝子変異が一部のネフローゼ症候群や糸球体硬化症の原因となっているという報告がなされたため、デザインを変更し、こうした臨床新知見を取り入れた研究計画を準備中である。

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 73 件)

① Kawarazaki W, Nagase M, Yoshida S, Takeuchi M, Ishizawa K, Ayuzawa N, Ueda K, Fujita T. Angiotensin II- and Salt-Induced Kidney Injury through Rac1-Mediated Mineralocorticoid Receptor Activation. **J Am Soc Nephrol**. 査読有 2012;23(6):997-1007. DOI: 10.1681/ASN.2011070734.

② Shibata S, Fujita T. Mineralocorticoid receptors in the pathophysiology of chronic kidney diseases and the metabolic syndrome. **Mol Cell Endocrinol**. 査読有 2012;350(2):273-80. DOI: 10.1016/j.mce.2011.07.018.

③ Nagase M, Ayuzawa N, Kawarazaki W, Ishizawa K, Ueda K, Yoshida S, Fujita T. Oxidative stress causes mineralocorticoid receptor activation in rat cardiomyocytes: role of small GTPase Rac1. **Hypertension**. 査読有 2012;59(2):500-6. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.185520.

④ Shibata S, Mu S, Kawarazaki H, Muraoka K, Ishizawa K, Yoshida S, Kawarazaki W, Takeuchi M, Ayuzawa N, Miyoshi J, Takai Y, Ishikawa A, Shimosawa T, Ando K, Nagase M, Fujita T. Rac1 GTPase in rodent kidneys is essential for salt-sensitive hypertension via a mineralocorticoid receptor-dependent pathway. **J Clin Invest**. 査読有 2011;121(8):3233-43. DOI: 10.1172/JCI43124.

⑤ Kawarazaki H, Ando K, Fujita M, Matsui H, Nagae A, Muraoka K, Kawarazaki C, Fujita T. Mineralocorticoid receptor activation: a major contributor to salt-induced renal injury and hypertension in young rats. **Am J Physiol Renal Physiol**. 査読有 2011;300(6):F1402-9. DOI: 10.1152/ajprenal.00691.2010.

⑥ Shibata S, Fujita T. The kidneys and aldosterone/mineralocorticoid receptor system in salt-sensitive hypertension. **Curr Hypertens Rep**. 査読有

2011;13(2):109-15.

DOI: 10.1007/s11906-010-0175-6.

⑦ Nagase M, Fujita T. Endocrinological aspects of proteinuria and Podocytopathy in diabetes: role of the aldosterone/mineralocorticoid receptor system. **Curr Diabetes Rev**. 査読有 2011;7(1):8-16.

<http://www.benthamdirect.org/pages/content.php?CDR/2011/00000007/00000001/D0003D.SGM>

⑧ Kawarazaki H, Ando K, Nagae A, Fujita M, Matsui H, Fujita T. Mineralocorticoid receptor activation contributes to salt-induced hypertension and renal injury in prepubertal Dahl salt-sensitive rats. **Nephrol Dial Transplant**. 査読有 2010;25(9):2879-89.

DOI: 10.1093/ndt/gfq197.

⑨ Ando K, Ohtsu H, Arakawa Y, Kubota K, Yamaguchi T, Nagase M, Yamada A, Fujita T. Eplerenone combination Versus conventional Agents to Lower blood pressure on Urinary Antialbuminuric Treatment Effect Study Investigators. Rationale and design of the Eplerenone combination Versus conventional Agents to Lower blood pressure on Urinary Antialbuminuric Treatment Effect (EVALUATE) trial: a double-blinded randomized placebo-controlled trial to evaluate the antialbuminuric effects of an aldosterone blocker in hypertensive patients with albuminuria. **Hypertens Res**. 査読有 2010;33(6):616-21.

DOI: 10.1038/hr.2010.46.

⑩ Nagase M. Activation of the aldosterone/mineralocorticoid receptor system in chronic kidney disease and metabolic syndrome. **Clin Exp Nephrol**. 査読有 2010;14(4):303-14.

DOI:10.1007/s10157-010-0298-8.

⑪ Fujita T. Mineralocorticoid receptors, salt-sensitive hypertension, and metabolic syndrome. **Hypertension**. 査読有 2010;55(4):813-8.

DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.149062.

⑫ Nagase M, Fujita T. Mineralocorticoid receptor activation in obesity hypertension. **Hypertens Res**. 査読有 2009;32(8):649-57.

DOI: 10.1038/hr.2009.86.

[学会発表] (計 30 件)

① Ishizawa K, Role of mineralocorticoid receptor and Rac1 in inflammatory cytokine production in rat peritoneal macrophages.

American Society of Nephrology Kidney Week 2011, 11/10/2011, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, USA

② 長瀬美樹、酸化ストレスが鉱質コルチコイド受容体を活性化する分子メカニズムの解析、第34回日本高血圧学会総会、10/20/2011、栃木県総合文化センター (栃木)

③ 長瀬美樹、アルドステロンと腎障害、第51回日本腎臓学会東部学術大会教育講演 1、10/14/2011、京王プラザホテル (東京)

④ Nagase M、Oxidative stress causes mineralocorticoid receptor activation in rat cardiomyocytes: role of small GTPase Rac1. High Blood Pressure Research 2011 Scientific Sessions (oral)、9/23/2011、Walt Disney World Dolphin Resort, Florida, USA

⑤ Kawarazaki W、Exploring The Role of Rac1-Mineralocorticoid Receptor System in Renal Disease. High Blood Pressure Research 2011 Scientific Sessions、9/23/2011、Walt Disney World Dolphin Resort, Florida, USA (学会賞受賞)

