

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23790242
研究課題名（和文）脳・心血管・腎臓障害における（プロ）レニン受容体の病態生理学的役割の解明
研究課題名（英文）(Pro)renin receptor in cerebral, cardiac and renal diseases
研究代表者 廣瀬 卓男 (HIROSE TAKUO) 東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師 研究者番号：20599302

研究成果の概要（和文）：

本研究は、(プロ)レニン受容体の脳・心血管・腎臓障害への関与とその作用機序を検討した。脱水や高塩食負荷により、腎臓における(プロ)レニン受容体タンパク質発現が上昇していること、(プロ)レニン受容体は細胞小胞 pH を制御に関与していること、血漿中可溶性(プロ)レニン受容体濃度が他のレニン・アンジオテンシン系構成因子の血漿濃度と独立して、心不全患者、慢性腎臓病患者等で血漿濃度が増加していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to clarify the roles of (pro)renin receptor in cerebral, cardiac and renal diseases. We have demonstrated that expression of (pro)renin receptor protein in mouse kidney is increased after dehydration or high salt diet. We also showed that (pro)renin receptor regulates vesicular pH. Plasma soluble (pro)renin receptor concentration is increased in the patients of congestive heart failure and chronic renal failure. These observations suggest that (pro)renin receptor has crucial roles in organ homeostasis and cerebral, cardiac and renal diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：(プロ)レニン受容体、レニン・アンジオテンシン系、生理活性物質、発現・制御、腎臓障害

1. 研究開始当初の背景

脳卒中、虚血性心疾患、慢性腎臓病等の脳・心血管・腎臓疾患における障害は長期入院・要介護・認知症・寝たきり・透析導入の主な原因であり、患者本人のみならず、医療経済・健康保険財政上、大きな負担を国民全体に強いている。しかしながら、脳・心血管・腎臓障害は何故進行するのか？その機序の詳細は今も完全には解明されていない。(プロ)レニン受容体はレニン・アンジオテンシン系の新規構成因子であり、フランスの Nguyen 博士らにより同定された。申請者らは

これまでに、動物実験モデルを用いて(プロ)レニン受容体の mRNA 及びタンパク質発現が腎不全時の腎臓及び心不全時の心臓および腎臓で亢進していることを報告し、加えて、遺伝子多型解析により(プロ)レニン受容体遺伝子領域に存在する一塩基多型(SNP)がヒトの脳心血管障害に関与することを世界で最初に報告した。また、最近、Nguyen 博士らのグループにより、血中・尿中に可溶性(プロ)レニン受容体が存在すること、Wnt シグナル系に関与することも明らかにされた。このような(プロ)レニン受容体の複雑な機能を

解明するには、動物実験や細胞培養系を用いた基礎的検討から、ヒト病態と血中・尿中濃度の関連解析や遺伝子多型解析といった臨床的検討を行い、それぞれの結果をフィードバックさせ、総合的な視点から研究を進展させていく必要がある。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、(プロ)レニン受容体の脳・心血管・腎臓障害への関与とその作用機序を動物実験モデル及びヒトを対象として検証し、(プロ)レニン受容体を用いた脳・心血管・腎臓障害に対する新しい予防・治療戦略の基盤を構築することである。そのために、動物疾患モデルを用いたインターベンション実験、可溶性(プロ)レニン受容体の遺伝子配列を導入した培養細胞を用いた可溶性(プロ)レニン受容体の機能解析、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)を用いたヒト血中・尿中(プロ)レニン受容体濃度の測定を行い、(プロ)レニン受容体の病態生理学的役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) 動物実験：

脱水や高塩食負荷環境下での脳・心臓・腎臓における(プロ)レニン受容体の遺伝子発現、タンパク質発現を競合的RT-PCR法、免疫染色、ウェスタンブロットにより検討する。加えて、組織特異的(プロ)レニン受容体ノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析する。

(2) 可溶性(プロ)レニン受容体の機能解析：マウス(プロ)レニン受容体 floxed マウスから(プロ)レニン受容体 flox ES細胞を確立し、アデノウイルス-Creを感染させ(プロ)レニン受容体ノックアウトES細胞を作製する。この細胞に(プロ)レニン受容体の3形態(全長、可溶性、膜貫通型)のそれぞれのpcDNAを導入し、3形態内の1つのみを発現したES細胞系を作製、3形態の機能を検討する。

(3) ELISAによるヒト血中・尿中(プロ)レニン受容体濃度の測定：

申請者らはヒト(プロ)レニン受容体に対する2種類の自家抗体を作製済みであり、本抗体の特性は、ヒト及びラットの脳・心臓・腎臓の免疫染色とWestern Blot及びその吸収試験により検証済みである。本(プロ)レニン受容体抗体を用いてサンドイッチ法によるELISAを開発し、(プロ)レニン受容体の測定系を確立する。(プロ)レニン受容体が脳・心血管・腎臓疾患に対する新たな診断マーカーとなるかを検討するため、開発したELISAを用いて、血液、尿中における可溶性(プロ)レニン受容体濃度を定量し、病態での発現変化

