
助成研究報告書

医学プロジェクト研究

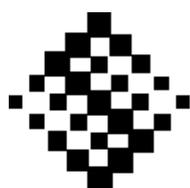
(2018 - 2020年度)

食塩バランスと生体機能

Salt Balance and Body Function

The Salt Science Research Foundation
Project Research Report

2022年3月



公益財団法人
ソルト・サイエンス研究財団

プロジェクト研究報告書 目次

医学分野

18C-20C 食塩バランスと生体機能

1	まえがき 菱田 明 (浜松医科大学)	1
2	腎腸連関による細胞間タイト結合を介した新たな食塩バランス制御機構の解明 (18C1 - 20C1) 五十里 彰 (岐阜薬科大学)	3
3	味蕾におけるアミロライド感受性塩味センサーメカニズムの解明 (18C2 - 20C2) 樽野 陽幸 (京都府立医科大学)	23
4	慢性腎臓病における ENaC の不適切な活性化が食塩感受性高血圧, 血圧日内リズム変化に及ぼす影響 (18C3 - 20C3) 柿添 豊 (熊本大学)	37
5	受容体結合蛋白による腎尿細管特異的な2つの作用を介した食塩感受性高血圧と腎性老化の克服戦略研究 (18C4 - 20C4) 田村 功一 (横浜市立大学)	53
6	食塩バランス異常によって生じるサルコペニアの機序解明 (18C5 - 20C5) 西山 成 (香川大学)	69

CONTENTS

PROJECT RESEARCHES OF MEDICAL SCIENCE

18C-20C Salt Balance and Body Function

1	Foreword	
	Akira Hishida (Hamamatsu University School of Medicine)	2
2	Clarification of Regulatory Mechanism of Salt Balance through Intercellular Tight Junction by Kidney-Gut Interaction (18C1 - 20C1)	
	Akira Ikari (Gifu Pharmaceutical University)	22
3	Amiloride-Sensitive Salt-Sensing Mechanism in Taste Buds (18C2 - 20C2)	
	Akiyuki Taruno (Kyoto Prefectural University of Medicine)	36
4	The Effect of Aberrant ENaC Activation on Salt-Sensitive Hypertension and Blood Pressure Circadian Rhythm in Chronic Kidney Disease - (18C3 - 20C3)	
	Yutaka Kakizoe (Kumamoto University)	52
5	Therapeutic Strategy against Salt Hypertension and Renal Aging via Novel Dual Actions of Receptor-binding Molecule (18C4 - 20C4)	
	Kouichi Tamura (Yokohama City University)	67
6	Mechanism of Sarcopenia Induced by Inappropriate Sodium Intake (18C5 - 20C5)	
	Akira Nishiyama (Kagawa University)	83

まえがき

菱田 明

プロジェクトリーダー

浜松医科大学名誉教授

体内食塩の過剰が高血圧や心不全の発症・増悪に関係し、その欠乏が脱水による生命の危険を招くことは古くから知られている。高齢化社会を迎え、高血圧や心不全が健康寿命延伸の大きな障害となる一方、高齢者での食塩摂取の欠乏による脱水の危険も大きくなっている。

こうした中、食塩バランスに影響する「塩味センサーによる塩味の感受機構」、「消化管や腎臓での食塩吸収・排泄の調節機構」についての研究は、適正な食塩バランスの維持に重要な課題となっている。また、「食塩バランスと高血圧やサルコペニアの発症との関係」など、食塩バランスの異常が健康障害に与える影響についての研究の重要性が高まっている。

ソルト・サイエンス研究財団は、2018~2020 年度の医学分野プロジェクト研究として「食塩バランスと生体機能」を取り上げ、「新しい食塩バランスの調節機構」と「食塩バランスが臓器機能に与える影響」という二つのサブテーマのもと5 課題を採択し、研究助成を行った。

三年間の研究によって、いくつかの重要な発見が行わ

れた。「細胞間接着因子のクローデインの調節を介して、大腸や腎集合管の細胞間隙を介する食塩輸送が制御されていること」(五十里)、「味蕾の塩味細胞において、ENaC を介した Na^+ 流入が CALHM1/3 チャネルシナプスを活性化させて塩味の神経伝達に関わること」(樽野)、「慢性腎臓病において蛋白尿とともに増加する尿中セリンプロテアーゼが ENaC の活性化を介して食塩感受性高血圧に関与すること」(柿添)、「近位尿細管の ATRAP(1 型アンジオテンシン II 受容体結合因子)がナトリウム再吸収には関与しないこと」(田村)、「慢性腎臓病では肝臓での浸透圧物質産生に対して骨格筋から内因性のエネルギーと窒素が動員される結果、サルコペニアにつながる可能性があること」(西山)などが明らかにされた。

これらの新しい重要な発見は、「食塩バランス異常」への新しい介入方法の開発、食塩摂取の過不足による生体への悪影響を克服する方法の開発に繋がるであろう。

今回の研究成果が「食塩との新たな付き合い方」に役立つことを期待したい。

Foreword

Akira Hishida

Project Leader

Emeritus Professor, Hamamatsu University School of Medicine

Summary

It has long been known that excess salt in the body is associated with the onset of hypertension and heart failure, and that salt deficiency causes a risk of dehydration. In the aging society, both the salt excess and salt deficiency are the major risks to healthy life.

Understanding the mechanisms of the perception of sodium taste, and the regulation of salt absorption and excretion in the digestive tract and kidney, which affect salt balance, is an important issue for maintaining an appropriate salt balance. In addition, understanding the effects of abnormal salt balance on health disorders, such as high blood pressure and sarcopenia, is also today's key issue.

The Salt Science Research Foundation took up "Salt balance and biological function" as the theme of project research in the medical field from fiscal year 2018 to 2020, and adopted five subjects under two sub-themes, "New regulatory mechanisms of salt balance" and "Effects of salt balance on organ function".

Regarding the new regulatory mechanisms of salt balance, "Clarification of regulatory mechanism of salt balance through intercellular tight junction by kidney-gut interaction" and "Amiloride-sensitive salt-sensing mechanism in taste buds" were adopted. Regarding the effects of salt balance on organ function, three research plans were adopted: "The effect of aberrant ENaC activation on salt-sensitive hypertension and blood pressure circadian rhythm in chronic kidney disease", "Therapeutic strategy against salt hypertension and renal aging via novel dual actions of receptor-binding molecule" and "Mechanism of sarcopenia induced by inappropriate sodium intake".

Many new and important discoveries have been made in this project research. Ikari A. revealed that salt transport in the large intestine and renal collective tubes is controlled through the regulation of claudine, an intercellular adhesion factor. Taruno A. showed that the entry of Na^+ induces depolarization for action potential discharge driving voltage-dependent neurotransmitter release via the CALHM1/3-dependent channel in a subpopulation of taste cells. Kakizoe Y. found that urinary extracellular serine proteases which increase with proteinuria in chronic kidney disease, are involved in salt-sensitive hypertension through activation of ENaC. Tamura K. demonstrated that ATRAP (type1 angiotensin II receptor binding factor) in the proximal tubules is not involved in the Ang II-mediated hypertension. Nishiyama A. found that chronic kidney disease may lead to sarcopenia as a result of increased use of energy and nitrogen in skeletal muscle for osmotic substance production in the liver.

腎腸連関による細胞間タイト結合を介した新たな食塩バランス制御機構の解明

五十里 彰¹, 林 久由², 田淵 圭章³, 安西 尚彦⁴, 長谷川 元⁵

¹岐阜薬科大学薬学部, ²静岡県立大学食品栄養科学部,
³富山大学生命科学先端研究センター, ⁴千葉大学医学部, ⁵埼玉医科大学医学部

概要

体内のナトリウムや塩素などの電解質濃度は、腸管における吸収と腎臓における再吸収機構によって調節される。これまでにイオンチャネルやトランスポーターを介した電解質吸収機構がよく検討されてきたが、細胞間を介した吸収機構は不明な点が多い。近年、上皮細胞間の接着を担うクローディンが、電解質の吸収や体液漏出の抑制に寄与することが明らかになってきた。

血圧や循環血流量の低下により、腎臓のレニン・アンジオテンシン(ANG)・アルドステロン(ALD)系(RAA系)が活性化され、食塩濃度を改善するように種々のイオンチャネルやトランスポーターの機能および発現量が変化する。低食塩食で飼育したマウスを用いてクローディンの発現を調べ、結腸クリプトの下部でクローディン-2が、上部でクローディン-7の発現量が増加することを発見した。ALD処理により、ミネラルコルチコイド受容体の核移行を介してクローディン-2の発現量が増加した。一方、クローディン-7の発現はALDによって変化しなかったが、ANGIIがNF- κ Bの活性化を介してクローディン-7の発現量を増加させた。機能解析などの結果から、ALDはクローディン-2の発現増加を介してナトリウムイオンの分泌を阻害、ANGIIはクローディン-7の発現増加を介して塩素イオンの吸収を促進することが推察された。また、クローディン-2とクローディン-7のクリプトにおける発現は、p53・HNF4a複合体によってそれぞれ逆方向に制御されることが示唆された。

上皮膜を介するイオン輸送は、細胞膜上に発現するトランスポーターとクローディンによって制御されることが推察されるため、両者の発現連関を検討した。ALDによりNa⁺/H⁺-交換体2(NHE2)とNHE3 mRNA量が低下し、この効果はクローディン-2のノックダウンにより阻害された。また、クローディン-2の過剰発現により、NHE2/3 mRNA量が低下した。一方、上皮型ナトリウムチャネルのENaC mRNA量は有意に変化しなかった。これらの結果から、NHE2/3の発現がクローディン-2の発現変化を介して調節されることが示唆された。

腎尿細管におけるクローディンの発現と低食塩食の関係を調べたところ、集合管のクローディン-3発現量が増加し、クローディン-8発現量が低下した。マウス集合管由来mIMCD-3細胞をALD処理したところ、クローディン-3 mRNA量が増加した。また、ALD処理によってナトリウムイオンの輸送比が低下し、この効果はミネラルコルチコイド受容体拮抗薬のスピロノラクトンの共処理やクローディン-3のノックダウンにより阻害された。以上の結果から、ALDはクローディン-3発現の増加を介してナトリウムイオンの逆輸送(分泌)を阻害し、上皮膜を介した食塩再吸収を促進することが示唆された。

本研究により、大腸のクローディン-2、-7や集合管のクローディン-3、-8の発現がRAA系によって制御されることが明らかになった。さらに、大腸のNHE2/3の発現はクローディン-2によって負に制御されており、クローディンと細胞膜上のイオントランスポーターの発現が連動して変化することが見出され、クローディンとトランスポーターが協働的に食塩輸送の制御に関わることが示唆された。

1. 研究目的

生体内のナトリウムや塩素などの電解質濃度は、腸管における吸収と腎臓における再吸収機構によって調節される。これまでに、イオンチャネルやトランスポーターを介した電解質吸収機構がよく検討されてきたが、細胞間を介した吸収機構は不明な点が多い。近年、上皮細胞間の接着を担うタイトジャンクションは、イオン選択的なポアまたはバリアを形成することが明らかになってきた⁽¹⁾。タイトジャンクションには 27 種類のサブタイプからなるクローディンが発現し、これらのサブタイプの組み合わせの違いによってイオン選択性が変化する。そのため、クローディンは生体内食塩濃度のホメオスタシスに重要な役割を果たすと推察されるが、その発現制御機構は大部分が不明である。

血圧低下や腎臓の循環血液量の低下に伴って、レニン・アンジオテンシン (ANG)・アルドステロン (ALD) 系 (RAA 系) が活性化される。ALD は結腸における上皮型ナトリウムチャネル (ENaC) の発現量を増加させ、起電性ナトリウム吸収を増大させる⁽²⁾。一方、クローディンの発現と機能に対する RAA 系の影響はほとんど解析が進んでいない。近年我々は低食塩食で飼育したマウスを用いて、結腸におけるクローディン-2 とクローディン-7 の発現量が増加することを発見した⁽³⁾。正常マウス結腸由来の MCE301 細胞において、クローディン-2 の発現が ALD によって調節されることが明らかになった。しかし、クローディン-7 の発現は ALD によって変化しなかったため、他因子の関与が示唆されたが、その分子メカニズムは不明である。さらに、他のイオントランスポーターとの機能協働を含め、食塩吸収の制御におけるクローディン-7 の役割は未解明である。

腎臓の糸球体でろ過された電解質は、尿細管上皮細胞の経細胞または傍細胞輸送機構を介して再吸収される。ろ過されたナトリウムのうち、近位尿細管、ヘンレの太い上行脚、遠位曲尿細管でそれぞれ 65%、25%、5% が再吸収され、最後に約 5% が集合管の主細胞に発現する ENaC と Na^+/K^+ -ATPase を介して再吸収される。ALD は ENaC の発現や細胞膜上での分布量の増加を介して、ナトリウム再吸収を促進する⁽⁴⁾。ALD は集合管におけるクローディン-4 の細胞局在を変化させ、タイトジャンクションを介した塩素イオン透過性を低下させることが報告されている⁽⁵⁾。しかし、RAA 系と他のクローディンサブタイプの発現との関係は

不明である。

本研究では、食塩バランスの調節における結腸と腎尿細管のクローディンの役割を解明するため、下記の 3 つの課題に取り組んだ。

1. 結腸における RAA 系によるクローディン-2/7 の発現調節機構と機能の解明
2. 結腸におけるクローディン-2/7 とイオントランスポーターの発現連関の解明
3. 集合管における RAA 系によるクローディンの発現調節機構と機能の解明

2. 研究方法

2. 1. 動物実験

C57BL/6J Jcl マウス (雄, 6 週齢, 日本クレア) を通常食 (0.25% Na^+ , 0.75% K^+) と低食塩食 (0% Na^+ , 0.75% K^+) で 10 日間飼育後、結腸を摘出した。液体窒素で凍結後、組織を 10 mm 間隔で薄切し、上部、中部、下部に分画した。なお、動物実験は、静岡県立大学動物実験委員会にて承認後、静岡県立大学動物実験規定に基づいて実施された。分画したサンプルから RNA を抽出後、ReverTra Ace (東洋紡) を用いて cDNA を調製した。また、サンプルを 2 x Laemmli sample buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 10% β -mercaptoethanol, 0.004% bromophenol blue) に溶解し、ウエスタンブロット解析に供した。

2. 2. 細胞培養とトランスフェクション

マウス結腸由来 MCE301 細胞を、DMEM 培地 (5% ウシ血清含) で培養した。3~4 日毎に 0.25% トリプシン溶液を用いて継代した。2 x 10⁵ 個の細胞を 35 mm dish に播種してから 24 時間後に、HilyMax (同仁化学研究所) を用いてプラスミド DNA をトランスフェクションした。なお、マウスクローディン-7 レポーターベクターは、池ノ内順一教授 (九州大学) にご供与いただいた。

2. 3. 細胞ライセートの調製

細胞を PBS で 2 回洗浄後、セルスクレーパーで掻き集めてマイクロチューブに移し、5,000 rpm, 4°C で 2 分間遠心した。上清を除去後、lysis buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% SDS) で懸濁し、20 秒間のソニケーションにより細胞膜を破壊した。その後、8,000 rpm で 5 分間遠心して得られた上清画分を細胞ライセートとして使用した。

2. 4. SDS-PAGE とウエスタンブロット

10%, 12.5%または 15%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。セミドライ方式でゲルから PVDF 膜へタンパク質を転写後、一次抗体(1,000 倍希釈)で一晩インキュベートした。ブロッキングには 2%スキムミルクを使用した。一次抗体を洗浄後、二次抗体(3,000 倍希釈)を室温で 1.5 時間インキュベートした。バンドの検出には、EzWestLumi plus (アトー) および C-DiGit Blot Scanner(LI-COR)を使用した。

2. 5. リアルタイム PCR

細胞を PBS で 2 回洗浄後、TRI Reagent(Molecular Research Center)で溶解してマイクロチューブに回収した。プロトコールに従って total RNA を調製した。ReverTra Ace を用いて cDNA を調製後、THUNDERBIRD qPCR Mix(東洋紡)を用いてリアルタイム PCR を行った。なお、リアルタイム PCR の解析には、リアルタイム PCR Eco(アズワン)を使用した。

2. 6. 蛍光免疫染色

クライオスタットを用いて、凍結組織切片(10 mm)を調製した。切片をカバーガラスにのせ、乾燥させた。氷冷した 95%エタノールでインキュベート後、5%スキムミルクでブロッキングした。その後、一次抗体(100 倍希釈)と Alexa Fluor 488 標識二次抗体(1,000 倍希釈)を室温で 1 時間インキュベートした。培養細胞の蛍光免疫染色では、細胞をカバーガラス上に培養し、メタノールで固定した。0.2% Triton X-100 で膜の透過処理を行い、4%ブロックエースでブロッキングした。各種一次抗体(100 倍希釈)を一晩インキュベート後、Alexa Fluor 488 標識二次抗体(100 倍希釈)を室温で 1.5 時間インキュベートした。LSM700 共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss)を用いて、標的タンパク質の細胞局在を調べた。

2. 7. 細胞間透過性の解析

細胞間を介したイオンおよび非電解質の透過性を評価するため、細胞をトランスウェル上に培養した。Millicell ERS volt-ohm meter(Millipore)を用いて、上皮膜間電気抵抗値(TER)を測定した。TER は細胞間イオン透過性の指標であり、イオン透過性が増加すると TER が低下する。非電解質化合物として、ルシファーイエロー(LY)と FITC 標識デキストラン(4 kDa:

FD4; 20 kDa: FD20)を使用した。非電解質化合物をトランスウェルの上層に添加し、1 時間後に下層溶液を回収した。Infinite F200Pro 蛍光マイクロプレートリーダー(テカン)で蛍光強度を測定し、細胞間分子透過性を算出した。クローデインのイオン選択性を評価するため、ユッシングチャンバーにトランスウェルを設置し、希釈電位法で膜間電位、ナトリウムイオン透過性、塩素イオン透過性を解析した。

2. 8. 細胞内 pH の測定

細胞を 24 ウェルプレートで培養後、pH 感受性色素の pHrodo Red を 37°C で 30 分間負荷した。プレートを Infinite F200Pro に設置し、560 nm の励起波長と 585 nm の蛍光波長で、蛍光強度を測定した。細胞外溶液の塩化ナトリウムを塩化アンモニウムに置換した溶液またはテトラメチルアンモニウムに置換した溶液で、蛍光強度の変化を確認した。塩化ナトリウムを含む溶液に置換後、10 秒毎に蛍光強度を測定し、傾きを算出した。

3. 研究結果

3. 1. 結腸におけるクローデイン-7 の発現に対する低食塩食と ANGII の影響

通常食または低食塩食で 10 日間飼育したマウスから結腸を摘出後、タンパク質を抽出した。ウエスタンブロット法でクローデイン-7 の発現量を比較したところ、以前に報告したように低食塩食飼育マウスでクローデイン-7 の発現量が増加した(Fig. 1)。低食塩食飼育マウスで血清中の ANGII と ALD 濃度が増加していたため、クローデイン-7 の発現に対する効果を検討した。マウス結腸由来の MCE301 細胞に ANGI や ALD を処理したところ、クローデイン-7 の発現量は有意に変化しなかったが、ANGII 処理によって増加した(Fig. 2)。ANGII の効果は濃度依存的であった。ANGII によるクローデイン-7 発現の増加は、ANG タイプ 1 受容体(AT1)アンタゴニストであるロサルタンの共処理によって阻害されたが、タイプ 2 受容体(AT2)アンタゴニストである PD123319 は阻害効果を示さなかった。以上の結果から、ANGII はタイプ 1 受容体に作用し、結腸におけるクローデイン-7 の発現量を増加させると示唆された。

3. 2. 内在性細胞間接着タンパク質の発現に対する ANGII の効果

クローディン-7 に対する ANGII の選択性を明らかにするため、タイトジャンクション構成因子の mRNA 発現量を解析した。ウエスタンブロットの結果と同様に、ANGII によってクローディン-7 mRNA 量が増加し、この効果はロサルタンの共処理によって阻害された。一方、結腸での内在的な発現が推察されるクローディン-1, -2, -4, オクルディン, ZO-1 の mRNA 量は、ANGII によって有意に変化しなかった。以上の結果から、ANGII の作用はクローディン-7 に対する選択性が高いことが示唆された。

3. 3. ANG 受容体の発現

マウスの結腸および MCE301 細胞の抽出液を用いて AT1 と AT2 の発現を調べたところ、マウスの結腸に AT1 のバンドが観察されたが、MCE301 細胞ではバンドが見えなかった。一方、AT2 のバンドはマウス結腸と MCE301 細胞の両方で観察された。蛍光免疫染色法で受容体の細胞局在を検討したところ、AT1 は細胞膜、細胞質、核に広く分布していた。一方、AT2 はドット状で細胞質に分布していた。ウエスタンブロット法と蛍光免疫染色法における AT1 の発現の違いは、抗体の特性に起因すると示唆される。

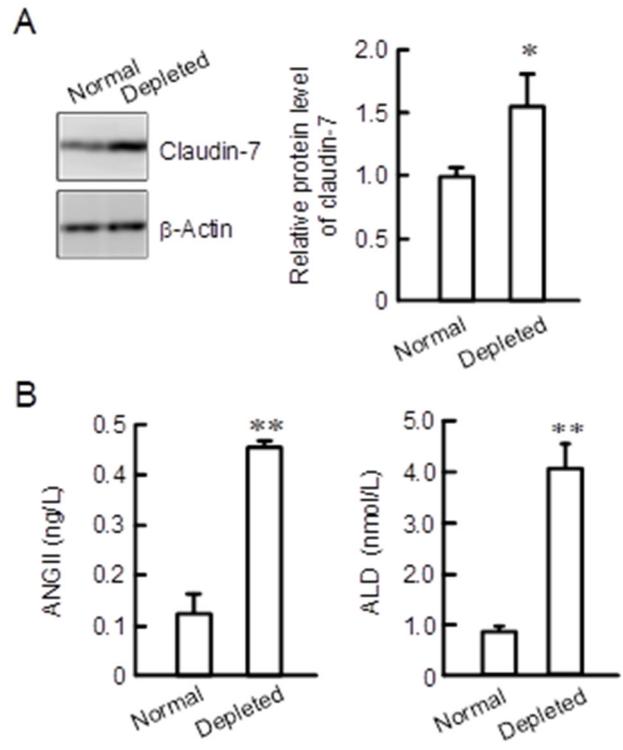


Fig. 1 Effect of NaCl-depleted diets on colonic claudin-7 expression and serum RAA concentration.

