

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590352

研究課題名(和文)心腎貧血症候群の病態におけるレニン・アンジオテンシン系の新規因子の解析

研究課題名(英文)Studies on the novel factor in the renin-angiotensin system in the pathophysiology of the cardio-renal anemia syndrome

研究代表者

高橋 和広 (TAKAHASHI, Kazuhiro)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80241628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：プロレニン受容体は、レニンとプロレニンに特異的に結合する受容体である。赤芽球系細胞であるYN-1細胞とYN-1-0A細胞において、プロレニン受容体の発現を明らかにした。プロレニン受容体の発現は、インターフェロン- $\gamma$ 、エリスロポエチンやトリヨードサイロニンの影響を受けることが判明した。さらに、プロレニン受容体は細胞増殖を刺激する。プロレニン受容体は、造血に関与し、腎性貧血等のある種の貧血の病態に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Prorenin receptor is a specific receptor for renin and prorenin. We have shown expression of prorenin receptor in cultured erythroid cells, YN-1 cells and YN-1-0A cells. Interferon-gamma, erythropoietin and triiodothyronine affected its expression levels. Prorenin receptor stimulates cell proliferation. These findings have raised the possibility that prorenin receptor is related to erythropoiesis and may play some pathophysiological roles in anemia, such as renal anemia.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：プロレニン受容体 赤芽球 血 トリヨードサイロニン インターフェロン- $\gamma$  エリスロポエチン トリヨードサイロニン 腎性貧血

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性の腎疾患に脳卒中、狭心症、心筋梗塞、慢性動脈疾患が合併しやすいことは以前より知られている。貧血は慢性の腎疾患と心不全の両者に合併し、それらの病態に深く関与していることが明らかになってきており、「心腎貧血症候群(The cardio-renal anemia syndrome)」と呼ぶことが提唱されている。

(2) レニン・アンジオテンシン系の構成因子であるアンジオテンシノーゲンやアンジオテンシン受容体は、赤芽球系細胞にも発現しており、アンジオテンシン II は赤芽球の増殖刺激作用を介して造血を刺激していることが報告されている。

(3) レニンとプロレニンに特異的に結合する受容体であるプロレニン受容体が最近発見された。プロレニン受容体は、350 個のアミノ酸からなる 1 回膜貫通型蛋白である。レニンの前駆体であるプロレニンには、アンジオテンシノーゲンをアンジオテンシン I に変換する酵素活性がほとんどないと考えられてきたが、プロレニン受容体に結合することによって、レニンとほぼ同等の酵素活性を持つようになることが明らかになってきた。さらに、プロレニン受容体は、腎臓、脳、心臓、脂肪組織等様々な器官に発現しており、MAP キナーゼを介したシグナルによって、細胞増殖を刺激する。

(4) プロレニン受容体の赤芽球系細胞における発現の報告は無いが、申請者等は予備実験によってプロレニン受容体が蛋白レベルで赤芽球系細胞である YN-1 細胞に発現していることを発見した。

## 2. 研究の目的

「心腎貧血症候群(The cardio-renal anemia syndrome)」の病態におけるレニン・アンジオテンシン系の関与、特に最近発見されたプロレニン受容体の関与を解明することを目的とする。赤芽球系細胞の培養細胞を用いて、赤芽球系細胞におけるプロレニン受容体の発現を明らかにする。特に、分化や低酸素における発現の変化と、炎症性サイトカインの効果を検討する。次いで、プロレニン受容体が赤芽球系細胞の分化あるいは増殖に促進的に作用するのか、機能の解析を行なう。

## 3. 研究の方法

赤芽球系細胞である YN-1 細胞と YN-1-0A 細胞を用いた。増殖実験には、乳癌培養細胞株である MCF-7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-231 を用いた。

ウェスタンブロット法と定量的 RT-PCR にて発現を検討した。プロレニン受容体特異的 siRNA を用いて内因性の発現を抑制して、細胞増殖への影響を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 赤芽球系細胞におけるプロレニン受容体の発現と TGF- $\beta$ ・インターフェロン- $\gamma$  の効果

プロレニン受容体の蛋白および mRNA が、赤芽球系細胞である YN-1 細胞と YN-1-0A 細胞に発現していることを明らかにした。

YN-1-0-A 細胞において、TGF- $\beta$  の処理によって分化を刺激して、プロレニン受容体の発現をウェスタンブロット法と定量的 RT-PCR にて検討したが、プロレニン受容体の発現に変化はみられなかった。

