

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, 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、ATRAPについて腎での発現調節に焦点をあてて2年間にわたって実施してきた研究をさらに発展させるために、今回発生工学的手法を用いて *gain-of-function in vivo strategy* として腎尿細管 ATRAP 高発現マウスを、また、*loss-of-function in vivo strategy* として全身性 ATRAP 欠損マウスを作製して個体レベルでの総合的解析を行い、食塩感受性高血圧を含む高血圧における ATRAP の病態生理学的意義について明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法 腎尿細管 ATRAP 高発現マウス、全身性 ATRAP 欠損マウスを作製し、Ang II 刺激にともなう血圧変動や腎機能、水電解質代謝(腎での Na⁺ handling)の変化について検討した。また、腎尿細管での Na(+) transporter の発現についても検討を加えた。

3. 研究結果 まず、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。Ang II 刺激(1,000-2,000 ng/kg/min, 14 日間)により、WT mice に比較して、Kid-ATRAP TG mice では平均動脈圧の上昇が有意に抑制された。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、全身性 ATRAP 欠損マウスでの検討では、Ang II 刺激下では、血圧上昇の有意な増強がみられ、Ang II 刺激下での尿量および飲水量は、全身性 ATRAP 欠損マウスでは WT マウスと比較して有意に低値であった。さらに、全身性 ATRAP 欠損マウスでは Ang II 刺激後の ENaC alpha-subunit の発現レベルが WT mice と比較して有意に上昇していた。

4. 考察 以上の結果は腎遠位尿細管を中心とした腎 ATRAP の発現レベルが腎での AT1 受容体情報伝達系に対する活性制御を通じた腎での 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と考えられる。

5. 今後の課題 今後は腎尿細管の特定の部位の関与をより詳細に検討していくとともに、腎に限らず全身の組織局所での ATRAP 発現・活性制御と高血圧、高血圧関連生活習慣病の病態生理との関連について検討を進めていく予定である。

1. 研究目的

食塩感受性高血圧を含む高血圧の発症・進展とそれにと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。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⁹⁾、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。

本研究課題では、ATRAP について腎での発現調節に焦点をあてて 2 年間にわたって実施してきた研究をさらに発展させるために、今回発生工学的手法を用いて gain-of-function *in vivo* strategy として腎尿細管 ATRAP 高発現マウスを、また、loss-of-function *in vivo* strategy として全身性 ATRAP 欠損マウスを作製して個体レベルでの総合的解析を行い、食塩感受性高血圧を含む高血圧における ATRAP の病態生理学的意義について明らかにすることを目的とした¹⁰⁻¹⁴⁾。

2. 研究方法

2. 1 腎尿細管 ATRAP 高発現が Ang II 刺激による高血圧に与える影響についての検討

すでに作製済みの腎尿細管 ATRAP 高発現マウスを用いて、miniosmotic pump による Ang II infusion 刺激を行った。そして、tail-cuff 法およびテレメトリー法による血圧測定、代謝ケージ測定による解析を施行し、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、遠位尿細管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 全身性 ATRAP 欠損が Ang II 刺激による高血圧に与える影響についての検討

次に、loss-of-function strategy として、gene targeting 法を用いて ATRAP の機能上重要なエクソン 3、4、5 を欠失させることにより全身性 ATRAP 欠損マウスを作製し、得られたマウス個体における 内在性 ATRAP 発現の欠損を確認した。それら ATRAP 欠損マウスを用いて、miniosmotic pump による Ang II infusion 刺激を行った。そして、tail-cuff 法による血圧測定、代謝ケージ測定による解析を施行し、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、遠位尿細管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 法により検討した。

