

受容体結合型の食塩感受性高血圧抑制因子に着目した 慢性腎臓病の病態解明および病態制御の試み

田村 功一¹, 小林 竜², 畷田 一司¹, 小豆島 健護¹, 大澤 正人¹, 涌井 広道¹

¹横浜市立大学大学院医学研究科, ²横浜市立大学附属病院

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、貴財団からの助成により作製に成功した、発生工学的手法による ATRAP 遺伝子特異的欠損マウス[ATRAP ノックアウト (KO) マウス]において、持続的慢性アンジオテンシン II (Ang II) 刺激が血圧制御や腎ナトリウム代謝に及ぼす影響を検討した。

2. 研究方法

発生光学的手法を用いて、相同的遺伝子組み換え法により、ATRAP 遺伝子特異的欠損マウス[ATRAP ノックアウト (KO) マウス]を作製し、持続的慢性 Ang II 刺激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。そして慢性的な Ang II 刺激に伴う慢性腎臓病病態における腎でのナトリウム代謝系や血圧調節系の異常の状態、および内在性 ATRAP の病態生理学的意義について検討を加えた。

3. 研究結果

1型アンジオテンシン II 受容体(AT1R)関連蛋白質(ATRAP)は、組織 AT1R シグナル伝達の病的活性化の抑制とともに AT1R の内在化を促進する。しかし、病的刺激下での腎ナトリウム処理や血圧調節における ATRAP の機能的な意義は完全に解明されていない。今回の検討において、ATRAP を特異的に欠損させたマウスのベースライン時の血圧は野生型と同等であったことを示した。しかし、ATRAP ノックアウトマウスではアンジオテンシン II 誘導性の高血圧が増悪し、アンジオテンシン II 刺激により腎尿細管でのナトリウム排泄量が減少しており、野生型コントロールマウスと比べて、正のナトリウムバランスを呈していた。一方、近位尿細管での主なナトリウム輸送体である Na⁺/H⁺ 交換輸送体 3 の腎発現、尿中 pH、腎臓でのアンジオテンシン産生やアンジオテンシン II 含有量に影響はみられなかった。さらに、慢性アンジオテンシン II 刺激による、遠位尿細管での主なナトリウム輸送体の上皮型ナトリウムチャンネル (ENaC) の腎発現と活性化は ATRAP ノックアウトマウスにおいて野生型マウスと比較して有意に増強していた。一方、血中および尿中アルドステロン濃度は同等であり、アルドステロンによる血圧反応や腎 ENaC 発現にも影響はみられなかった。

以上の結果から、ATRAP 欠損は、アンジオテンシン II による腎尿細管 AT1R の病的活性化を亢進し、腎尿細管でのナトリウム再吸収を促進し、アンジオテンシン II 誘導性の高血圧を増悪させると考えられる。そして、AT1R の病的活性化は遠位尿細管での ENaC を直接刺激して、アルドステロン非依存性にナトリウム貯留を促進し得ると考えられる。

4. 考察

ATRAP-KO マウスでの Ang II による高血圧増悪の開始プロセスのメカニズムに関しては、Ang II 誘導性のナトリウム貯留および BP 上昇は、Ang II 投与の初期段階でも、ATRAP-KO マウスおよび WT マウスで異なる傾向にあったものの、

Ang II 投与の day 1 での腎 α ENaC 蛋白質発現量は両マウスで同等であった。これらの結果から、Ang II 投与の初期段階で生じるナトリウムバランス、および BP 上昇の差には糸球体血行動態、糸球体濾過量、血管収縮の変化が関与している可能性が示唆される。実際、WT マウスと比べて ATRAP-KO マウスの血管リングでは、Ang II によってより過度の血管収縮反応が誘導された。ATRAP 欠損による Ang II 誘導性の血管収縮の亢進は、Ang II による高血圧増悪を引き起こす機序(特に開始プロセスにおける)の1つと考えられる。本研究の結果から、腎尿細管 AT1R の病的活性化は、慢性的 Ang II 刺激に反応したものであり、これは ATRAP 欠損により亢進され、遠位尿細管での ENaC の活性化が直接増強される。そしてアルドステロン非依存性にナトリウム貯留が促進され、Ang II による高血圧増悪が起きることが示唆された。

5. 今後の課題

本研究では全身性の ATRAP-KO マウスを用いており、ネフロンセグメント特異的な ATRAP の影響については検討がなされておらず今後の検討課題である。また、ENaC 以外のナトリウム輸送体との相互作用の可能性を含め、*in vivo* での ATRAP のネフロンセグメント特異的な機能的役割を解明する研究も今後行っていくことが重要である。今後はさらに種々の慢性腎臓病病態での腎障害や血圧異常(高血圧)における ATRAP の病態生理学的意義について検討を展開して行く予定である。

1. 研究目的

高血圧は世界中で最も一般的にみられる慢性疾患である。その病因は複雑であり、遺伝や環境因子が複雑に関連している。高血圧を引き起こすメカニズムを完全に解明することは困難であるものの、レニン-アンジオテンシン系(RAS)が極めて重要な役割を担っていることが知られている。組織 RAS のうち、腎尿細管での1型アンジオテンシン II 受容体(AT1R)シグナル伝達の活性化は、高血圧で認められる腎ナトリウム処理の変化と密接に関連することが示唆されている。Guyton の仮説によると、高血圧は、動脈圧に起因する腎ナトリウム排泄の不適切な抑制によって生じるとされている。すなわち、腎尿細管での AT1R シグナル伝達の病的活性化が腎ナトリウム処理異常を引き起こし、その結果、体液量の調節異常が生じ、これが高血圧の発症につながると考えられる。

特異的 AT1R 結合蛋白質として、これまでに AT1R 関連蛋白質(ATRAP/Agtrap)が同定されている。過去の研究から、ATRAP が心血管細胞においてアンジオテンシン II(Ang II)を介した AT1R の病的活性化を選択的に抑制すること、および Ang II 投与マウスにおいて心 ATRAP 亢進が血圧(BP)を含むベースラインの心血管機能に影響を及ぼすことなく心肥大を改善することが明らかにされている。これらの観察所見に基づきわれわれは、組織 ATRAP の発現低下は、ベースラインの生理学的 AT1R シグナル伝達に顕著な影響を及ぼさない特定の刺激によって、組織 AT1R の病的活性化を亢進するという仮説を立

てた。ATRAP は腎尿細管に沿って豊富に分布している。そこで、本研究課題では貴財団からの助成により作製に成功した、発生工学的的手法による ATRAP 遺伝子特異的欠損マウス[ATRAP ノックアウト(KO)マウス]において、持続的慢性 Ang II 刺激が血圧制御や腎ナトリウム代謝に及ぼす影響を検討した。

2. 研究方法と研究結果

2.1 発生工学的的手法による ATRAP 遺伝子特異的欠損マウス[ATRAP ノックアウト(KO)マウス]の作製と持続的慢性アンジオテンシン II (Ang II)刺激による慢性腎臓病病態。

発生光学的手法を用いて、相同的遺伝子組み換え法により、ATRAP 遺伝子特異的欠損マウス[ATRAP ノックアウト(KO)マウス]を作製し、持続的慢性 Ang II 刺激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。そして慢性的な Ang II 刺激に伴う慢性腎臓病病態における腎でのナトリウム代謝系や血圧調節系の異常の状態、および内在性 ATRAP の病態生理学的意義について検討を加えた。

2.2 ATRAP 欠損は腎臓の形態や機能、または AT1R 発現に顕著な影響を及ぼさない。

ATRAP mRNA は同腹仔野生型対照マウス(WT マウス)の組織に広範に分布しており、腎での発現が最も高かった(**Figure 1a**)。一方、ATRAP-KO マウスでは、腎臓を含むどの組織でも ATRAP 発現は検出されなかった(**Figure**

1a, b)。メガリン(近位曲尿細管)、カルビンジン D(遠位曲尿細管および結合尿細管)、アクアポリン 2(集合管)などの各尿細管セグメントに特異的なマーカーを用いた連続

切片による免疫組織化学染色では、WT マウスの近位曲尿細管から集合管のネフロンセグメントにおいて、ATRAP 免疫染色が広範に検出された (Figure 1c)。