他方、インターフェロン- $\gamma$  の 48 時間の刺激によって、プロレニン受容体の細胞内蛋白量の有意な増加がみられた。インターフェロン- $\gamma$  によってプロレニン受容体 mRNA の発現量に有意の増加はみられなかったので、プロレニン受容体蛋白の安定性の増大によるものと考えられた。

以上の結果から、赤芽球系細胞に発現するプロレニン受容体が、ある種の貧血の病態に関与する可能性が示唆された。

(2) 赤芽球系細胞におけるプロレニン受容体の発現機構の解析：エリスロポエチン、甲状腺ホルモン(トリヨードサイロニン; T3)、アンジオテンシン、低酸素の効果の検討

赤芽球系細胞である YN-1 細胞において、エリスロポエチンあるいは T3 刺激により (P)RR の mRNA の発現に濃度依存的な上昇が確認された(いずれも、コントロール群と比べて約 1.6 倍)。他方、ウェスタンブロット法による検討では、エリスロポエチンや T3 の刺激により (P)RR タンパクの発現レベルの増加傾向は見られたが、統計学的に有意な増加は確認されなかった。

アンジオテンシン II 刺激では濃度によらず mRNA・タンパクレベル共に (P)RR の発現に有意な差は確認されなかった。

YN-1 細胞を酸素分圧 1%の低酸素条件で 24 時間・72 時間培養し、低酸素の (P)RR タンパクの発現への効果を検討した。しかし、低酸素による (P)RR タンパク発現の有意な変化は見られなかった。

今回の研究により、赤芽球系細胞において、(P)RR の発現がエリスロポエチンや甲状腺ホルモン(T3)によって増大することが初めて明らかになった。T3 は赤芽球増殖刺激作用を有するが、本作用には (P)RR の発現誘導が関与している可能性が示唆された。

(3) プロレニン受容体の細胞増殖における機構の解明

予備実験によって、YN-1 細胞は浮遊細胞であり、siRNA 導入効率等が低く、プロレニン受容体の細胞増殖への効果の検討には不向きであることが判明したため、ヒト乳癌培養細胞を用いて検討を行った。

プロレニン受容体は検討した 4 種全例の乳

癌培養細胞株 (MCF-7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-231) で発現が確認された。プロレニン受容体特異的 siRNA を用いて内因性の発現を抑制して、細胞増殖への影響を検討した。プロレニン受容体の発現をノックダウンすると、培養細胞の増殖が有意に抑制された。

アンジオテンシン II の添加によって細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK1/2; extracellular regulated kinase 1/2) のリン酸化や細胞増殖の促進はみられなかった。他方、プロレニンを添加すると ERK1/2 のリン酸化がみられた。V-ATPase 阻害剤であるバフィロマイシン A1 を添加すると細胞増殖が著しく抑制された。

プロレニン受容体のシグナリングは、細胞増殖刺激に作用することが明らかとなり、細胞増殖刺激経路として、ERK1/2 あるいは V-ATPase を介した作用が示唆された。

#### 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 5 件)

Ohba K, Suzuki T, Nishiyama H, Kaneko K, Hirose T, Totsune K, Sasano S, Takahashi K. Expression of (pro)renin receptor in breast cancers and its effect on cancer cell proliferation. Biomed Res (Tokyo) 査読有、35:117-126; 2014.

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biomedres>

Yamamoto H, Kaneko K, Ohba K, Morimoto R, Hirose T, Satoh F, Totsune K, Takahashi K. Increased expression of (pro)renin receptor in aldosterone-producing adenomas. Peptides 査読有、49:68-73; 2013.

DOI: 10.1016/j.peptides.2013.08.022.

Takahashi K, Yatabe M, Fujiwara K, Hirose T, Totsune K, Yashiro T. In situ hybridization method reveals (pro)renin receptor expressing cells in the pituitary gland of rats: Correlation with anterior pituitary hormones. Acta Histochem Cytochem 査読有、46:47-50; 2013.

DOI: 10.1267/ahc.12030.

Kaneko K, Nishiyama H, Ohba K, Shibasaki A, Hirose T, Totsune K, Furuyama K, Takahashi K. Expression of (pro)renin receptor in human erythroid cell lines and its increased protein accumulation by interferon-. Peptides 査読有、37: 285-289; 2012.

DOI: 10.1016/j.peptides.2012.07.015.

