

助成番号 0911

食塩感受性高血圧における新規アンジオテンシン受容体結合因子の 病態生理学的意義についての検討

田村 功一¹, 涌井 広道¹, 出島 徹¹, 重永 豊一郎², 東 公一¹, 梅村 敏¹¹横浜市立大学医学研究科病態制御内科学(循環器腎臓内科学)²横浜市立大学附属病院循環器内科

概要 1. 研究目的 本研究課題では、情報伝達系活性化や受容体 internalization に重要な 1 型アンジオテンシン II 受容体(AT1 受容体)C 末端への新規直接結合因子として単離同定した ATRAP(Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein)について、培養細胞、Dahl 食塩感受性高血圧ラットを用いて機能解析と発現調節の検討をおこなった。

2. 研究方法 遠位尿細管機能をよく保持している培養遠位尿細管細胞(mDCT 細胞)を用いて、AT1 受容体と ATRAP の内在性発現の評価、および腎尿細管細胞における AT1 受容体および ATRAP の機能解析をおこなった。また、Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける高血圧と腎障害の進行にともなう腎 ATRAP の発現調節を、AT1 受容体阻害薬(ARB)の持続投与および思春期前の一過性投与の効果との関連性を含めて検討した。

3. 研究結果 mDCT 細胞には AT1 受容体、ATRAP の内在性発現が認められ、mDCT 細胞への Ang II 刺激は TGF- β 産生を増加させたが、ARB は TGF- β 産生増加を抑制した。そして、アデノベクターによる ATRAP の高発現は、Ang II 刺激による TGF- β 産生増加、NADPH oxidase 4 (NOX4) および epithelial sodium channel α -subunit (α ENaC) の遺伝子発現誘導を有意に抑制した。また、Dahl 食塩感受性高血圧ラットへの高食塩負荷は高血圧、尿蛋白増加、腎臓酸化ストレスの増加とともに、腎組織における ATRAP 発現の減少をもたらした。一方、ARB の投与は 持続投与および一過性投与ともに、持続的な降圧効果とともに、尿蛋白減少、腎酸化ストレスおよび腎組織での ATRAP 発現の回復をもたらした。

4. 考察 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同時に、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。

5. 今後の課題 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。

1. 研究目的

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 1 型アンジオテンシン II 受容体

(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・進展とそれにとま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、申請者ら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¹⁻³⁾。申請者らは、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⁴⁻⁸⁾、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⁹⁾。

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、まず、培養細胞、Dahl 食塩感受性高血圧ラットを用いて細胞レベルおよび個体レベルでの ATRAP の機能解析と発現調節について明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

2.1 ATRAP の遠位尿細管細胞での機能の検討

ATRAP の尿細管細胞における機能を gain-of-function strategy により検討するために、通常型の ATRAP 発現ベクターに加えて、アデノウイルス型 ATRAP 高発現ベクターによる高効率 ATRAP 発現ベクターを作製した。また尿細管細胞については、アルドステロン反応性や Na⁺ 輸送能など遠位尿細管機能をよく保持している培養遠位尿細管細胞 (mDCT 細胞) を米国ピッツバーグ大学医学部 Friedman 教授から入手した。そしてこの mDCT 細胞を用いて、AT1 受容体と ATRAP の内在性発現の評価、および腎尿細管細胞における AT1 受容体および ATRAP の機能解析をおこなった。

2.2 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、腎障害の進行にともなう腎 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, 8 mg/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。

3. 研究結果

3.1 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(図 1, A) および蛋白レベル(図 1, B) 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(図 2, A)、時間依存的(図 2, B) 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、

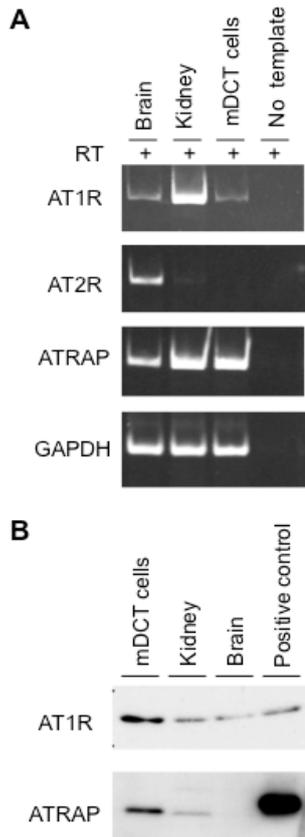


図1. 遠位尿細管細胞(mDCT細胞)におけるAT1受容体およびATRAPの内在性発現。mDCT細胞にはAT1受容体およびATRAPの内在性発現が認められた。

AT1受容体阻害薬(candesartan, 10^{-5} M)あるいはAT2受容体阻害薬(PD123319, 10^{-5} M)を前投与した場合のAng II (10^{-6} M)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(図2, C)、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。引き続き、アデノベクターにより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(図2, D)。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(図3)。