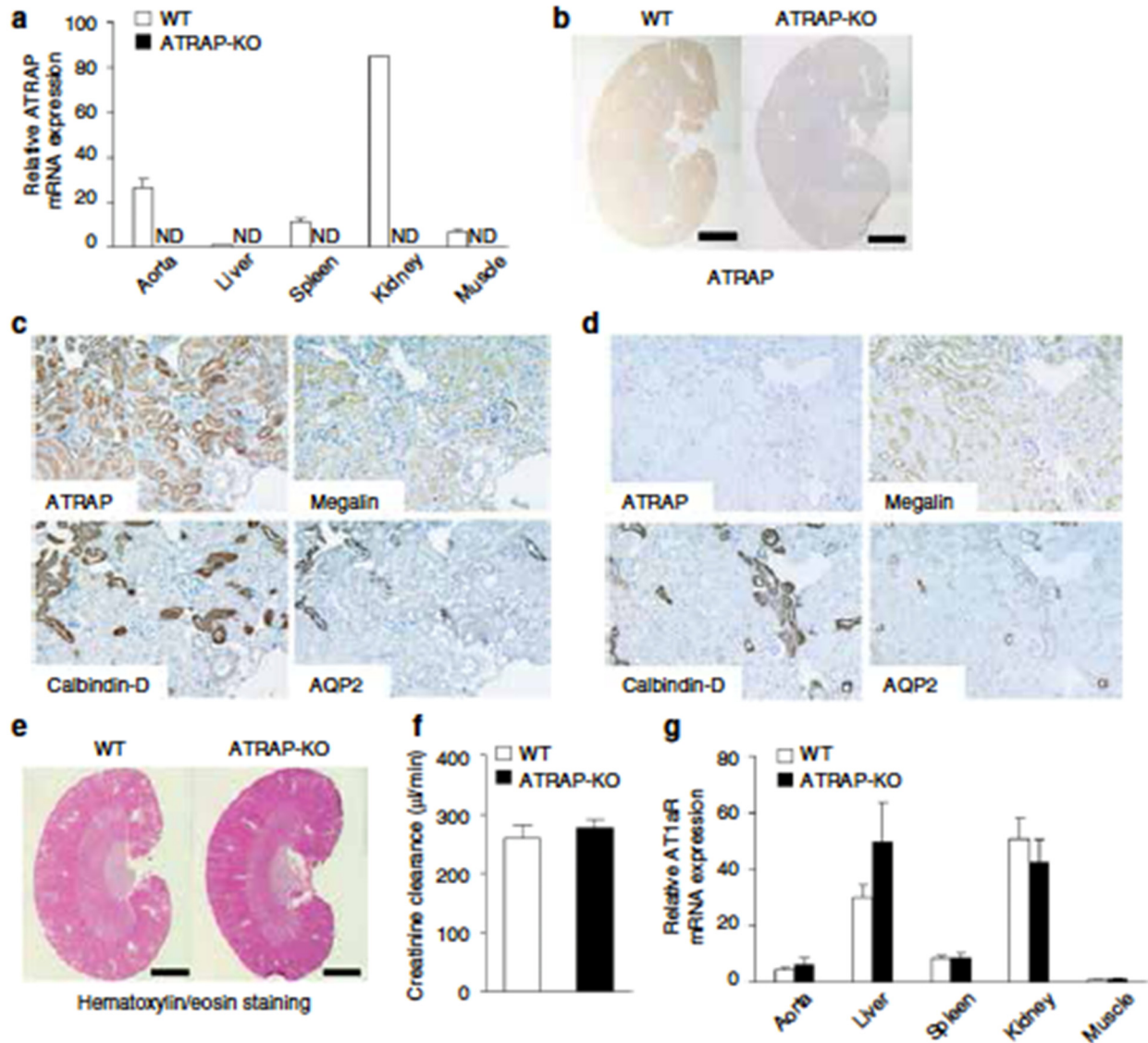


Figure 1. 1型アンジオテンシンII受容体(AT1R)関連蛋白質(ATRAP)欠損は、腎臓の形態またはAT1R遺伝子発現に顕著な影響を及ぼさない。(a) ATRAP mRNAは多くの異なる組織に広範に分布しており、野生型(WT)マウスの腎臓に豊富に発現している。値はWTマウス肝臓からの抽出量に対する相対量として算出。平均値±s.e.(各群n=2)。ND:検出なし。(b)免疫組織化学染色により、ATRAPがWTマウス腎臓に豊富に発現していることが確認された。同切片においてATRAP免疫染色陽性領域は茶色い点として明確に検出される。スケールバー=1.5mm。原倍率×40。(c)免疫組織化学染色により、WTマウスの連続腎皮質切片ではATRAPが近位から遠位尿細管のネフロンセグメントに沿って発現していることが確認された。AQP2(アクアポリン2):集合管の特異的なマーカー、カルビンジンD:遠位曲尿細管(DCT)および結合尿細管(CNT)の特異的なマーカー、メガリン:近位尿細管の特異的なマーカー。原倍率×200。(d) ATRAPノックアウト(KO)マウス腎臓尿細管では、ATRAP免疫染色がみられない。原倍率×200。(e) WTマウスおよびATRAP-KOマウス腎臓切片の典型的なHE染色像。両マウス腎臓で解剖学的な差はみられなかった。スケールバー=1.5mm。原倍率×40。(f) ATRAP欠損はクレアチニンクリアランスに影響を及ぼさない。平均値±s.e.(各群n=4)。(g) ATRAP欠損はAT1aR mRNAの組織分布または発現量に影響を及ぼさない。値はWTマウス筋肉からの抽出量に対する相対量として算出。平均値±s.e.(各群n=4~6)(文献16)。

一方、ATRAP-KO マウスのネフロンセグメントでは ATRAP 免疫染色はみられなかった (Figure 1d)。アンジオテンシノーゲン (AGT)、レニン、AT1R などの他の RAS 構成要素の遺伝的不活化は、ベースライン条件下でも腎臓の形態学的変化をもたらすことが報告されているが¹¹⁻¹⁵⁾、ベースライン時の ATRAP-KO マウスでは腎形態 (Figure 1e) またはクレアチニンクリアランス (Figure 1f, WT 260.8 ± 21.7 vs. ATRAP-KO 277.6 ± 13.2 μL/min, P = 0.918; 独立 t 検定) の顕著な変化は認められなかった。さらに、AT1R mRNA 発現は、WT マウスと ATRAP-KO マウスで有意差はみられなかった (Figure 1g)。

2.3 ATRAP 欠損はベースラインの BP または尿中 pH に顕著な影響を及ぼさない。

RAS 構成要素 (すなわち AGT, レニン, AT1R) の遺伝的欠損は、ベースライン BP の有意な低下をもたらすことも報告されている。しかし、ラジオテレメトリーで測定された

ベースラインの 24 時間平均収縮期 BP、拡張期 BP、心拍数 (HR) は、WT マウスと ATRAP-KO マウスとで同等であった [Figure 2a, 収縮期 BP 120 ± 2 vs 123 ± 4 (mmHg), P = 0.545; Figure 2b, 拡張期 BP 92 ± 5 vs 95 ± 4 (mmHg), P = 0.793; Figure 2c, HR 541 ± 18 vs 547 ± 10 (拍/min), P = 0.598; いずれも独立 t 検定]。Na⁺/H⁺ 交換輸送体 3 (NHE3) 活性を反映する尿中 pH も、WT マウスと ATRAP-KO マウスで同等であった (Figure 2d)。

2.4 ATRAP 欠損は Ang II 誘導性高血圧を増悪させる。

ATRAP-KO マウスではベースライン BP の変化が認められなかったことから、次に、ATRAP 欠損が長期 Ang II (500 または 2,000 ng/kg/min) 投与に対する BP 反応に及ぼす影響を検討した。WT マウスでは長期 Ang II 投与期間中に収縮期 BP が上昇したが、Ang II 誘導性の同収縮