Hirose T, Hashimoto M, Totsune K, Metoki H, Hara A, Satoh M, Kikuya M, Ohkubo

T, Asayama K, Kondo T, Kamide K, Katsuya T, Ogiwara T, Izumi S, Rakugi H, Takahashi K, Imai Y. Association of (pro)renin receptor gene polymorphisms with lacunar infarction and left ventricular hypertrophy in Japanese women: the Ohasama study. Hypertens Res 査読有、34:530-535; 2011.

DOI: 10.1038/hr.2010.274.

[学会発表](計 11 件)

Takahashi K, Ohba K, Nishiyama H, Kaneko K, Hirose T, Totsune K, Sasano H, Suzuki T. (Pro)renin receptor in the breast cancer and its possible pathophysiological role in cancer cell proliferation. 13th International Conference on Endothelin. 2013 年 9 月 8~11 日、東京

Ohba K, Nishiyama H, Kaneko K, Hirose T, Totsune K, Takahashi K. Role of (pro)renin receptor in cell proliferation. The 37th World Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2013) 2013 年 7 月 21~26 日、Birmingham, UK

Nishiyama H, Kaneko K, Ohba K, Hirose T, Totsune K, Takahashi K. Effect of triiodothyronine and erythropoietin on expression of (pro)renin receptor in the human erythroid cell line, YN-1.

International symposium of aldosterone and related substances in hypertension 2013 (ISARSH2013). 2013 年 4 月 27~28 日、仙台

Ohba K, Nishiyama H, Kaneko K, Hirose T, Totsune K, Sasano H, Suzuki T, Takahashi K. (Pro)renin receptor in breast carcinoma. International symposium of aldosterone and related substances in hypertension 2013 (ISARSH2013). 2013 年 4 月 27~28 日、仙台

Yamamoto H, Kaneko K, Ohba K, Morimoto R, Hirose T, Satoh F, Totsune K, Takahashi K. High expression of (pro)renin receptor in tumor tissues of aldosterone-producing adrenocortical adenomas. International symposium of aldosterone and related substances in hypertension 2013 (ISARSH2013). 2013 年 4 月 27~28 日、仙台

西山浩史、金子桐子、大場浩史、廣瀬卓男、戸恒和人、高橋和広。赤芽球系細胞 YN-1 におけるプロレニン受容体の発現の検討：エリスロポエチンとトリヨードサイロニンの効果。第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013 年 4 月 25 日~27 日、仙台

西山浩史、大場浩史、金子桐子、宍戸夕

記、高橋日和、廣瀬卓男、戸恒和人、高橋和広。赤芽球系細胞 YN-1 におけるプロレニン受容体の発現：プロレニン受容体の造血への関与の示唆。第 42 回日本心脈管作動物質学会、2013 年 2 月 8 日～9 日、奈良

西山浩史、金子桐子、大場浩史、廣瀬卓男、戸恒和人、高橋和広。赤芽球系細胞 YN-1 におけるプロレニン受容体の発現の検討：トリヨードサイロニンの効果。第 16 回日本心血管内分泌代謝学会、2012 年 11 月 23 日～24 日、東京

Nishiyama H, Kaneko K, Ohba K, Yoshioka T, Shimizu T, Hirose T, Totsune K, Takahashi K. Effect of triiodothyronine and angiotensin-II on expression of (pro)renin receptor in the human erythroid cell line, YN-1. 15th International Congress of Endocrinology and 14th European Congress of Endocrinology. 2012 年 5 月 5～9 日、Florence, Italy

Kaneko K, Shibasaki A, Nishiyama H, Hirose T, Ohba K, Totsune K, Furuyama K, Takahashi K. Expression of (pro)renin receptor in human erythroid cell lines: the effect of interferon-gamma. 53rd American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition, 2011 年 12 月 10-13 日、San Diego, CA, USA

金子桐子、柴崎瑛子、廣瀬卓男、大場浩史、西山浩史、戸恒和人、高橋和広。ヒト赤芽球系培養細胞におけるプロレニン受容体の発現：interferon- の効果。第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21 日～24 日、京都

〔図書〕(計 1 件)

Takahashi K, Totsune K. Urotensin peptides. In Handbook of Biologically Active Peptides Second Edition. Kastin AJ, ed. Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 2013、1437-1442 ページ。

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.tohoku.ac.jp/org/health/81/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋 和広 (TAKAHASHI, Kazuhiro)

東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：80241628

(2)研究分担者

戸恒 和人 (TOTSUNE, Kazuhito)  
東北福祉大学・総合福祉学部・教授  
研究者番号：10217515

金子 桐子 (KANEKO, Kiriko)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：10545784