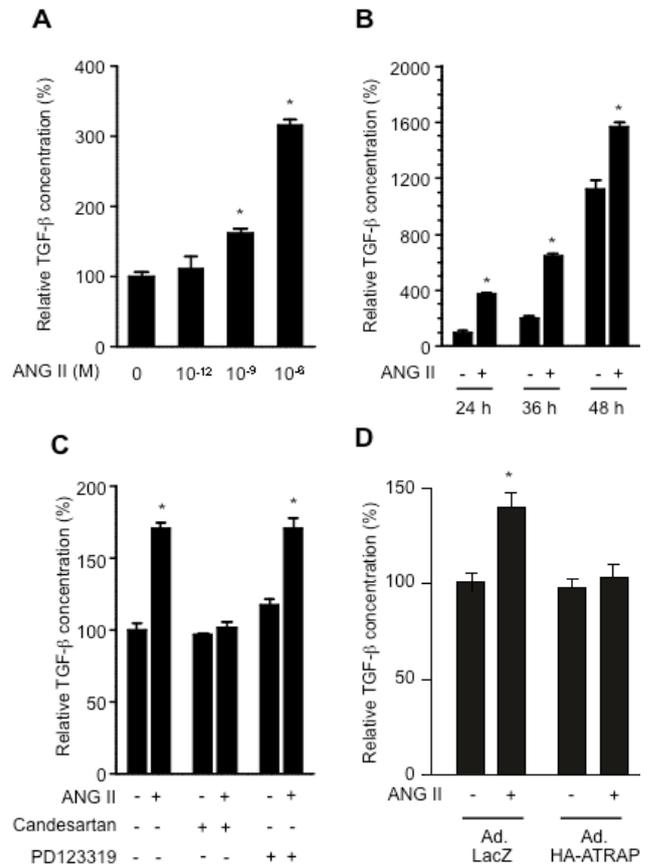


図2. 遠位尿細管細胞(mDCT細胞)におけるAT1受容体系活性化に対するATRAPの抑制作用。mDCT細胞に対するAng II刺激はAT1受容体を介して尿細管線維化促進物質TGF- β 産生を増加させたが、アデノベクターによるATRAP高発現はTGF- β 産生増加を抑制した。

3.2 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 ± 7 mmHg)が得られた(対照群=第1群, 128 ± 2 mmHg; 高食塩負荷群=第2群, 199 ± 15 mmHg; AT1受容体阻害薬持続投与群=第4群, 149 ± 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)ともに同様に有意な尿蛋白減少効果が認めら

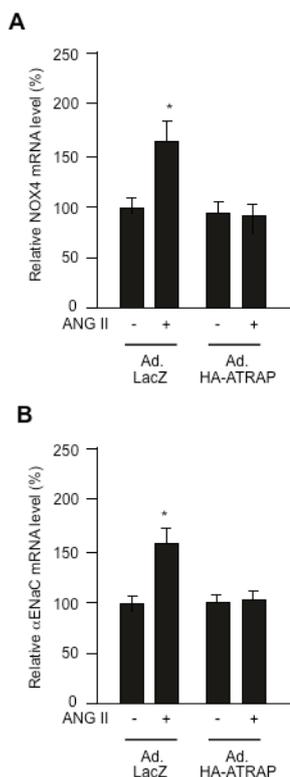


図3. 遠位尿細管細胞(mDCT細胞)に対するATRAPの酸化ストレス、Na⁺再吸収への抑制作用。mDCT細胞へのAng II刺激による酸化ストレス(NOX4)増加および上皮型Na⁺チャネル(ENaC)発現増強は、ATRAP高発現により抑制された。