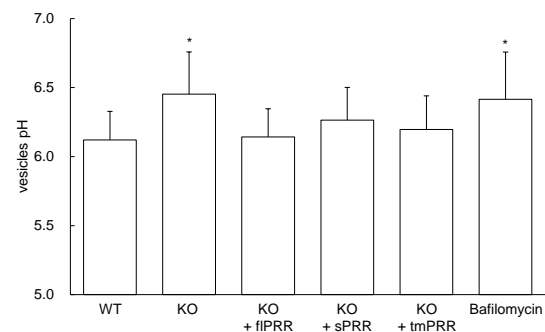
を検討する。

4. 研究成果

(1) 動物実験：

脱水や高塩食負荷により、腎臓の各セグメントにおける(プロ)レニン受容体のタンパク質発現が上昇していた。加えて、血漿中の可溶性(プロ)レニン受容体の上昇も認められた。また、(プロ)レニン受容体腎尿細管特異的ノックアウトモデルを作製したところ、多発性嚢胞腎様の病理所見を示した。 β -カテニンについても同様の検討を行ったところ、(プロ)レニン受容体ノックアウトモデルより軽度であるが多発性嚢胞腎様の病理所見が見いだされた。これらより、(プロ)レニン受容体の情報伝達系としてWnt/ β -カテニン系が関与していることが示唆された。

(2) 可溶性(プロ)レニン受容体の機能解析：マウス(プロ)レニン受容体ノックアウトES細胞を作製し、(プロ)レニン受容体の全長、可溶性、膜貫通型のそれぞれの遺伝子を導入して小胞のpHを測定した。(プロ)レニン受容体ノックアウト細胞では小胞pHが上昇していたが、全長、可溶性、膜貫通型の全てでこのpH上昇が抑えられ、(プロ)レニン受容体は小胞pHを制御することで細胞の恒常性維持に関連していることが示唆された。



図：各ES細胞の小胞におけるpH(平均値±標準偏差)。WT：正常(プロ)レニン受容体(PRR)ES細胞、KO：PRRノックアウトES細胞、flPRR：全長PRR、sPRR：可溶性PRR、tmPRR：膜貫通型PRR、*：P < 0.05 vs WT、KO + flPRR、KO + sPRR、KO + tmPRR。

(3) ELISAによるヒト血中・尿中(プロ)レニン受容体濃度の測定：

EDTA採血管やヘパリン採血管等の採血条件や冷蔵、冷凍等の保存方法により可溶性(プロ)レニン受容体濃度が変化していた。本結果は(プロ)レニン受容体測定に重大な影響を与えるため、まず健常者の血液・尿を用い(プロ)レニン受容体測定法を検証した。その後、可溶性(プロ)レニン受容体を測定したところ、レニン・アンジオテンシン系構成因子の血漿濃度と関連しないこと、心不全患者、慢性腎臓病患者等で血漿濃度が増加していることが示唆された。現在、測定数を増やし

て再検討を行っている。

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 6 件) 全て査読有り

1. 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.* 16:47-50, 2013. DOI: 10.1267/ahc.12030
2. Kaneko K, Nishiyama H, Ohba K, Shibayama 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- γ . *Peptides.* 37:285-289, 2012. DOI: 10.1016/j.peptides.2012.07.015
3. Terata S, Kikuya M, Satoh M, Ohkubo T, Hashimoto T, Hara A, Hirose T, Obara T, Metoki H, Inoue R, Asayama K, Kanno A, Totsune K, Hoshi H, Satoh H, Sato H, Imai Y. Plasma renin activity and the aldosterone-to-renin ratio are associated with the development of chronic kidney disease: the Ohasama study. *J Hypertens.* 25:1632-1638, 2012. DOI: 101097/HJH.0b013e328354f65b
4. Satoh M, Kikuya M, Ohkubo T, Mori T, Metoki H, Hara A, Utsugi MT, Hashimoto T, Hirose T, Obara T, Inoue R, Asayama K, Kanno A, Totsune K, Hoshi H, Satoh H, Imai Y. Aldosterone-to-renin ratio as a predictor of stroke under conditions of high sodium intake: the Ohasama Study. *Am J Hypertens.* 25:777-783, 2012. DOI: 10.1038/ajh.2012.33
5. Satoh M, Kikuya M, Ohkubo T, Mori T, Metoki H, Hashimoto T, Hara A, Utsugi MT, Hirose T, Obara T, Inoue R, Asayama K, Kanno A, Totsune K, Hoshi H, Satoh H, Imai Y. Aldosterone-to-renin ratio and nocturnal blood pressure decline in a general population: the Ohasama Study. *J Hypertens.* 29:1940-1947, 2011. DOI: 10.1097/HJH.0b013e32834ab46a
6. Hirose T, Hashimoto M, Totsune K, Metoki H, Hara A, Satoh M, Kikuya M, Ohkubo T,