3. 研究結果

3. 1 腎尿細管 ATRAP 高発現が Ang II 刺激による高血圧に与える影響についての検討

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(Fig. 1)、野生種のコントロールマウス(WT mice)と比較した。Osmotic minipump での vehicle (saline) 刺激下では、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、Ang II 刺激(1,000-2,000 ng/kg/min, 14 日間)により、WT mice に比較して、Kid-ATRAP TG mice では平均動脈圧の上昇が有意に抑制された(1,000 ng/kg/min 投与では day 11, 131.1±2.1 versus 118.9±3.3 mmHg, $P=0.015$) (Fig. 2)。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-ATRAP 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。さらに、Kid-ATRAP 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 ATRAP 発現量の増加は、ENaC の活性化を抑制し、Ang II 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、ATRAP が Ang II 刺激を介した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(in revision)である。

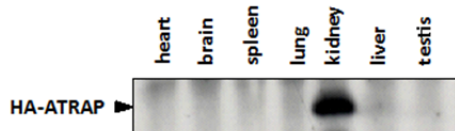
3. 2 全身性 ATRAP 欠損が Ang II 刺激による高血圧に与える影響についての検討

WT mice では腎において内在性 ATRAP の発現レベルが最も高く認められた。一方全身性 ATRAP 欠損マウスでは腎をはじめ諸組織での ATRAP 発現が認められなかったが、vehicle 投与下では、WT mice と比較して血圧に有意差を認めなかった(106.9±1.4 mmHg vs 107.5±1.1 mmHg, NS)。しかしながら Ang II 刺激下では、全身性 ATRAP 欠損マウスにおいて血圧上昇の有意な増強がみられた(137.4±2.0 mmHg vs 160.8±6.8 mmHg, $P<0.05$) (Fig. 4)。また、Ang II 刺激下での尿量および飲水量は、全身性 ATRAP 欠損マウスでは WT mice と比較して有意

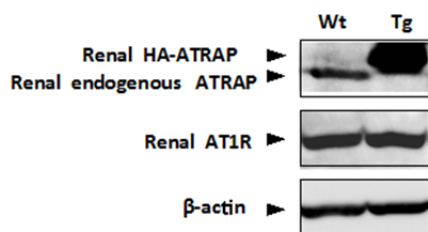
に低値であり、尿中ナトリウム排出量も有意に抑制されていた。さらに、腎臓での水・電解質トランスポーター関連遺伝子の発現に関しては、全身性 ATRAP 欠損マウスでは Ang II 刺激後の ENaC alpha-subunit の発現レベルが WT

mice と比較して有意に上昇していた。これらの研究成果については、今後国内外の学会にて発表予定となっており、現在論文執筆中である。

A 導入したHA-ATRAP蛋白の腎特異的高発現



B 腎でのATRAP, AT1R蛋白発現



C 腎尿細管高発現マウス (Tg) 腎皮質におけるATRAPの発現部位 (褐色領域)

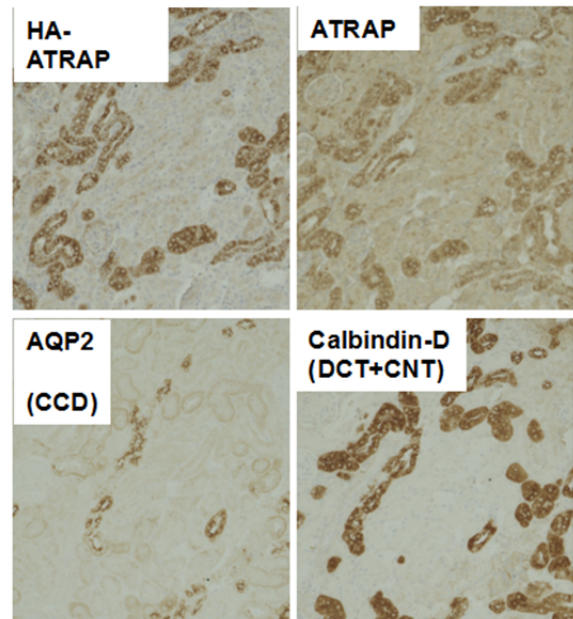


Fig. 1. 腎尿細管高発現マウス(Tg)において導入された HA-ATRAP 蛋白は、(A, B)腎において高発現がみられ、腎の中でも(C)遠位尿細管(DCT~CNT)に高発現が認められた。

