

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², 出島 徹¹, 大澤 正人¹, 前田 晃延¹, 梅村 敏¹

¹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腎臓・高血圧内科

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、発生工学的手法により得られた腎尿細管 ATRAP 高発現マウス、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機能解析と発現調節の検討を行った。

2. 研究方法 腎尿細管 ATRAP 高発現マウスを作製し、食塩摂取量の変化にともなう血圧変動や腎機能、水電解質代謝の変化について検討した。また、ヒト腎摘出術時に得られた正常腎組織における内在性 ATRAP の局所発現解析を行うとともに、腎生検標本を用いて、食塩感受性高血圧を呈する慢性腎炎(IgA 腎症)における ATRAP 蛋白発現レベルおよび AT1 受容体発現部位との共局在性、さらには ATRAP と AT1 受容体の発現量バランスについて検討を加えた。

3. 研究結果 食塩感受性マウスとして知られる C57BL/6J マウスを background として腎尿細管(遠位曲尿細管～皮質集合管)ATRAP 高発現トランスジェニックマウス(Kid-ATRAP TG mice)を作製し、野生種のコントロールマウス(WT mice)と比較した。高食塩食投与(4% NaCl, 7 日間)により、WT mice では収縮期血圧の上昇がみられたが、Kid-ATRAP TG mice では血圧の上昇を認めなかった。Kid-ATRAP TG mice は WT mice に比べて、腎皮質における ENaC alpha-subunit の発現低下と尿中 Na⁺ 排泄量の増加がみられた。また、ヒト正常腎生検組織での検討では、ボウマン囊から髓質集合管に至るまで広範囲の尿細管に ATRAP mRNA・蛋白発現が認められた。さらに、IgA 腎症患者からの腎生検組織での検討では、尿細管間質での ATRAP 発現と腎機能(eGFR)との間に正の相関が認められた。

4. 考察 腎遠位尿細管に ATRAP を高発現するトランスジェニックマウスでは高食塩負荷状態において腎遠位尿細管での Na⁺ 再吸収に重要な役割を担っている ENaC alpha-subunit の発現低下にともなう尿中 Na⁺ 排泄量の増加がみられ、食塩感受性血圧上昇が抑制されていた。この結果は腎遠位尿細管を中心とした腎 ATRAP が腎での AT1 受容体情報伝達系に対する抑制作用を通じた腎での Na⁺ 制御機構への作用を介して食塩感受性血圧調節に関与している可能性を示している。また、ヒト腎においても尿細管を中心として広範囲に ATRAP の発現が認められたが、食塩感受性高血圧を呈することが多い慢性腎炎(IgA 腎症)では腎機能低下の程度に比例して腎尿細管 ATRAP 発現の低下が認められた。これらは、腎 ATRAP 発現と食塩感受性高血圧・腎障害との関連性がヒト病態においても示唆された結果と考えられる。

5. 今後の課題 今後は、全身性 ATRAP 欠損マウス(ATRAP ノックアウトマウス)を用いて、食塩感受性高血圧、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・進展とそれとも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、『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尿細管 ATRAP 高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生体レベルでの解析を行い¹⁰⁾、また、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行うことを目的とした¹¹⁾。

2. 研究方法

2.1 腎尿細管 ATRAP 高発現トランスジェニックマウスの作製と機能解析

腎尿細管 ATRAP 高発現マウスを作製し、tail-cuff 法お

よびテレメリー法による血圧測定、水電解質代謝測定を行うとともに、食塩摂取量の変化にもなう血圧変動や腎機能、水電解質代謝の変化について、代謝ケージを用いて検討した。また、遠位尿細管細胞から集合管にかけて多く分布している epithelial Na(+) channel (ENaC) や Na(+)-Cl(-) cotransporter (NCC) などの Na(+) transporter の発現についても real-time PCR 法や Western blot 法により検討した。

2.2 ヒト腎組織での ATRAP の発現分布および腎炎での発現調節についての検討

まず、ポリクローナル抗ヒト ATRAP 抗体を作製し、特異的に ATRAP 蛋白を認識することを確認した。本学の倫理委員会での承認後に十分なインフォームドコンセントのもとに同意が得られた患者の腎摘出術時に得られた正常腎組織における内在性 ATRAP の局所発現解析のために、腎血管壁、糸球体、尿細管各セグメントにおける ATRAP 蛋白発現レベルについて、抗 ATRAP 抗体を用いて免疫組織染色法により詳細に検討するとともに、AT1 受容体発現部位との共局在性についても比較検討した。また、慢性腎臓病合併高血圧患者では食塩感受性高血圧を呈することが知られており、腎生検目的で入院した慢性腎臓病合併高血圧患者を対象として、本学の倫理委員会での承認後に十分なインフォームドコンセントのもとに同意が得られた患者の腎生検標本を用いて、食塩感受性高血圧を呈する慢性腎炎 (IgA 腎症) における ATRAP 蛋白発現レベルおよび AT1 受容体発現部位との共局在性、さらには ATRAP と AT1 受容体の発現量バランスについて検討を加えた。

3. 研究結果

3.1 腎尿細管 ATRAP 高発現トランスジェニックマウスの作製と機能解析

食塩感受性マウスとして知られる C57BL/6J マウスを background として腎尿細管 (遠位曲尿細管～皮質集合管) ATRAP 高発現トランスジェニックマウス (Kid-ATRAP TG mice) を作製し、野生種のコントロールマウス (WT mice) と比較した。通常食塩食 (0.3% NaCl) 摂取下では、Kid-ATRAP TG mice と WT mice において体重、血圧、脈拍、血漿浸透圧、電解質、クレアチニンクリアランスなどに差を認めなかったが、高食塩食投与 (4% NaCl, 7 日間)

により、WT mice では収縮期血圧の上昇がみられたが (dark period; day 7 versus baseline, 135.8±3.7 versus 126.3±2.4 mmHg, P=0.027)、Kid-ATRAPP TG mice では血圧の上昇を認めなかった (day 7 versus baseline, 128.4±3.1 versus 127.7±2.9 mmHg, NS) (Fig. 1)。尿中ナトリウム排泄量を検討したところ、高食塩食負荷状態では Kid-ATRAPP TG miceの方がWT miceよりも尿中 Na⁺ 排泄量が有意に増加していた (Fig. 2)。さらに、Kid-ATRAPP TG mice は WT mice に比べて、腎皮質における ENaC alpha-subunit の発現レベルが有意に低下していることが明らかになった (Fig. 3)。以上から遠位曲尿細管～皮質集合管における ATRAPP 発現量の増加は、ENaC の活性化を抑制し、塩分負荷時に尿中ナトリウム排泄量を増加させることにより血圧上昇を抑制していると考えられ、ATRAPP が食塩感受性高血圧症の新たな治療上の分子標的となり得る可能性が明らかにされた。これらの研究成果については、国内外の学会にて発表をおこない、現在論文投稿中である。

3. 2 ヒト腎組織での ATRAPP の発現分布および腎炎での発現調節についての検討

手術時に得られたヒト正常腎生検組織での検討では、ボウマン嚢から髄質集合管に至るまで広範囲の尿細管に ATRAPP mRNA・蛋白発現が認められた (Table 1)。尿細管細胞では、ATRAPP 発現と AT1 受容体発現との共局在性も認められた。また、IgA 腎症患者からの腎生検組織での検討では、尿細管間質での ATRAPP 発現と腎機能 (eGFR) との間に正の相関が認められた (Fig. 4)。これらの研究成果については、国内外の学会にて発表をおこない、国際学術誌に掲載受理された。

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、前年度の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 ATRAPP 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 ATRAPP 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ともに、尿細管細胞における内在性 AT1 受容体抑制系としての ATRAPP の機能的意義を示唆していると考えられた。

そこで、2 年目の本年度の研究においては、まず腎遠位尿細管に ATRAPP を高発現するトランスジェニックマウス (Kid-ATRAPP TGM) を確立して、高食塩負荷による血圧上昇におよぼす効果を検討した。対照とした野生型マウスは遺伝的に食塩感受性高血圧を呈することが報告されている C57BL/6 WT mice であり、高食塩負荷により食塩感受性高血圧を呈した。一方、Kid-ATRAPP TGM では高食塩負荷状態では腎遠位尿細管での Na⁺ 再吸収に重要な役割を担っている ENaC alpha-subunit の発現低下にともない尿中 Na⁺ 排泄量の増加がみられ、また食塩感受性血圧上昇が抑制されていた。これらの結果は腎遠位尿細管を中心とした腎 ATRAPP が腎での AT1 受容体情報伝達系に対する抑制作用を通じた腎での Na⁺ 制御機構への作用を介して食塩感受性血圧調節に関与している可能性を示している。

また、ヒト腎においても尿細管を中心として広範囲に ATRAPP の発現が認められたが、食塩感受性高血圧を呈することが多い慢性腎炎 (IgA 腎症) では腎機能低下の程度に比例して腎尿細管 ATRAPP 発現の低下が認められた。これらは、腎 ATRAPP 発現と食塩感受性高血圧・腎障害との関連性がヒト病態においても示唆された結果と考えられる。

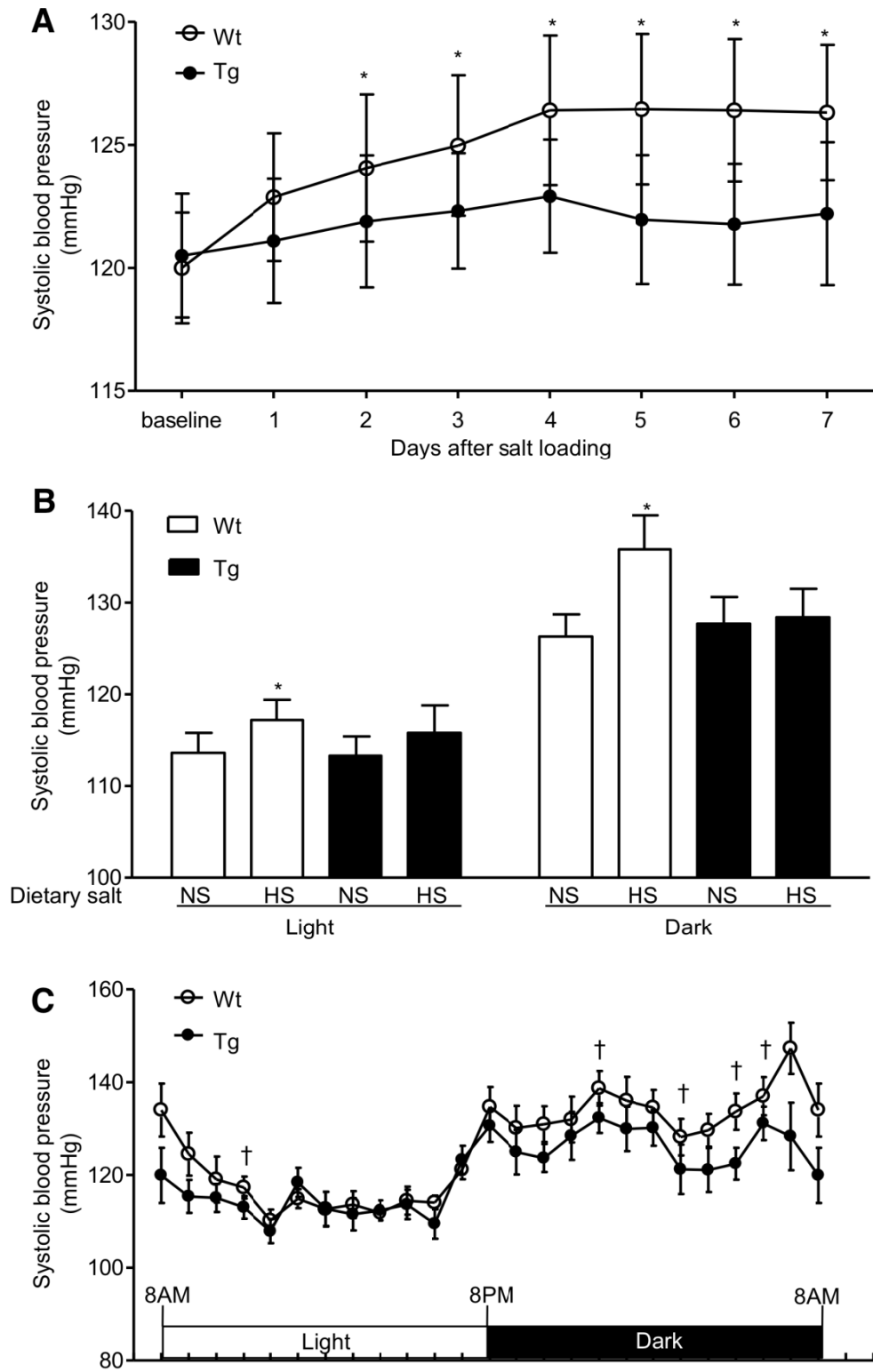


Fig. 1. 野生型マウス(Wt)および腎尿細管高発現マウス(Tg)における高食塩負荷(4% NaCl, 7日間)によるテレメトリー測定での血圧の推移。野生型マウスでみられる特に dark period の血圧上昇が腎尿細管高発現マウスでは抑制されていた。