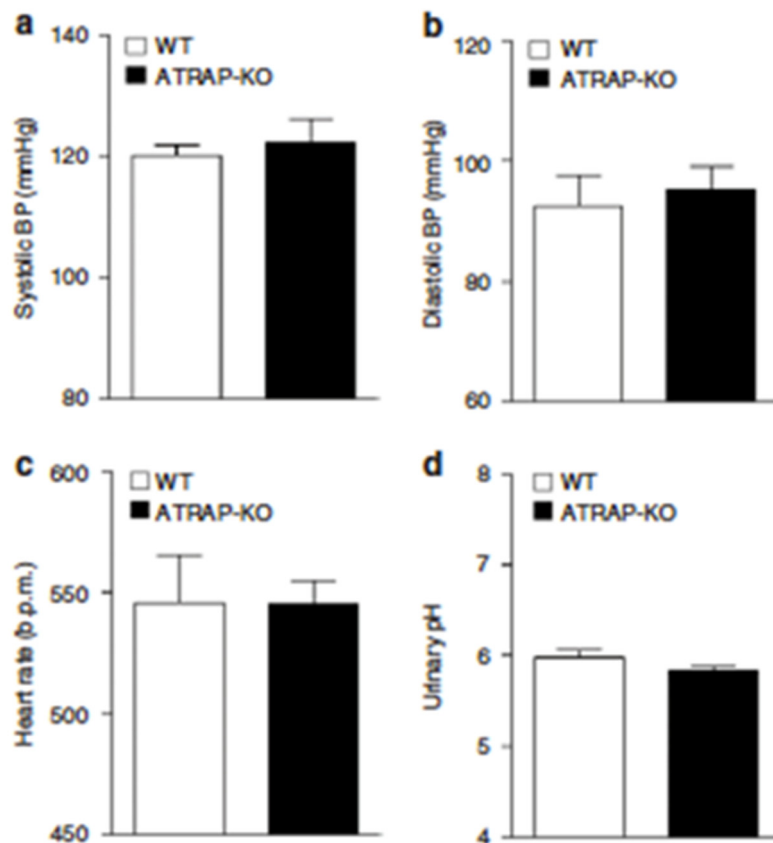


Figure 2. 1型アンジオテンシンII受容体(AT1R)関連蛋白質(ATRAP)欠損は、ベースラインの血圧(BP)または尿中pHに顕著な影響を及ぼさない。ラジオテレメトリーにより測定した(a)収縮期BP、(b)拡張期BP、(c)心拍数は、野生型(WT)マウスおよびATRAPノックアウト(KO)マウスで同等であった。(d)尿中pHもWTマウスおよびATRAP-KOマウスで同等であった。平均値±s.e.(各群n=5~6)

期 BP 上昇の程度は、用量にかかわらず、WT マウスと比べて ATRAP-KO マウスにおいて有意に大きかった (Figure 3a, Ang II 500 ng/kg/min, $F=6.117$, $P=0.048$; Figure 3b, Ang II 2,000 ng/kg/min, $F=86.758$, $P<0.001$;いずれも two-way repeated measures ANOVA)。WT マウスとの比較における ATRAP-KO マウスの特性をより明らかにするため、高用量 Ang II (2,000 ng/kg/min) を用いた。

ATRAP-KO マウスでは、WT マウスと比べて Ang II による心重量/体重比率の有意な上昇も観察された (Figure 3c, $P=0.040$, ANOVA)。同様に、ATRAP-KO マウスでは WT マウスと比べて尿中アルブミン排泄量も上昇していた (Figure 3d, $P<0.001$, ANOVA)。14 日間の Ang II (2,000 ng/kg/min) 投与期間中の死亡率は、WT マウスと ATRAP-KO マウスで同等であった [5.7 vs 7.3 (%), $P=0.576$, χ^2 検定]。

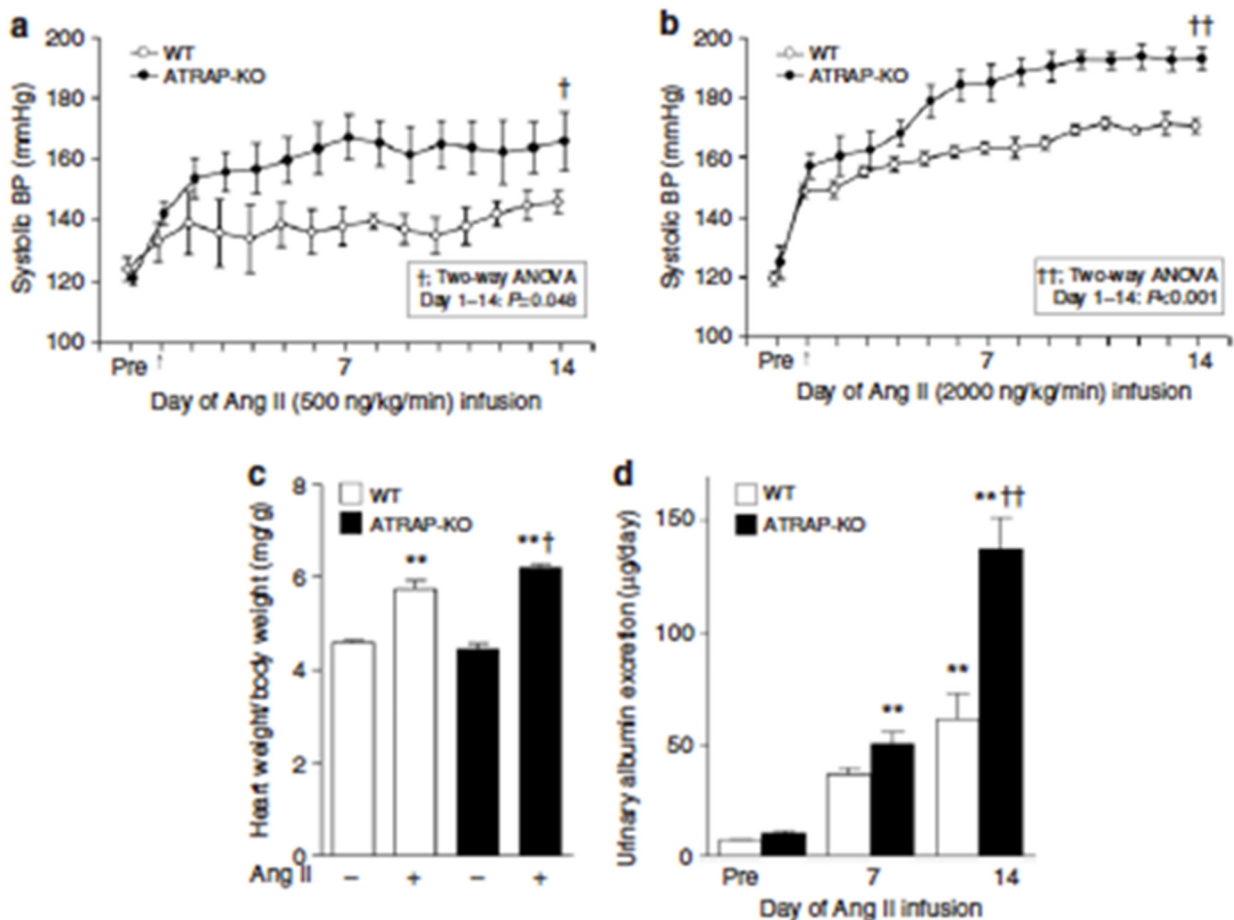


Figure 3. 1型アンジオテンシンII受容体(AT1R)関連蛋白質(ATRAP)欠損は、アンジオテンシンII(Ang II)による高血圧を増悪させる。Ang II誘導性の収縮期血圧(BP)上昇は、Ang IIの用量にかかわらず ATRAPノックアウト(KO)マウスのほうが野生型(WT)マウスと比べて有意に増悪した(a: 500 ng/kg/min, b: 2,000 ng/kg/min)。平均値±s.e.(各群n=4)。† $P<0.05$ vs. WTマウス, †† $P<0.01$ vs. WTマウス。(c) ATRAP-KOマウスではWTマウスと比べてAng II(2,000 ng/kg/min)投与後の心重量/体重の比率の有意な上昇が観察された。平均値±s.e.(各群n=7~9)。** $P<0.01$ vs. vehicle投与, † $P<0.05$ vs. WTマウス。(d) Ang II(2,000 ng/kg/min)投与後の尿中アルブミン排泄量は、WTマウスと比べてATRAP-KOマウスでさらに上昇した。平均値±s.e.(各群n=6~8)。** $P<0.01$ vs. vehicle投与, †† $P<0.01$ vs. WTマウス。テレメトリーにより測定した(a)収縮期BP、(b)拡張期BP、(c)心拍数は、野生型(WT)マウスおよびATRAPノックアウト(KO)マウスで同等であった。(d)尿中pHもWTマウスおよびATRAP-KOマウスで同等であった。平均値±s.e.(各群n=5~6)(文献16)。