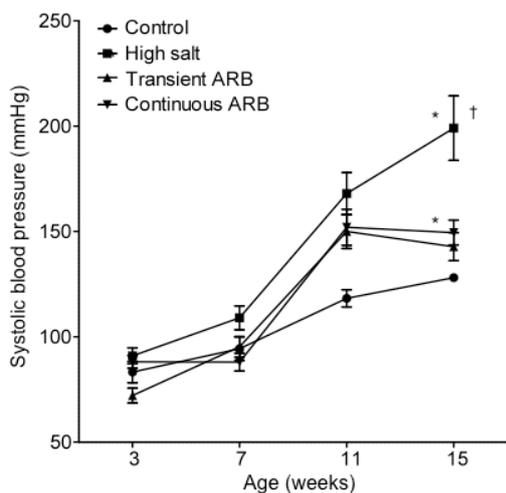


図4. Dahl食塩感受性高血圧ラットの各群における収縮期血圧の推移。一過性ARB投与は投与終了後も長期に渡る降圧効果を維持した。Control, 対照群(第1群); High salt, 高食塩負荷群(第2群); Transient ARB, 一過性ARB投与群(第3群); Continuous ARB, ARB持続投与群(第4群)。

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は対照群と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(図6)。

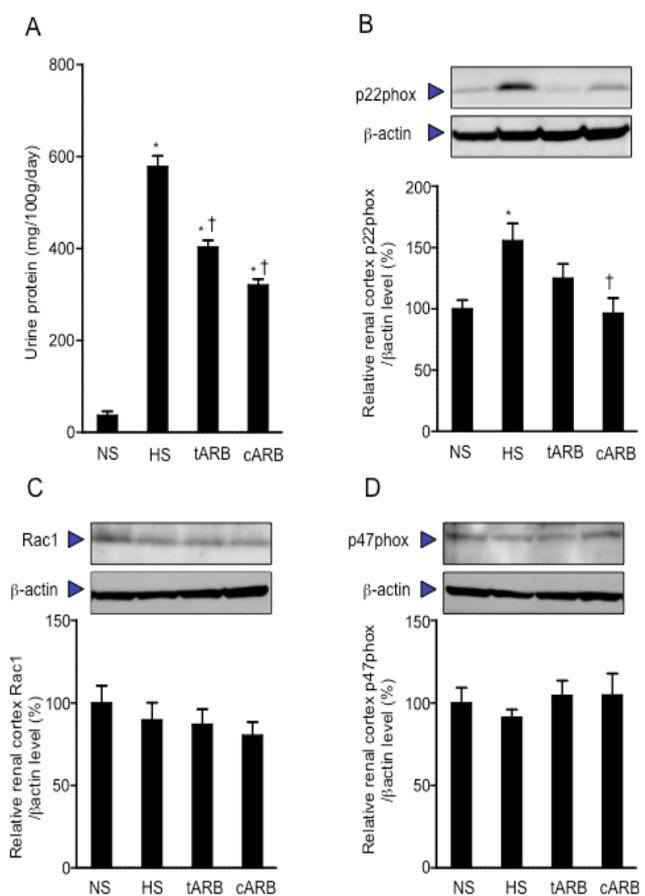


図5. Dahl食塩感受性高血圧ラットの各群における尿蛋白および腎酸化ストレス。一過性ARB投与は投与終了後も尿蛋白および腎酸化ストレス改善効果を示した。NS, 対照群(第1群); HS, 高食塩負荷群(第2群); tARB, 一過性ARB投与群(第3群); cARB, ARB持続投与群(第4群)。

