

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461254

研究課題名(和文)新規MR転写共役因子CASZ1による高血圧発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)Contribution of novel MR cofactor CASZ1 to onset of hypertension

研究代表者

横田 健一 (YOKOTA, KENICHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50424156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミネラルコルチコイド受容体活性化機構解明のため、生化学的手法を用いたMR相互作用因子の探索でcorepressorであるCASZ1を同定した。そこでこの蛋白質の生理学的な重要性を解明するために尿細管特異的CASZ1ノックアウトマウスを作製した。このマウスはDOCA+salt負荷において、対照群と比較して血圧が有意に高く、尿中K排泄も有意に増加していた。このことからノックアウトマウス群ではアルドステロン作用が増強されることが示唆される。以上からCASZ1がMRの転写活性を通じて高血圧発症に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mineralocorticoid receptor belongs to the nuclear hormone receptor superfamily and serves as an aldosterone-induced transcriptional factor. However, molecular mechanism mediated through MR is barely known. To address this issue, we tried to identify novel MR co-regulators using HEK293 cells by a biochemical approach with LC-MS/MS analysis. A novel protein CASZ1 interacted with MR in vivo and was co-localized with MR in rat renal tubule. To address physiological significance of CASZ1, we generated renal tubule specific Casz1 knockout mouse. These mouse showed hypertensive phenotype compared with control (sBP cont. 115 ± 3.8 VS cKO 135 ± 3.3 mmHg; $p < 0.01$) under DOCA+salt loading. Urinary potassium excretion was also increased compared with control (K/Cr ratio cont. 5.959 ± 1.390 VS cKO 9.72 ± 0.499 ; $p < 0.05$). These data suggested activation of aldosterone action in the knockout mouse. In conclusion, CASZ1 is a novel MR co-repressor and plays important role in pathophysiology of hypertension.

研究分野：高血圧

キーワード：高血圧

1. 研究開始当初の背景

RALES(N.Eng.J.Med.341:709-717,1999) や EPHEBUS 研究(N.Eng.J.Med.348:1309 - 1321, 2003) を初めとする近年の多くの大規模臨床研究の結果から、心不全や高血圧といった循環器系疾患の病態生理にミネラルコルチコイド受容体(MR)の活性化が非常に重要な役割を担うことが明らかとなっており、現在これらの疾患を治療する上で MR 作用メカニズムを理解することは必須となっている。MR は、リガンドであるアルドステロンの結合により活性化されると、標的遺伝子のプロモータ内にある MR 応答配列に結合し、co-regulator と呼ばれる蛋白質複合体を標的遺伝子プロモータに動員し、ヒストンのアセチル化、メチル化修飾や、クロマチン構造調節を起こすことで、ダイナミックに標的遺伝子 ENaC や SGK1 発現量を制御し、血圧を調節していると考えられている。このようなゲノム情報に依らない遺伝子発現制御メカニズムはエピゲノムと呼ばれ、多くの核内受容体(NR)でその機能を制御する中心的な役割を果たすことが知られているが、MRのエピゲノムを介した標的遺伝子転写活性化の分子メカニズムについては殆ど不明なままであった。

そこで本研究で我々はまず新規 MR 転写共役因子を探索・同定し、その機能解析を行うことで、MRによるエピゲノム制御機構を初めて明らかにすること、さらに最終的には高血圧発症の遺伝的因子を、MRを切り口としたメカニズムで解明することを目的とした。そしてこれまでに我々は、MR安定発現細胞株を樹立し、大量培養ののち回収し、生化学的手法を用いて MR 相互作用因子群を取得し、LC-MS/MS 質量分析計にて MR 新規

co-regulatorとして機能未知因子CASZ1を同定した。

CASZ1 は、その遺伝子内に高血圧発症と強く相関する SNP が存在することが近年複数の GWAS で報告され、注目されている蛋白質であるが (Nature Genetics:2009 & 2011、Circulation:2010) 分子機能は不明である。そこでまず CASZ1 の機能解析を進めたところ、CASZ1は大腸や腎尿管でMRと共発現し、ヒストン脱アセチル化(HDAC)活性を有する転写抑制性複合体 Mi-2/NuRD 複合体とMRの両者を bridging するアダプターとなり、ヒストン脱アセチル化を介したエピゲノム制御によりMR標的遺伝子ENaC やSGK1の発現を抑制することが明らかとなった。さらに、倫理委員会承認のもと、ヒト腎臓皮質サンプルを用いた検討により、CASZ1 遺伝子内の高血圧関連 SNP が CASZ1 発現レベルに影響を及ぼすいわば expression associated SNP (eSNP)であることが示され、さらに、ヒト腎皮質において CASZ1 の発現量と MR 標的遺伝子 ENaC、SGK1 の発現量に逆相関を認めただことから、SNP に起因した CASZ1 発現量の個人差が、高血圧発症に果たす役割が vivo で示された。

2. 研究の目的

生体での CASZ1 の機能を明らかにするために、尿管特異的 CASZ1 ノックアウトマウスの作成をおこなう。得られた個体は血圧や各種生化学、ホルモン値を解析し、また心臓、腎臓、血管などの高血圧標的臓器を中心とした表現型解析を行う。尿管特異的 CASZ1 ノックアウトマウスがアルドステロン過剰活性化を呈し、高血圧を呈することが示されれば、喫煙や肥満といった環境因子のみが解明