2. 5 ATRAP 欠損は Ang II 刺激中の尿中ナトリウム排泄を抑制する。

検討を行った種々の組織のうち、ATRAP 発現量が最も高かったのが腎尿細管であったことから、われわれは ATRAP 欠損が、腎ナトリウム処理に影響を及ぼすことによって、Ang II による高血圧を亢進する可能性があるかと仮定した。このことを検証するため、代謝ケージを用いた解析を行った (Figure 4a~d)。日ごとのナトリウム摂取量は、WT マウスと ATRAP-KO マウスで同等であり (Figure 4a, $F=0.559$, $P=0.469$, two-way repeated measures ANOVA)、

尿中ナトリウム排泄量も両マウスで同等であった (Figure 4b, $F=1.690$, $P=0.218$, two-way repeated measures ANOVA)。しかし、日ごとのナトリウムバランスは Ang II 投与の全期間を通して ATRAP-KO マウスにおいて、WT マウスと比べて有意に高かった (Figure 4c, $F=4.892$, $P=0.047$, two-way repeated measures ANOVA)。さらに、14 日間の Ang II 投与期間中の累積ナトリウムバランスの程度は、WT マウスと比べて ATRAP-KO マウスにおいて有意に上昇し (Figure 4d, $P=0.047$, 独立 t 検定)、これは Ang II 誘導性の高血圧増悪の機序でのナトリウム利尿の

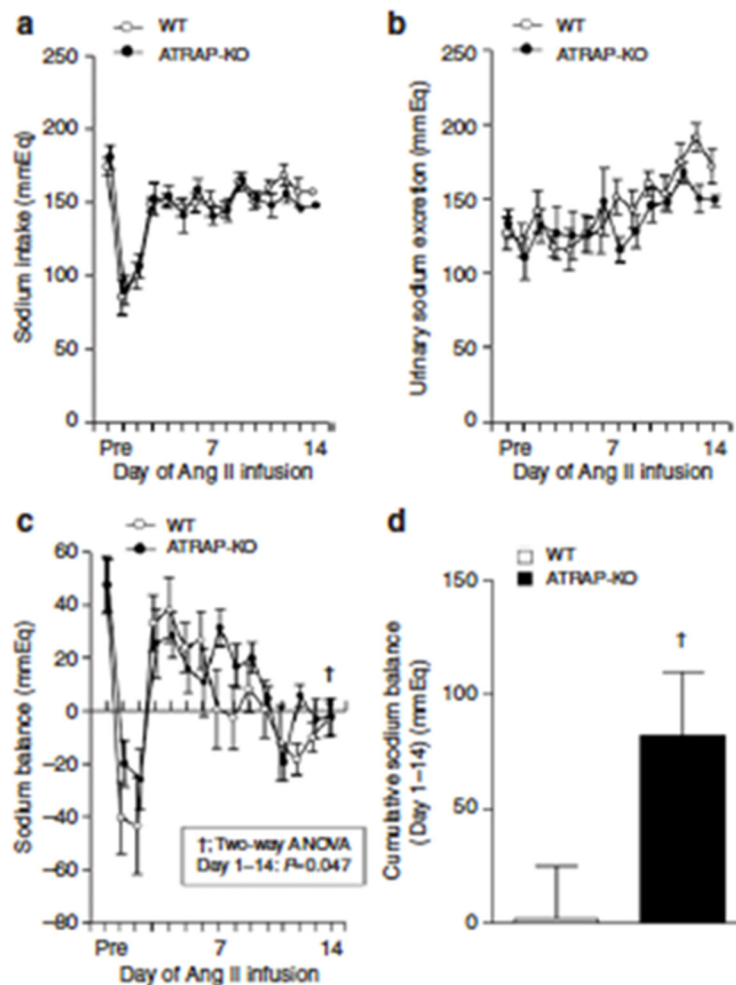


Figure 4. 1 型アンジオテンシン II 受容体 (AT1R) 関連蛋白質 (ATRAP) 欠損は、アンジオテンシン II (Ang II) 投与中のナトリウム貯留を増悪させる。(a) 日ごとのナトリウム摂取量は Ang I (I 2,000 ng/kg/min) 投与の全期間を通して野生型 (WT) マウスおよび ATRAP ノックアウト (KO) マウスで同等であった ($F=0.559$, $P=0.469$, two-way repeated measures ANOVA)。(b) 日ごとの尿中ナトリウム排泄量は、Ang II 投与の全期間を通して WT マウスおよび ATRAP-KO マウスで同等であった ($F=1.690$, $P=0.218$, two-way repeated measures ANOVA)。(c) 日ごとのナトリウムバランスは、Ang II 投与の全期間を通して ATRAP-KO マウスのほうが WT マウスと比べて有意に高かった ($F=4.892$, $P=0.047$, two-way repeated measures ANOVA)。(d) 代謝ケージを用いた解析から、Ang II (2,000ng/kg/min) 投与期間中の累積ナトリウムバランスの程度は、ATRAP-KO マウスのほうが WT マウスと比べて有意に上昇した。平均値 \pm s.e. (各群 $n=7\sim 8$)。† $P<0.05$ vs. WT マウス (文献 16)。

抑制と一致していた。

2. 6 ATRAP 欠損は慢性的 Ang II 刺激による上皮型ナトリウムチャネル α サブユニット (α ENaC) の腎発現を増強する。

ATRAPKO マウスでの Ang II に応じた尿中ナトリウム排泄の抑制に関与する機序を検討するため、主なナトリウム共輸送体 [NHE3, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体 (NKCC2), $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ 共輸送体 (NCC), ENaC サブユニット] の腎発現を比較した。年齢をマッチさせた WT マウスおよび ATRAP-KO マウスを 4 群に分けた。すなわち (1) vehicle 投与 WT マウス、(2) Ang II 投与 WT マウス、(3) vehicle 投与 ATRAP-KO マウス、(4) Ang II 投与 ATRAP-KO マウスである。14 日間の Ang II 投与の有無にかかわらず、WT マウスおよび ATRAP-KO マウスでは、NHE3 または NKCC2 の mRNA および蛋白質発現量に差は認められなかった (Figures 5a, b および 6a, b)。それに対し、NCC

mRNA 発現は ATRAP-KO マウスにおいてのみ Ang II によって有意に増強したものの (Figure 5c)、活性化 NCC 蛋白質であるリン酸化 NCC の Ang II による腎発現量の増加は両マウスで同等であった (Figure 6c)。

一方、 α ENaC mRNA 発現量は、WT マウスと比べて ATRAP-KO マウスにおいて Ang II により有意に増強したが、 β ENaC と γ ENaC mRNA ではこのような発現増強はみられなかった (Figure 5d~f)。さらに、 α ENaC 蛋白質発現量は、vehicle 投与の WT マウスと ATRAP-KO マウスで差はなかったが、後者では同腎発現量が Ang II により有意に増加した ($P=0.007$ vs. vehicle 投与 ATRAP-KO マウス, $P=0.042$ vs. AngII 投与 WT マウス, ANOVA, Figure 6d)。 β ENaC および γ ENaC 蛋白質発現量は、WT マウスと ATRAP-KO マウスで同等であった (Figure 6e, f)。

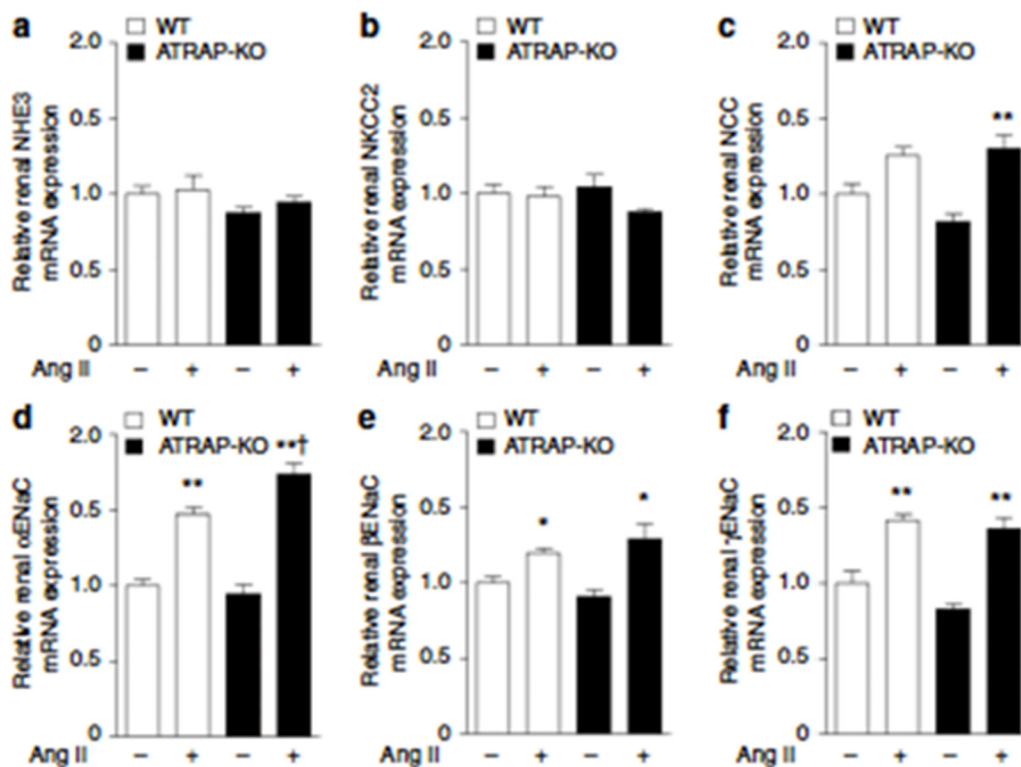


Figure 5. 1 型アンジオテンシン II 受容体 (AT1R) 関連蛋白質 (ATRAP) 欠損は、長期アンジオテンシン II (Ang II) 投与による上皮型ナトリウムチャネル α サブユニット (α ENaC) mRNA の腎発現を増強する。14 日間の Ang II (2,000 ng/kg/min) 投与が野生型 (WT) マウスおよび ATRAP ノックアウト (KO) マウスの腎における主なナトリウム輸送体の mRNA 発現に及ぼす影響。[a: $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 交換輸送体 3 (NHE3), b $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体 (NKCC2), c: $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ 共輸送体 (NCC), d: α ENaC, e: β ENaC, f: γ ENaC] 平均値 \pm s.e. (各群 $n=6\sim 8$)。* $P<0.05$ vs. vehicle 投与, ** $P<0.01$ vs. vehicle 投与, † $P<0.05$ vs. WT マウス (文献 16)。

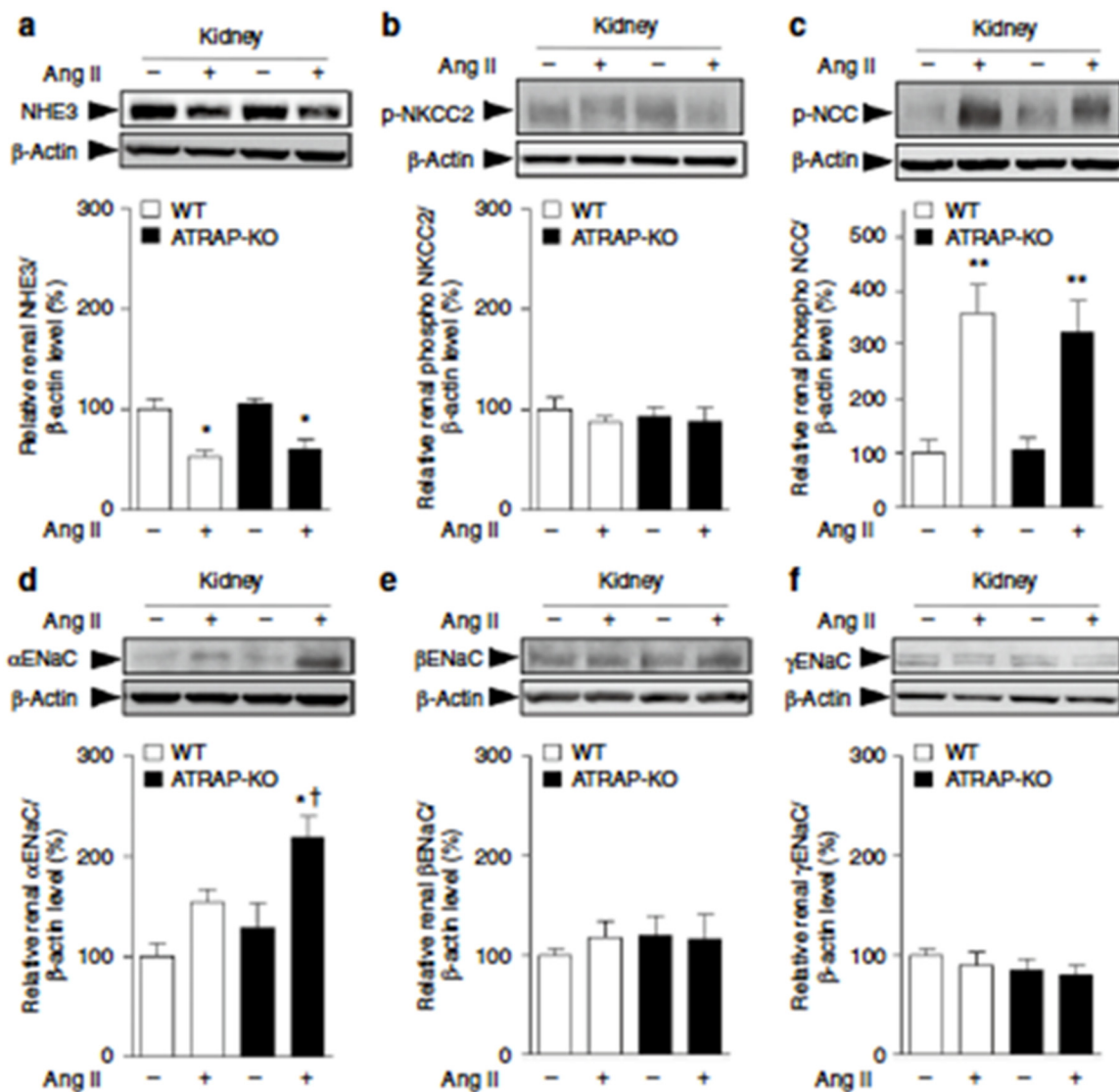


Figure 6. 1 型アンジオテンシン II 受容体 (AT1R) 関連蛋白質 (ATRAP) 欠損は、長期アンジオテンシン II (Ang II) 投与による上皮型ナトリウムチャネル α サブユニット (α ENaC) 蛋白質の腎発現を増強する。14 日間の Ang II (2,000 ng/kg/min) 投与が野生型 (WT) マウスおよび ATRAP ノックアウト (KO) マウス腎での主なナトリウム輸送体の蛋白質発現に及ぼす影響。[a: Na⁺/H⁺ 交換輸送体 3 (NHE3), b: Thr96 上の Na⁺-K⁺-2Cl⁻ 共輸送体 (NKCC2), c: Ser71 上の Na⁺-Cl⁻ 共輸送体 (NCC), d: α ENaC, e: β ENaC, f: γ ENaC] 平均値 \pm s.e. (各群 n=6~8)。*P<0.05 vs. vehicle 投与, **P<0.01 vs. vehicle 投与, †P<0.05 vs. WT マウス (文献 16)。