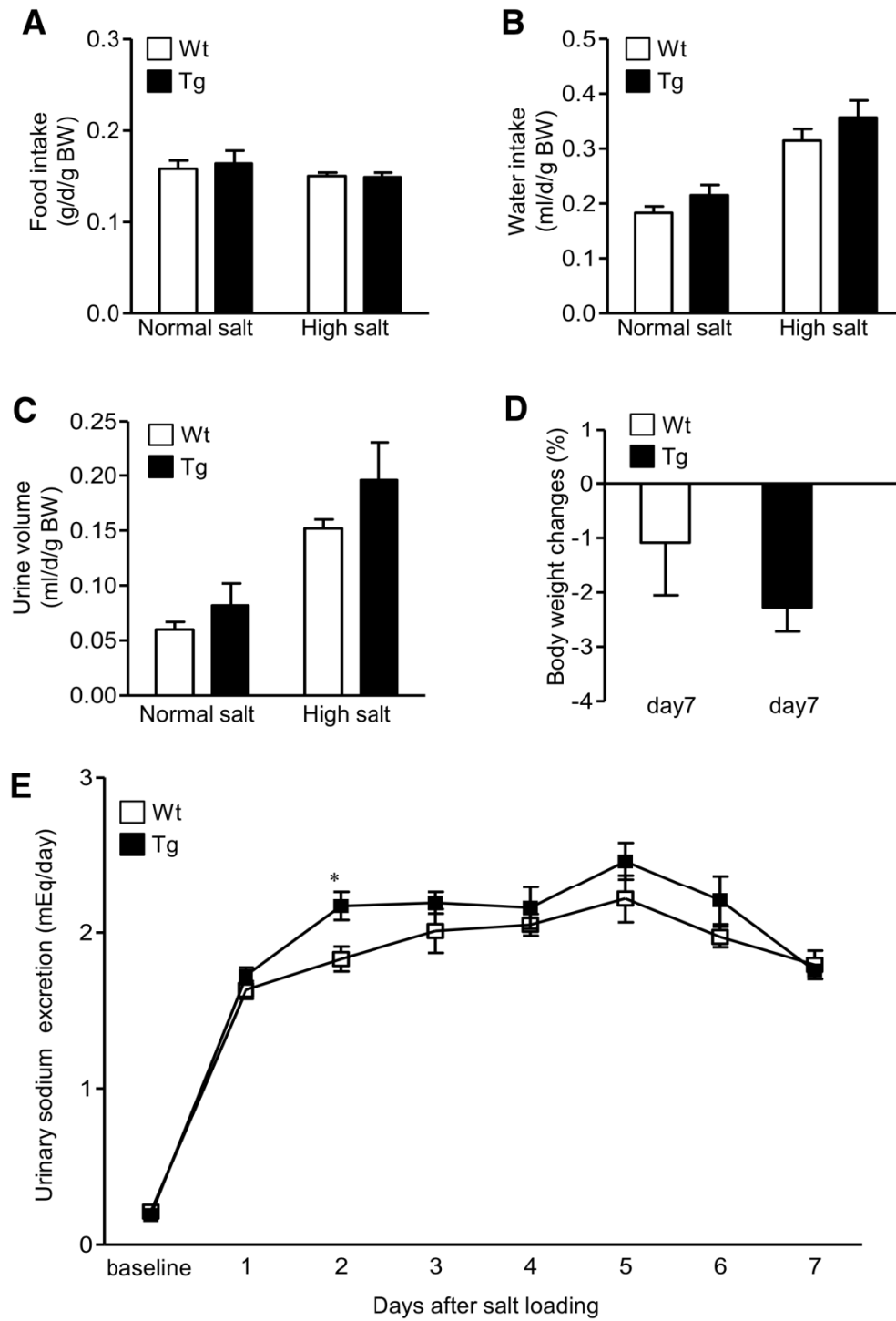


Fig. 2. 野生型マウス(Wt)および腎尿細管高発現マウス(Tg)における高食塩負荷(4% NaCl, 7日間)による食事摂取量(A)、飲水量(B)、尿量(C)、体重(D)、および尿中 Na⁺ 排泄量(E)の推移。腎尿細管高発現マウスでは野生型マウスと比較して尿中 Na⁺ 排泄量の増加がみられた。