されていた本態性高血圧の発症原因について、SNP に起因する CASZ1 蛋白量の個人差という、遺伝因子からその発症原因に迫った世界で初めての報告となる。さらには、高血圧患者の CASZ1 遺伝子の eSNP 解析を行うことにより、遺伝的に規定される腎臓 MR 活性が予測でき、MR 拮抗薬の早期介入のメリットのある患者像を明らかにできる可能性があり、高血圧症の新しいテーラーメイド治療を確立できると期待される。

3. 研究の方法

CASZ1 flox マウスに関しては、すでに存在するキメラマウスからの交配により CASZ1 flox マウスのヘテロ、ホモマウスを取得する。次に腎臓尿細管特異的 Cre マウスである KSP1-Cre マウスと CASZ1 flox マウスの交配により尿細管特異的ノックアウトマウスを作出する。26 週齢になった時点でコントロール群とともに代謝ゲージ内で飼育し、蓄尿にて尿を採取する。また、毎日非観血血圧測定計にてこれらマウスの血圧を測定する。さらに DOCA+salt 負荷を行い、コントロール群とともに代謝ゲージ内で飼育し、蓄尿にて尿を採取する。DOCA + salt 負荷 2 週間後に解剖を行い、腎臓や血管などの各種臓器採取、血液採取を行った。血液および尿サンプルから血中尿中電解質、各種ホルモン、浸透圧など様々な生理学的パラメータを測定し、尿中ナトリウム、カリウム排泄率などを算出する。

4. 研究成果

得られたキメラマウスを野生型マウスと交配し、genotyping により、germline mutation を確認した。このマウスを FLP-Tg マウスと交配させることで、Casz1 flox ヘテロノックアウトマウスを作出した。このヘテロ flox マウス同士を交配させるこ

とでホモ flox マウスを作製した。このマウスを KSP1-Cre マウスと交配させることで、最終的には尿細管特異的 Casz1 ノックアウトマウスを作出した。この尿細管特異的 Casz1 ノックアウトマウスの腎臓における免疫染色および qPCR 法によって Casz1 遺伝子発現がノックアウトされていることを確認したのち、26 週齢から DOCA + salt 負荷を 2 週間行った。すると負荷中にノックアウトマウス群では対照群と比較して血圧が有意に高く (sBP cont. 115 ± 3.8 VS cKO 135 ± 3.3 mmHg; $P < 0.01$) また尿中 K 排泄も有意に増加 (K/Cr 比 cont 5.959 ± 1.390 VS cKO 9.72 ± 0.499 ; $P < 0.05$) していた。このことからノックアウトマウス群ではアルドステロン作用が増強されることが示唆され、CASZ1 が MR の転写活性を通じて高血圧発症に重要な役割を果たすことが示唆された。本態性高血圧症において、CASZ1 遺伝子内の SNP 解析により、MR blocker が有効な症例を見出すことができる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nishimoto K, Seki T, Kurihara I, Yokota K, Omura M, Nishikawa T, Shibata H, Kosaka T, Oya M, Suematsu M, Mukai K. Case Report: Nodule Development From Subcapsular Aldosterone-Producing Cell Clusters Causes Hyperaldosteronism. J Clin Endocrinol Metab. 査読有, 101(1)巻 2016, 6-9

doi: 10.1210/jc.2015-3285

〔学会発表〕(計 5 件)

中村 俊文, 栗原 勲, 城 理絵, 小林 佐紀子, 横田 健一, 武田 彩乃, 三石 木綿子, 盛崎 瑞葉, 高畑 尚, 伊藤 裕, 新規ミネラルコルチコイド受容体(MR)結合因子 Evi1 は転写共役因子として MR 活性を調節する、日

本高血圧学会学術総会、2015年10月10日、
ひめぎんホール（愛媛県松山市）

大嶋 洋佑，栗原 勲，宮下 和季，小林
佐紀子，横田 健一，城 理絵，門松 賢，武
田 彩乃，小黒 草太，宮嶋 哲，亀山 香織，
伊藤 裕、複数の腫瘍があるPAにおける超選
択的副腎静脈サンプリングの意義、第88回
日本内分学会学術総会、2015年4月23日、
ホテルニューオータニ（東京都千代田区）

渡辺 雄佑，栗原 勲，宮下 和季，小林
佐紀子，横田 健一，中村 俊文，井上 博之，
北村 和雄，小黒 草太，伊藤 裕、重度の低K
血症を伴いながら正常血圧を呈した原発性
アルドステロン症の1例、第88回日本内分
学会学術総会、2015年4月23日、ホテルニ
ューオータニ（東京都千代田区）

盛崎 瑞葉，栗原 勲，小林 佐紀子，横
田 健一，城 理絵，武田 彩乃，三石 木綿
子，中村 俊文，高畑 尚，伊藤 裕、高脂肪
食負荷マウスの副腎におけるアルドステロ
ン合成酵素発現の検討、第88回日本内分学
会学術総会、2015年4月23日、ホテルニ
ューオータニ（東京都千代田区）

住谷 智恵子，横田 健一，栗原 勲，宮
下 和季，中島 裕也，小林 佐紀子，乃村
元子，中村 俊文，高畑 尚，戸田 正博，亀
山 香織，伊藤 裕、GH自体が脳梗塞発症のリ
スクファクターとして疑われた先端巨大症
の1例、第88回日本内分学会学術総会、2015
年4月23日、ホテルニューオータニ（東京
都千代田区）

〔図書〕(計 0 件)

〔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

[http://www.keio-emn.jp/research/07.ht
ml](http://www.keio-emn.jp/research/07.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

横田 健一 (YOKOTA Kenichi)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：50424156

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし