

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591221

研究課題名(和文) イオントランスポーターの翻訳後制御に着目した高血圧性心腎連関の分子機序の解明

研究課題名(英文) Analyses of molecular mechanism of hypertensive cardio-renal relationships focusing on post-transcriptional regulations of ion-transporters.

研究代表者

石上 友章 (ISHIGAMI, Tomoaki)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：50264651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：『高血圧症の食塩感受性をもたらす尿細管性機序の分子病態』にかかわる分子の遺伝学的・生物学的意義を明らかにすることができた。高度に分化した尿細管上皮細胞は、相互にtight junctionによって結合し、発生学的に尿管芽由来の尿細管腔を形成している。これまでの我々の研究によって、近位尿細管細胞でのアンジオテンシノーゲン、結合尿細管細胞で発現するレニンにより構成される尿細管RA系が、アルドステロン感受性遠位尿細管細胞に働いてENaCを介するナトリウム再吸収を調整することで生体の恒常性を保ち、その破綻が食塩感受性の病態をもたらし、高血圧症を発症する分子病態モデルを確立した。

研究成果の概要(英文)：Our research revealed the genetic and biological significance of molecules involved in "Molecular pathogenesis of tubular mechanisms leading to salt-sensitive hypertension." Renal tubular epithelial cells, joined by tight junction with each other, were highly differentiated, forming a tubule lumen of the ureteric bud-derived embryologically. Our research to date, a renal tubular RA system, the ENaC working in aldosterone-sensitive distal tubule cell work as endogenous endocrine systems for maintaining homeostasis. We have established molecular pathogenesis models maintaining homeostasis by regulating sodium reabsorption and via its collapse leading to pathology of salt-sensitivity, developing hypertension.

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 食塩感受性 尿細管 レニン アンジオテンシノーゲン レニン・アンジオテンシン系

### 1. 研究開始当初の背景

近年、慢性腎臓病(CKD)が、新たな心血管病のリスクファクターとして注目されている。臓器としての心臓と腎臓において、相互に致死的な疾病をもたらす『心腎連関』のメカニズムが存在するとされている。数々の疫学的研究から『心腎連関』の存在は、明白であるが、その分子メカニズムは不明である。従来より、我々は腎臓尿細管上皮細胞の上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)に特異的なユビキチン化酵素である Nedd4L に着目して、本態性高血圧症の成因を解明してきた。これまでに、ヒト Nedd4L 遺伝子産物の分子多様性と、evolutionary new isoform(Isoform I)を産生する SNP の発見。(Ishigami T, Dunn M, et al. JHG 2002) Nedd4L 遺伝子のラットでの分子多様性の発見、アルドステロン感受性遠位性ネフロン(ASDN)における **ENaC と Nedd4L の共局在**および、遺伝性食塩感受性高血圧症との関連。(Umemura M, Ishigami T, et al. BBRC 2006) 本邦人での関連研究。(Ishigami T, et al. GGI 2007) Nedd4L C2 ドメインを有する Isoform I がタンパクレベルで他の isoform に対する dominant negative 効果により ENaC の発現を抑制し、**高血圧発症をもたらす分子メカニズムの解明**。(Araki N, Ishigami T, et al. Hypertension 2008) **ヒト C2 ドメイン結合タンパク質として NPC2** の同定と、ASDN における共局在および、NPC2 発現における食塩感受性分子として性質。(Araki N, Ishigami T, et al. BBRC 2009) 食塩感受性高血圧の診断に有効な、**新規多機能家庭血圧計(HBPM)**が、携帯型血圧計(ABPM)に対する優位性があること。(Ushio H, Ishigami T, et al. CEN2009)を明らかにしてきた。RC.Lifton, J.M.Lalouel 等の遺伝性家族性高血圧症の遺伝子解析によって、腎尿細管におけるナトリウム再吸収機構に高血圧症の一次的な異常が存在することが明らかになった。これまでに我々が明らかにした Nedd4L による ENaC の制御機構に着目した分子病態モデルにおいては、遺伝性、家族性に乏しいと考えられる本態性高血圧においては、緻密班以後の ASDN の主要なナトリウムチャンネルである ENaC を食塩感受性に発現亢進に至らしめる分子病態があり、ユビキチン化を介する ENaC の proteasome での分解を通じて、発現を制御する Nedd4L が重要な役割を果たしていると考えられている。本モデルでは、緻密班以前の強力なナトリウム再吸収恒常性維持機構である TGF や、myogenic response による腎臓内での生理的な修正の及ばない distal nephron におけるナトリウム再吸収異常に対する、全身的な適応として高血圧症を発症するに至る病態を想定している。こうした病態モデルは、現在進行中の食塩感受性動物モデル(C57Bl6/J)を用いた、食塩負荷・薬理学的介入研究により、ASDN におけるアルドステロン非依存性の鉍質コ

ルチコイド受容体(MR)活性化、sgk1 活性化と Nedd4L の反応性の活性化を明らかにした実験からも、分子病態生理学的に支持されると考えている。(Ushio H, Ishigami T, et al. ESH 2010, Oslo)

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、心腎イオンチャンネルの共通分子(Nedd4L)による翻訳後制御メカニズムに着目した高血圧性心腎連関の理解と制圧が目標であり、以下にあげた二つのレベルで統合的に遂行することにある。**高血圧症分子病態モデルの解明** 高血圧症の成因を明らかにするとともに、高血圧性臓器障害に認められる、致死的な心腎連関の分子基盤を明らかにする。**高血圧診療モデルの確立** 分子病態モデルに基づいた、理論的、より効果的な致死的心血管イベント抑制のための診療モデルの確立により、健康長寿を達成すること。

### 3. 研究の方法

これまでの研究成果を受けて、本研究期間内に**本態性高血圧症の食塩感受性の分子病態および、心腎連関に関する分子病態を、より詳細に解明する。**具体的には、**(ノックアウトマウスの作成と解析)**昨年作成に成功し、現在繁殖中の**マウス Nedd4L C2 ドメイン全身性ノックアウトマウス**の表現型の解析。特に、食塩摂取量の変化に対する、全身血圧、尿細管細胞における ENaC, MR, sgk1 等のナトリウム再吸収機構関連分子の発現を解析することで、distal nephron におけるナトリウム再吸収機構と食塩感受性高血圧症との関連を決定的に明らかにする。**(長期間食塩負荷、RA 系抑制薬投与実験)** C2 ドメインノックアウトマウスおよび、食塩感受性高血圧モデルである C57Bl6/J を対象にして、**長期間の食塩負荷、RA 系抑制薬投与実験**を行い、心、腎における Nedd4L および、その基質である ENaC/SCN5A 分子の分子病態を明らかにして、心腎連関の分子病態を明らかにする。さらに、これまでの基礎的な検討を臨床医学にトランスレーションする試みとして、以下の研究に着手し遂行する。**(食塩感受性におけるバイオマーカーの確立)**ヒト Nedd4L C2 ドメイン結合タンパクとしてクローニングした NPC2 は、Dahl ラットを対象にした解析から、ENaC/Nedd4L と ASDN において共局在し、その発現が食塩感受性に制御されることを明らかにした。(Araki N, Ishigami T, et al. BBRC 2009) NPC2 は、その N 端に signal peptide を持ち、尿中に分泌される。ヒトおよびマウス、ラットの尿中 NPC2 を定量する ELISA 法を開発、**高血圧症の食塩感受性におけるバイオマーカーとしての可能性を検討し、ベッドサイドでの応用を目指す。**