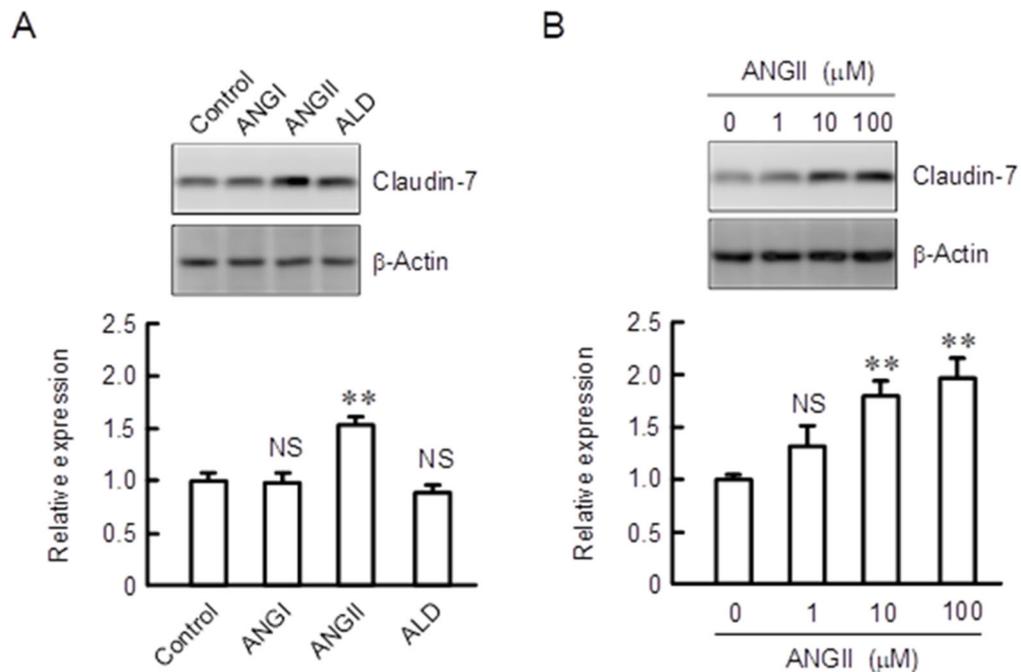


Fig. 2 Effects of ANG, ALD, and inhibitors on claudin-7 expression in MCE301 cells.

3. 4. クローディン-7 の細胞局在に対する ANGII の効果

蛍光免疫染色法でクローディン-7 とクローディン-2 の細胞局在を調べた。コントロール細胞では、細胞間接着部位にクローディン-7 の弱い蛍光が観察された (**Fig. 3**)。ANGII によってクローディン-7 の蛍光強度が強くなり、ZO-1 と共局在した。このクローディン-7 の蛍光強度の増大は、ロサルタンの共処理によって阻害されたが、PD123319 によって阻害されなかった。一方、クローディン-2 の蛍光強度は ANGII によって増加しなかったが、過去の報告のように ALD によって増加した。以上の結果から、ANGII によって発現が増加したクローディン-7 は、主にタイトジャンクションに分布することが示唆された。

3. 5. 細胞間透過性に対する ANGII の効果

ANGII によって、タイトジャンクションにおけるクローディン-7 の分布量が増加したため、細胞間透過性に対する ANGII の効果を検討した。ANGII は TER を低下させ、この効果はロサルタンの共処理によって阻害されたが、PD123319 によって阻害されなかった (**Fig. 4A**)。これらの結果は、リアルタイム PCR やウエスタンブロットの結果と一致する。一方、FD4 の透過性は、ANGII や受容体アンタ

ゴニストの処理によって変化しなかった。希釈電位法を用いてクローディン-7 の機能解析を行った。ANGII 処理により、希釈電位の変化が増大し、塩素イオン/ナトリウムイオン透過比が増大した (**Fig. 4B**)。これらの効果はロサルタンの共処理によって阻害された。以上の結果から、ANGII 処理によって発現増加したクローディン-7 が、塩素イオン透過性を亢進させることが示唆された。

3. 6. 細胞内シグナル伝達因子の解析

AT1 受容体の下流のシグナル伝達因子を解明するため、ERK, p38, NF-kB p65 のリン酸化に対する ANGII の効果を検討した。ANGII によって NF-kB p65 のリン酸化量が増加したが、ERK や p38 のリン酸化量は変化しなかった。コントロール細胞で NF-kB p65 は主に細胞質に分布したが、ANGII 処理細胞では主に核内に分布した。この NF-kB p65 の核移行はロサルタンの共処理によって阻害されたが、PD123319 によって阻害されなかった。また、ANGII によるクローディン-7 の発現増加は、NF-kB 阻害剤である BAY 11-7082 の共処理によって阻害された。以上の結果から、ANGII によるクローディン-7 の発現増加に、NF-kB が関与すると示唆された。

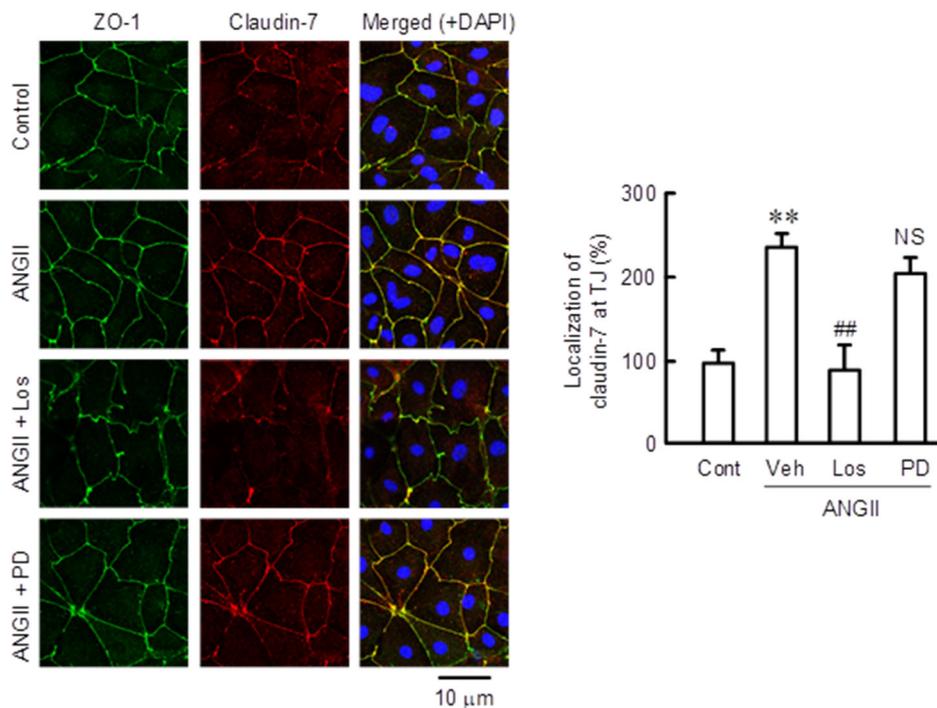


Fig. 3 Effects of ANGII and inhibitors on the cell localization of claudin-7 in MCE301 cells.

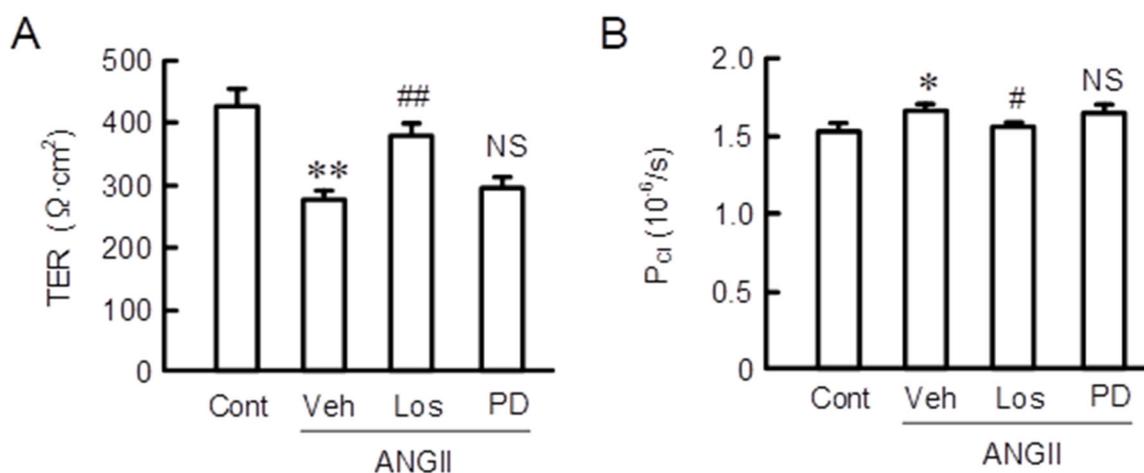


Fig. 4 Effects of ANGII and inhibitors on paracellular permeability.

3. 7. クローディン-7の転写調節におけるNF-kBの関与

クローディン-7のプロモーター活性は、ANGIIによって増加し、この効果はロサルタンやBAY 11-7082の共処理によって有意に阻害された(**Fig. 5**)。また、NF-kB p65の結合が予想されるkB結合モチーフに変異を導入したところ、ANGIIによるプロモーター活性の増加が抑制された。以上の結果から、NF-kB p65がクローディン-7のプロモーターに作用することが推察されたため、クロマチン免疫沈

降法で検証実験を行った。その結果、ANGIIによってクローディン-7のプロモーターに対するNF-kB p65の結合量が増加し、この効果はロサルタンやBAY 11-7082の共処理によって有意に阻害された。以上の結果から、ANGIIによってリン酸化されたNF-kBは、クローディン-7のプロモーター領域に結合し、転写活性を亢進させることが示唆された。

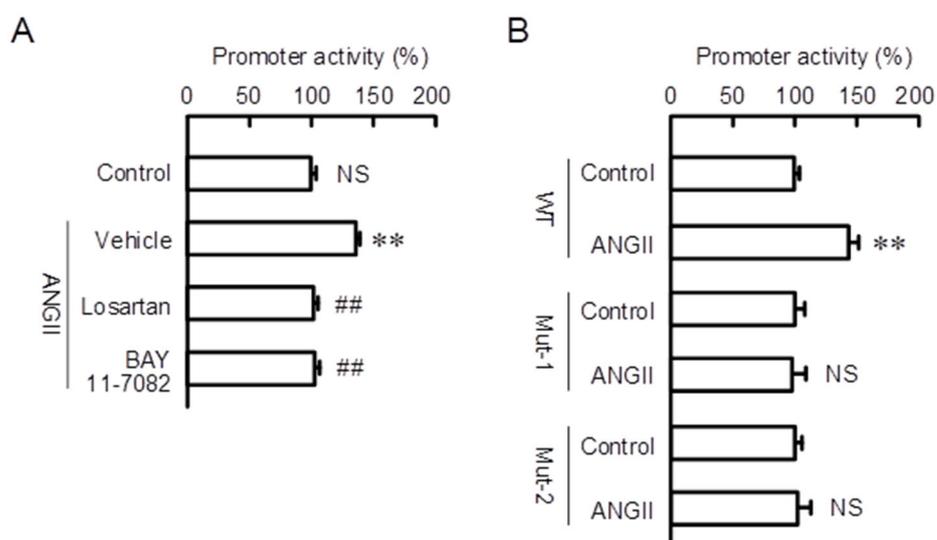


Fig. 5 Effects of ANGII and inhibitors on the promoter activity of claudin-7.

3. 8. 結腸クリプトにおけるクローデインの分布

免疫蛍光染色法でマウス結腸のクリプトにおけるクローデイン-2 とクローデイン-7 の分布を調べたところ、クローデイン-2 はクリプトの下部、クローデイン-7 は上部に多く分布していた。遺伝子レベルでの発現量を比較するため、クリプトの上部、中部、下部に分離後、リアルタイム PCR 法により各部位におけるクローデイン mRNA 量を測定した。下部から上部にかけて、クローデイン-7 の発現量が増加し、反対にクローデイン-2 の発現量が減少した (Fig. 6)。低食塩食で飼育したマウスでは、クリプト上部におけるクローデイン-7 の発現量が増加傾向にあり、下部におけるクローデイン-2 の発現量が低下傾向にあった。これらの結果は、免疫蛍光染色法の結果と一致する。

3. 9. MCE301 細胞の培養日数とクローデイン発現の関係

腸管細胞はクリプト下部で発生し、分化して上部へと移動し、先端から脱落する⁽⁶⁾。そのため、クローデインの発現変化が腸管上皮細胞の成長に関連すると推察される。この仮説を証明するため、3, 7, 14, 21, 28 日間培養した MCE301 細胞を用いて、クローデインの発現量を比較した。7 日目にクローデイン-2 の発現量が一過性に増加したのに対し、クローデイン-7 の発現量は 21 日目まで緩やかに増加した (Fig. 7)。これまでに大腸クリプトにおけるクローデイン-7 の発現が、HNF4a によって調節されることが報告されている⁽⁷⁾。また、細胞の分化と p53 の発現が相関することが報告されているため⁽⁸⁾、p53 の活性化による分化誘導作用をもつ tenovin-1 の効果を検討した。蛍光免疫染色法でこれらの調節因子の発現と細胞局在を調べたところ、

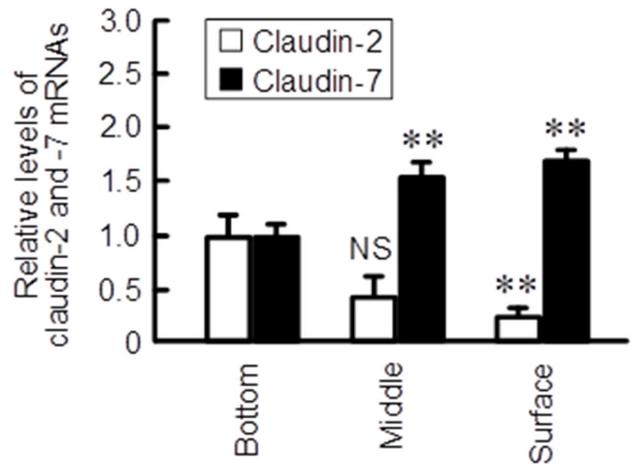


Fig. 6 Localization of claudin-2 and -7 expression in the crypt of mouse colon.

7 日目よりも 21 日目に核内における HNF4a と p53 の分布量が増加した (Fig. 8)。また、tenovin-1 処理により、核内における HNF4a と p53 の分布量が増加した。次に免疫沈降法を用いて、HNF4a と p53 の会合を検討した。抗 p53 抗体または抗 HNF4a 抗体で免疫沈降後、それぞれ抗 HNF4a 抗体または抗 p53 抗体でブロットしたところ、tenovin-1 処理細胞におけるバンドが強くなった。また、ウサギ IgG で免疫沈降したところ、p53 と HNF4a のバンドが検出されなかったため、非特異的な吸着ではないことが証明された。以上の結果から、分化が進行した細胞では p53 と HNF4a の発現量が増加し、両者が会合して核内に分布することが示唆された。

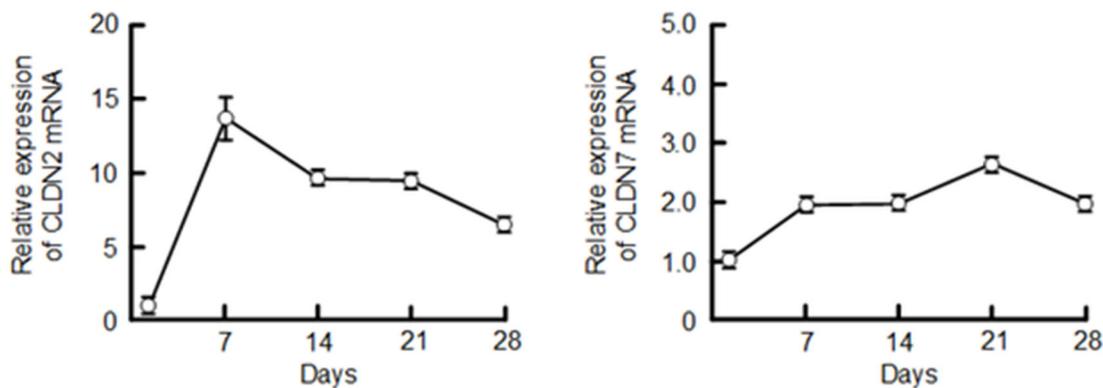


Fig. 7 Effects of culture days on claudin expression.

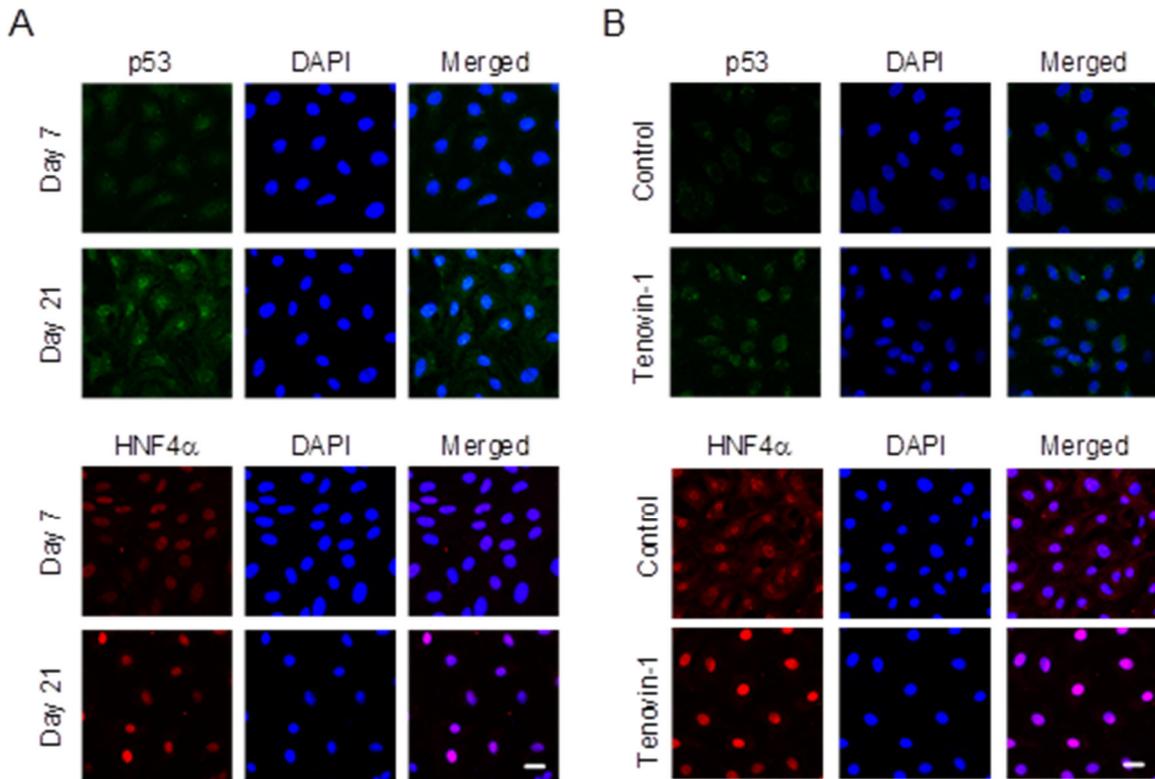


Fig. 8 Effects of culture days and tenovin-1 on the localization of p53 and HNF4 α .

3. 10. クローデインの転写活性に対する tenovin-1 の効果

クローデインの mRNA 発現に対する tenovin-1 の効果を検討したところ、クローデイン-2 の発現量が低下し、クローデイン-7 の発現量が増加した (**Fig. 9**)。この結果は、ウェスタンブロットの結果と一致する。クローデイン-2 またはクローデイン-7 のプロモーター領域を組み込んだレポーターベクターを用いて転写活性を調べたところ、tenovin-1 処理によってクローデイン-2 の転写活性が低下し、クローデイン-7 の転写活性が増加した。以上の結果から、p53 はクローデインの転写過程に作用し、タンパク質の発現量を変化させることが示唆された。

3. 11. クローデイン-2 とクローデイン-7 の発現関連

クローデイン-2 とクローデイン-7 の発現関連を解明するため、クローデイン-2 ノックダウンとクローデイン-7 過剰発現の影響を検討した。クローデイン-7 の過剰発現により、クローデイン-2 mRNA 量は有意に変化しなかった。また、クローデイン-2 のノックダウンにより、クローデイン-7 mRNA 量は有意に変化しなかった。以上の結果から、クローディ

ン-2 とクローデイン-7 の発現は、個別に調節されることが示唆された。次に p53 と HNF4 α のノックダウンの影響を検討した。Tenovin-1 処理によりクローデイン-2 mRNA 量が低下し、この効果は p53 と HNF4 α のノックダウンにより同程度に阻害された。また、クローデイン-7 mRNA 量の増加が、p53 と HNF4 α のノックダウンにより同程度に阻害された。以上の結果から、p53 と HNF4 α が協働的にクローデイン-2 とクローデイン-7 の発現を調節することが示唆された。

3. 12. クローデイン-2 とクローデイン-7 のプロモーター領域への p53 と HNF4 α の結合

クロマチン免疫沈降法により、プロモーター領域への p53 と HNF4 α の結合を解析した。Tenovin-1 処理により、クローデイン-2 とクローデイン-7 のプロモーター領域への p53 と HNF4 α の結合量が増加した (**Fig. 10**)。クローデインの mRNA 発現とクロマチン免疫沈降の結果より、p53 と HNF4 α はクローデイン-2 とクローデイン-7 のプロモーター領域に結合し、転写活性をそれぞれ抑制、促進することが示唆された。

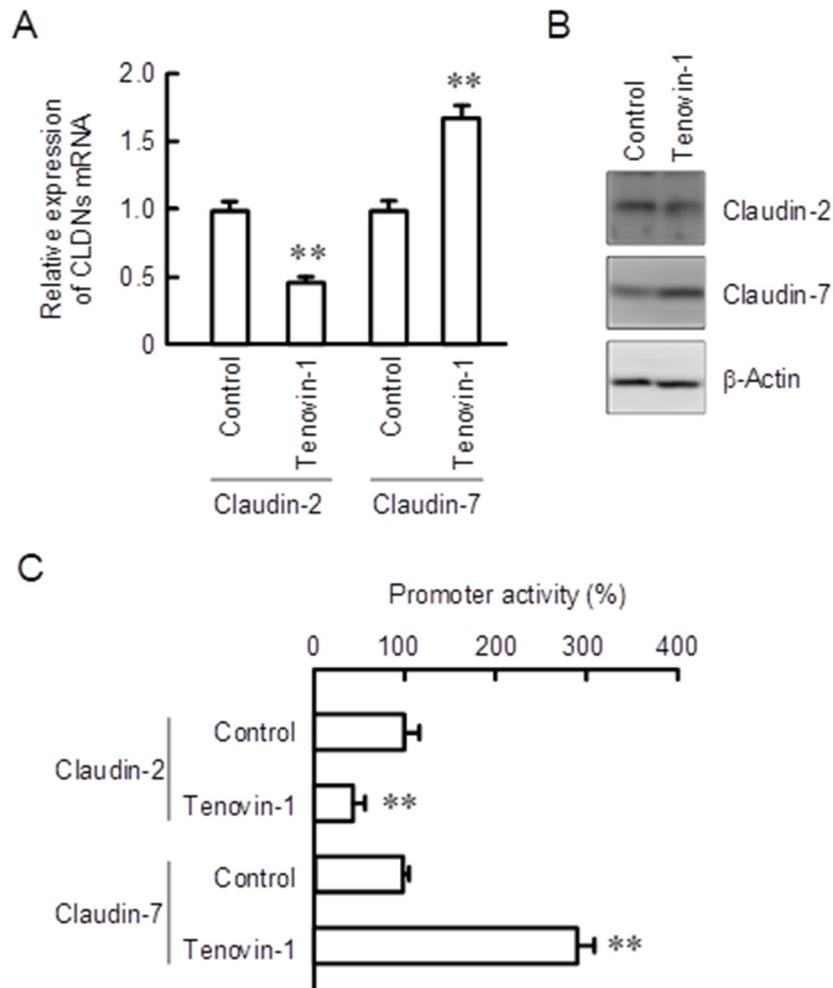


Fig. 9 Effect of tenovin-1 on expression and promoter activity of claudins.

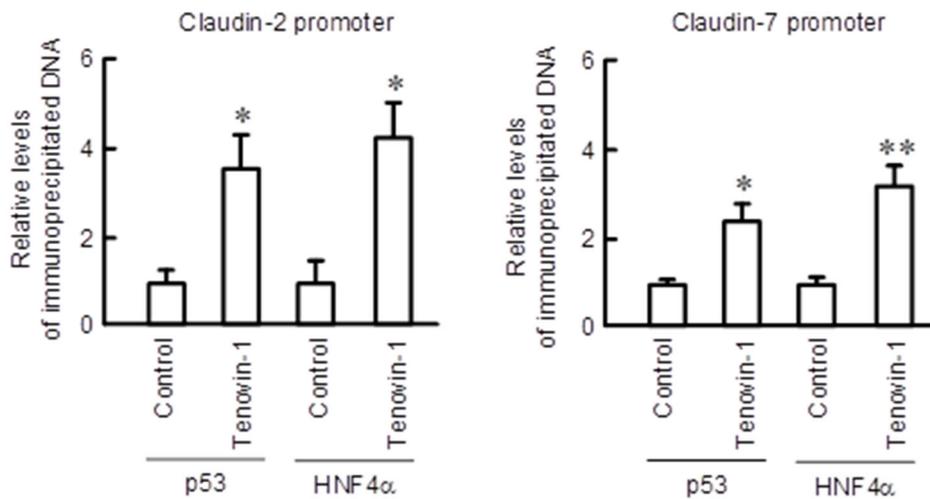


Fig. 10 Binding of p53 and HNF4 α to claudin-2 and -7 promoter by tenovin-1.

3. 13. 細胞間イオン透過性に対する tenovin-1 の効果

昨年度までの研究において、クロードイン-2 とクロードイン-7 はそれぞれカチオンポアとアニオンポアを形成することが示唆されたが、両者の発現が変化した場合の細胞間イオン透過性は不明である。MCE301 細胞を tenovin-1 処理したところ、TER が有意に低下した (Fig. 11)。一方、LY, FD4, FD20 の透過性は有意に変化しなかった。次に、希釈電位法によりイオン選択性を評価した。Tenovin-1 処理により、希釈電位と塩素イオン/ナトリウムイオン輸送比が増加した。同様に、クロードイン-2 のノックダウンとクロードイン-7 の過剰発現により、希釈電位と塩素イオン/ナトリウムイオン輸送比が増加した。以上の結果から、tenovin-1 はクロードイン-2 発現の低下とクロードイン-7 発現の増加を介して、細胞間塩素イオン透過性を亢進させることが示唆された。

3. 14. クロードインサブタイプの発現に対する tenovin-1 の影響

他のクロードインサブタイプの発現に対する tenovin-1 の効果を、リアルタイム PCR 法で検討した。Tenovin-1 処理によりクロードイン-1 発現量が増加し、クロードイン-8 発現量が低下した。一方、クロードイン-3, -4, -12, -15, -23

の発現量は有意に変化しなかった。ウェスタンブロット法でクロードイン-1 とクロードイン-8 の発現量を調べたところ、tenovin-1 処理によりクロードイン-1 の発現量が増加した。一方、クロードイン-8 の発現量は検出限界以下であった。Tenovin-1 による細胞間イオン透過性の変化に、クロードイン-1 の発現変化が寄与する可能性があるため、クロードイン-1 過剰発現の影響を検討した。クロードイン-1 の過剰発現により、希釈電位と塩素イオン透過性は有意に変化しなかった。以上の結果から、tenovin-1 はクロードイン-1 の発現量も変化させるが、クロードイン-1 は細胞間イオン透過性に影響を及ぼさないことが示唆された。

3. 15. 大腸クリプトにおける p53 と HNF4a の分布

クリプトの切片から mRNA を抽出し、部位毎のクロードイン mRNA の発現を比較した。クロードイン-7 mRNA は上部に多く、クロードイン-2 mRNA は下部に多く分布した。また、蛍光免疫染色法により、p53 と HNF4a がクリプトの上部に高発現することが明らかになった。以上の結果から、腸管上皮細胞の分化の進行とともに p53 と HNF4a の発現が増加し、クロードイン-2 発現の低下とクロードイン-7 発現の増加により、細胞間イオン透過性を変化させることが示唆された。

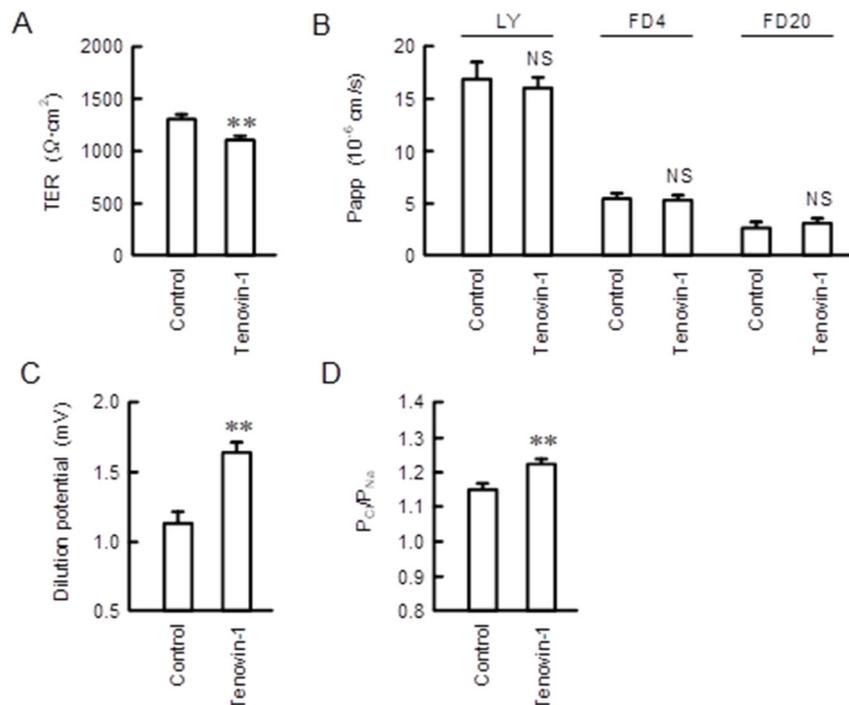


Fig. 11 Effect of tenovin-1 on paracellular permeability.

3. 16. イオン輸送体の発現に対するANGIIとALDの影響

ナトリウム吸収に関わるチャネルやトランスポーターの発現に対する RAA 系の影響を解明するため、ENaC と Na⁺/H⁺-交換体(NHE)などの発現に対するANGIIとALDの効果を検討した。ENaCは α , β , γ の3つのサブユニットから構成され、低食塩食で飼育したラットの腸管上皮細胞の表面に高発現することが報告されている⁹⁾。ANGII処理によりENaC β , ENaC γ , NHE3のmRNA量が増加した(Fig. 12A)。一方、ENaC α , NHE2, NHE8の発現量は有

意に変化しなかった。また、大コンダクタンスカルシウム活性化カリウム(BK)チャネル、塩素イオンチャネルの囊胞性線維症膜コンダクタンス制御因子(CFTR)、H⁺/K⁺-ATPaseの発現は検出限界以下であった。次にALDの効果を検討したところ、NHE2とNHE3 mRNA量が低下したが、ENaCやNHE8の発現量は有意に変化しなかった(Fig. 12B)。以上の結果より、チャネルやトランスポーターの発現に対するANGIIとALDの作用は異なることが明らかになった。

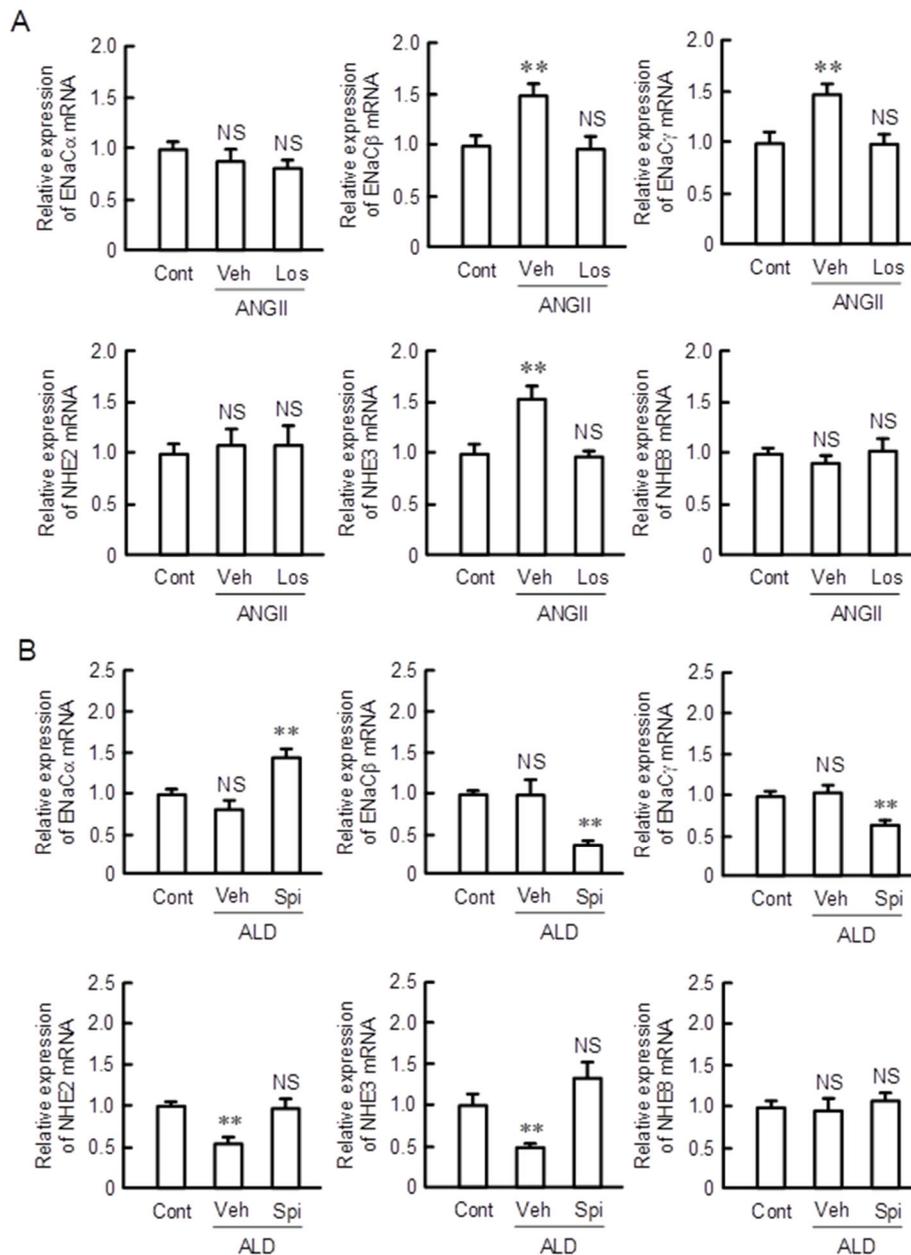


Fig. 12 Effects of ANGII and ALD on the expression of ion transporters.

3. 17. クローディンとトランスポーターの発現協関

MCE301 細胞にクローディン-7 を過剰発現したところ、ENaCとNHE の mRNA 量は有意に変化しなかった。そのため、ANGII によるクローディン-7 の発現増加と ENaC β , ENaC γ , NHE3 の発現増加は、独立して制御されることが示唆された。一方、クローディン-2 の過剰発現により、ENaC mRNA 量は変化しなかったが、NHE2 と NHE3 mRNA 量が有意に低下した (Fig. 13)。siRNA を用いてクローディン-2 発現をノックダウンしたところ、ALD による NHE2 と NHE3 発現の低下が抑制された。以上の結果から、ALD 処理によってクローディン-2 発現が増加し、二次的に NHE2 と NHE3 の発現が低下することが示唆された。

3. 18. 細胞内 pH の調節に対する ALD とクローディン-2 の影響

NHE の働きに対する ALD とクローディン-2 の影響を解明するため、pH 感受性 pHrodo を用いて、細胞内 pH の変化を測定した。細胞外溶液のナトリウムを塩化アンモニウムに置換することにより蛍光強度が低下 (アルカリ化) し、テトラメチルアンモニウムに置換することにより蛍光強度が増加 (酸性化) した。その後、ナトリウム含溶液に置換することにより徐々に蛍光強度が低下 (アルカリ化) し、この時の傾きを比較した。その結果、ALD 処理によって pH 変化の傾きが減少し、この効果はスピロラク톤の共処理やクローディン-2 のノックダウンによって抑制された。

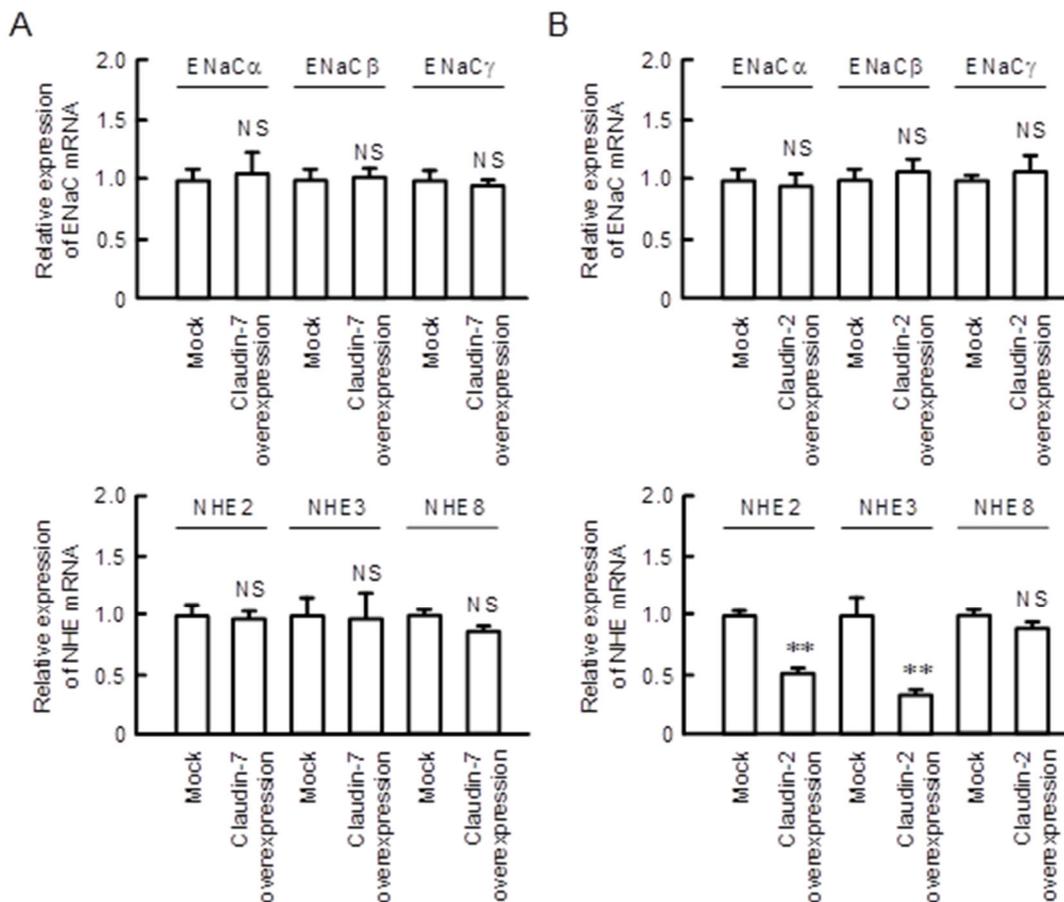


Fig. 13 Effects of claudin-2 or -7 overexpression on the expression of ion transporters.

3. 19. 腎臓の集合管におけるクローディン発現に対する低食塩食の影響

腎臓の集合管において、ALD は遺伝性および非遺伝性経路を介してENaCの発現量や細胞膜上での分布量を増加させる⁽⁴⁾。しかし、クローディンサブタイプの発現に対するALDの効果は大部分が不明である。通常食と低食塩食で飼育したマウスから腎臓を摘出後、リアルタイムPCR法により、ENaCとクローディンの発現変化を解析した。ENaC α の発現量は変化しなかったが、ENaC β とENaC γ のmRNA量が有意に増加した(Fig. 14)。また、クローディン-4、-7の発現量は変化しなかったが、クローディン-3 mRNA量が増加し、クローディン-8 mRNA量が低下した。一方、クローディン-6 mRNA量は検出限界以下であった。次に腎尿細管の切片を用いて、クローディン-3、-8の分布を調べた。低食塩食での飼育により、集合管のマーカー分子であるAQP2とクローディン-3の共局在量が増加し、クローディン-8の共局在量が低下した。以上の結果から、低食塩食での飼育により、集合管におけるクローディン-3の発現量が増加し、クローディン-8の発現量が低下することが明らかになった。

3. 20. クローディン-3、-8の発現調節におけるRAA系の関与

クローディン-3、-8の発現調節におけるRAA系の関与を解明するため、mIMCD-3細胞を用いてANGIIとALDの効果を検討した。ALD処理によりクローディン-3 mRNA量が増加し、ANGII処理によりクローディン-8 mRNA量が減少した。一方、クローディン-4とクローディン-7のmRNA量は有意に変化しなかった。ALDによるクローディン-3 mRNAおよびタンパク質発現の増加は、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬のスピロラク톤の共処理により阻害された(Fig. 15)。一方、グルココルチコイド受容体拮抗薬のRU486は阻害効果を示さなかった。同様の結果が、蛍光免疫染色とプロモーターアッセイで得られた。

3. 21. 細胞間透過性に対するALDとクローディン-3発現の影響

mIMCD-3細胞をトランスウェルに培養し、細胞間イオン透過性と非電解質化合物透過性を評価した。ALD処理によりTERが増加し、この効果はスピロラク톤の共処理によって阻害された(Fig. 16)。希釈電位法によりイオン選択性を解析したところ、ALD処理により希釈電位と塩素イ

オン/ナトリウムイオン透過比が増加した。これらの効果は、スピロラク톤の共処理やクローディン-3のノックダウンによって阻害された。

4. 考察

血液中の食塩濃度は約0.8~0.9%で一定に保たれており、血圧低下や循環血液量の低下によって腎臓の傍糸球体装置からレニンが分泌され、ANGIIやALDの濃度が増加する⁽¹⁰⁾。これらのホルモンが食塩濃度の調節に関わるイオンチャネルやトランスポーターの機能および発現を変化させる^(11, 12)。これまでに我々は低食塩食飼育マウスの結腸において、クローディン-2とクローディン-7の発現量が増加することを報告した⁽¹³⁾。しかし、これらのクローディンの発現調節機構と機能は、大部分が不明であった。本研究においてクローディン-7の発現調節因子を探索し、ANGIIを同定した。ANGIやALDはクローディン-7の発現量を増加させなかったため、ANGIIが高選択的に作用することが示唆された。ANGIIの効果がAT1アンタゴニストであるロサルタンで阻害されたが、AT2アンタゴニストであるPD123319は阻害効果を示さなかった。ウエスタンブロット法でMCE301細胞にAT1の発現が確認できなかったが、蛍光免疫染色法で細胞膜や細胞質での発現が観察された。また、マウスの結腸において、AT1のmRNAとタンパク質の発現が報告されている⁽¹⁴⁾。そのため、ANGIIは結腸上皮細胞のAT1受容体への結合を介して、その作用を発揮すると示唆された。

ANGII処理によって発現が増加したクローディン-7は、主にタイトジャンクションに分布した。そのため、タイトジャンクションを介した電解質や非電解質の輸送に影響を及ぼす可能性がある。トランスウェルアッセイにおいて、ANGIIはFD4輸送量を変化させなかった。同様に、クローディン-7ノックアウトマウスの腸管において、FD4輸送量に変化しないことが報告されており⁽¹⁵⁾、クローディン-7は高分子の非電解質透過性に影響を及ぼさないことが示唆された。一方、TERに対する効果を検討したところ、ANGIIによってTERが低下し、この効果はロサルタンの共処理によって阻害された。つまり、ANGIIはAT1受容体を介して、細胞間イオン透過性を亢進させると示唆された。過剰発現細胞やノックアウトマウスを用いた解析において、腎臓のクローディン-7がナトリウムまたは塩素イオンチャネルとして機能することが報告されている^(16, 17)。

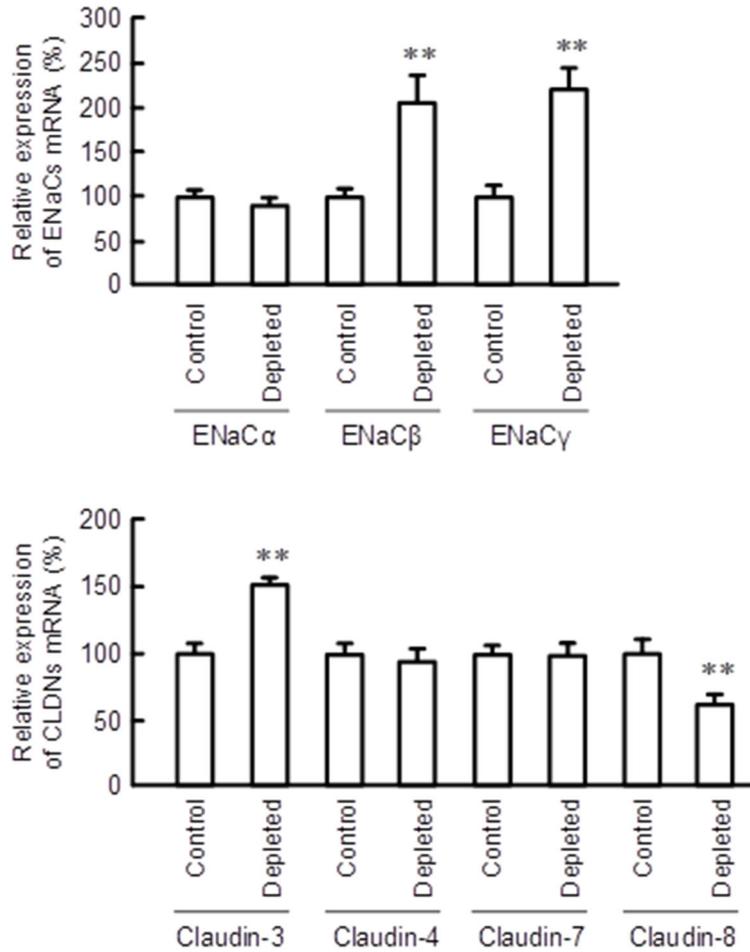


Fig. 14 Effect of NaCl-depleted diets on the expression of claudins in the kidney.

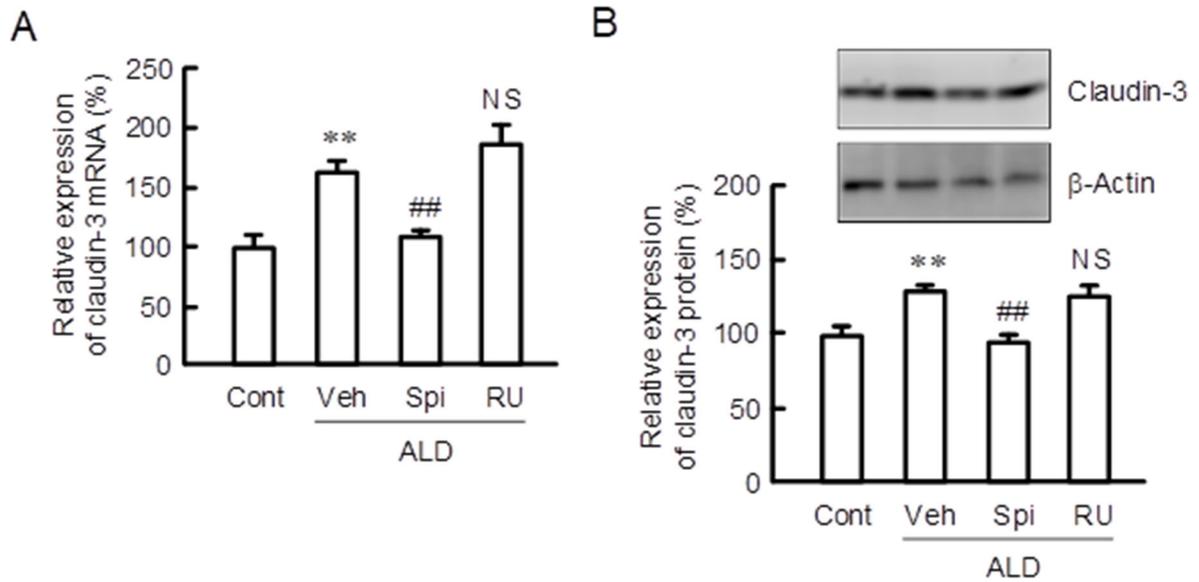


Fig. 15 Effects of ALD and inhibitors on claudin-3 expression in mIMCD-3 cells.

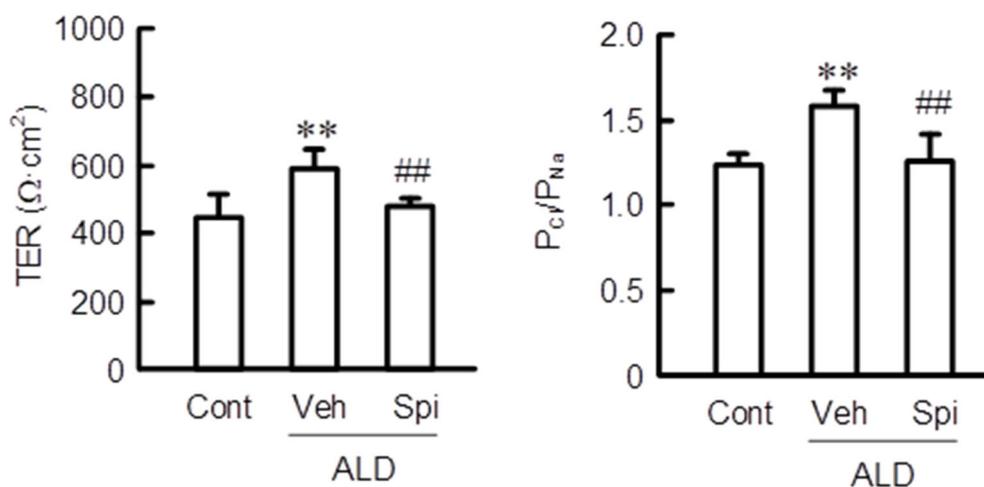


Fig. 16 Effects of ALD and inhibitor on paracellular permeability in mIMCD-3 cells.

本研究において、MCE301細胞をANGII処理したところ、塩素イオン/ナトリウムイオン透過比が増大し、この効果はロサルタンの共処理によって阻害された。そのため、結腸においてもクロードイン-7は塩素イオンチャネルとして機能すると示唆された。

結腸のクリプトにおけるクロードイン-2とクロードイン-7の局在を調べたところ、クロードイン-2は幹細胞や増殖過程の細胞が多いクリプトの下部、クロードイン-7は分化した細胞が多いクリプトの上部に分布していた。また、MCE301細胞の培養日数に応じて、クロードイン-2とクロードイン-7の発現が逆方向に変化した。MCE30細胞をtenovin-1で処理したところ、クロードイン-2の発現量が低下し、クロードイン-7の発現量が増加したため、細胞分化の促進によってクロードインの発現が変化することが示唆された。低食塩食飼育によりクリプト下部でクロードイン-2の発現が増加し、クリプト上部でクロードイン-7の発現が増加したため、これらのクロードインの基本転写因子の発現がクリプトの部位によって異なっており、低食塩食飼育によって転写活性が増大すると示唆された。これまでにクリプトにおけるクロードイン-7の発現が、HNF-4aによって調節されることが報告されている⁽⁷⁾。我々の知見も含めると、HNF4aはp53と複合体を形成してクロードインの発現調節に関与することが示唆される。

NHE2とNHE3は結腸の頂端膜に分布し⁽¹⁸⁾、ナトリウム吸収に関与すると考えられている。しかし、NHE2ノックアウトマウスではナトリウム吸収能が変化しないという報告も

あり、その機能は不明な点もある。低食塩食飼育したトリの結腸において、NHE2の発現量が増加することが報告されている⁽¹⁹⁾。しかし、本研究において、低食塩飼育で誘導されるANGIIはNHE3 mRNA量を増加させたが、NHE2 mRNA量を有意に変化させなかった。また、ALDはNHE2/3 mRNA量を低下させた。このようなNHEの発現変動の違いは、動物種の違いによるものとも考えられるが、今後の検討が必要である。

クロードイン-7ノックアウトマウスを用いた解析で、腎臓の集合管でクロードイン-7が非選択的傍細胞イオンチャネルとして機能し、ナトリウムイオン、塩素イオン、カリウムイオンの漏出によって慢性的な脱水症状になることが報告された⁽²⁰⁾。しかし、同グループはブタ尿細管由来のLLC-PK₁細胞を用いてクロードイン-7が塩素イオン透過性を低下させ、イヌ尿細管由来のMDCK type II細胞を用いてクロードイン-7がナトリウムイオン透過性を増加させると報告している⁽²¹⁾。そのため、クロードイン-7の機能は過剰発現/ノックダウンや他のクロードインとの組み合わせの違いによって変化することが示唆される。我々はMCE301細胞において、クロードイン-7の発現を増加させるANGIIが塩素イオン透過性を増加させるという結果を得た。クロードイン-7と他のクロードインとの相互作用については、今後の検討が必要である。

腎尿細管の集合管では、ANGIIの灌流によりENaC α , β , γ のタンパク質発現量が有意に増加する⁽²²⁾。また、ALDは遺伝性および非遺伝性経路を介してENaCの発現量や

細胞膜上での分布量を増加させる⁽⁴⁾。本実験系において ENaC α の発現量は変化しなかったが, ENaC β と ENaC γ の発現量が増加したため, 集合管で RAA 系が活性化していることが示唆された。また, 低食塩食飼育によりクロードイン-3 の発現量が増加, クロードイン-8 の発現量が低下することが明らかになった。クロードイン-8 はクロードイン-4 と結合し, 塩素イオンチャンネルを形成することが報告されている⁽²³⁾。集合管側は血管側よりも負電荷が大きく, 塩素イオンは間在細胞の管腔側膜に発現する Cl⁻/HCO₃⁻ 交換体や Na⁺/Cl⁻/HCO₃⁻ 交換体, およびタイトジャンクションを介して再吸収されると考えられている。しかし, 低食塩食飼育によりクロードイン-8 の発現量が低下したため, タイトジャンクションを介した塩素イオンの逆輸送(分泌)が抑制されることが示唆された。一方, 本研究でクロードイン-4 の mRNA 量は変化しなかったが, ALD はクロードイン-4 のスレオニンリン酸化量を増加させ, タイトジャンクションを介した塩素イオン透過性を低下させることが報告されている⁽⁶⁾。そのため, 集合管における食塩再吸収機構の全容解明

には, 非遺伝性経路の関与も検討する必要がある。

マウス集合管由来の M-1 細胞および mIMCD-3 を用いたノックダウン実験において, クロードイン-3 は細胞間イオン透過性の制御に関与しないことが報告されている⁽²³⁾。しかし, 本研究において ALD による TER の増加と塩素イオン/ナトリウムイオン輸送比の増加が, クロードイン-3 のノックダウンによって阻害された。イヌ腎臓由来の MDCK 細胞にクロードイン-3 を過剰発現させると, 細胞間イオン透過性が低下する⁽²⁴⁾。ノックダウン実験との結果の相違の理由は不明であるが, クロードイン-3 の過剰発現により細胞間ナトリウムイオン透過性が低下すると考えられるため, ALD はクロードイン-3 の発現増加を介してナトリウムイオンの逆輸送(分泌)を抑制することが示唆された。

5. 今後の課題

本研究では, 腸管におけるクロードイン発現の解析において, ANGII が NF- κ B 系の活性化を介してクロードイン-7 の発現を増加させることを見出した (Fig. 17A)。

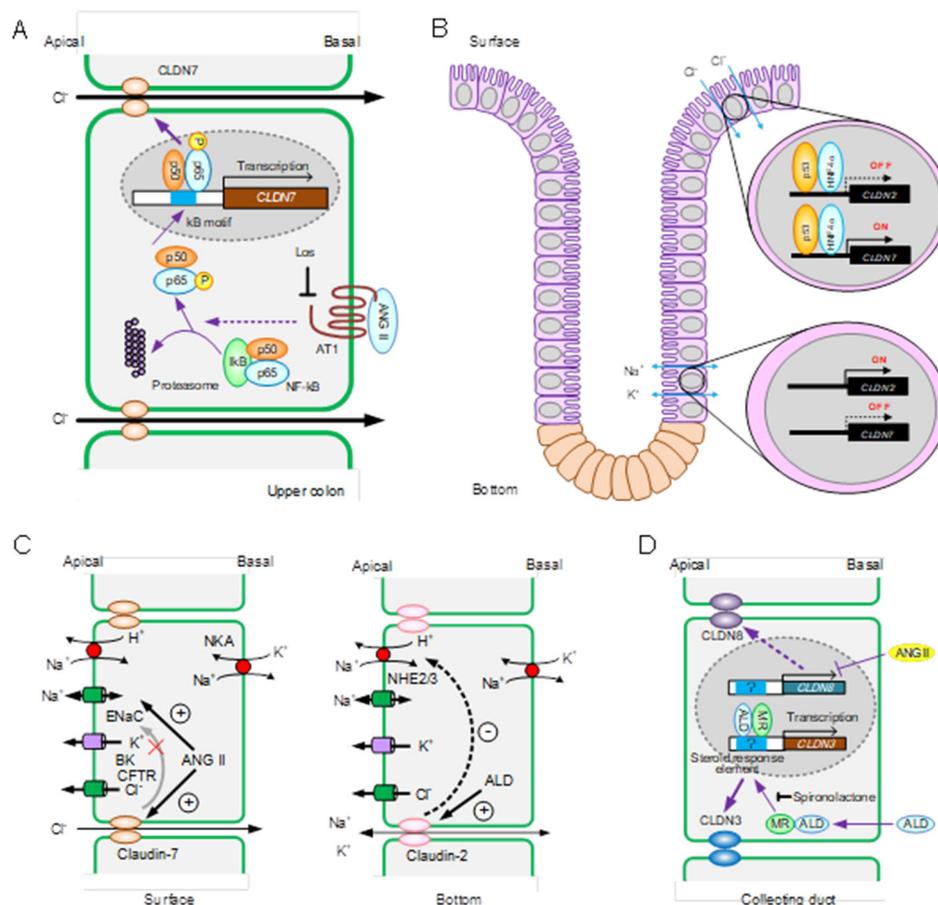


Fig. 17 Regulatory mechanism of claudins expression in colon and collecting duct cells.