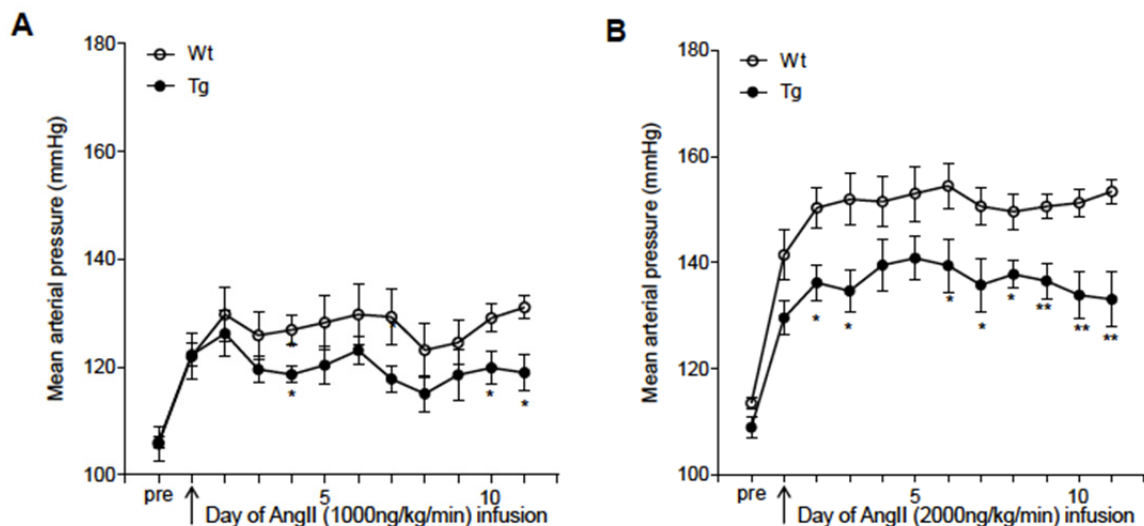


Fig. 2. 野生型マウス(Wt)および腎尿細管高発現マウス(Tg)における Ang II 刺激 (A, Ang II 1,000 ng/kg/min; B, 2,000 ng/kg/min; 14 日間)によるテレメリー測定での血圧の推移。野生型マウスでみられる Ang II 刺激による血圧上昇が腎尿細管高発現マウスでは抑制されていた。