### 4. 研究成果

#### 研究の学術的背景

RC.Lifton, J.M.Lalouel らの遺伝性家族性高血圧症の遺伝子解析によって、腎尿細管におけるナトリウム再吸収機構に高血圧症の一

次的な異常が存在する可能性が示唆された。従来より、研究代表者は**アルドステロン感受性腎臓尿細管上皮細胞(ASDN)**の上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)に特異的なユビキチン化酵素である Nedd4L に着目して、本態性高血圧症の成因を解明してきた。これまでに研究代表者らが明らかにした Nedd4L による ENaC の制御機構に着目した分子病態モデルにおいては、遺伝性、家族性に乏しいと考えられる本態性高血圧においても、**緻密班以後の ASDN の主要なナトリウムチャンネルである ENaC による Na 再吸収を食塩感受性に亢進に至らしめる分子病態があり**、ユビキチン化を介する ENaC の proteasome での分解を通じて、細胞膜での発現を制御する Nedd4L が重要な役割を果たしていると考えられた。研究代表者は、平成 20 年度までの研究によって、以下のような成果をあげてきた。ヒト Nedd4L 遺伝子産物の分子多様性と、evolutionary new (Isoform I)を産生する SNP の発見。(Ishigami T, Dunn M, et al. JHG 2002) Nedd4L 遺伝子のラットでの分子多様性の発見、アルドステロン感受性遠位性ネフロン(ASDN)における ENaC と Nedd4L の共局在および、遺伝性食塩感受性高血圧症との関連。(Umemura M, Ishigami T, et al. BBRC 2006) 本邦人での関連研究。(Ishigami T, et al. GGI 2007) Nedd4L C2 ドメインを有する Isoform I タンパクの他の isoform に対する dominant negative 効果による ENaC の発現の抑制・高血圧発症をもたらす分子メカニズムの解明。(Araki N, Ishigami T, et al. Hypertension 2008) ヒト Nedd4L C2 ドメイン結合タンパク質として NPC2 の同定と、ASDN における共局在および、NPC2 発現における食塩感受性分子として性質。(Araki N, Ishigami T, et al. BBRC 2009)。こうした成果に引き続き、本申請に至る期間には、**以下のような『高血圧症の食塩感受性をもたらす尿細管性機序の分子病態』についての重要な知見を深めることができた。** C57Bl6/J マウスに対する高食塩負荷による血圧と尿中電解質の変化を telemetry 法、代謝ケージ法によって**アルドステロン非依存性に起こる食塩感受性の血圧変化を示した**うえで、ACEI, ARB, SAB(選択的アルドステロン拮抗薬)の投与による、ASDN における ~ ENaC, 結合尿細管レニン、MR, Sgk1 の変化を、細胞膜タンパクに対する western blotting, 免疫組織化学、laser-capture microdissection 法を用いて検討し、**アルドステロン非依存性に、尿細管レニン・アンジオテンシン(RA)系が ~ ENaC を賦活化する病態を明らかにした。**(Ushio-Yamana H, Ishigami T, Nephron Experimental Nephrology 2012)、in silico に、マウス Nedd4L 遺伝子の分子多様性を明らかにし、Nedd4L C2 ドメインをコードする新規エクソンの発見に成功した。この結果をもとに、**Nedd4L C2 ドメイン特異的な KO マウス**を作製し表現型を解析した。

(Minegishi S, et al. 分子腎臓フォーラム、ISHR Featured Research Session, 2012)代謝ケージを使った観察によって、KO マウスが**高食塩食下において尿中ナトリウム排泄・尿浸透圧の低下が先行する形で、尿量・飲水量が増加していく病態**を明らかにした。**正常食塩食下では KO マウスと野生型マウスは、尿中ナトリウム排泄量・尿浸透圧・尿量・飲水量のすべて同等の変化を示した。**従って、Nedd4L 遺伝子のなかでも Nedd4L C2 Isoform が、経口の食塩摂取依存性の ASDN でのナトリウム再吸収を制御し、生体のナトリウム・体液の恒常性の維持と食塩感受性高血圧症の発症に、極めて重要な役割を果たしていることを証明した。さらに、マウスレニン遺伝子の Ren1C Ren1D, Ren2 遺伝子の intron 1 に転写開始点を持った exon 1a を発見し、**それぞれのレニン遺伝子に由来する第二のレニンの存在を明らかにした。**(Alternative Renin, ARen) ARen1C は、in situ hybridization 法により結合尿細管(CNT)・皮質集合管(CCD)に発現していることを明らかにした。ARen2 を強制発現させたマウス(ARen2TG)は、血漿レニン活性の上昇を伴わない組織内 angiotensin II の活性亢進を呈し、インスリン抵抗性・血圧上昇を認めた。(Ishigami T, et al. Identification of bona fide alternative renin transcripts expressed along cortical tubules and potential roles in promoting insulin resistance in vivo without significant PRA elevation.Hypertension, 2014)