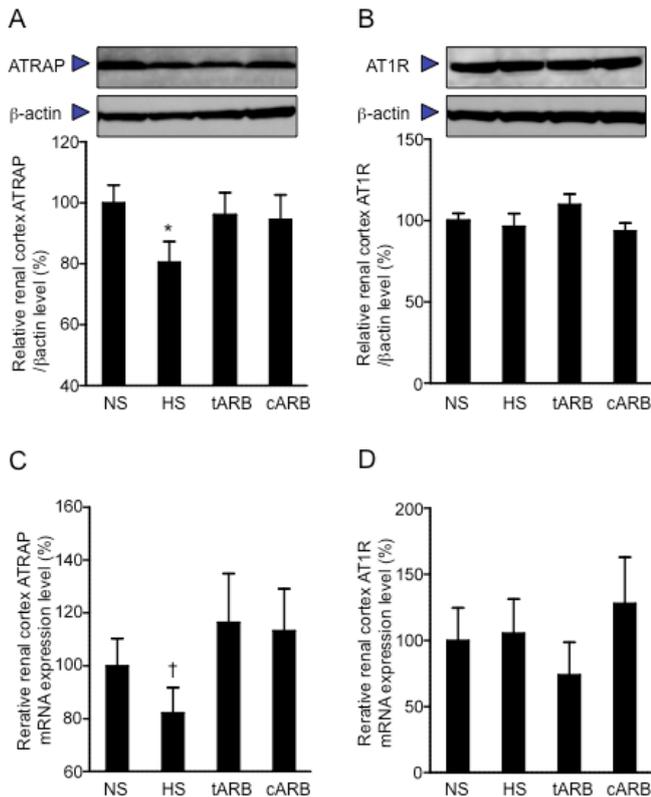


図 6. Dahl 食塩感受性高血圧ラットの各群における腎での ATRAP および AT1 受容体 (AT1R) 発現。一過性 ARB 投与は投与終了後においても腎での ATRAP 発現回復効果を示した。NS, 対照群 (第 1 群); HS, 高食塩負荷群 (第 2 群); tARB, 一過性 ARB 投与群 (第 3 群); cARB, ARB 持続投与群 (第 4 群)。

4. 考察

AT1 受容体は腎臓では血管、糸球体、近位尿細管に加えて、遠位尿細管でも発現しているにも関わらず、遠位尿細管における役割は不明な点が多い。そこでまず本研究ではマウス遠位曲尿細管 (mDCT) の不死化培養細胞を用いて、*in vitro* 環境での遠位尿細管における AT1 受容体の機能を検討した。その結果、mDCT 細胞では AT1 受容体と ATRAP は内在性に発現していることが確認され、mDCT 細胞を Ang II で刺激した場合に TGF-β 産生、NOX4 発現、αENaC 発現の増強が認められ、AT1 受容体阻害薬によって抑制されるとともに、アデノベクターによる ATRAP 高発現によっても抑制が認められた。以上の結果は、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同時に、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と考えられる。

また、AT1 受容体に直接結合し、その機能を制御している ATRAP (angiotensin II associated protein) について、申請者らは以前、自然発症高血圧ラットを用いた検討で、AT1 受容体阻害薬が降圧効果に依存せずに組織特異的に ATRAP と AT1 受容体の発現バランスを改善することによって、高血圧性心肥大を抑制する機序を提示した⁷⁾。そして今回 Dahl 食塩感受性高血圧ラットを用いた検討では、高食塩負荷による食塩感受性高血圧にともない腎組織内の ATRAP 発現量の低下が認められたが、AT1 受容体阻害薬を性成熟期前より持続あるいは性成熟期前のみ一過性投与した際に、持続性の降圧効果と腎障害の改善効果とともに腎での ATRAP 発現の回復が確認された。本研究の結果、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おける腎障害に対して ATRAP が抑制的に作用して腎保護作用を発揮しているとともに、AT1 受容体阻害薬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た。

5. 今後の課題

本研究においては、腎細胞レベル (特に遠位尿細管細胞)、食塩感受性高血圧モデル動物レベル (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 過剰発現トランスジェニックマウスレベル、およびヒト腎組織レベルにおける ATRAP についての統合的解析をおこなうことにより、ATRAP についての細胞レベルでの Na 再吸収機構に対する機能、生体レベルでの生理機能と血圧循環調節および水電解質代謝調節への関与および食塩感受性高血圧における病態生理学的意義を明らかにすることを目的としている。よって、今後は、『組織 ATRAP 発現量 / AT1 受容体発現量の低下 → 組織局所での ATRAP 発現低下による相対的な AT1 受容体情報伝達系活性の亢進 → 食塩感受性高血圧、腎障害の発症・進展』という仮説の検証のために、gain-of-function *in vivo* strategy により、ATRAP 機能を生体レベルで解明すべく、発生工学的手法により得られた腎特異的 ATRAP 過剰発現マウスを用いて、食塩感受性高血

庄、腎障害における ATRAP の機能的意義についての生体レベルでの解析を行い、未知の部分が依然として多い ATRAP の機能を明らかにする。さらに食塩感受性高血圧を呈するとされる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 発現の局在性の検討、および ATRAP と AT1 受容体の発現量バランスの解析をおこなう予定である。