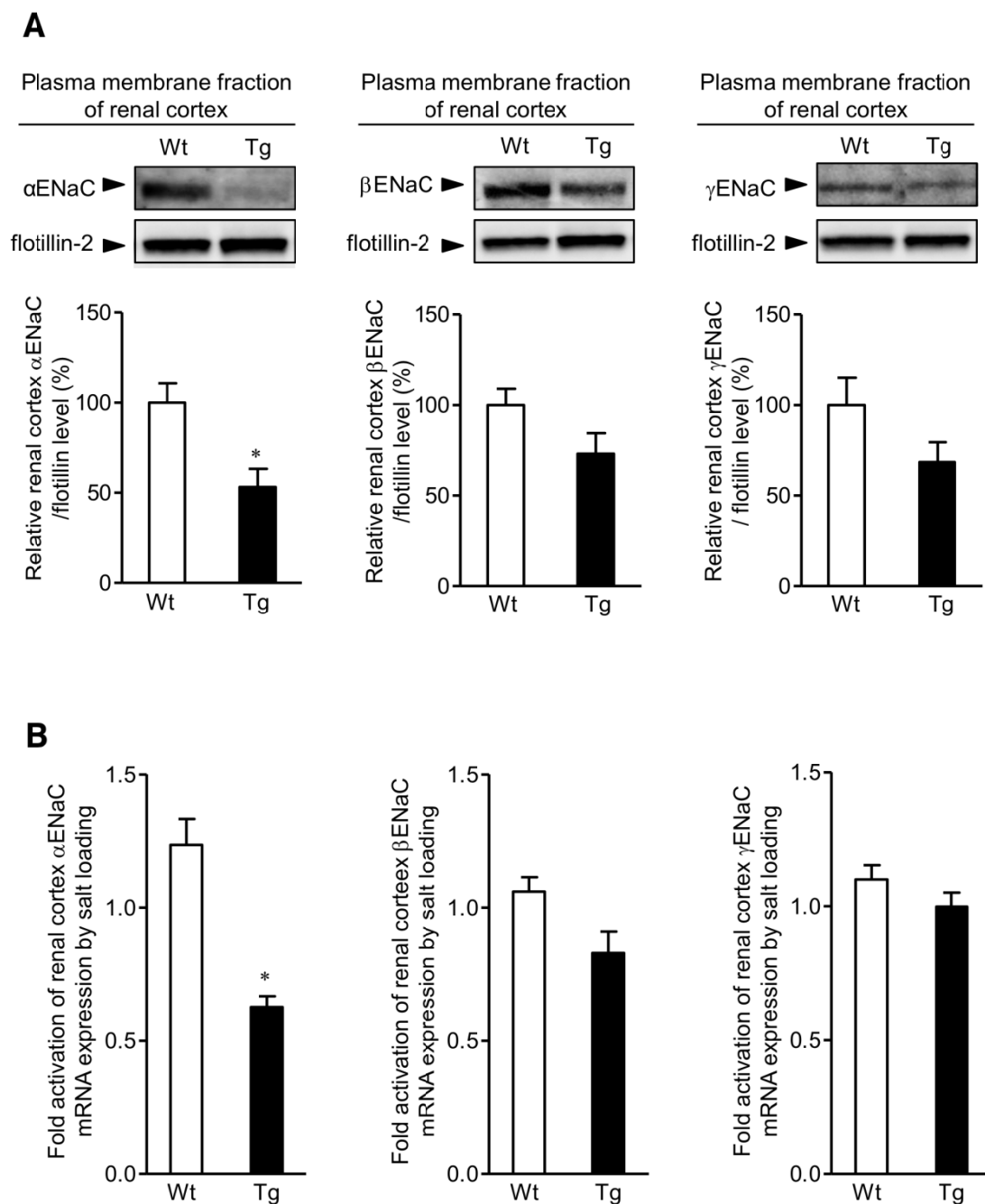


Fig. 3. 野生型マウス(Wt)および腎尿細管高発現マウス(Tg)における高食塩負荷(4% NaCl, 7日間)による腎皮質膜分画での ENaC alpha-, beta-, and gamma-subunits 発現の変化。腎尿細管高発現マウスでは野生型マウスと比較して ENaC alpha-subunit の発現抑制がみられた。

Table 1. ヒト正常腎組織における AT1 受容体と ATRAP の発現分布

	ATRAP		AT1 受容体
	mRNA	蛋白	蛋白
Glomerulus:			
Podocyte	+	±	±
Mesangial cell	+	±	±
Renal tubule:			
Bowman's capsule	+	±	++
