

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890212

研究課題名（和文） 食塩感受性高血圧におけるアンジオテンシン受容体結合蛋白の機能的意義についての検討

研究課題名（英文） Pathophysiological Role of Angiotensin Receptor Binding Protein in Salt-sensitive Hypertension

研究代表者

三橋 洋 (MITSUHASHI HIROSHI)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：90517020

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、この ATRAP (Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein) について、高レベルの発現が認められる腎での発現調節と特に食塩感受性高血圧における病態生理学的意義に焦点をあてて、培養細胞、実験動物（高食塩・アンジオテンシン II 負荷高血圧マウス、Dahl 食塩感受性高血圧ラット、腎特異的 ATRAP 過剰発現マウス）、およびヒト腎組織を用いて細胞レベルおよび個体レベルでの総合的解析を行い、ATRAP の腎細胞・腎組織での機能解析、および生体腎での詳細な発現分布と病態での発現調節について明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Dahl salt-sensitive hypertensive rats (DS rats, 3 wks of age) were divided into three groups for oral administration of vehicle (vehicle group) or ARB either continuously from 6 to 16 wks of age (continuous ARB group) or transiently from 3 to 10 wks of age (transient ARB group) and fed high salt diet from 6 to 16 wks of age. DS rats fed a normal salt diet were used as controls (control group). Not only continuous ARB treatment (SBP 149±9 mmHg) but also transient ARB treatment (SBP 142±7 mmHg) significantly improved hypertension at 16 wks of age with reduction of urinary protein excretion, as compared to vehicle group (SBP 199±15 mmHg). With respect to the regulation of ATRAP expression in the kidney, the renal ATRAP expression was significantly suppressed in vehicle group compared with control group. However, transient ARB treatment as well as continuous ARB treatment significantly recovered the suppressed renal ATRAP expression. These results indicate that the transiently administrated ARB-mediated sustained activation of renal ATRAP expression may play a role in the long-term therapeutic effects of ARB even after withdrawal on hypertension and renal injury in salt-induced hypertension.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	840,000	252,000	1,092,000
2010 年度	760,000	228,000	988,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

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：高血圧学

1. 研究開始当初の背景

| 高血圧や慢性腎炎，糖尿病性腎症の発症・

進展,そして高血圧性腎障害,慢性腎炎,糖尿病性腎症の増悪から腎不全へと至る過程において,レニン-アンジオテンシン系の主要な受容体であるAT1受容体とその情報伝達系の腎局所での活性化は極めて重要な役割を演じている.また,最近では食塩感受性高血圧の発症・進展とそれともなう心血管系病変および腎障害における腎でのAT1受容体情報伝達系活性化の関与の可能性が指摘されている.

AT1受容体に直接結合してその機能を調節する因子の存在は以前から想定されており,長年にわたって多くの研究室で単離同定が試みられてきたが,申請者の研究室では情報伝達系活性化や受容体 internalization に重要なAT1受容体C末端への新規直接結合因子としてATRAP (Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein)の単離同定に世界で初めて成功した.研究代表者の研究室では,ATRAPが培養細胞ではAT1受容体を細胞内で捕捉して細胞表面のAT1受容体を減少させることによりAT1受容体情報伝達系に抑制的に作用すること,ATRAPが生体組織に広く分布し特に腎に高い発現が認められること,および腎内では尿細管に多く発現し,特に遠位尿細管においてAT1受容体との共局在がみられることなどを世界で初めて報告した.

2. 研究の目的

本研究課題では,このATRAPについて,高レベルの発現が認められる腎での発現調節と特に食塩感受性高血圧における病態生理学的意義に焦点をあてて,培養細胞,実験動物(高食塩・アンジオテンシンII負荷高血圧マウス,Dahl食塩感受性高血圧ラット,腎特異的ATRAP過剰発現マウス),およびヒト腎組織を用いて細胞レベルおよび個体レベルでの総合的解析を行い,ATRAPの腎細胞・腎組織での機能解析,および生体腎での詳細な発現分布と病態での発現調節について明らかにすることを目的とする.