2. 7 慢性的 Ang II 刺激による ATRAP 欠損を介した腎 α ENaC 発現の増強はアルドステロン非依存性である。

これまで、近位尿細管では、Ang II 投与により AGT などの腎 RAS 構成要素の発現が増強することが報告されている^{16,17)}。そこで、ATRAP-KO マウスでの Ang II 誘導性の腎 α ENaC 発現に関連する機序を検討するため、腎での AGT mRNA 発現量および Ang II 含有量、尿中 AGT 排泄量を評価した。しかし、腎 AGT mRNA 発現量と尿中 AGT 排泄量は、vehicle 投与の WT マウスと ATRAP-KO

マウスで同等であり、Ang II 投与による明らかな変化はみられなかった (Figure 7a, b)。また、腎 Ang II 含有量は vehicle 投与の WT マウスと ATRAP-KO マウスで同等であり、かつ Ang II 投与により WT マウスおよび ATRAP-KO マウスの双方で有意かつ同等に増強した (Figure 7c)。これらの結果は、ATRAP 欠損が近位尿細管 AGT 産生または腎 Ang II 含有量に顕著な影響を及ぼさないことを示している。

次に、Ang II に応じた α ENaC 発現増強におけるアルドステロンの潜在的な役割を検討するため、血漿アルドステ

ロン濃度と尿中アルドステロン排泄量を評価した。Vehicle 投与下の血漿アルドステロン濃度[Figure 8a, 208.7±38.1 vs.197.5±29.3 (pg/mL), P=1.000, ANOVA]および尿中アルドステロン排泄量[Figure 8b, 5.2±0.6 vs. 4.6±0.8 (ng/日), P=0.974, ANOVA]は、WT マウスと ATRAP-KO マウスで同等であった。さらに、Ang II 投与により血漿アルドステロン濃度[Figure 8a, 1,154.0±170.5

vs. 1,464.5±267.9 (pg/mL), P =0.401, ANOVA]および尿中アルドステロン排泄量[Figure 8b, 19.2±0.5 vs. 15.9±2.1 (ng/日), P=0.126, ANOVA]は、WT マウスおよび ATRAP-KO マウスの双方で有意かつ同等に増加した。

そこで、WT マウスおよび ATRAP-KO マウスに外因性アルドステロンを皮下投与した。テールカフ法によって測定した収縮期 BP は、vehicle 投与の WT マウスと ATRAP

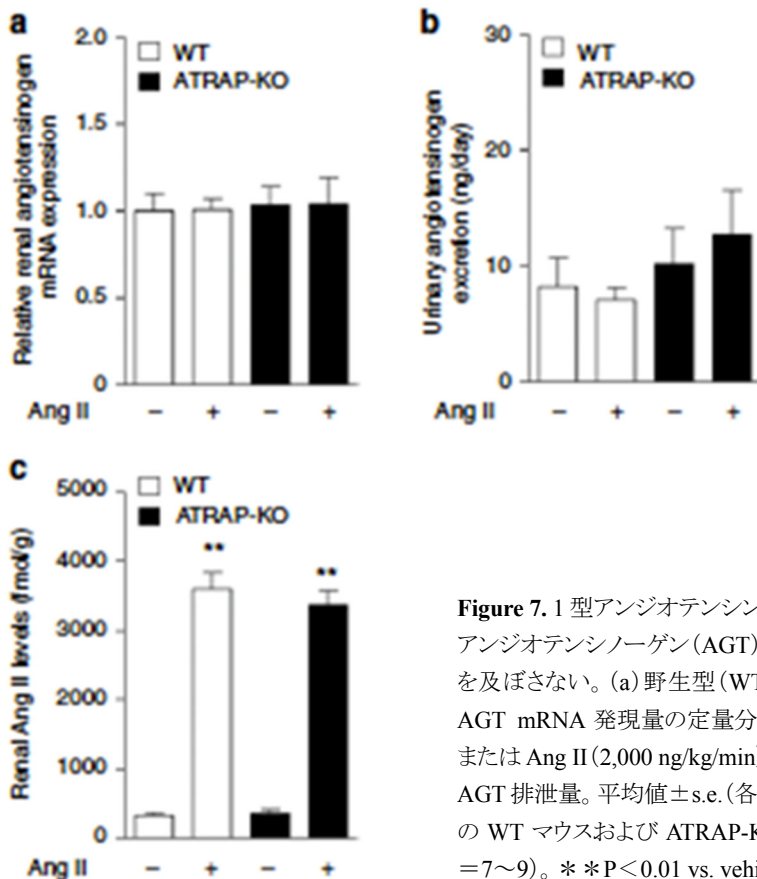


Figure 7. 1型アンジオテンシン II 受容体 (AT1R) 関連蛋白質 (ATRAP) 欠損は、腎でのアンジオテンシノーゲン (AGT) 産生、アンジオテンシン II (Ang II) 発現量に顕著な影響を及ぼさない。(a) 野生型 (WT) マウスおよび ATRAP ノックアウト (KO) マウスでの腎 AGT mRNA 発現量の定量分析。平均値±s.e. (各群 n=7~9)。(b) 14 日間の vehicle または Ang II (2,000 ng/kg/min) 投与後の WT マウスおよび ATRAP-KO マウスでの尿中 AGT 排泄量。平均値±s.e. (各群 n=6~7)。(c) 14 日間の vehicle または Ang II 投与後の WT マウスおよび ATRAP-KO マウスにおける腎 Ang II 濃度。平均値±s.e. (各群 n=7~9)。**P<0.01 vs. vehicle 投与(文献 16)。

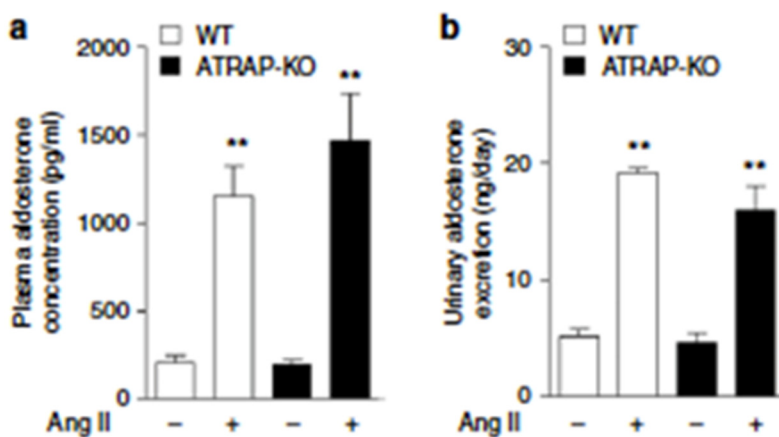


Figure 8. 1型アンジオテンシン II 受容体 (AT1R) 関連蛋白質 (ATRAP) 欠損は、血漿アルドステロン濃度または尿中アルドステロン排泄量に影響を及ぼさない。(a) 14 日間の vehicle または Ang II (2,000 ng/kg/min) 投与後の野生型 (WT) および ATRAP ノックアウト (KO) マウスでの血漿アルドステロン濃度。平均値±s.e. (各群 n=6)。**P<0.01 vs. vehicle 投与。(b) 14 日間の vehicle または Ang II 投与後の WT および ATRAP-KO マウスでの尿中アルドステロン排泄量。平均値±s.e. (各群 n=5~6)。**P<0.01 vs. vehicle 投与(文献 16)。

-KO マウスで同等であり、アルドステロンを長期に投与すると両マウスで同収縮期 BP が同等に上昇した (Figure 9a)。また、腎 α ENaC 蛋白質発現量は、アルドステロン投与の有無にかかわらず WT マウスと ATRAP-KO マウスで差はみられなかった (Figure 9b)。これらの結果は、ATRAP 欠損がアルドステロン非依存性に腎 α ENaC 発現を増強するという考えを裏づけている。

2. 8 ATRAP 欠損において ENaC は慢性的 Ang II 刺激により機能的に活性化され、腎ナトリウム貯留を促進する。

ATRAP-KO マウスにおいて ENaC 活性が腎 α ENaC 発現増強の影響を受けるか否かを検討するため、強力な ENaC 特異的阻害物質であるアミロライドを用いて利尿試験を実施し、ATRAP 欠損が ENaC の機能的な輸送活性に及ぼす影響を評価した。アミロライドの腹腔内投与後の尿中ナトリウム排泄量および尿量は、Ang II 投与 WT マウ

スと比べて Ang II 投与 ATRAP-KO マウスで有意に増加した (Figure 10a, b)。この結果は、ATRAP-KO マウスでは長期 Ang II 刺激により ENaC が機能的に活性化され、腎ナトリウム貯留が増大することを示している。

2. 9 ATRAP 欠損は Ang II 誘導性の血管収縮を亢進する。

ATRAP-KO マウスでの腎 α ENaC 蛋白質発現量は、14 日間の長期 Ang II 投与により WT マウスと比べて有意に増強したものの (Figure 6d)、Ang II 投与開始直後 (day 1) の α ENaC 蛋白質発現量は両マウスで同等であった (Figure 11)。一方、日ごとのナトリウムバランスは、Ang II 投与期間の早期には WT マウスと比べて ATRAP-KO マウスで上昇傾向を示し、それに伴ってラジオテレメトリーで測定した BP も、ATRAP-KO マウスにおいて Ang II 誘導性の上昇傾向を示した (Figures 3, 4)。

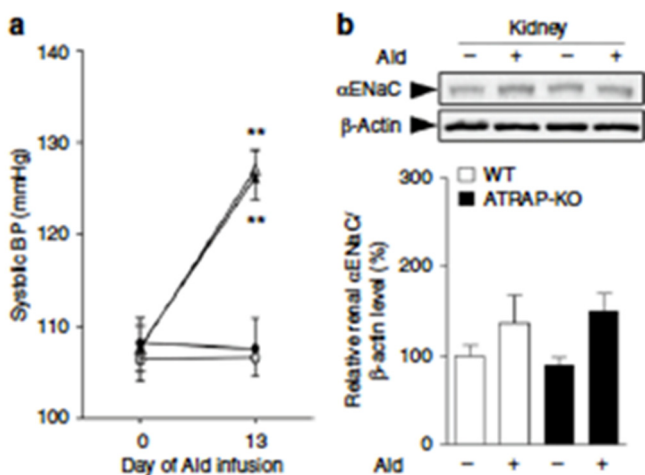


Figure 9. 1 型アンジオテンシン II 受容体(AT1R)関連蛋白質(ATRAP)欠損は、アルドステロン(Ald)による血圧(BP)および上皮型ナトリウムチャンネル α サブユニット(α ENaC)の腎発現の変化に顕著な影響を及ぼさない。

(a) 通常のナトリウム食(0.3%)および1% NaClの飲料水を摂取させた野生型(WT)マウスおよび ATRAP ノックアウト(KO)マウスの収縮期 BP は、14 日間のアルドステロン(50 μ g/kg/日)投与により同等に上昇した。平均値 \pm s.e. (各群 n=5)。* * P<0.01 vs. vehicle 投与。(b) WT マウスおよび ATRAP-KO マウス腎でのアルドステロン投与が α ENaC 蛋白質発現に及ぼす影響。平均値 \pm s.e. (各群 n=5) (文献 16)。

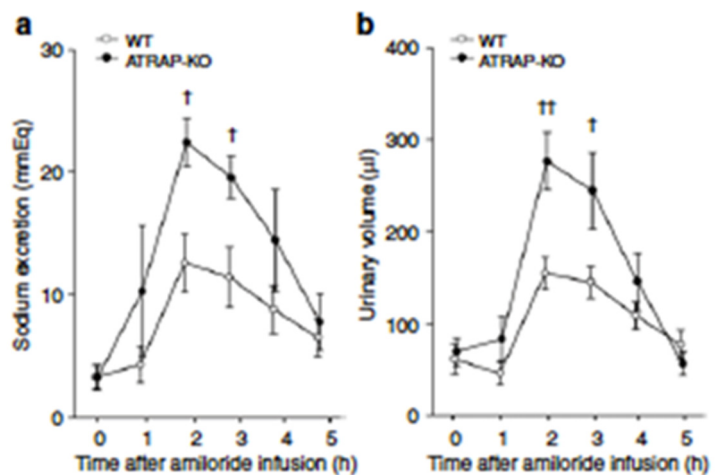


Figure 10. 1 型アンジオテンシン II 受容体(AT1R)関連蛋白質(ATRAP)欠損は、長期アンジオテンシン II(Ang II)投与後のアミロライドによる尿中ナトリウム排泄作用を増強する。

(a) アミロライド(3 mg/kg)投与後の尿中ナトリウム排泄量は、Ang II(2,000 ng/kg/min)投与野生型(WT)マウスと比べて Ang II 投与 ATRAP ノックアウト(KO)マウスで有意に増加した。(b) アミロライド(3 mg/kg)投与後の尿量は、Ang II 投与 WT マウスと比べて Ang II 投与 ATRAP-KO マウスでさらに増加した。平均値 \pm s.e. (各群 n=5~7)。†P<0.05 vs. WT マウス、††P<0.01 vs. WT マウス(文献 16)。

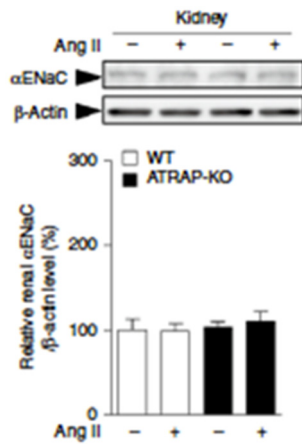


Figure 11. アンジオテンシン (Ang II) 投与開始直後の上皮型ナトリウムチャンネル α サブユニット (α ENaC) 蛋白質の腎発現量は、野生型 (WT) および 1 型アンジオテンシン II 受容体 (AT1R) 関連蛋白質 (ATRAP) ノックアウト (KO) マウスで有意な差がみられない。24 時間の Ang II (2,000 ng/kg/min) 投与が WT マウスおよび ATRAP-KO マウス腎での α ENaC 蛋白質発現に及ぼす影響。平均値 \pm s.e. (各群 n=7~8) (文献 16)。

これらの結果に基づき、ATRAP-KO マウスでの Ang II 投与の初期段階における過度の BP 上昇を引き起こす寄与因子の 1 つとして、Ang II に対する血管反応が亢進されているかどうかを検討するため、Ang II に対する動脈リングの血管収縮反応を評価した。大動脈切片の組織学的解析から、ATRAP-KO マウスの血管では ATRAP 免疫染色が検出されないにもかかわらず、大動脈中膜厚の変化も認められず、同マウスは正常な血管構造を示すことが明らかになった (Figure 12a, b)。しかし、ワイヤーミオグラフを用いた解析から、WT マウスと比べて ATRAP-KO マウスでは、Ang II により血管リングの過度の血管収縮反応が引き起こされることが確認された (Figure 12c, $F=8.583$, $P=0.015$, two-way repeated measures of ANOVA)。このことから、ATRAP-KO マウスでは、Ang II による高血圧増悪の初期段階に、血管収縮の亢進が関与していることが示唆された。

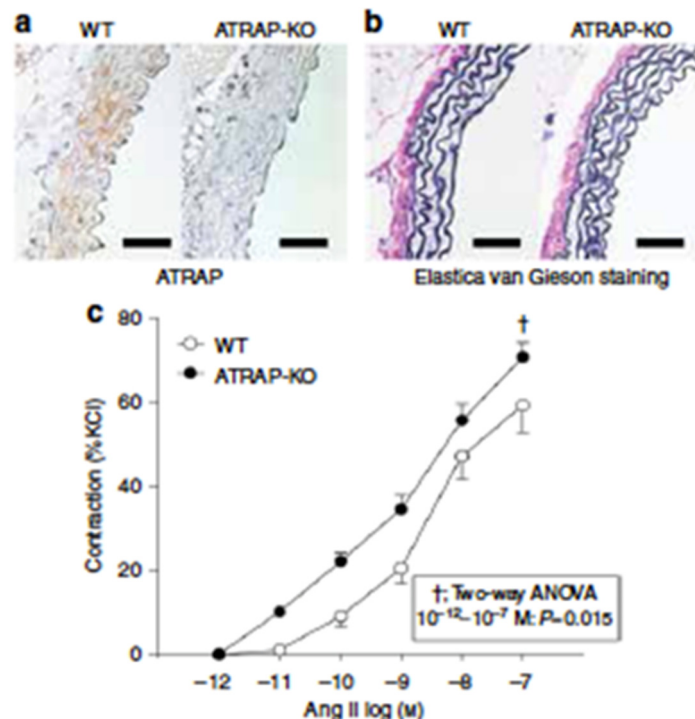


Figure 12. 1 型アンジオテンシン II 受容体 (AT1R) 関連蛋白質 (ATRAP) 欠損は、アンジオテンシン II (Ang II) 誘導性の血管収縮を亢進する。(a) 野生型 (WT) マウスおよび ATRAP ノックアウト (KO) マウスの大動脈切片における ATRAP の免疫組織化学染色像。同切片において ATRAP 免疫染色陽性領域は茶色い点として明確に検出される。スケールバー=50 μ m。原倍率 \times 400。(b) WT マウスおよび ATRAP-KO マウス大動脈切片の典型的なエラスチカ・ワンギーンソン染色像。スケールバー=50 μ m。原倍率 \times 400。(c) ATRAP-KO マウスの血管リングでは、Ang II 誘導性の血管収縮が WT マウスと比べて有意に増強した。Ang II 濃度は 10^{-12} から 10^{-7} mol/L に増加。Ang II に対する血管収縮反応は、カリウム濃縮液 (22 mmol/L NaCl, 120 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L CaCl₂, 6 mmol/L グルコース, 1 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L HEPES, pH 7.4) により誘導された収縮に対する比率 (%) として示す。平均値 \pm s.e. (各群 n=6)。† $P<0.05$ vs. WT マウス (文献 16)。

3. 考察

本研究において通常飼育下におけるベースラインの状態において ATRAP-KO マウスの血圧には有意な変化がみられなかった。しかし、ATRAP-KO マウスでは、WT マウスと比べてナトリウムバランスが上昇しており、それに伴って Ang II 刺激による高血圧が有意に増悪した。Ang II 誘導性の高血圧に関与する機序については、一連の腎交差移植実験を行った過去の研究から、腎内 Ang II-AT1R 系の活性化が Ang II 依存性高血圧およびそれにとまなう臓器霜害の両者において非常に重要であることが示されており本研究結果とも矛盾はないと考えられる。

また、ATRAP-KO マウスでの Ang II による高血圧増悪の開始プロセスのメカニズムに関しては、Ang II 誘導性のナトリウム貯留および BP 上昇は、Ang II 投与の初期段階でも、ATRAP-KO マウスおよび WT マウスで異なる傾向にあったものの、Ang II 投与の day 1 での腎 α ENaC 蛋白質発現量は両マウスで同等であった。これらの結果から、Ang II 投与の初期段階で生じるナトリウムバランス、および BP 上昇の差には糸球体血行動態、糸球体濾過量、血管収縮の変化が関与している可能性が示唆される。実際、WT マウスと比べて ATRAP-KO マウスの血管リングでは、Ang II によってより過度の血管収縮反応が誘導された。ATRAP 欠損による Ang II 誘導性の血管収縮の亢進は、Ang II による高血圧増悪を引き起こす機序(特に開始プロセスにおける)の1つと考えられる。

以上、上記の本研究の結果から、腎尿細管 AT1R の病的活性化は、慢性的 Ang II 刺激に反応したものであり、これは ATRAP 欠損により亢進され、遠位尿細管での ENaC の活性化が直接増強される。そしてアルドステロン非依存性にナトリウム貯留が促進され、Ang II による高血圧増悪がもたらされることが示唆された。

4. 今後の課題

本研究では全身性の ATRAP-KO マウスを用いており、ネフロンセグメント特異的な ATRAP の影響については検討がなされておらず今後の検討課題である。また、ENaC 以外のナトリウム輸送体との相互作用の可能性を含め、*in vivo* での ATRAP のネフロンセグメント特異的な機能的役割を解明する研究も今後行っていくことが重要である。今後はさらに種々の慢性腎臓病病態での腎障害や血圧異

常(高血圧)における ATRAP の病態生理学的意義について検討を展開して行く予定である¹⁻¹⁷⁾。

5. 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 I 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.
- 13) Maeda A, Tamura K, Wakui H, Dejima T, Ohsawa M, Azushima K, Kanaoka T, Uneda K, Matsuda M, Yamashita A, Miyazaki N, Yatsu K, Hirawa N, Toya Y, Umemura S. Angiotensin receptor-binding protein ATRAP/Agtrap inhibits metabolic dysfunction with visceral obesity. **J Am Heart Assoc**, 2: e000312, 2013.
- 14) Wakui H, Tamura K, Masuda S, Tsurumi-Ikeya Y, Fujita M, Maeda A, Ohsawa M, Azushima K, Uneda K, Matsuda M, Kitamura K, Uchida S, Toya Y, Kobori H, Nagahama K, Yamashita A, Umemura S. Enhanced angiotensin receptor-associated protein in renal tubule suppresses angiotensin-dependent hypertension. **Hypertension**, 61: 1203-1210, 2013.
- 15) Tamura K, Wakui H, Maeda A, Dejima T, Ohsawa M, Azushima K, Kanaoka T, Haku S, Uneda K, Masuda S, Azuma K, Shigenaga A, Koide Y, Tsurumi-Ikeya Y, Matsuda M, Toya Y, Tokita Y, Yamashita A, Umemura S. The physiology and pathophysiology of a novel angiotensin receptor-binding protein ATRAP/Agtrap. **Curr Pharm Des**, 19: 3043-3048, 2013.
- 16) Ohsawa M, Tamura K, Wakui H, Maeda A, Dejima T, Kanaoka T, Azushima K, Uneda K, Tsurumi-Ikeya Y, Kobayashi R, Matsuda M, Uchida S, Toya Y, Kobori H, Nishiyama A, Yamashita A, Ishikawa Y, Umemura S. Deletion of the angiotensin II type 1 receptor-associated protein enhances renal sodium reabsorption and exacerbates angiotensin II-mediated hypertension. **Kidney Int**, 86: 570-581, 2014.
- 17) Wakui H, Uneda K, Tamura K, Ohsawa M, Azushima K, Kobayashi R, Ohki K, Dejima T, Kanaoka T, Tsurumi-Ikeya Y, Matsuda M, Haruhara K, Nishiyama A, Yabana M, Fujikawa T, Yamashita A, Umemura S. Renal tubule angiotensin II type 1 receptor-associated protein promotes natriuresis and inhibits salt-sensitive blood pressure elevation. **J Am Heart Assoc**, 4: e001594, 2015.

Development of New Therapeutic Strategy by Receptor Binding Molecule-Mediated Regulation of Chronic Kidney Disease

Kouichi TAMURA, Ryu KOBAYASHI, Kazushi UNEDA, Kengo AZUSHIMA, Masato OHSAWA,
Hiromichi WAKUI

Yokohama City University Graduate School of Medicine

Summary

Angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-associated protein (ATRAP) promotes AT1R internalization along with suppression of pathological activation of tissue AT1R signaling. However, the functional significance of ATRAP in renal sodium handling and blood pressure regulation under pathological stimuli is not fully resolved. Here we show the blood pressure of mice with a gene-targeted disruption of ATRAP was comparable to that of wild-type mice at baseline. However, in ATRAP-knockout mice, angiotensin II-induced hypertension was exacerbated and the extent of positive sodium balance was increased by angiotensin II. Renal expression of the sodium-proton antiporter 3, a major sodium transporter in the proximal tubules, urinary pH, renal angiotensinogen production, and angiotensin II content was unaffected. Stimulation of the renal expression and activity of the epithelial sodium channel (ENaC), a major sodium transporter in the distal tubules, was significantly enhanced by chronic angiotensin II infusion. The circulating and urinary aldosterone levels were comparable. The blood pressure response and renal ENaC expression by aldosterone were not affected. Thus, ATRAP deficiency exacerbated angiotensin II-mediated hypertension by pathological activation of renal tubular AT1R by angiotensin II. This directly stimulates ENaC in the distal tubules and enhances sodium retention in an aldosterone-independent manner.