Asayama K, Kondo T, Kamide K, Katsuya T, Ogihara T, Izumi S, Rakugi H, Takahashi K, Imai Y. Association of (pro)renin receptor gene polymorphism with lacunar infarction and left ventricular hypertrophy in Japanese women: The Ohasama Study. *Hypertens Res.* 34:530-535, 2011. DOI: 10.1038/hr.2010.274

[学会発表] (計 12 件)

1. 廣瀬卓男, Genevieve Nguyen. (プロ)レニン受容体と Wnt シグナル. 第 86 回日本内分泌学会総会. 2013 年 4 月 26 日. 宮城県仙台市(招待講演).
2. Kaori Narumi, Takuo Hirose, Emiko Sato, Mayuko Ishikawa, Kiyomi Kisu, Takefumi Mori, Sadayoshi Ito. Functional (pro)renin receptor in human lymphocytes and monocytes. German Society of Hypertension 2012. 2012 年 12 月 8 日. Berlin, Germany (口演).
3. Takuo Hirose, Genevieve Nguyen, Kazuhito Totsune. Increased expression of (pro)renin receptor in remnant kidney of 5/6 nephrectomized rats. 1st German French Symposium in Berlin. 2012 年 10 月 25 日. Berlin, Germany (ポスター).
4. 山本肇, 金子桐子, 大場浩史, 森本玲, 廣瀬卓男, 佐藤文俊, 戸恒和人, 高橋和広. 副腎腫瘍における(プロ)レニン受容体 mRNA 発現の検討: アルドステロン産生副腎皮質腺腫における発現増加. 第 35 回日本高血圧学会総会. 2012 年 9 月 21 日. 愛知県名古屋市(ポスター).
5. 鳴海かほり, 森建文, 佐藤恵美子, 石川繭子, 廣瀬卓男, 石井智徳, 伊藤貞嘉. ヒトリンパ球における(プロ)レニン受容体の検討. 第 55 回日本腎臓学会学術総会. 2012 年 6 月 3 日. 神奈川県横浜市(口演).
6. 鳴海かほり, 森建文, 石川繭子, 廣瀬卓男, 石井智徳, 伊藤貞嘉. ヒトリンパ球に存在する(プロ)レニン受容体の機能について. 第 85 回日本内分泌学会学術総会. 2012 年 4 月 21 日. 愛知県名古屋市(ポスター).
7. Takuo Hirose, Alfredo Cabrera-Socorro, Hager Tabka, Sabrina Martin, Matthias Groszer, Genevieve Nguyen. The role of (pro)renin receptor in the cerebral cortex. 4th (pro)renin receptor forum in Japan '12. 2012 年 3 月 20 日. 宮城県仙台市(招待講演).

8. Alfredo Cabrera-Socorro, Takuo Hirose. Dissecting the role of PRR in the cerebral cortex. P2R symposium. 2011年12月5日. Paris, France (招待講演).

9. Kazuhito Totsune, Takuo Hirose, Nobuyoshi Mori, Kei Asayama, Masahiro Kikuya, Osamu Murakami, Yutaka Imai, Kazuhiro Takahashi. Immunoreactive (pro)renin receptor in plasma and urine. P2R symposium. 2011年12月5日. Paris, France (招待講演).

10. Kazuhito Totsune, Takuo Hirose, Hirohito Metoki, Kei Asayama, Masahiro Kikuya, Osamu Murakami, Yutaka Imai, Kazuhiro Takahashi. (Pro) renin receptor-like immunoreactivity in patients with chronic renal failure. American Society of Nephrology Renal Week 2011. 2011年11月12日. Philadelphia, USA (ポスター).

11. 戸恒和人, 廣瀬卓男, 森信芳, 浅山敬, 菊谷昌浩, 大久保孝義, 高橋和広, 今井潤. ヒト血漿中(プロ)レニン受容体の検討. 第54回日本腎臓学会総会. 2011年6月15日. 神奈川県横浜市(口演).

12. 戸恒和人, 廣瀬卓男, 森信芳, 菊谷昌浩, 大久保孝義, 高橋和広, 今井潤. 血漿中(プロ)レニン受容体可溶性成分の検討. 第84回日本内分泌学会総会. 2011年4月21日. 兵庫県神戸市(ポスター).

[図書] (計1件)

1. 廣瀬卓男, 森建文, 伊藤貞嘉. 腎臓リハビリテーション 腎内分泌とその機能-レニン・アンジオテンシン系、カリクレイン・キニン系、ナトリウム利尿ペプチド系、プロスタノイド、エンドセリン、一酸化窒素、アドレノメデュリン-. 医歯薬出版. 39-43. 2012.

[その他]

ホームページ等

<http://www.int2.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 卓男 (HIROSE TAKUO)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：20599302

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

今井 潤 (IMAI YUTAKA)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：40133946

戸恒 和人 (TOTSUNE KAZUHITO)

東北大学・大学院薬学研究科・客員教授

研究者番号：10217515

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

森 建文 (MORI TAKEFUMI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40375001

森 信芳 (MORI NOBUYOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50463790

GENEVIEVE NGUYEN

College de France・Center for

Interdisciplinary Research in Biology・

Director