クリプトの部位により、クローデイン-2 と-7 の発現が p53・HNF4a 複合体によって逆方向に調節されることが示唆された (**Fig. 17B**)。また、ALD はクローデイン-2 発現の増加を介して、NHE2 発現を低下させることが示唆された (**Fig. 17C**)。しかし、ナトリウム吸収およびプロトン分泌の制御におけるクローデイン-2 と NHE2 の機能協関が不明なため、今後の検討が必要である。腎尿細管におけるクローデイン発現の解析において、ANGII がクローデイン-8 発現量を低下させ、ALD がクローデイン-3 発現量を増加させることを見出した (**Fig. 17D**)。さらに、クローデイン-3 の発現調節にミネラルコルチコイド受容体の活性化が関与することを解明した。一方、ANGII によるクローデイン-8 発現の抑制機構の詳細は不明である。さらに、クローデイン-3 の発現増加によりナトリウム透過性が低下することが示唆されたが、クローデイン-8 の発現低下の影響は不明であり、今後の検討が必要である。

6. 文 献

- 1) Tsukita, S., Tanaka, H., Tamura, A., The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems, *Trends Biochem Sci*, 44, 141-152 (2019).
- 2) Epple, H.J., Amasheh, S., Mankertz, J., Goltz, M., Schulzke, J.D., Fromm, M., Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits, *Am. J. Physiol.-Gastrointest Liver Physiol.*, 278, G718-724 (2000).
- 3) Furukawa, C., Ishizuka, N., Hayashi, H., Fujii, N., Manabe, A., Tabuchi, Y., Matsunaga, T., Endo, S., Ikari, A., Up-regulation of claudin-2 expression by aldosterone in colonic epithelial cells of mice fed with NaCl-depleted diets, *Sci. Rep.*, 7, 12223 (2017).
- 4) Bubien, J.K., Epithelial Na⁺ channel (ENaC), hormones, and hypertension, *J Biol Chem*, 285, 23527-23531 (2010).
- 5) Le Moellic, C., Boulkroun, S., Gonzalez-Nunez, D., Dublineau, I., Cluzeaud, F., Fay, M., Blot-Chaubaud, M., Farman, N., Aldosterone and tight junctions: modulation of claudin-4 phosphorylation in renal collecting duct cells, *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, 289, C1513-C1521 (2005).
- 6) Boman, B.M., Fields, J.Z., An APC:WNT Counter-Current-Like Mechanism Regulates Cell Division Along the Human Colonic Crypt Axis: A Mechanism That Explains How APC Mutations Induce Proliferative Abnormalities That Drive Colon Cancer Development, *Front Oncol*, 3, 244 (2013).
- 7) Farkas, A.E., Hilgarth, R.S., Capaldo, C.T., Gerner-Smidt, C., Powell, D.R., Vertino, P.M., Koval, M., Parkos, C.A., Nusrat, A., HNF4alpha regulates claudin-7 protein expression during intestinal epithelial differentiation, *Am J Pathol*, 185, 2206-2218 (2015).
- 8) Zhao, T., Xu, Y., p53 and stem cells: new developments and new concerns, *Trends Cell Biol*, 20, 170-175 (2010).
- 9) Coric, T., Hernandez, N., Alvarez de la Rosa, D., Shao, D., Wang, T., Canessa, C.M., Expression of ENaC and serum- and glucocorticoid-induced kinase 1 in the rat intestinal epithelium, *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.*, 286, G663-G670 (2004).
- 10) Spielman, W.S., Davis, J.O., The renin-angiotensin system and aldosterone secretion during sodium depletion in the rat, *Circ Res*, 35, 615-624 (1974).
- 11) Hirsch, D., Pace, P., Binder, H.J., Hayslett, J.P., Evidence that aldosterone influences transport in target tissues by dissimilar mechanisms, *Am J Physiol*, 248, F507-512 (1985).
- 12) Kunzelmann, K., Mall, M., Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease, *Physiol. Reviews*, 82, 245-289 (2002).
- 13) Furukawa, C., Fujii, N., Manabe, A., Matsunaga, T., Endo, S., Hasegawa, H., Ito, Y., Yamaguchi, M., Yamazaki, Y., Ikari, A., Up-regulation of transient receptor potential melastatin 6 channel expression by tumor necrosis factor-alpha in the presence of

- epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, *J Cell Physiol*, 232, 2841-2850 (2017).
- 14) Garrido-Gil, P., Dominguez-Mejide, A., Moratalla, R., Guerra, M.J., Labandeira-Garcia, J.L., Aging-related dysregulation in enteric dopamine and angiotensin system interactions: implications for gastrointestinal dysfunction in the elderly, *Oncotarget*, 9, 10834-10846 (2018).
- 15) Tanaka, H., Takechi, M., Kiyonari, H., Shioi, G., Tamura, A., Tsukita, S., Intestinal deletion of Claudin-7 enhances paracellular organic solute flux and initiates colonic inflammation in mice, *Gut*, 64, 1529-1538 (2015).
- 16) Tatum, R., Zhang, Y., Salleng, K., Lu, Z., Lin, J.J., Lu, Q., Jeansonne, B.G., Ding, L., Chen, Y.H., Renal salt wasting and chronic dehydration in claudin-7-deficient mice, *Am J Physiol Renal Physiol*, 298, F24-F34 (2010).
- 17) Alexandre, M.D., Lu, Q., Chen, Y.H., Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells, *J Cell Sci*, 118, 2683-2693 (2005).
- 18) Wormmeester, L., Sanchez de Medina, F., Kokke, F., Tse, C.M., Khurana, S., Bowser, J., Cohen, M.E., Donowitz, M., Quantitative contribution of NHE2 and NHE3 to rabbit ileal brush-border Na⁺/H⁺ exchange, *Am J Physiol*, 274, C1261-1272 (1998).
- 19) Donowitz, M., De La Horra, C., Calonge, M.L., Wood, I.S., Dyer, J., Gribble, S.M., De Medina, F.S., Tse, C.M., Shirazi-Beechey, S.P., Ilundain, A.A., In birds, NHE2 is major brush-border Na⁺/H⁺ exchanger in colon and is increased by a low-NaCl diet, *Am J Physiol*, 274, R1659-1669 (1998).
- 20) Tatum, R., Zhang, Y., Salleng, K., Lu, Z., Lin, J.J., Lu, Q., Jeansonne, B.G., Ding, L., Chen, Y.H., Renal salt wasting and chronic dehydration in claudin-7-deficient mice, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 298, F24-34 (2010).
- 21) Hou, J., Gomes, A.S., Paul, D.L., Goodenough, D.A., Study of claudin function by RNA interference, *J Biol Chem*, 281, 36117-36123 (2006).
- 22) Wu, P., Gao, Z.X., Zhang, D.D., Duan, X.P., Terker, A.S., Lin, D.H., Ellison, D.H., Wang, W.H., Effect of Angiotensin II on ENaC in the Distal Convolute Tubule and in the Cortical Collecting Duct of Mineralocorticoid Receptor Deficient Mice, *J. Am. Heart Assoc.*, 9, e014996 (2020).
- 23) Hou, J., Regulation of paracellular transport in the distal nephron, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*, 21, 547-551 (2012).
- 24) Milatz, S., Krug, S.M., Rosenthal, R., Gunzel, D., Muller, D., Schulzke, J.D., Amasheh, S., Fromm, M., Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes, *Biochim Biophys Acta*, 1798, 2048-2057 (2010).

7. 論文業績および学会発表

論文業績

1. Takashina Y, Ishizuka N, Ikumi N, Hayashi H, Manabe A, Hirota C, Tabuchi Y, Matsunaga T, Ikari A: Upregulation of claudin-7 expression by angiotensin II in colonic epithelial cells of mice fed with NaCl-depleted diets. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, E1442 (2020)
2. Hirota C, Takashina Y, Ikumi N, Ishizuka N, Hayashi H, Tabuchi Y, Yoshino Y, Matsunaga T, Ikari A: Inverse regulation of claudin-2 and -7 expression by p53 and hepatocyte nuclear factor 4a in colonic MCE301 cells. *Tissue Barriers*, 9, 1860409 (2021)

著書

1. 五十里彰: 臨床医として知っておきたいミネラルの知識, マグネシウム, 成人病と生活習慣病, 48, 634-638, 2018
2. 吉野雄太, 五十里彰: 尿細管における Ca²⁺, Mg²⁺の動態: TRP チャネル, 腎と透析, in press

学会発表

1. 廣田智恵子, 高階優衣, 眞鍋綾, 古川千紗, 石塚典子, 林久由, 田渕圭章, 松永俊之, 五十里彰: アンジオテンシン II による結腸食塩吸収の調節におけるクロードインの関与, 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2020(岐阜), 2020年11月21-22日
2. 廣田智恵子, 高階優衣, 眞鍋綾, 石塚典子, 林久由, 田渕圭章, 松永俊之, 五十里彰: 大腸塩分吸収の調節における細胞間接着分子クロードイン-7 の役割, 第67回中部日本生理学会(名古屋), 2020年10月16日
3. 廣田智恵子, 高階優衣, 眞鍋綾, 古川千紗, 石塚典子, 林久由, 田渕圭章, 松永俊之, 五十里彰: 全身性レニン・アンジオテンシン系による結腸のクロードイン発現と食塩吸収の制御, 第93回日本生化学会大会(横浜), 2020年9月14-16日
4. 五十里彰: RAA系による大腸におけるクロードイン発現の制御, 2020年度生理研研究会(岡崎), 2020年9月3-4日
5. 廣田智恵子, 高階優衣, 眞鍋綾, 古川千紗, 石塚典子, 林久由, 田渕圭章, 松永俊之, 五十里彰: 結腸の食塩吸収におけるアンジオテンシン II の作用メカニズムの解明(名古屋), 第84回日本生化学会中部支部例会, 2020年5月24日
6. 廣田智恵子, 高階優衣, 眞鍋綾, 古川千紗, 石塚典子, 林久由, 田渕圭章, 松永俊之, 五十里彰: アンジオテンシン II による新たな食塩吸収制御機構の解明(京都), 日本薬学会第140年会, 2020年3月26日

Clarification of Regulatory Mechanism of Salt Balance through Intercellular Tight Junction by Kidney-Gut Interaction

Akira Ikari¹, Hisayoshi Hayashi², Yoshiaki Tabuchi³, Naohiko Anzai⁴, Hajime Hasegawa⁵

¹Department of Biopharmaceutical Sciences, Gifu Pharmaceutical University, ²School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, ³Life Science Research Center, University of Toyama, ⁴Department of Pharmacology, Chiba University Graduate School of Medicine, ⁵Saitama Medical Center, Saitama Medical University

Summary

The absorption (reabsorption) of Na⁺ and Cl⁻ in the intestine and kidney is controlled by renin-angiotensin-aldosterone (RAA) system, but the mechanisms are not fully understood. In mice fed with NaCl-depleted diets, the expression levels of claudin-2 and -7, tight junctional proteins, increase compared to those in control mice. Claudin-2 expression is upregulated by ALD, but the regulatory mechanism of claudin-7 has not been clarified. Here, we found that angiotensin II (ANGII) increases claudin-7 expression mediated by the activation of NF- κ B pathway in mouse colonic MCE301 cells. Dilution potential assay indicated that ALD may inhibit Na⁺ secretion mediated by the reduction of claudin-2 expression and ANGII may promote Cl⁻ absorption mediated by the elevation of claudin-7 expression. Furthermore, the expressions of claudin-2 and -7 may be inversely regulated by a complex of p53 and HNF4a in the colon crypt.

Expression linkage between claudins and ion transporters expressed in the plasma membrane were investigated using MCE301 cells. ALD decreased the mRNA levels of Na⁺/H⁺-exchanger 2 (NHE2) and NHE3, which were inhibited by claudin-2 siRNA. Furthermore, the expression levels of NHE2 and NHE3 were decreased by the overexpression of claudin-2. These results suggest that the expressions of NHE2 and NHE3 are controlled by claudin-2 in the colon.

In the collecting duct of mice fed with NaCl-depleted diets, the expression levels of claudin-3 and -8 were upregulated and downregulated, respectively. ALD increased the mRNA level of claudin-3 in mouse collecting duct-derived mIMCD-3 cells, which was inhibited by spironolactone, a mineralocorticoid receptor antagonist. In addition, the permeability of Na⁺ was decreased by aldosterone, which was inhibited by spironolactone and claudin-3 knockdown. These results suggest that ALD may inhibit the secretion of Na⁺ mediated by the elevation of claudin-3, resulting to promote salt reabsorption in the kidney.

In the present study, we found that the expression levels of claudin-2 and -7 in the colon and claudin-3 and -8 in the collecting duct are controlled by the RAA system. In addition, the expressions of NHE2 and NHE3 were downregulated by claudin-2 in the colon, suggesting that claudins are involved in the regulation of not only paracellular ion transport, but also transcellular ion transport. We suggest that the homeostasis of salt balance is cooperatively regulated by claudins and ion transporters in the plasma membrane in the colon and kidney.

味蕾におけるアミロライド感受性塩味センサーメカニズムの解明

樽野 陽幸

京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学

概要 ナトリウムイオン(Na^+)は必須栄養素の一つであるため、口に含むと“好ましい”味として知覚される。現代、このおいしさに起因する食塩摂取過多が多くの高血圧症患者を生み出している。そのため、減塩によって国民の健康を守ることが公衆衛生上の喫緊の課題になっているが、舌で塩味を感じる科学的なしくみが十分に理解されていないため、これまでの減塩戦略は経験的にならざるを得ず、十分な効果が得られていない。このように、舌で“好ましい”塩味を感じるしくみを解明することが求められている。 Na^+ を検知するセンサー分子はアミロライド感受性上皮型ナトリウムチャネル(ENaC)だが、ENaCを発現する味細胞(塩味細胞)の正体および細胞内メカニズムは、30年以上もの間不明だった。本研究で我々は、味蕾における塩味細胞の同定に成功し、さらにこれらの細胞が Na^+ の情報を変換して脳へと伝達するしくみを分子レベルで解明した。まず、マウス味細胞に対するパッチクランプおよび細胞内 Ca^{2+} 測光実験により、ENaCとCALHM1/3を発現する味細胞において、ENaCを介した Na^+ 流入によって生じる脱分極が活動電位を発生させることを見出した。さらに、*Calhm1*発現細胞におけるENaCのコンディショナルノックアウトマウスが味神経活動や行動レベルでの“好ましい”塩味応答を失っていた。このように、数ある味細胞のうち、ENaCとCALHM1/3を共発現する味細胞集団が塩味受容を担当する細胞、すなわち塩味細胞であることを突き止めた。一方、我々は先行研究において、甘味・うま味・苦味受容味細胞が味神経への情報伝達にATP放出チャネルCALHM1/3に依存した“チャネルシナプス”とよばれるATP作動性神経伝達機構を利用していることを報告している。今回、*Calhm3*ノックアウトマウスにおいて“好ましい”塩味応答が消失しており、かつ、塩味細胞のうち味神経と接している部分にCALHMチャネルが局在していることを発見した。これらは塩味もチャネルシナプスで味神経へと神経伝達されていることを強く示唆している。以上より、味蕾における“好ましい”塩味受容の細胞分子メカニズムが以下のように明らかとなった:ENaCとCALHM1/3を共発現する塩味細胞において、ENaCを介した Na^+ 流入により脱分極すると活動電位が発生する。この活動電位に反応してCALHM1/3チャネルシナプスが活性化して神経伝達物質ATPを放出し、ATP受容体を発現する味神経を活性化させることで塩味を生じさせる。以上に加え本研究では、塩味神経伝達を担うチャネルシナプスの構造、さらにそこで働く神経伝達物質放出チャネルの立体構造および機能制御機構を明らかにした。今回解明された食塩のおいしさの背景にあるしくみを標的とした食品開発や創薬研究が、近い未来、全く新しい塩味制御技術を創出するものと期待する。

1. 研究の背景と目的

味覚としての塩味受容機構は、塩(特に Na^+ イオン)の摂取量を適切な範囲に制御するために発達してきたと考えられる。進化の過程で陸上では欠乏しがちな必須栄養素である塩に対する「おいしい」という感覚が生まれ、製塩技術の発達した飽食の現代では塩分摂取過多による生

活習慣病が社会問題になっている。実際に、我が国の高血圧症患者数は900万人に登り、成人の死因上位を占める脳心血管障害の発症と進展に深く関与している。食塩(NaCl)の摂取過多が高血圧の牽引であることがよく知られているが、日本人の平均塩分摂取量(9.9 g)は世界保健機関の減塩目標値(5.0 g)を大きく上回る。しかしながら、

塩味を感じる科学的なしくみが十分に理解されていないため、これまでの減塩食品・戦略は経験的にならざるを得ず、十分な効果が得られていなかった。このように、舌における“おいしい”塩味を感じる細胞および分子レベルのメカニズムを解明することが社会的に求められてきた。

これまで味蕾における味覚受容メカニズムについては世界中で多くの研究がなされ、甘味・苦味・うま味・酸味・塩味による 5 つの基本味のうち、塩味以外の全ての味質の受容細胞、センサー分子、細胞内情報伝達系、そして神経伝達機構が明らかとなっている (Roper and Chaudhari, 2017)。味蕾での塩味すなわち Na^+ 感知機構としてはアミロライド感受性機構の関与が指摘されていたが (Heck et al., 1984)、近年、アミロライド感受性上皮型 Na^+ チャンネル (Epithelial Sodium Channel, ENaC) が Na^+ センサー分子であることが実証されたとともに、この AS 機構が塩味の“好ましさ”を司ることが示された (Chandrashekar et al., 2010)。しかし、この“好ましい”塩味受容を担う味蕾細胞 (以下、味細胞)、すなわち塩味細胞の正体は 30 年以上もの間不明である。さらに塩味細胞の中で、センサー分子である ENaC の下流のシグナルトランスダクションおよび求心性味神経への神経伝達機構についても未解明である。このように、“好ましい”塩味受容を担う細胞分子機構の解明が現在の味覚研究分野における喫緊の課題である (Liman et al., 2014)。

一方、我々は先行研究において、II 型味細胞に分類される甘味・苦味・うま味受容味細胞における味神経への神経伝達がシナプス小胞の開口分泌に依らず、Calcium Homeostasis Modulator 1 (CALHM1) と CALHM3 のヘテロ多量体で構成される電位依存性アデノシン 3 リン酸 (ATP) 透過性イオンチャンネル CALHM1/3 のイオン透過ポアが神経伝達物質である ATP の放出経路を担う事を先行研究で報告している (Ma et al., 2016; Ma et al., 2018; Taruno, 2018; Taruno et al., 2013a; Taruno et al., 2017; Taruno et al., 2013b)。我々はこれを「チャンネルシナプス」と命名している (Taruno et al., 2021)。ここで、いくつか重要な疑問が生じている。多くのイオンチャンネルは ATP を透過することはできないが、なぜ CALHM1/3 チャンネルは ATP を透過することができるのだろうか、そして、CALHM1/3 チャンネルの機能はどのような制御を受けているのだろうか。イオンチャンネルが直接伝達物質を放出するシナプスは前

代未聞であるが、どのような構造をしているのだろうか。そして、塩味細胞も神経伝達にこのチャンネルシナプスを使っているのだろうか。

こうした背景をもとに、我々は舌における味覚センサー器官である味蕾における塩味受容の細胞分子機構の解明を目指して、以下の研究課題について研究を行った。

- (1) 味細胞特殊チャンネルシナプスの局在・構造の解明
- (2) CALHM チャンネルの立体構造の決定
- (3) 翻訳後修飾による CALHM1/3 チャンネルの機能制御機構の解明
- (4) 塩味細胞の同定と、細胞内トランスダクション・神経伝達機構の解明

2. 研究方法

2. 1. 遺伝子改変動物の作出

2. 1. 1. ENaC α -GCaMP3 マウス: ENaC α プロモーターの下流で Cre リコンビナーゼを発現するノックインマウス系統 ENaC α -Cre (コロンビア大学 Zuker 教授より譲り受けた) と GCaMP3 レポーターマウス *Rosa26^{GCaMP3}* (Ai38 系統, Jackson Laboratory より購入) と交配して ENaC α 発現 (ENaC α^+) 細胞で GCaMP3 を発現する ENaC α -GCaMP3 マウスを作出した。