3. 研究の方法

(1) ATRAPの遠位尿細管細胞でのNa(+) transporter系に対する機能の解析: 通常型のATRAP発現ベクターに加えて,アデノウイルス発現ベクターを用いて高効率ATRAP発現ベクターを作製に成功した.また,内在性ATRAP遺伝子発現をノックダウンさせるsiRNA-ATRAPの配列決定にも成功した.そして,ATRAPの局所発現解析実験においてATRAPの内在性発現が認められた細胞のうち,特に高発現が認められた遠位尿細管細胞の腎細胞培養系において,wild type ATRAPを過剰発現あるいはsiRNA-ATRAPを遺伝子導入することにより細胞内でのATRAP発現を増加ある

いは減少させて,receptor binding assay,細胞免疫染色法,蛋白質リン酸化酵素活性測定,epithelial Na(+) channel (ENaC)やNa(+)-Cl(-) cotransporter (NCC)などのNa(+) transporter活性および発現解析(mRNA,蛋白質),パッチクランプ法によるNa(+) current測定などを行い,細胞培養液へのNa(+)負荷刺激,アンジオテンシンII刺激,あるいは生体での圧負荷を細胞レベルでsimulateする周期的伸展刺激が遠位尿細管細胞に与える影響に対するATRAPの作用について検討を加えた.

(2) 食塩感受性高血圧モデル動物におけるATRAP発現調節と食塩感受性高血圧・腎障害との関係および降圧薬投与の影響についての検討: 申請者らは,『組織ATRAP発現量/AT1受容体発現量の低下→組織局所でのATRAP発現低下によるAT1受容体情報伝達系に対する内在性抑制機序の減弱→組織局所での相対的なAT1受容体情報伝達系の活性化→食塩感受性高血圧,腎障害の発症・進展』という仮説を実証するためのひとつの手段として,食塩感受性高血圧モデル動物における組織ATRAP発現調節とAT1受容体発現との関連について検討した.具体的には,食塩感受性高血圧モデル動物であるDahl食塩感受性高血圧ラットにおける高血圧,腎障害の進行ともなう腎ATRAPの発現調節をWestern blot法により検討した.また,Dahl食塩感受性高血圧ラットに対してAT1受容体阻害薬の持続投与および思春期前の一過性投与を施行し,対照治療群と比較した降圧効果と腎障害の改善度について検討した.

具体的には,Dahl食塩感受性高血圧ラットを次の4群に分けた.第1群(対照群)には0.3%NaCl食を与え,第2群~第4群には8%NaCl食を与えた.さらに第3,第4群にはAT1受容体阻害薬(olmesartan,8mg/kg/Day)を3週齢から投与し,第3群では,AT1受容体阻害薬を10週齢までの性成熟期前の一過性に投与とし,第4群ではAT1受容体阻害薬を15週齢まで持続投与した.そして,tail-cuff法による血圧測定によりAT1受容体阻害薬の降圧効果を検討し,各群の尿蛋白量と各群の腎皮質におけるATRAP,AT1受容体発現量をWestern blot法,免疫組織染色とRT-PCR法で測定し,さらに腎皮質組織中のNADPHコンポーネントであるp22phox,p47phox,Rac-1の発現をWestern blot法,免疫組織染色で検討した.

4. 研究成果

(1) ATRAPの遠位尿細管細胞での機能の検討.

培養遠位尿細管細胞(mDCT細胞)にはAT1受容体およびATRAPの内在性発現がmRNAレベルおよび蛋白レベルで認められた.よって,

まず mDCT 細胞における AT1 受容体系活性化の病態生理学的意義を明らかにするために、mDCT 細胞をアンジオテンシン II (Ang II) で刺激し、尿細管細胞の線維化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) に重要な役割を担っている transforming growth factor- β (TGF- β) の産生の変化について検討した。mDCT 細胞への Ang II 刺激は濃度依存的、時間依存的に TGF- β 産生を増加させた。次に Ang II 刺激による TGF- β 産生増加における Ang II 受容体サブタイプの関与を調べるために、AT1 受容体阻害薬 (candesartan, 10-5M) あるいは AT2 受容体阻害薬 (PD123319, 10-5M) を前投与した場合の Ang II (10-6M) 刺激による TGF- β 産生増加への影響について検討したところ、AT1 受容体阻害薬による TGF- β 産生増加抑制作用が認められ、mDCT 細胞における AT1 受容体活性化は尿細管細胞の線維化反応を促進していることが明らかにされた。引き続いて、アデノバクターにより ATRAP を高発現させたところ、Ang II 刺激による TGF- β 産生増加は完全に抑制された。さらに、mDCT 細胞における酸化ストレスおよび Na(+)-transporter 系の指標として、それぞれ NADPH oxidase 4 (NOX4) と epithelial sodium channel α -subunit (α ENaC) の mRNA 発現に与える Ang II 刺激と ATRAP 高発現の影響を検討したところ、mDCT 細胞において Ang II 刺激は NOX4) と epithelial sodium channel α -subunit (α ENaC) の mRNA 発現を増加させたが、ATRAP 高発現はこれらの増加を有意に抑制した。