PCT	+	++	++
PST	+	++	++
DCT	+	++	++
CCD	+	±	++
TAL	±	+	++
TL	+	±	±
MCD	+	+	++
Vasculature (interlobular artery, arteriole):			
Vascular smooth muscle cell	±	±	+
Vascular endothelial cell	-	-	-

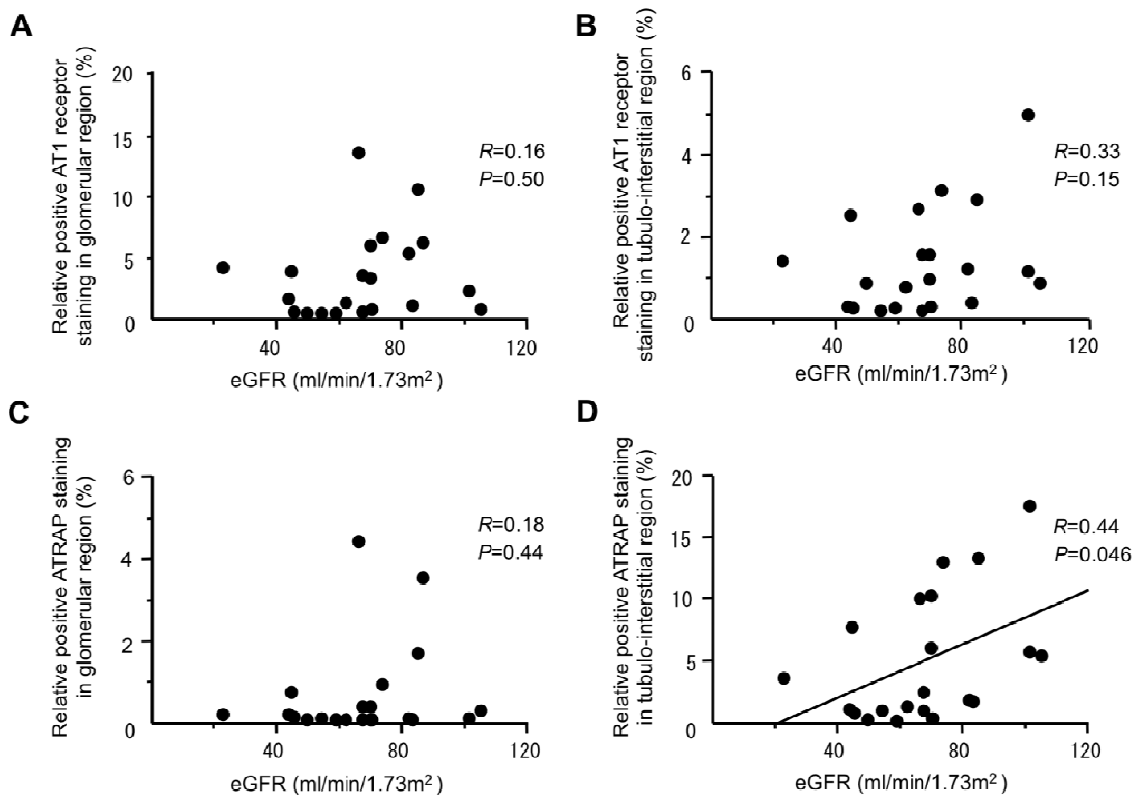


Fig. 4. IgA 患者腎生検組織における AT1 受容体および ATRAP 発現についての免疫組織学的検討。IgA 患者腎生検組織の尿細管間質における ATRAP 発現量と腎機能(eGFR)との間には有意な正の相関関係が認められた(D)。