文献

- 1) Daviet L, Lehtonen JY, Tamura K, Griese DP, Horiuchi M, Dzau VJ. Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. **J Biol Chem**, 274: 17058-17062, 1999.
- 2) Cui T, Nakagami H, Iwai M, Takeda Y, Shiuchi T, Tamura K, Daviet L, Horiuchi M. ATRAP, novel AT1 receptor associated protein, enhances internalization of AT1 receptor and inhibits vascular smooth muscle cell growth. **Biochem Biophys Res Commun**, 279: 938-941, 2000.
- 3) Lopez-Illasaca M, Liu X, Tamura K, Dzau VJ. The angiotensin II type I receptor-associated protein, ATRAP, is a transmembrane protein and a modulator of angiotensin II signaling. **Mol Biol Cell**, 14: 5038-5050, 2003.
- 4) Tanaka Y, Tamura K, Koide Y, Sakai M, Tsurumi Y, Noda Y, Umemura M, Ishigami T, Uchino K, Kimura K, Horiuchi M, Umemura S. The novel angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-associated protein ATRAP downregulates AT1R and ameliorates cardiomyocyte hypertrophy. **FEBS Lett**, 579: 1579-1586, 2005.
- 5) Azuma K, Tamura K, Shigenaga A, Wakui H, Masuda S, Tsurumi-Ikeya Y, Tanaka Y, Sakai M, Matsuda M, Hashimoto T, Ishigami T, Lopez-Illasaca M, Umemura S. Novel regulatory effect of angiotensin II type 1 receptor-interacting molecule on vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, 50: 926-932, 2007.
- 6) Tamura K, Tanaka Y, Tsurumi Y, Azuma K, Shigenaga A, Wakui H, Masuda S, Matsuda M. The role of angiotensin AT1 receptor-associated protein in renin-angiotensin system regulation and function. **Curr Hypertens Rep**, 9: 121-127, 2007.
- 7) Shigenaga A, Tamura K, Wakui H, Masuda S, Azuma K, Tsurumi-Ikeya Y, Ozawa M, Mogi M, Matsuda M, Uchino K, Kimura K, Horiuchi M, Umemura S. Effect of olmesartan on tissue expression balance between angiotensin II receptor and its inhibitory binding molecule. **Hypertension**, 52: 672-678, 2008.
- 8) Wakui H, Tamura K, Tanaka Y, Matsuda M, Bai Y, Dejima T, Masuda S, Shigenaga A, Maeda A, Mogi M, Ichihara N, Kobayashi Y, Hirawa N, Ishigami T, Toya Y, Yabana M, Horiuchi M, Minamisawa S, Umemura S. Cardiac-specific activation of angiotensin II type 1 receptor-associated protein completely suppresses cardiac hypertrophy in chronic angiotensin II-infused mice. **Hypertension**, 55: 1157-1164, 2010.
- 9) Tsurumi Y, Tamura K, Tanaka Y, Koide Y, Sakai M, Yabana M, Noda Y, Hashimoto T, Kihara M, Hirawa N, Toya Y, Kiuchi Y, Iwai M, Horiuchi M, Umemura S. Interacting molecule of AT1 receptor, ATRAP, is colocalized with AT1 receptor in the mouse renal tubules. **Kidney Int**, 69: 488-494, 2006.

No. 0911

Investigation of Pathophysiological Role of Novel Interacting Molecule with Angiotensin II Receptor in Salt Sensitive Hypertension

Kouichi Tamura¹, Hiromichi Wakui¹, Toru Dejima¹, Atsu-ichiro Shigenaga²,
Koichi Azuma¹, Satoshi Umemura¹

¹Department of Medical Science and Cardiorenal Medicine,
Yokohama City University Graduate School of Medicine

²Department of Cardiology, Yokohama City University Hospital

Summary

We firstly examined the function of renal tubular angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-signaling using an immortalized cell line of mouse distal convoluted tubule (mDCT) cells. AT1R and its associated protein (ATRAP) were expressed endogenously in mDCT cells. Stimulation of mDCT cells with ANG II increased the production of transforming growth factor- β (TGF- β), with increases in mRNA expression of NADPH oxidase 4 (NOX4) and the epithelial sodium channel α -subunit (α ENaC) in mDCT cells. These activating effects of ANG II were completely inhibited by an AT1R-specific blocker (ARB). Furthermore, overexpression of ATRAP by adenoviral gene transfer suppressed the ANG II-mediated pathological responses. These results demonstrate the functional significance of renal distal tubular AT1R signaling and the antagonistic effect of tubular ATRAP on this signaling.

To examine further whether the regulation of renal ATRAP expression is related to the development of hypertension and renal injury and therapeutic effects of ARB, we investigated regulatory effects of transient ARB treatment on renal ATRAP expression in salt-sensitive hypertension. 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 administered 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.