2. 1. 2. *Calhm3^{tdTomato}* マウス: CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術を用いて、*Calhm3* の exon1 を tdTomato に置換した *Calhm3^{tdTomato}* マウス系統を作出した。本マウスは、*Calhm3* をノックアウト (KO) するとともに *Calhm3* プロモーターの下流で赤色蛍光タンパク tdTomato を発現する。

2. 1. 3. コンディショナル ENaC α ノックアウトマウス (ENaC α -cKO): 独自に作出した *Calhm1*-Cre マウス (Taruno et al., 2017) と ENaC α -Cre マウスを交配させて、*Calhm1⁺* 細胞において選択的に ENaC α が欠損した ENaC α -cKO を作出した。

2. 1. 4. 光塩味マウス: 塩味細胞マーカー遺伝子の Cre ドライバーマウスとチャンネルロドプシン 2 (ChR2) レポーターマウス *Rosa26^{GCaMP3}* (Ai38 系統, Jackson Laboratory より購入) を交配させて、ENaC を発現する細胞に選択的に ChR2 を発現するマウスを作出した。

2. 2. 抗マウス CALHM1 抗体の作出

マウス CALHM1 の C 末端領域 (アミノ酸残基 338 から 348 まで: RKEVATYFSKV) に対するポリクローナル抗体

をモルモットを宿主として作製した。血清からアフィニティ精製によって得た精製抗体を実験に用いた。

2. 3. 組織・細胞染色

細胞を4% paraformaldehyde in PBS で固定し(室温, 20 min), 0.25% Triton X-100 in PBS で透過処理(室温, 15 min), 5% Normal Goat Serum in PBS でブロッキング(室温, 1 hr)を行った後, 1次抗体でインキュベートし(4°C, 一晚), 続いて蛍光2次抗体と反応させた。撮影は共焦点レーザー顕微鏡(LSM510, Carl Zeiss)を用いて行った。一部の試験では撮影に Airyscan モジュールを搭載した LSM800 共焦点ユニットによる超解像イメージングを用いた。

味細胞免疫蛍光染色は先行研究の通り行った(Ma et al., 2018; Taruno et al., 2013b)。抗マウス CALHM1 抗体による染色では, アビジン・ビオチン・コンプレックス法とチラミッドシグナル増幅法を組み合わせた検出感度の増幅のプロセスを追加した。

2. 4. 細胞培養

Madin-Darby canine kidney II (MDCKII) 細胞は東京大学村田昌之教授より譲り受けた。

N2a 細胞, HeLa 細胞は ATCC より購入した。10% FBS および抗生物質を添加した DMEM 培地を用い, 37°C の 5% CO₂/ 95% O₂ インキュベーター内にて培養した。MDCKII 細胞極で性単層上皮を作るのには Transwell フィルターインサート(Corster 社)に細胞を播種し, 3~7 日間培養した。プラスミド DNA の導入には Lipofectamine 3000 (Invitrogen)を用いた。

2. 5. 単離味細胞パッチクランプ・Ca²⁺イメージング

味細胞の単離は先行研究の通り行った(Ma et al., 2018; Taruno et al., 2013b)。活動電位記録は, セルアタッチモードでピペット電圧を 0 mV に固定して行った。全細胞記録において, 電位固定法では -80 mV の固定電圧を, 電流固定法では 0 pA の固定電流をそれぞれ用いた。細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) の変化は GCaMP3 の蛍光輝度の測光により行った。全ての試験は室温で行った。溶液は以下の組成のものを用いた。標準細胞外溶液: 140 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM glucose, 1 μM amiloride, and 10 mM HEPES, pH 7.4。標準ピペット内溶液 140 mM CsCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM Na₂ATP,

and 0.3 mM Tris-GTP, pH 7.3。電流固定での実験のピペット内溶液: 140 mM KCl, 11 mM BAPTA, 2 mM MgCl₂, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM Na₂ATP, and 0.3 mM Tris-GTP, pH 7.3。

2. 6. リックテスト

マウスの味覚嗜好性を調べるためにリックテストを行った(Ma et al., 2018; Taruno et al., 2013b)。マウスが5秒間の溶液提示時間の間に何回ボトルを舐める(リックする)かを計測し, リック回数が多いほどその溶液の味を“おいしい”と感じていると解釈する。テストする味質に応じてマウスを適切な生理的条件下に置いて実験している。塩味テストでは 24 時間前から塩欠乏状態にし, うま味・甘味のテストでは 24 時間前から摂取カロリー制限による飢餓状態に, 苦味・酸味のテストでは 24 時間前から水を与えない脱水状態にして実験を行った。テスト溶液は蒸留水に直接化合物を溶解したものを用いた。

2. 7. 鼓索神経応答記録

マウスの舌への味刺激に対する求心性味神経の応答を記録した。方法は先行研究に従った(Ma et al., 2018; Taruno et al., 2013b)。麻酔下のマウスの鼓索神経に電極を接触させて神経インパルスを記録, シグナルを積分することで神経応答の定量解析を行った。味刺激は蒸留水に直接化合物を溶解したものを用いた。

2. 8. 生化学解析・遺伝子組み換え実験

ウェスタンブロットングおよび各種生化学実験, プラスミド上での点変異導入などのプロトコルは発表論文を参照のこと(Kashio et al., 2019; Okui et al., 2021)。

2. 9. Cryo 電子顕微鏡による単粒子解析

プロトコルは発表論文を参照のこと(Demura et al., 2020)。

3. 研究結果

3. 1. 味細胞特殊チャネルシナプスの局在・構造の解明

3. 1. 1. 抗マウス CALHM1 抗体のテスト

モルモットを宿主に抗マウス CALHM1 ポリクローナル抗体を作製し, 抗体の特異性の評価を行った。まず, 強制発現系におけるウェスタンブロットによりこの抗体はヒトおよびマウス CALHM1 タンパクを特異的に検出し, CALHM3 へ交差反応を示さなかった(図 1A)。また, 強制発現系における細胞染色においても形質膜に局在するマウス CALHM1 タンパクを検出できた(図 1B)。さらに組織

免疫染色により有郭乳頭において味細胞特異的に点状の小さなシグナルが多数見られ、CALHM1 ノックアウト組織においてそのシグナルは消失していた(図 1C および D)。以上の結果から作製した抗マウス CALHM1 抗体が味蕾組織中の CALHM1 タンパク質を特異的に検出できることが明らかとなった。

3. 1. 2. 味細胞特殊CALHMチャンネルシナプスの局在と構造

CALHM1/3 を伝達物質の放出経路とする味細胞チャンネルシナプス(Ma et al., 2018; Taruno et al., 2013b)の局在や構造は全く分かっていない。そこで、上で作製した抗マウス CALHM1 抗体を用いてマウス有郭乳頭味蕾における CALHM1 の局在を解析し、CALHM チャンネルが PLCB2とTRPM5を発現して甘味・苦味・うま味を受容する

ことが知られている II 型味細胞の細胞膜上で、ATP 受容体 P2X2R を発現する求心性味細胞と接する膜ドメインに局在することを明らかにした(図 2)。

PLCB2とTRPM5を発現する味細胞内で、求心性味神経と接する部分の形質膜を裏打ちするように巨大なミトコンドリアが存在することが知られている。これらの結果から、巨大ミトコンドリア(ATP リザーバー)～CALHM1/3 チャンネル(ATP 放出部位)～求心性味神経(ATP レシーバー)が直線的空間配置を取ることで限局的かつ安定した神経伝達を可能にしていることが強く示唆された。以上を踏まえて現在考えられているチャンネルシナプスの構造モデルを図 3 に示す。

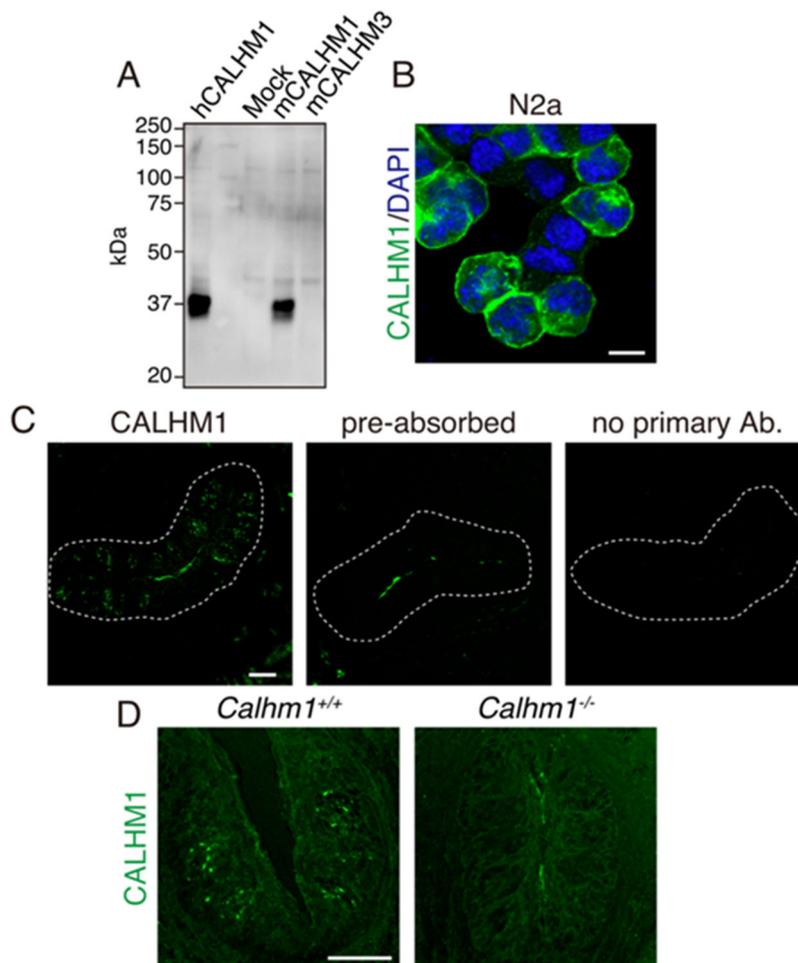


図 1. 抗マウス CALHM1 ポリクローナル抗体の特異性評価

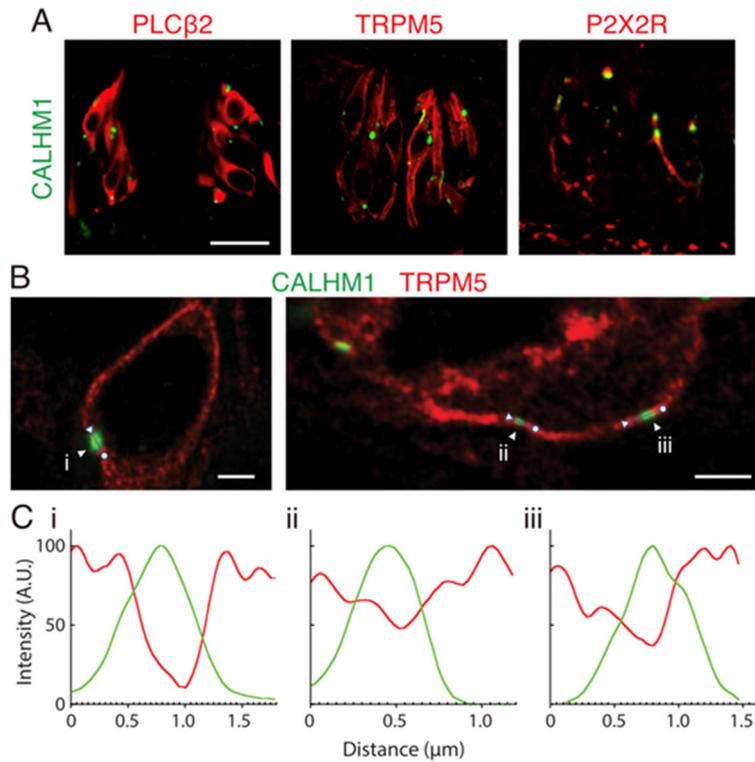


図 2. 有郭乳頭味細胞における CALHM1 (緑) の局在解析. PLCβ2 と TRPM5 は II 型味細胞マーカータンパク P2X2R は求心性味細胞マーカータンパク CALHM1 が II 型細胞側底膜上で求心性味神経と接触する部位に局在していることがわかる

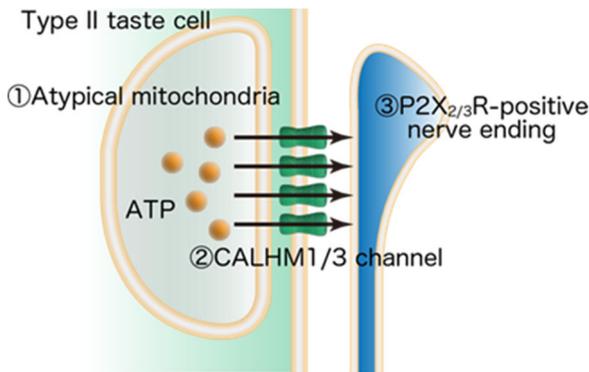


図 3. CALHM チャンネルシナプスの構造モデル

さらに, MDCKII 細胞がつくる極性上皮への CALHM サブユニットの強制発現系を用いて, CALHM チャンネルが生得的に側底膜へと選択的にソーティングされる性質をもつことが明らかになった(図 4)。加えて, 側底膜ソーティングに必要なシグナル配列の一部も突き止めた。

3.1. に関する結果は, 原著論文として発表している (Kashio et al., 2019)。

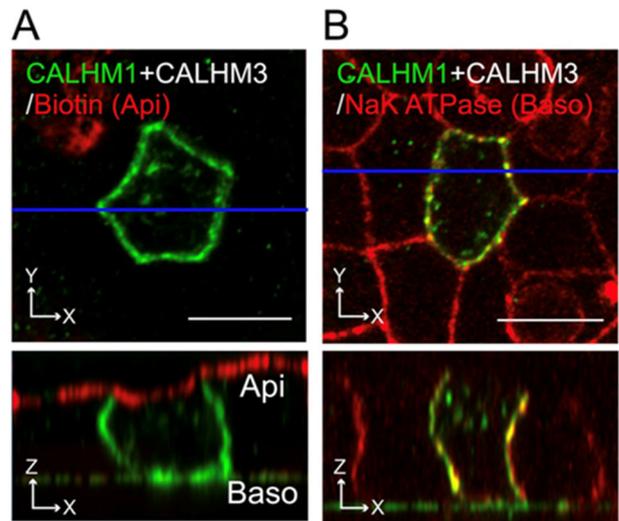


図 4. モデル上皮細胞における CALHM チャンネル(緑)の側底膜ソーティング. A では管腔膜が赤で, B では側底膜が赤で染色されている

3. 2. CALHM チャンネルの立体構造の決定

東京大学理学部瀧木研究室との共同研究により, Cryo 電子顕微鏡による単粒子解析を用いてメダカ CALHM1 (図 5), ヒト CALHM2, 線虫 CLHM-1 の立体構造を決定した。本成果は原著論文として発表している (Demura et al., 2020)。ここでは, 味覚に關与する CALHM1 チャンネルの開口状態の立体構造について報告する。

メダカ CALHM1 は先行研究で予想されていた 6 量体とは異なり (Siebert et al., 2013), ホモ 8 量体を形成し, 中央に細胞膜と垂直に走るイオン透過ポアを持つ。開口状態で N 末端ヘリックスがポアの最も狭い部分を形成し, その直径は 1.57 nm であった。ATP 分子の大きさは約 1.2 nm であるので, この大きなポアによって ATP が透過できるものと考えられた。さらに, ポアを作るアミノ酸側鎖は電荷を帯びておらず, CALHM1 チャンネル機能の大きな特徴の一つであるカチオンもアニオンも非選択的に透過することができるという性質をよく説明することも明らかとなった。以上のように, 味覚神経伝達に關わる ATP 放出チャンネルファミリー-CALHM の ATP 透過性の分子構造基盤を明らかにすることができた。

本研究ではメダカ CALHM1 の構造を決定したが, サブユニットストイキオメトリーを決定するのに必要なアミノ酸配列の相同性から, ヒト CALHM1/3 チャンネルはヘテロ 8 量体を形成することが予想されるが, 今後, ヒト CALHM1/3 の構造を決定する必要がある。

3. 3. 翻訳後修飾による CALHM1/3 チャンネルの機能制御機構の解明

CALHM1/3 チャンネルの味覚神経伝達における役割は明確となったが, その制御機構はほとんど未解明である。そこで, CALHM1/3 の各サブユニットに対する翻訳後修飾について, N-グリコシル化修飾と S-パルミトイル化修飾の性質及びその役割の解明を目指した。本成果は原著論文として発表している (Okui et al., 2021)。

強制的発現系において, CALHM3 の共発現により CALHM1 の電流密度や細胞膜局在の亢進が認められたが, この現象の背景で CALHM1 の化学修飾が変化している可能性についてウェスタンブロットティングで検証した。すると, CALHM3 発現に伴い, 約 45 kDa の CALHM1 シグナルが増強する一方, 約 40 kDa のシグナルが減弱していた。次に, この CALHM1 の分子量変化に關して, N-グ

リコシル化阻害剤であるツニカマイシンや N 型糖鎖を除去する PNGase F, アスパラギン結合ハイブリッド又は高マンノースオリゴ糖を切断する Endo H を用いて検証した。その結果, CALHM3 の存在は CALHM1 の N 型糖鎖の高マンノース型からハイブリット型/複合型へのプロセッシングを促進することが明らかとなった。さらに, 高マンノース型からハイブリット型/複合型へのプロセッシングを担う酵素の欠損細胞株である Lec1 細胞において CALHM1/3 の電位依存性活性化キネティクスの減速が観察された。また, N→Q 点変異体の解析から, CALHM1 と CALHM3 はそれぞれ N139 及び N142 に N 型糖鎖が付加されることが明らかになった。そこで, 各サブユニットが N-グリコシル化されることの意義を多角的に検証した。CALHM1NQ 変異体やツニカマイシン処理下ではチャンネルコンダクタンスが消失した一方, CALHM3NQ 変異体では電位依存性活性化キネティクスの減速が観察された。CALHM1NQ 変異体やツニカマイシン処理下でチャンネル機能が観察できなかった原因は, CALHM1 の細胞膜への局在が抑制されていることが原因であることが局在解析により明らかとなった。その原因として, CALHM1NQ 変異体でプロテアソームにおける MG132 感受性タンパク質分解が亢進している事が明らかとなり, CALHM1 生成の際の正しいフォールディングに N-グリコシル化が重要な役割を担うことが示唆された。以上の結果から, CALHM1/3 の各サブユニットにおける N-グリコシル化修飾の付与やそのプロセッシングがチャンネル形成から機能まで多様な制御に關与していることが解明された。

次に, CALHM3 が受ける S-パルミトイル化反応の可逆性を生化学的に検証し, CALHM3 の S-パルミトイル化反応は可逆的であることを明らかにした。次に, CALHM3 の C→S 変異体を用いてパルミトイル化部位を検証したところ, C99, C200, C204 が CALHM3 のパルミトイル化部位であることを見出した。次に, CALHM3 と 23 種類の DHHC パルミトイル化酵素を共発現させることで CALHM3 のパルミトイル化責任酵素候補を検証したところ, DHHC3 及び DHHC15 が CALHM3 のパルミトイル化レベルを増加させることを見出した。また, DHHC3 と 15 は CALHM3 と共免疫沈降すること, Dhhc3 及び 15 をノックダウンすることで CALHM3 のパルミトイル化レベルの低下を観察した。これらの結果は, DHHC3 と 15 が CALHM3 のパルミトイル化