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、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、loss-of-function *in vivo* strategy により、ATRAP 機能を生体レベルで解明すべく、標的遺伝子に対する相同的遺伝子組み換え法を用いた発生工学的手法により得られた全身性 ATRAP 欠損マウス(ATRAP ノックアウトマウス)を用いて、食塩感受性高血圧、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.
- 10) Masuda S, Tamura K, Wakui H, Maeda A, Dejima T, Hirose T, Toyoda M, Azuma K, Ohsawa M, Kanaoka T, Yanagi M, Yoshida SI, Mitsuhashi H, Matsuda M,

Ishigami T, Toya Y, Suzuki D, Nagashima Y, Umemura S. Expression of Angiotensin II Type 1 Receptor Interacting Molecule in Normal Human Kidney and IgA Nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol**, 299: 720-731, 2010..

11) Wakui H, Tamura K, Matsuda M, Bai Y, Dejima T,

Shigenaga AI, Masuda S, Azuma K, Maeda A, Hirose T, Ishigami T, Toya Y, Yabana M, Minamisawa S, Umemura S. Intrarenal suppression of angiotensin II type 1 receptor binding molecule in angiotensin II-infused mice. **Am J Physiol Renal Physiol**, 299: F991-F1003, 2010.

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

Kouichi Tamura, Hiromichi Wakui, Toru Dejima, Masato Ohsawa,
Akinobu Maeda, Satoshi Umemura

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

Summary

We firstly examined investigate the putative functional role of renal ATRAP in the regulation of blood pressure by salt loading *in vivo*. Since C57BL/6J mice are known to be salt sensitive, we produced transgenic mice dominantly expressing ATRAP in the renal distal tubules on a C57BL/6J background. Although dietary high sodium (4%) loading for 7 days increased systolic blood pressure particularly in the dark period in wild-type mice (day 7 versus baseline, 135.8 ± 3.7 versus 126.3 ± 2.4 mmHg, $P=0.027$), this increase in blood pressure was suppressed in the renal ATRAP transgenic mice (day 7 versus baseline, 128.4 ± 3.1 versus 127.7 ± 2.9 mmHg, NS) with a concomitant trend of increase in urinary sodium excretion (2.17 ± 0.09 versus 1.83 ± 0.08 mEq/day, $P=0.019$). Furthermore, the mRNA level and plasma membrane level of the α -subunit of the epithelial sodium channel were significantly decreased in the renal ATRAP transgenic mice. These results demonstrate that distal tubule-dominant overexpression of ATRAP *in vivo* suppresses the salt-sensitive increase in blood pressure, thereby suggesting ATRAP to be a target of interest in the salt-mediated regulation of blood pressure.

To examine further whether the regulation of renal ATRAP expression is related to the development of hypertension and renal injury, we next investigated expression and distribution of human ATRAP in normal kidney and renal biopsy specimens from patients with IgA nephropathy. In the normal human kidney, both the ATRAP mRNA and protein were widely and abundantly distributed along the renal tubules from Bowman's capsule to the medullary collecting ducts. In all renal tubular epithelial cells, the ATRAP protein co-localized with the AT1 receptor. In renal biopsy specimens with IgA nephropathy, a significant positive correlation between ATRAP and AT1 receptor gene expression was observed. There was also a positive relationship between tubulo-interstitial ATRAP expression and the estimated glomerular filtration rate (eGFR) in patients with IgA nephropathy. Furthermore, we examined the function of the tubular AT1 receptor using an immortalized cell line of mouse distal convoluted tubule (mDCT) cells and found that overexpression of ATRAP by adenoviral gene transfer suppressed the angiotensin II-mediated increases in TGF- β production in mDCT cells. These findings suggest that ATRAP might play a role in balancing the renal renin-angiotensin system synergistically with the AT1 receptor by counter-regulatory effects in IgA nephropathy, and propose an antagonistic effect of tubular ATRAP on AT1 receptor signaling.