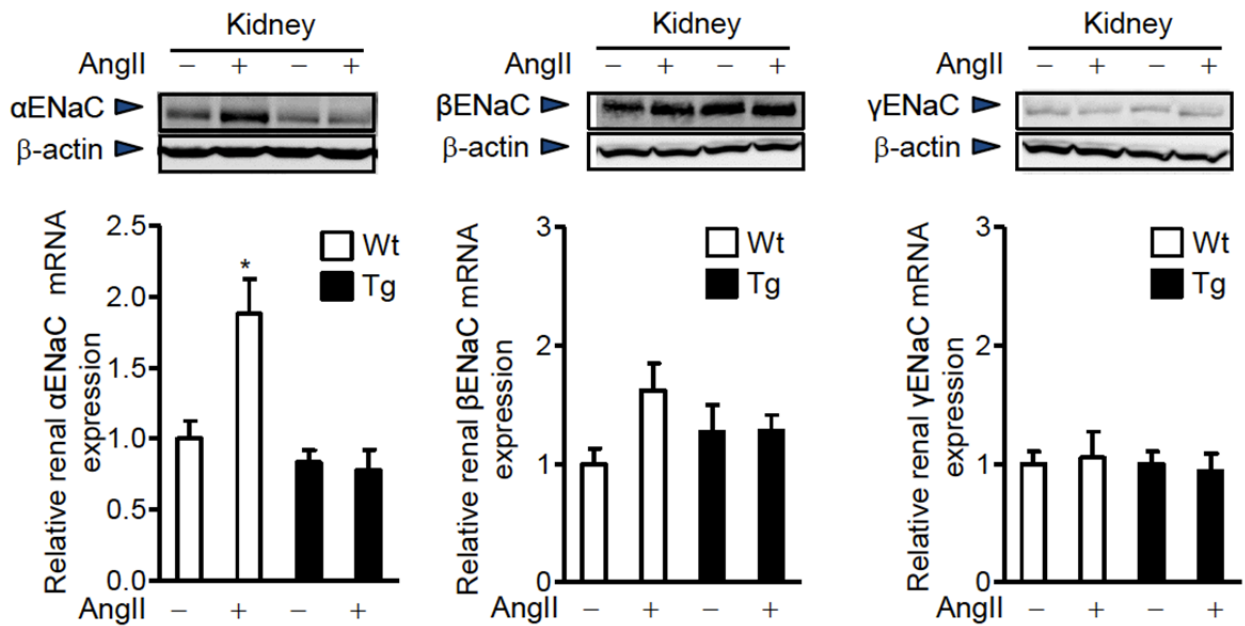


Fig. 3. 野生型マウス(Wt)および腎尿細管高発現マウス(Tg)における Ang II 刺激(Ang II 2 000 ng/kg/min; 14 日間)による腎皮質膜分画での ENaC alpha-, beta-, and gamma-subunits 発現の変化。腎尿細管高発現マウスでは野生型マウスと比較して、Ang II 刺激後の ENaC alpha-subunit の発現抑制がみられた。

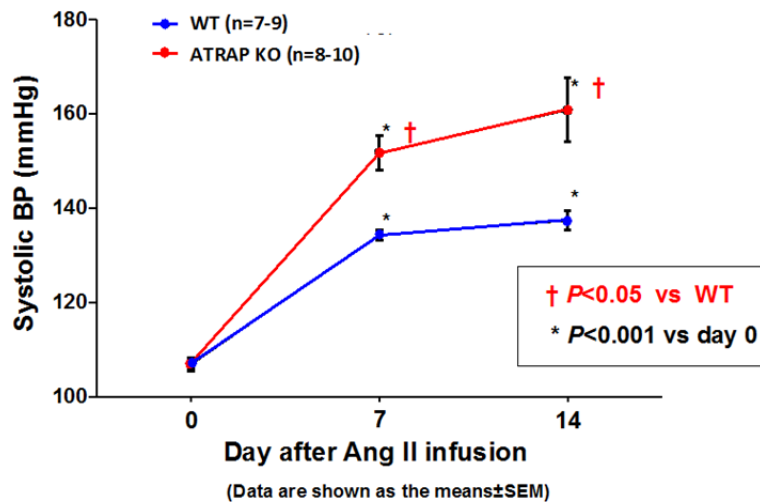


Fig. 4. 野生型マウス(WT)および全身性 ATRAP 欠損マウス(ATRAP-KO)における Ang II 刺激(Ang II 2,000 ng/kg/min; 14 日間)による tail-cuff 測定での血圧の推移。野生型マウスでみられる Ang II 刺激による血圧上昇が全身性 ATRAP 欠損マウスでは増強されていた。

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、初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 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、 α ENaC 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 ATRAP の機能的意義を示唆していると考えられた。

そこで、昨年度の 2 年目の研究においては、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。そして、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すことを示した。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ことも明らかにした。したがって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た。

3 年目の本年度の研究においては、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 (Kid-ATRAP TGM) と全身性 ATRAP 欠損マウスを確立して、Ang II 刺激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 C57BL6 WT mice であり、Ang II 刺激により食塩感受性の高血圧を呈した。一方、Kid-ATRAP TGM では Ang II 刺激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。一方、全身性 ATRAP 欠損マウスでは Ang II 刺激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 の発現亢進にともない尿中 Na⁺排泄量の減少がみられ、また食塩感受性血圧上昇が増強されていた。以上の結果は腎尿細管局所における ATRAP が食塩感受性高血圧の病態生理に深く関与している可能性を強く示唆していると考えられた。