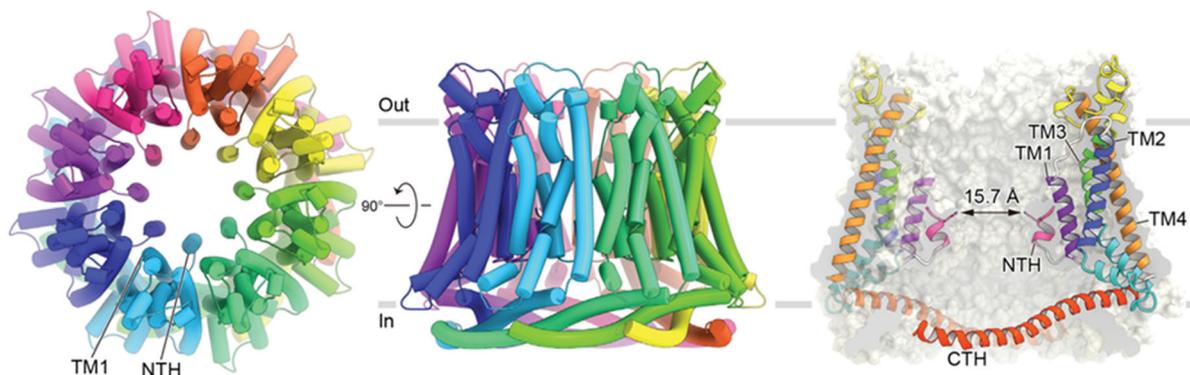


図 5. メダカ CALHM1 の立体構造

責任酵素であることを強く示唆している。

さらに、CALHM1/3 の機能発現における CALHM3 のパルミトイル化の意義をタンパク質の安定性、CALHM1 との多量体形成、細胞膜局在という観点で検証したところ、CALHM3 のパルミトイル化はそれらに対しては影響しなかった。しかし、野生型 CALHM1+野生型 CALHM3 に比べて野生型 CALHM1+CALHM3CS 変異体ではルシフェリルシフェラーゼ化学発光法を用いて測定される ATP の放出能が強く減弱していた。また、パッチクランプ全細胞電位固定法で、ATP 放出能の低下が膜コンダクタンスの低下によるものであることを確認した。以上の結果から、CALHM3 のパルミトイル化はチャネルの形成・細胞膜局在ではなく機能そのものを制御していることが明らかとなった。

以上の通り、CALHM1/3 チャネルの N-グリコシル化反応と S-パルミトイル化反応の性質及び機能発現における意義を解明した(図 6)。

3. 4. 塩味細胞の同定と、細胞内トランスダクション・神経伝達機構の解明

3. 4. 1. ENaC α 茸状乳頭味細胞の一部でアミロライド除去により活動電位が生じる

ENaC α -GCaMP3 マウスの茸状乳頭および有郭乳頭より単離した GCaMP3 蛍光を持つ味細胞 (ENaC α 細胞) に対して、セルアタッチモード・パッチクランプ法による活動電位記録及び GCaMP3 蛍光の測光による $[Ca^{2+}]_i$ イメージングの同時計測を行った(図 7A)。ここでは、2 mM Ba^{2+} に対して活動電位を生じる興奮性を持つ細胞を選択し、ENaC 再活性化を狙った細胞外アミロライドの急速除去

(アミロライド除去)、および細胞外酸性化 (pH6) の 2 つの刺激に対する細胞応答を計測した。その結果、有郭乳頭から単離した ENaC α 細胞ではアミロライド除去にตอบสนองせず pH6 に対して活動電位のバースト発火及びそれに伴う $[Ca^{2+}]_i$ 増加が見られた(図 7C, E)。一方で、茸状乳頭から単離した ENaC α 細胞では pH6 に対して応答を示さずに、アミロライド除去に対して活動電位バーストが見られた。しかしこの時、活動電位バーストに伴う $[Ca^{2+}]_i$ 増加は見られなかった(図 7B, D)。このことは、ENaC α 茸状乳頭味細胞が塩味細胞の有力な候補であることを示している。また、有郭乳頭 ENaC α 味細胞が酸味細胞らしき応答を示したことは、ENaC α 有郭乳頭味細胞が酸味細胞マーカー遺伝子を発現しているとする先行研究結果 (Chandrashekar et al., 2010) とも合致する結果であった。

3. 4. 2. ENaC を介した Na^+ 流入により活動電位が発生する

上記の活動電位記録・ $[Ca^{2+}]_i$ イメージングに引き続き、パッチクランプ記録を行っていたパッチ膜を破ってセルアタッチモードからホールセルモードに移行して細胞膜に存在するイオンチャネルコンダクタンスを詳細に解析した。すると、-80 mV に固定した ENaC α 茸状乳頭味細胞ではアミロライド除去によって素早く Na^+ 選択的内向き電流が生じたのに対し、ENaC α 有郭乳頭味細胞ではアミロライド感受性電流は観察できなかった。このように、ENaC α 茸状乳頭味細胞はアミロライド感受性 Na^+ 電流、すなわち ENaC 電流を有していることがわかり、これらの細胞には α サブユニットに加えて、ENaC を構成するのに必須の β 及び γ サブユニットも発現していることが示唆された。一方で、ENaC α 有郭乳頭味細胞では β もしくは γ サブユニットの

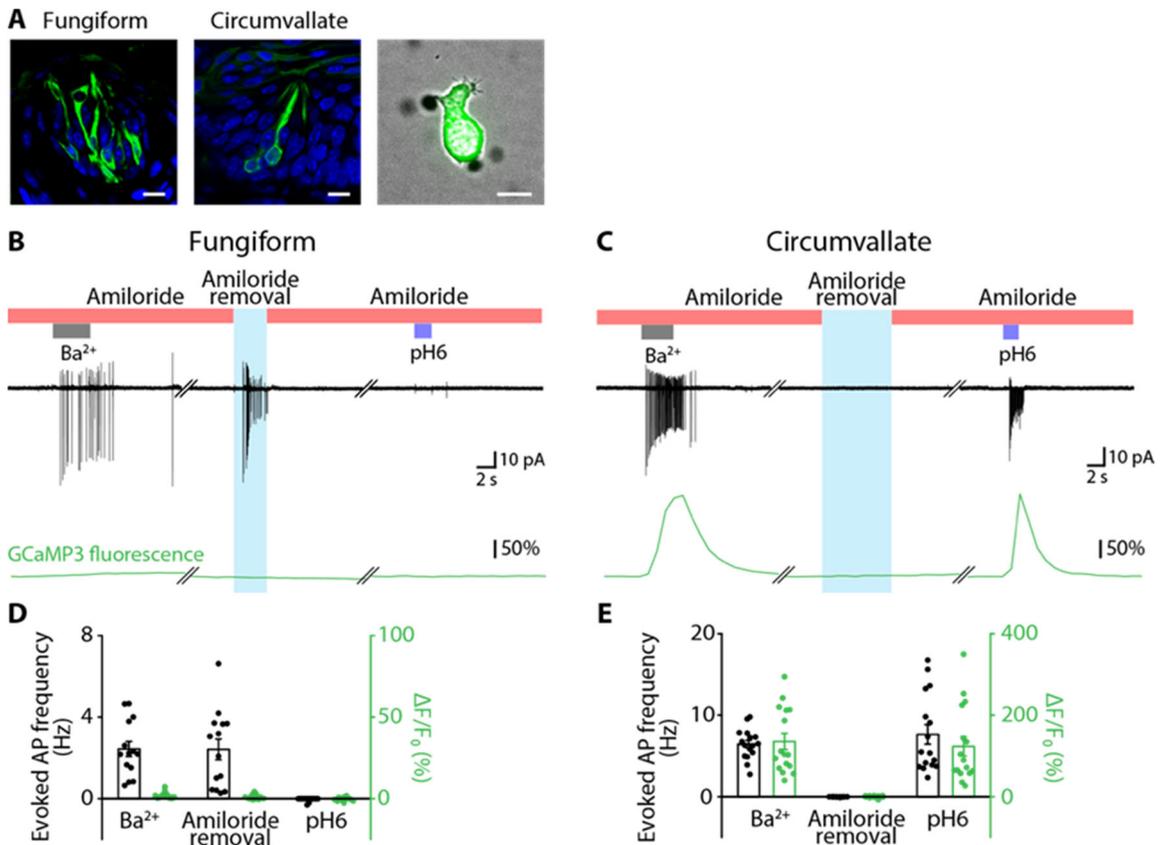
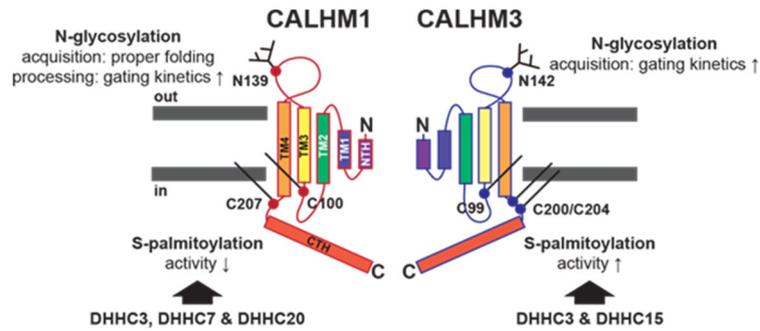


図 6. N-グリコシル化修飾と S-パルミトイル化修飾による CALHM1/3 チャンネルの機能制御機構

図 7. ENaCa-GCaMP3 細胞の単一細胞応答解析

発現が欠けていると考えられた。

さらに、ENaCa⁺茸状乳頭味細胞においてホールセル電流固定法による記録を行なったところ、ENaC を介した Na⁺流入によって生じる脱分極が活動電位を発生させるのに充分であった(図 8)。また、3.4.1.での結果と合わせて ENaCa⁺茸状乳頭味細胞が Na⁺流入に対して活動電位を生じる過程及びその結果において、細胞内 Ca²⁺シグナルの関与が見られないことも明らかとなった。

3. 4. 3. 茸状乳頭には ENaC と CALHM1/3 を共発現する興奮性細胞が存在する

続いて、電位依存性コンダクタンスを解析したところ、ENaCa⁺茸状乳頭味細胞には電位依存性 Na⁺(Nav)チャンネル電流に加えて、carbenoxolone 感受性電位依存性外向き電流が観察された。一方で、ENaCa⁺有郭乳頭味細胞は Nav チャンネル電流だけを持ち、外向き電流はみられなかった。

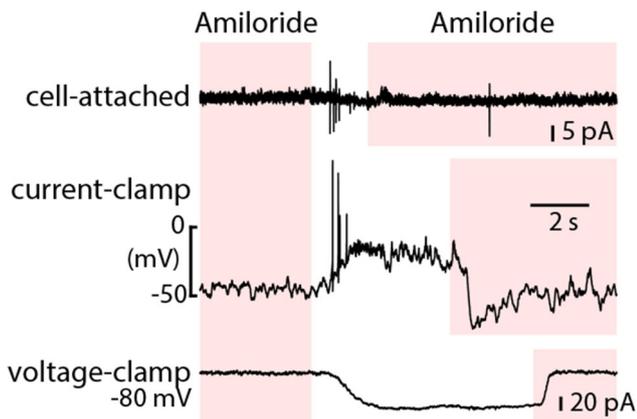


図 8. ENaC を介した Na⁺流入による活動電位の発生

ENaC⁺茸状乳頭味細胞の持つ carbenoxolone 感受性電位依存性外向き電流は、その薬剤感受性やゲート機構に甘味・苦味・うま味を受容する味細胞で我々が先行研究で発見した ATP 放出チャネル CALHM1/3 (Ma et al., 2018; Taruno et al., 2013b) の性質と共通点がみられたため、この細胞が CALHM1/3 チャネルを持つことが示唆された。そこで、CALHM3⁺細胞が tdTomato で、ENaC⁺細胞が GCaMP3 で標識された遺伝子改変マウス (*ENaCα-Cre::Rosa26^{GCaMP3/+}::Calhm3^{Tomato/Tomato}* マウス) を作製し、味蕾中で両遺伝子の発現パターンを組織学的解析を行なった。その結果、茸状乳頭味蕾において tdTomato と GCaMP3 の共発現、すなわち CALHM3 と ENaCα の共発現がみられた (約 55% の ENaC⁺細胞が CALHM3 を発現していた、図 9)。一方で、有郭乳頭では共発現はほとんど見られなかった。この結果は、ENaC⁺

茸状乳頭味細胞の持つ carbenoxolone 感受性電位依存性外向き電流が CALHM1/3 チャネルによるものである可能性を支持していた。

そこで、*Calhm3* KO マウスから単離した ENaC⁺茸状乳頭味細胞に対して 3.4.1. 及び 3.4.2. と同様の実験を行ったところ、Ba²⁺ で活動電位を生じる *Calhm3* KO ENaC⁺茸状乳頭味細胞はアミロライド除去によって活動電位を生じ、ENaC 及び Nav チャネル電流を持つものの、電位依存性外向き電流が完全に消失していた。以上の結果は茸状乳頭味蕾の中に ENaC, Nav, CALHM1/3 の 3 つのイオンチャネルを持つ細胞が存在することを示していた。

3. 4. 4. Nav や CALHM1/3 を持たず ENaC のみを発現する細胞が存在する

これまでの実験は、Ba²⁺ で活動電位を生じる電氣的興奮性を示す ENaC⁺細胞だけを対象にして行われてきた。そこで、ここでは興奮性などの前提条件なしに全ての ENaC⁺茸状乳頭味細胞でホールセルパッチクランプ記録を行なった。すると、およそ 60% の細胞が上記の ENaC, Nav, CALHM1/3 の 3 つのイオンチャネルを持つ細胞であった。さらに 10% 程度の細胞が ENaC だけを持ち Nav チャネル及び CALHM1/3 チャネルを持たない非興奮性の細胞が存在することが明らかとなった。残りの 30% は Nav チャネルを持つが ENaC も CALHM1/3 チャネルも持たなかった。このように、ENaC 電流は興奮性と非興奮性細胞という機能的に全く異なる 2 種類の細胞を持つことが明らかとなった。

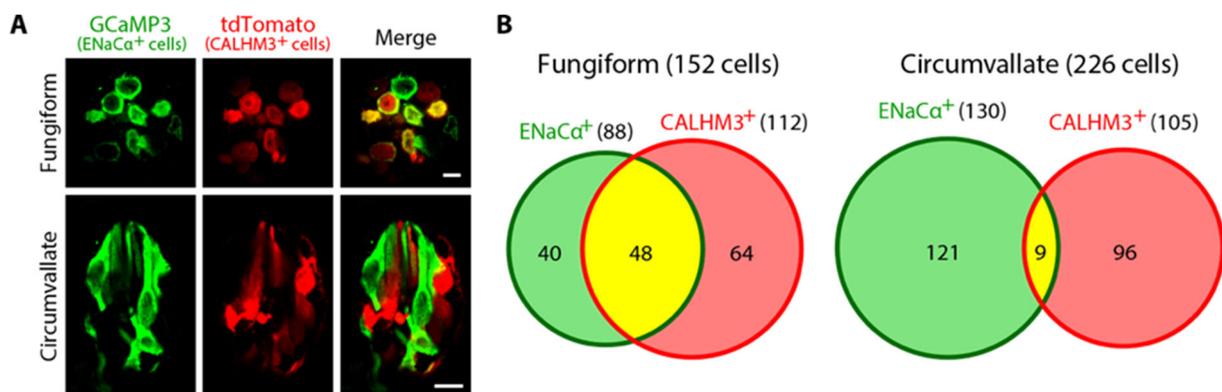


図 9. 茸状乳頭における ENaCα と CALHM3 の共発現

3. 4. 5. アミロライド感受性塩味は CALHM1/3 チャンネルシナプスが担う

ENaC をもつ興奮性細胞と非興奮性細胞, どちらがアミロライド感受性塩味を担っているのだろうか。これを明らかにするために, CALHM1⁺細胞において選択的に ENaC α が欠損したコンディショナル ENaC α ノックアウトマウス (ENaC α -cKO) を作製し, これらのマウスの味覚応答を解析した。コントロールマウスに対して ENaC-cKO マウスでは NaCl に対するアミロライド感受性鼓索神経応答が完全に消失し, リックテストで計測される NaCl に対する嗜好性行動も強く減弱していた (図 10)。一方で, ENaC-cKO マウスはその他の味質に対する鼓索神経応答や行動応答は全く正常であった。このことから, CALHM1/3 チャンネルを発現する興奮性を持つ ENaC α ⁺ 茸状乳頭味細胞がアミロライド感受性塩味を担う細胞, すなわち塩味細胞であることが示された。

さらに我々は, *Calhm3* KO マウスにおいても NaCl に対するアミロライド感受性鼓索神経応答および嗜好性行動が完全に消失していることを見出した。さらに, 超解像顕微鏡観察により, CALHM1 が塩味細胞において求心性

味神経とのシナプス部位に局在している事を明らかにした。これはチャンネルシナプスの構造的特徴の一つである (Kashio et al., 2019)。以上より, 甘味・苦味・うま味と同様に CALHM1/3 チャンネルシナプスが塩味の神経伝達を担っていることを強く示唆している。

以上の結果より, 数ある味蕾細胞のうち, ENaC と CALHM1/3 チャンネルを同時に発現するという特徴をもった細胞集団がアミロライド感受性塩味の受容を担当する細胞, すなわち塩味細胞であることを突き止めた。さらに, 塩味細胞が食塩に反応して活性化する仕組みを以下のように明らかにした。まず ENaC を介して細胞内に Na⁺が流入すると, Na⁺はプラスの電荷を帯びているためそれによって Nav チャンネルが活性化してさらなる Na⁺流入が起こる。この Nav チャンネルを介した Na⁺流入は塩味細胞に活動電位を発生させる。この活動電位に反応した CALHM1/3 チャンネルが神経伝達物質 ATP を放出し, 求心性味神経 (鼓索神経) を活性化させることで塩味を生じさせている (図 11)。本成果は原著論文として発表している (Nomura et al., 2020)

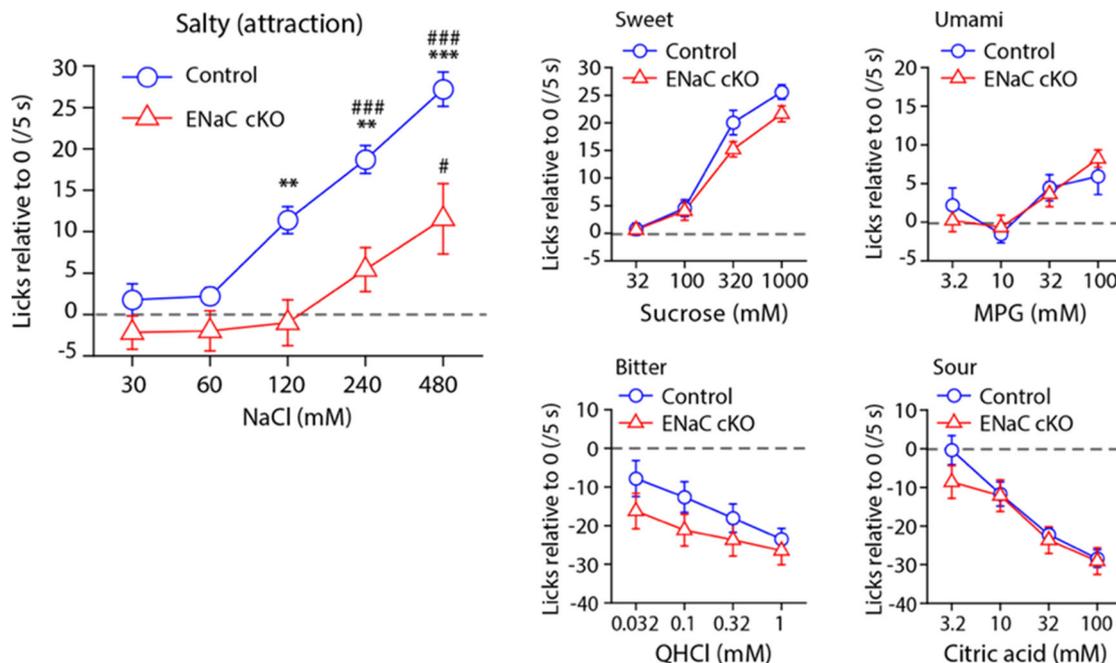


図 10. リックテストによる ENaC α -cKO マウスの味覚刺激に対する行動応答

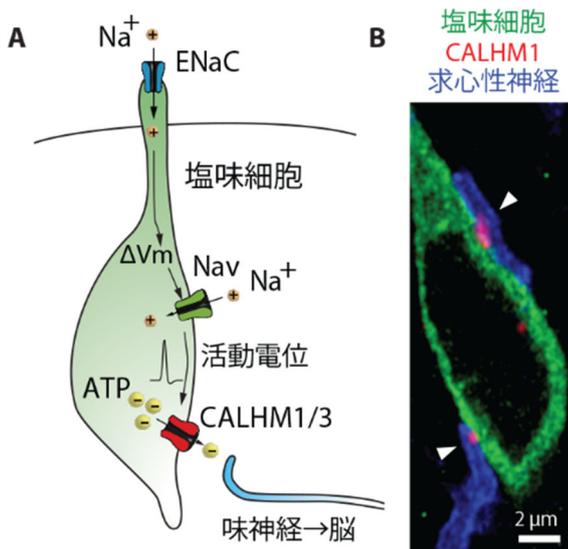


図 11. 塩味受容の細胞分子メカニズム(A)と塩味細胞の超解像顕微鏡写真(B)