⑥ Ayuzawa N、Aldosterone multiplies stretch-induced expression of target genes in cardiomyocytes、High Blood Pressure Research 2011 Scientific Sessions、9/21/2011、Walt Disney World Dolphin Resort, Florida, USA

⑦ Nagase M、Cross-talk of the small GTPase Rac1 and mineralocorticoid receptor cascades in cardio-renal disease. 2011 APS Conference: 7th International Symposium on Aldosterone and the ENaC/Degenerin Family of Ion Channels: Molecular Mechanisms and Pathophysiology (oral)、9/21/2011、Asilomar Conference Grounds, California, USA

⑧ 長瀬美樹、メタボリックシンドロームにおけるアルドステロン/鉱質コルチコイド受容体活性化機構と心臓器障害における役割、第16回日本女性科学者の会(奨励賞受賞講演)、6/19/2011、学士会館 (東京)

⑨ 石澤健一、ラット腹腔マクロファージの鉱質コルチコイド受容体と炎症に関する検討、第54回日本腎臓学会学術総会、6/16/2011、パシフィコ横浜会議センター (神奈川)

⑩ 長瀬美樹、アルドステロンと腎障害、第54回日本腎臓学会学術総会シンポジウム 1、6/15/2011、パシフィコ横浜会議センター (神奈川)

⑪ Yoshida S、Local, ligand-independent mineralocorticoid receptor activation by high glucose stimulation via Rac1. International Society of Hypertension、9/28/2010、Vancouver, Canada

⑫ Kawarazaki W、Ligand-Independent

Inhibition of Mineralocorticoid Receptor Activity by a Calcium Channel Blocker Azelnidipine. International Society of Hypertension 9/28/2010, Vancouver, Canada

⑬ Takeuchi M、Salt loading and inappropriate secretion of aldosterone contribute to the renal damage in angiotensin II overproducing mice. International Society of Hypertension、9/28/2010, Vancouver, Canada

⑭ Nagase M. Aldosterone and obesity. International Society of Hypertension 2010 satellite symposium (oral) 9/25/2010, Whistler, Canada

⑮ 長瀬美樹、アルドステロン／鉱質コルチコイド受容体と慢性腎臓病. 第 53 回日本腎臓学会学術総会ワークショップ 2、6/16/2010, 神戸.

⑯ Nagase M. Activation of Aldosterone /Mineralocorticoid Receptor System in Cardiovascular and Renal Disease. 第 14 回日本心血管内分泌代謝学会高峰謙吉研究奨励賞(学会賞受賞講演)(oral), 3/31/2010, 奈良.

⑰ Nagase M. Mineralocorticoid Receptor Activation and Cardiovascular Remodeling. The 14th Annual Scientific Session of the Society of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism Symposium 4 (oral), 3/31/2010, 奈良

⑱ Nagase M. Roles and Regulation of Mineralocorticoid Receptor Activation in Cardiovascular and Renal Disease. International Congress of Endocrinology 2010 official satellite symposium (oral), 3/24/2010, 仙台.

⑲ 長瀬美樹、慢性腎臓病の病態形成におけるミネラルコルチコイド受容体活性化とその新たな制御機構. 第 52 回日本腎臓学会学術総会シンポジウム 5, 6/4/2009, 横浜.

⑳ 長瀬美樹、高血圧・メタボリックシンドロームにおける腎障害機序の解明. 第 52 回日本腎臓学会学術総会大島賞(学会賞受賞講演), 6/3/2009, 横浜.

[図書] (計 10 件)

① 長瀬美樹、西村書店、18-5-7 副腎性器症候群 in カラー版内科学 (総編集: 門脇孝、永井良三)、2012 年、総 2000 頁 (in press)

② Nagase M, Fujita T. Science Publishers, Angiotensinogen as an adipokine. in "Adipokine" edited by Victor R. Preedy and Ross J. Hunter. 2011、P37-41

③ 長瀬美樹、中外医学社、アルドステロンと酸化ストレス in Annual Review 循環器、2011 年、P44-53

④ 長瀬美樹、医歯薬出版株式会社、メタボリ

ックシンドロームの新しい鉱質コルチコイド受容体活性化機序: 細胞内シグナル伝達物質 Rac1 in 医学のあゆみ 第 233 巻第 3 号、2010 年、P227-232

⑤ 鮎澤信宏、長瀬美樹、Life science information center、6-5. Dahl 食塩感受性ラット in 疾患モデルの作製と利用—循環器疾患、2010 年 P462-469

⑥ 長瀬美樹、南山堂、第 9 章 メタボリックシンドローム／酸化ストレス in CKD のサイエンス、2010 年

⑦ 長瀬美樹、中山書店、Vol3. 8-6 メタボリックシンドローム in 内科学書 改訂第 7 版 (総編集: 小川聡)、2009 年、総 2700 頁 (Vol3. P428-429)

⑧ Nagase M, Fujita T. Springer, Hypertension and obesity. in "Encyclopedia of Molecular Mechanisms of Diseases" edited by Lang F. 2009.

⑨ 長瀬美樹、社団法人日本内科学会、医学と医療の最前線 腎臓病とミネラルコルチコイド受容体 in 日本内科学会雑誌 第 98 巻第 11 号、2009 年、P2894-2902

⑩ 長瀬美樹、医歯薬出版株式会社、ミネラルコルチコイド受容体を介した心・腎障害 in 医学のあゆみ 第 231 巻第 8 号、2009 年、P809-814

[その他]

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~kid-endo/07-1ab/18-nagaselab/nagaselabtop.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長瀬 美樹 (NAGASE MIKI)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 60302733

(2) 研究分担者

藤田 敏郎 (FUJITA TOSHIRO)

東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 10114125