(2) 食塩感受性高血圧モデル動物における ATRAP 発現調節と食塩感受性高血圧・腎障害との関係および降圧薬投与の影響についての検討。

まず、Dahl 食塩感受性高血圧ラットの血圧の変化については、第 15 週齢の時点で、AT1 受容体阻害薬の一過性投与を行った第 3 群において有意な降圧効果 (142 \pm 7 mmHg) が得られた (対照群=第 1 群, 128 \pm 2 mmHg; 高食塩負荷群=第 2 群, 199 \pm 15 mmHg; AT1 受容体阻害薬持続投与群=第 4 群, 149 \pm 9 mmHg) (図 4)。次に、Dahl 食塩感受性高血圧ラットでの腎障害について、尿蛋白量と腎組織での酸化ストレス指標に焦点を当てて解析した。その結果、第 15 週齢の時点で、高食塩負荷群 (第 2 群) では有意な尿蛋白量の増加がみられたが、AT1 受容体阻害薬投与群では、一過性投与群 (第 3 群) および持続投与群 (第 4 群) とともに同様に有意な尿蛋白減少効果が認められた (図 5, A)。また、腎での組織酸化ストレス指標について検討したところ、高食塩負荷群 (第 2 群) では NADPH オキシダーゼの膜コンポーネントである p22phox は対照群に比較して蛋白レベルで有意な発現増強がみ

られたが、AT1 受容体阻害薬投与群では、一過性投与群 (第 3 群) および持続投与群 (第 4 群) とともに同様に有意な p22phox の発現抑制を認めた。そこで、腎組織における ATRAP 発現量について検討したところ、高血圧と尿蛋白増加がみられた高食塩負荷群 (第 2 群) では ATRAP mRNA および蛋白の有意な減少がみられたが、AT1 受容体阻害薬投与群では、一過性投与群 (第 3 群) および持続投与群 (第 4 群) とともに ATRAP 発現量の対照群と同等レベルへの回復が認められた。

本研究の結果は、マウス腎臓尿細管細胞における AT1 受容体シグナル活性化が尿細管細胞の線維化、酸化ストレス、Na+再吸収に重要であることを示すとともに、尿細管細胞における内在性 AT1 受容体抑制系としての ATRAP の機能的意義を示唆している。また、食塩感受性高血圧における腎障害への AT1 受容体を介した酸化ストレス亢進の関与が示されるとともに、食塩感受性高血圧に対する ARB の一過性投与による長期的な降圧効果や腎障害の改善効果には腎組織における持続的な ATRAP の発現回復効果が関与している可能性が示唆される。今後の課題としては、腎特異的 ATRAP 過剰発現マウスを用いて、食塩感受性高血圧における ATRAP の機能的意義についての解析を行うとともに、慢性腎臓病合併高血圧患者の腎生検標本を用いてヒト腎組織における ATRAP 発現解析をおこなう予定である。

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 3 件)

1 Masuda S, Mitsuhashi H (他 18 名), Umemura S, et al. Expression of angiotensin II type 1 receptor interacting molecule in normal human kidney and IgA nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 299: F720-F731, 2010. (査読有)

2 Tsurumi-Ikeya Y, Mitsuhashi H (他 12 名), Umemura S, et al. Sustained inhibition of oxidized low-density lipoprotein is involved in the long-term therapeutic effects of apheresis in dialysis patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30: 1058-1065, 2010. (査読有)

3 Mitsuhashi H, Tamura K (他 18 名), Umemura S, et al. Effect of losartan on ambulatory short-term blood pressure variability and cardiovascular remodeling in hypertensive patients on hemodialysis. *Atherosclerosis.* 207: 186-190, 2009. (査読有)

〔学会発表〕（計1件）

1 Mitsuhashi H, et al. Effect of Losartan on Ambulatory Short-Term Blood Pressure Variability and Cardiovascular Remodeling in Hypertensive Patients on Hemodialysis. Renal Week 2009. 42nd Annual Meeting & Scientific Exposition of American Society of Nephrology (San Diego, CA), Oct 27-Nov 1, 2009.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/res/tamura_1005.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三橋 洋 (MITSUHASHI HIROSHI)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：90517020

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

田村功一 (TAMURA KOUICHI)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：40285143