5. 今後の課題

今回の研究による一連の結果は、腎遠位尿細管を中心とした腎 ATRAP の発現の変化が、腎での AT1 受容体情報伝達系活性の変化を通じて腎での Na⁺制御機構への作用に影響を及ぼすこと、そして、この機序を介して食塩感受性の血圧調節に関与している可能性を示していると考えられる。また、今回、腎尿細管での ATRAP の発現レベルを制御することにより、おそらく腎 AT1 受容体情報伝達系の活性調節を介した腎での Na⁺制御機構制御を通じて食塩感受性高血圧を予防・治療する可能性を示したとも考えられる。今後は腎尿細管の特定の部位の関与をより詳細に検討していくとともに、腎に限らず全身の組織局所での ATRAP 発現・活性制御と高血圧、高血圧関連生活習慣病の病態生理との関連について検討を進めていく予定である¹⁵⁾。

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 I 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 I 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.
- 12) Dejima T, Tamura K, Wakui H, Maeda A, Ohsawa M, Kanaoka T, Haku S, Kengo A, Masuda S, Shigenaga A, Azuma K, Matsuda M, Yabana M, Hirose T, Uchino K, Kimura K, Nagashima Y, Umemura S. Prepubertal angiotensin blockade exerts long-term therapeutic effect through sustained ATRAP activation in salt-sensitive hypertensive rats. **J Hypertens**, 29: 1919-1929, 2011 (*Featured in Editorial Commentary: **J Hypertens**, 29: 1857-1858, 2011)
- 13) Matsuda M, Tamura K, Wakui H, Dejima T, Maeda A, Ohsawa M, Kanaoka T, Haku S, Azushima K, Yamasaki H, Saito D, Hirose T, Maeshima Y, Nagashima Y, Umemura S. Involvement of Runx3 in the basal transcriptional activation of the mouse angiotensin II type 1 receptor-associated protein gene. **Physiol Genomics**, 43: 884-894, 2011.
- 14) Yasuda N, Akazawa H, Ito K, Shimizu I, Kudo-Sakamoto Y, Yabumoto C, Yano M, Yamamoto R, Ozasa Y, Minamino T, Naito AT, Oka T, Shiojima I, Tamura K, Umemura S, Nemer M, Komuro I. Agonist-independent constitutive activity of angiotensin II receptor promotes cardiac remodeling in mice. **Hypertension**, 59: 627-633, 2012.
- 15) Tamura K, Wakui H, Maeda A, Ohsawa M, Azushima K, Uneda K, Haku S, Dejima T, Masuda S, Azuma K, Tokita Y, Umemura S. Angiotensin II receptor-associated proteins. **Current Pharmaceutical Design**, in press.

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

Kouichi Tamura¹, Hiromichi Wakui², Toru Dejima¹, Masato Ohsawa¹,
Akinobu Maeda¹, Satoshi Umemura¹

¹Department of Medical Science and Cardiorenal Medicine, Yokohama City University Graduate School of Medicine, ²Yokohama City University Hospital

Summary

We have been shown that ATRAP (angiotensin II type 1 receptor-associated protein) interacts with the angiotensin II type 1 receptor and promotes constitutive internalization of the angiotensin II type 1 receptor so as to inhibit its downstream signaling. The present study was designed to investigate the putatively beneficial role of renal ATRAP in angiotensin II-dependent hypertension. We generated transgenic mice dominantly expressing ATRAP in the renal distal tubules. In the renal ATRAP transgenic mice compared with the wild-type mice, the development of high blood pressure in response to angiotensin II infusion was suppressed based on radiotelemetry, with a concomitant increase in urinary sodium excretion. The renal mRNA and protein inductions of the α -subunit of the epithelial sodium channel (α ENaC) by angiotensin II infusion were decreased in the renal ATRAP transgenic mice compared with the wild-type mice. Furthermore, overexpression of ATRAP by adenoviral gene transfer suppressed the angiotensin II-mediated increase in the expression of the α ENaC in mouse distal convoluted tubule cells. These results demonstrate that kidney-dominant overexpression of ATRAP *in vivo* suppresses angiotensin II-dependent hypertension, thereby suggesting ATRAP is a target of interest in hypertension.