#### 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)

1: Ishigami T, Kino T, Chen L, Minegishi S, Araki N, Umemura M, Abe K, Sasaki R, Yamana H, Umemura S. Identification of Bona Fide Alternative Renin Transcripts Expressed Along Cortical Tubules and Potential Roles in Promoting Insulin Resistance In Vivo Without Significant Plasma Renin Activity Elevation. Hypertension. 2014 Apr 28. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24777979. 査読あり。

2 Ishigami T, Abe K, Aoki I, Minegishi S, Ryo A, Matsunaga S, Matsuoka K, Takeda H, Sawasaki T, Umemura S, Endo Y. Anti-interleukin-5 and multiple autoantibodies are associated with human atherosclerotic diseases and serum interleukin-5 levels. FASEB J. 2013 Sep;27(9):3437-45.doi:10.1096/fj.12-222.653. Epub 2013 May22. PubMed PMID: 23699176. 査読あり。

3: Ushio-Yamana H, Minegishi S, Ishigami T, Araki N, Umemura M, Tamura K, Maeda E, Kakizoe Y, Kitamura K, Umemura S. Renin angiotensin antagonists normalize

aberrant activation of epithelial sodium channels in sodium-sensitive hypertension. *Nephron Exp Nephrol.* 2012;122(3-4):95-102. doi: 10.1159/000348660. 査読あり。 Epub 2013 Apr 9. PubMed PMID: 23594971. 4: Abe K, Ishigami T, Shyu AB, Ohno S, Umemura S, Yamashita A. Analysis of interferon-beta mRNA stability control after poly(I:C) stimulation using RNA metabolic labeling by ethynyluridine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Nov 9;428(1):44-9. doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.144. Epub 2012 Oct 9. PubMed PMID: 23063848; PubMed Central PMCID: PMC3672056. 査読あり。 5: Hosoda J, Ishikawa T, Matsushita K, Matsumoto K, Kimura Y, Miyamoto M, Ogawa H, Takamura T, Sugano T, Ishigami T, Uchino K, Kimura K, Umemura S. Impact of renal insufficiency on long-term clinical outcome in patients with heart failure treated by cardiac resynchronization therapy. *J Cardiol.* 2012 Oct;60(4):301-5. doi: 10.1016/j.jjcc.2012.06.001. Epub 2012 Jul 2. PubMed PMID: 22763383. 査読あり。

〔学会発表〕(計2件)

1: 石上友章、梅村将就、新城名保美、峯岸慎太郎、山名比早子、Nedd4L および尿細管レニン・アンジオテンシン系を介した ENaC 発現機能制御～食塩感受性におけるその意義、第91回日本生理学会大会シンポジウム3(招待講演)平成26年3月16日、鹿児島

2: 石上友章ほか、Nedd4L および尿細管レニン・アンジオテンシン系を介した ENaC 発現機能制御～食塩感受性におけるその意義、第134回日本薬学会(招待講演)、平成26年3月30日、熊本

〔図書〕(計1件)

石上友章ほか 医学書院、循環器レビュー&トピックス、2014年、p205-211

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

医学群 循環器内科学 石上 友章准教授が、動脈硬化症のリスクを予測する自己抗体の解析に成功しました！ 患者のリスク診断や、個別化医療の実現の可能性

<http://www.yokohama-cu.ac.jp/univ/pr/press/130531.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石上 友章 (ISHIGAMI, Tomoaki)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：50264651