4. 考察

以上の研究によって、舌における味覚センサー器官である味蕾におけるアミロライド感受性塩味受容の細胞分子機構の大部分を解明することができた (Kashio et al., 2019; Nomura et al., 2020; Okui et al., 2021)。塩味細胞の遺伝学的同定に始まり、センサー分子 ENaC の下流のシグナルトランスダクション、そして CALHM1/3 チャネルシナプスによる神経伝達ที่明らかとなった。さらに、特殊ミトコンドリアを巻き込んだチャネルシナプスの組織構造、さらに伝達物質 ATP の放出路である CALHM チャネルの構造および機能発現の制御機構までを明らかにすることができた。

あらゆる生物が生存のために有する基本的な感覚である塩味受容の細胞分子メカニズムの理解に向けて大きく前進することができた。最初にも述べた通り、本研究は科学的な知見に基づいた減塩戦略の開発による健康長寿社会の実現のために行ったものである。今回解明された食塩のおいしさの背景にあるしくみを標的とした食品開発や創薬研究が、近い未来、全く新しい塩味制御技術を創出するものと期待する。

5. 今後の課題

舌つまり末梢における塩味受容メカニズムが明らかとなった。我々の塩味体験の全容解明に向けては、末梢でつくられた塩味情報がどのようにして脳で処理され、嗜好や欲求を司る神経回路と結合しているかを明らかにすることが今後の課題である。

6. 文献

- Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D.A., Hummler, E., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2010). The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464, 297-301.
- Demura, K., Kusakizako, T., Shihoya, W., Hiraizumi, M., Nomura, K., Shimada, H., Yamashita, K., Nishizawa, T., Taruno, A., and Nureki, O. (2020). Cryo-EM structures of calcium homeostasis modulator channels in diverse oligomeric assemblies. *Sci Adv* 6, eaba8105.
- Heck, G.L., Mierson, S., and DeSimone, J.A. (1984). Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science* 223, 403-405.
- Kashio, M., Wei-Qi, G., Ohsaki, Y., Kido, M.A., and Taruno, A. (2019). CALHM1/CALHM3 channel is intrinsically sorted to the basolateral membrane of epithelial cells including taste cells. *Sci Rep* 9, 2681.
- Liman, E.R., Zhang, Y.V., and Montell, C. (2014). Peripheral coding of taste. *Neuron* 81, 984-1000.
- Ma, Z., Tanis, J.E., Taruno, A., and Foskett, J.K. (2016). Calcium homeostasis modulator (CALHM) ion channels. *Pflugers Arch* 468, 395-403.
- Ma, Z., Taruno, A., Ohmoto, M., Jyotaki, M., Lim, J.C., Miyazaki, H., Niisato, N., Marunaka, Y., Lee, R.J., Hoff, H., et al. (2018). CALHM3 Is Essential for Rapid Ion Channel-Mediated Purinergic Neurotransmission of GPCR-Mediated Tastes. *Neuron* 98, 547-561 e510.
- Nomura, K., Nakanishi, M., Ishidate, F., Iwata, K., and Taruno, A. (2020). All-Electrical Ca(2+)-Independent Signal Transduction Mediates Attractive Sodium Taste in Taste Buds. *Neuron* 106, 816-829 e816.
- Okui, M., Murakami, T., Sun, H., Ikeshita, C., Kanamura, N., and Taruno, A. (2021). Posttranslational regulation of CALHM1/3 channel: N-linked glycosylation and S-palmitoylation. *FASEB J* 35, e21527.
- Roper, S.D., and Chaudhari, N. (2017). Taste buds: cells, signals and synapses. *Nat Rev Neurosci* 18, 485-497.

11. Siebert, A.P., Ma, Z., Grevet, J.D., Demuro, A., Parker, I., and Foskett, J.K. (2013). Structural and Functional Similarities of Calcium Homeostasis Modulator 1 (CALHM1) Ion Channel with Connexins, Pannexins, and Innexins. *J Biol Chem* 288, 6140-6153.
 12. Taruno, A. (2018). ATP Release Channels. *Int J Mol Sci* 19.
 13. Taruno, A., Matsumoto, I., Ma, Z., Marambaud, P., and Foskett, J.K. (2013a). How do taste cells lacking synapses mediate neurotransmission? CALHM1, a voltage-gated ATP channel. *Bioessays* 35, 1111-1118.
 14. Taruno, A., Nomura, K., Kusakizako, T., Ma, Z., Nureki, O., and Foskett, J.K. (2021). Taste transduction and channel synapses in taste buds. *Pflugers Arch* 473, 3-13.
 15. Taruno, A., Sun, H., Nakajo, K., Murakami, T., Ohsaki, Y., Kido, M.A., Ono, F., and Marunaka, Y. (2017). Post-translational palmitoylation controls the voltage gating and lipid raft association of the CALHM1 channel. *J Physiol* 595, 6121-6145.
 16. Taruno, A., Vingtdoux, V., Ohmoto, M., Ma, Z., Dvoryanchikov, G., Li, A., Adrien, L., Zhao, H., Leung, S., Abernethy, M., *et al.* (2013b). CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature* 495, 223-226.
7. 論文業績および学会発表
(*責任著者, #共同筆頭著者を示す)
7. 1. 英文原著論文
 1. Okui, M., Murakami, T., Sun, H., Ikeshita, C., Kanamura, N., and Taruno, A.*. (2021). Posttranslational regulation of CALHM1/3 channel: N-linked glycosylation and S-palmitoylation. *FASEB J* 35, e21527.
 2. Nomura, K., Nakanishi, M., Ishidate, F., Iwata, K., and Taruno, A.*#. (2020). All-Electrical Ca(2+)-Independent Signal Transduction Mediates Attractive Sodium Taste in Taste Buds. *Neuron* 106, 816-829 e816.
 3. Demura, K., Kusakizako, T., Shihoya, W., Hiraizumi, M., Nomura, K., Shimada, H., Yamashita, K., Nishizawa, T., Taruno, A.*, and Nureki, O. (2020). Cryo-EM structures of calcium homeostasis modulator channels in diverse oligomeric assemblies. *Sci Adv* 6, eaba8105.
 4. Kashio, M., Wei-Qi, G., Ohsaki, Y., Kido, M.A., and Taruno, A.*. (2019). CALHM1/CALHM3 channel is intrinsically sorted to the basolateral membrane of epithelial cells including taste cells. *Sci Rep* 9, 2681.
 7. 2. 英文総説論文
 1. Taruno, A.*, Nomura, K., Kusakizako, T., Ma, Z., Nureki, O., and Foskett, J.K. (2021). Taste transduction and channel synapses in taste buds. *Pflugers Arch* 473, 3-13.
 7. 3. 和文著書
 1. 樽野陽幸. 味覚の受容 高田明和編, 摂食と健康の科学, 朝倉書店; 15-41, 2020.
 7. 4. 和文総説論文
 1. 樽野陽幸. 味覚受容の分子メカニズム. *Clinical Neuroscience* 39(2); 159-162, 2021.
 2. 樽野陽幸. 味覚を担う第2の化学シナプス「チャンネルシナプス」. *Clinical Neuroscience* 39(1); 112-113, 2021.
 3. 樽野陽幸. 味蕾における味覚受容メカニズム. *嚥下医学* 8(2); 178-181, 2019.
 4. 樽野陽幸. 味覚系特殊イオンチャンネルシナプス. *京都府立医科大学雑誌* 128(9); 637-643, 2019.
 5. 樽野陽幸. 塩味の受容とそのメカニズムについて. *日本味と匂学会誌* 25; 79-82, 2018.
 7. 5. 学会発表

国際シンポジウム

 1. Taruno A. Salt-responsive Cells – A Unique Cell Type? The 42nd Annual Meeting of the Association for Chemoreception Sciences. 2021 Apr 19-23; Online, USA.
 2. Taruno A. All-electrical signal transduction and “channel synapses” mediate sodium taste. The 18th International Symposium on Olfaction and Taste. 2020 Jun 5-9; Portland, OR, USA.
 3. Taruno A. Cells and transduction of sodium taste at the periphery. The 18th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception. 2019 Nov 2-3; Fukuoka.

- 4 Taruno A, Ma Z, Ohmoto M, Matsumoto I, Kido MA, Tordoff MG, Foskett JK. Ion channel synapses of the taste bud. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress (in conjunction with the 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan). 2019 Mar 28-31; Kobe.
- 5 Taruno A, Ma Z, Ohmoto M, Matsumoto I, Kido MA, Tordoff MG, Foskett JK. CALHMs: Fast-activating voltage-gated ATP channels for rapid purinergic neurotransmission. The 49th National Institute of Physiological Sciences International Symposium “Ion channels: looking back, seeing ahead”. 2018 Dec 5-8; Okazaki.
- 6 Taruno A, Ma Z, Ohmoto M, Matsumoto I, Kido MA, Tordoff MG, Foskett JK. Ion channel synapses of the taste bud. The 17th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception. 2018 Nov 30- Dec 2; Fukuoka.
- 5 Taruno A. All-electrical signal transduction and “channel synapses” mediate sodium taste. 第5回食欲・食嗜好研究会. 2020 Sep 5; 岡崎(オンライン).
- 6 Taruno A. All-electrical signal transduction and “channel synapses” mediate sodium taste. 第43回日本神経科学大会. 2020 July 29- Aug 1; 神戸.
- 7 Taruno A. 味覚系特殊イオンチャネルシナプスの構造と分子機構. 第3回感覚器研究イニシアチブ・シンポジウム「感覚と脳-基礎から臨床へ-」. 2019 Apr 6; 東京.
- 8 Taruno A, Ma Z, Ohmoto M, Matsumoto I, Tordoff MG, Foskett JK. Ion channel synapses in taste buds. 第52回日本味と匂学会大会. 2018 Oct 29-31; さいたま.
- 9 Taruno A. Taste cells lacking synapses open a wide pore channel for rapid neurotransmission of tastes. 第56回日本生物物理学会年会. 2018 Sep 15-17; 岡山.
- 10 Taruno A. イオンチャネルから味覚へ(研究奨励賞受賞講演). 第52回日本味と匂学会大会. 2018 Oct 29-31; さいたま.
- 11 Taruno A, Ma Z, Matsumoto I, Tordoff MG, Foskett JK. CALHM1/3, a novel voltage-gated ATP-permeable channel, mediates action potential dependent rapid purinergic neurotransmission of tastes. 第41回日本神経科学大会. 2018 July 26-29; 神戸.
- 12 樽野陽幸. 塩味の受容とそのメカニズムについて. うま味研究会公開シンポジウム. 2018 Jun 29; 東京.
- 13 Taruno A, Ma Z, Ohmoto M, Matsumoto I, Tordoff MG, Foskett JK, Marunaka Y. A CALHM1/CALHM3 heteromeric channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter, and umami tastes. 第95回日本生理学会大会. 2018 Mar 26-28; 高松.

国内シンポジウム

- 1 Taruno A. Cellular and molecular mechanisms underlying sodium taste in taste buds. 第98回日本生理学会大会. 2021 Mar 29; 名古屋(オンライン).
- 2 Taruno A. 味覚神経伝達を担う“チャネルシナプス”の構造と機能. 自然科学研究機構 ネットワーク型研究加速事業 生理研プロジェクト「機能タンパク質の構造と機能のダイナミクスと、それに基づく細胞・生体システム作動機構の研究拠点の形成」シンポジウム. 2021 Mar 17; 岡崎(オンライン).
- 3 Taruno A. 塩味受容の細胞と分子のメカニズム -チャネルシナプスの構造と生理-. 日本味と匂学会第54回大会. 2020 Oct 22; 柏(オンライン).
- 4 Taruno A. Transduction and coding of sodium taste in taste buds. 生理学研究所研究会「イオンチャネルと生体膜のダイナミクス: 構造生物学の先にあるもの」. 2020 Oct 6; 岡崎(オンライン).

Amiloride-Sensitive Salt-Sensing Mechanism in Taste Buds

Akiyuki Taruno

Department of Molecular Cell Physiology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Summary

Sodium taste promotes salt ingestion by mediating attraction to sodium salts, and excessive dietary sodium intake has been linked to elevated blood pressure. Thus, understanding the mechanisms of the perception of sodium taste is important to devise strategies to reduce salt consumption. The amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel (ENaC) has been identified as the Na⁺ sensor in taste cells dedicated to sodium taste, a.k.a. sodium cells. However, the identity of sodium cells and their intracellular signal transduction cascade downstream of ENaC, including the involvement of action potentials and Ca²⁺ signals and neurotransmission mechanism, have remained unknown. Therefore, we continue to lack understanding of the cellular and molecular basis of the peripheral perception of sodium taste. In this study, we have discovered the identity of sodium cells and elucidated the underlying mechanism of sodium sensing in taste buds. We demonstrate that a subpopulation of taste cells expressing ENaC generate action potentials in response to Na⁺ influx through ENaC, and possess a channel synapse with afferent gustatory neurons involving CALHM1/3, a voltage-gated neurotransmitter-release channel. Furthermore, conditional knockout of ENaC in CALHM1-expressing cells and conventional *Calhm3* knockout in mice negate the animals' ability to perceive sodium taste. In summary, cells expressing ENaC and CALHM1/3 constitute sodium cells, in which the entry of Na⁺ induces depolarization for action potential discharge driving voltage-dependent neurotransmitter release via the CALHM1/3-dependent channel synapse. We also revealed the structures of the channel synapse and CALHM channels, further deepening our understanding of sodium taste mechanisms.

慢性腎臓病における ENaC の不適切な活性化が食塩感受性高血圧、 血圧日内リズム変化に及ぼす影響

柿添 豊

熊本大学大学院生命科学研究部腎臓内科学講座

概要

(背景)我が国では成人の 8 人に 1 人が慢性腎臓病 (CKD) と報告され、CKD は透析導入のみならず、心血管病 (CVD)・死亡のリスク因子でもあり、特に蛋白尿を呈する場合はリスクが飛躍的に高まる。進行した糖尿病性腎症のように高度蛋白尿を伴う疾患では、治療抵抗性の食塩感受性高血圧・浮腫を呈することが多い。上皮型 Na チャネル (ENaC) は腎集合尿細管で体内の Na バランスを調節しており、 γ subunit がセリンプロテアーゼ (SP) により切断され活性化されるが、慢性腎臓病 (CKD) では、尿蛋白に伴い障害糸球体から漏出した血液中の SP が、尿細管管腔内でアルドステロン非依存的に ENaC を活性化することが高血圧・浮腫の一因と報告されている。本研究の目的は、蛋白尿を伴う CKD において、SP による ENaC 活性化機序を解明し、SP や ENaC を標的とした新規降圧療法の開発を行い、最終的に CKD 患者の末期腎不全への進行および CVD イベントの抑制に繋げることである。

(方法)5 週齢の Dahl 食塩感受性 (DS) ラットを、0.3% NaCl 食 (NS)、8.0% NaCl 食 (HS)、HS+ SP 阻害薬メシル酸カモスタット投与 (0.1% 混餌投与、HS+CM) の 3 群に分け、経時的に収縮期血圧、24 時間蓄尿を行い、5 週後に sacrifice した。尿蛋白量、尿中 SP 排泄・活性、さらに経時的な尿エクソソーム ENaC γ subunit の活性化を評価した。次に、SP・プラスミンの影響を調べるために、DS ラットに対してプラスミン阻害薬であるトラネキサム酸 (TA, 0.5 mg/ml 飲水投与) および YO-2 (4 mg/kg/day 腹腔内投与) を投与し、降圧・腎保護効果を検討した。最後に、高血圧と蛋白尿を呈する CKD 患者の尿中 SP を評価した。

(結果)食塩負荷 DS ラットは経時的な血圧上昇と尿蛋白の増加を呈し、1 週間後より尿中プラスミノゲン/プラスミンおよびプロスタシンの排泄亢進、プラスミンの活性化を認め、尿エクソソームの ENaC γ の排泄亢進・SP による活性化を認めた。これらの変化は CM により抑制された。TA は尿中 SP、高血圧および蛋白尿の改善効果を有しなかったが、YO-2 は CM と同様に尿中 SP 変化と ENaC γ の活性化を抑制し、降圧・腎保護効果を発揮した。また、CKD 患者の尿中 SP は DS ラットと同様に活性化・排泄亢進を認めた。

(考察・結論)CKD では蛋白尿が増加するにつれ尿中 SP と ENaC γ の活性化を伴う食塩感受性高血圧を認め、これらの変化は CM と YO-2 で抑制されたことから、プラスミンを主とする SP の酵素活性が病態に関与していると考えられた。CKD 患者の尿中においても同様の SP 変化を認めており、SP-ENaC の系を標的とした新規降圧・腎保護治療の可能性が示唆された。

1. 研究の背景と目的

わが国では成人の 8 人に 1 人は慢性腎臓病 (CKD) を有していると推測されており、慢性透析患者数は未だに増加を続けており 2019 年末に 34.5 万人を超えた。さらに

CKD は透析導入のみならず脳心血管病 (CVD)・死亡とも密接に関与するリスク因子であり、CKD 進行抑制は国民の健康維持と医療費抑制の点で重要な課題である。特に蛋白尿を呈する CKD ではリスクが飛躍的に高まることが

知られている⁽¹⁾。進行した糖尿病性腎症のようにネフローゼ症候群レベルの高度蛋白尿を伴う疾患では複数の降圧薬を使用しても降圧目標に到達しない治療抵抗性の高血圧と浮腫・体液貯留を呈することが多い。このような患者は入院による減塩食で高血圧と浮腫が改善し、しばしば降圧・利尿薬を大幅に減量することができる。このような蛋白尿を呈する CKD に伴う食塩感受性高血圧の機序解明と新たな治療戦略は、CKD 患者の予後改善にとって重要な課題である。

上皮型 Na チャネル (ENaC) は腎集合尿管で体内の Na バランスを最終的に調節しており、 $\alpha\beta\gamma$ の 3 つの subunit がヘテロ 3 量体を構成して機能している。1997 年に ENaC がセリンプロテアーゼにより活性調節を受けることが報告され⁽²⁾、その後の検討により γ subunit が細胞外のセリンプロテアーゼ (SP) により切断され、活性阻害ペプチドが除去されることがチャネルの活性化に重要と考えられている⁽³⁾。この系は生理的には主にアルドステロンによって調整されており、アルドステロンにより誘導された細胞外 SP・プロスタシンやカリクレインが ENaC を切断・活性化すると報告されている⁽³⁾。一方で、高度蛋白尿を呈する CKD では、障害された糸球体から漏出した循環血液中のプラスミノゲンが尿細管管腔内で uPA (urokinase type plasminogen activator) により SP・プラスミンへと変換され、アルドステロン非依存的に ENaC を活性化することが高血圧・浮腫の一因と報告されており、血圧の上昇はさらに尿蛋白を増加させ、ENaC 活性化が亢進するという悪循環を招く⁽⁴⁾。私達はネフローゼを呈する Dahl 食塩感受性高血圧ラットで尿中 SP・プロスタシン排泄亢進と ENaC の活性化が亢進し、ENaC 阻害薬アミロライドや合成 SP 阻害薬メシル酸カモスタットが高血圧と腎障害を抑制することを報告した^(5,6)。また CKD では予後不良の non-dipper 型高血圧が多いことが報告されている^(7,8)。以上のことから、蛋白尿を伴う CKD の CVD イベント増加は、尿中 SP による過剰な ENaC 活性化によって血圧上昇や血圧日内リズムの変化が生じることが一因と推測できる。これまで尿蛋白中のプラスミン、プロスタシン、uPA、カリクレイン等が ENaC 活性化の候補 SP として挙げられているが⁽⁴⁾、病態に関与する真の SP は明らかになっておらず、さらなる検討が必要であった。

本研究の目的は、蛋白尿を伴う CKD において、SP による ENaC 活性化機序を解明し、SP や ENaC を標的とし

た新規降圧療法の開発を行い、最終的に CKD 患者の末期腎不全への進行および CVD イベント・死亡の抑制に繋げることである。

2. 研究方法

2.1 食塩感受性高血圧ラットにおいて尿中 SP による ENaC 活性化が高血圧に及ぼす影響と SP 阻害薬の降圧効果の検討

Dahl 食塩感受性 (DS) ラットでは食塩負荷により高血圧と高度の蛋白尿を呈するが、この際に尿中の SP・プロスタシン排泄亢進と ENaC の活性化を伴うことを報告している⁽⁶⁾。しかし、これまでは経時的な尿中 SP と ENaC 活性化の変化や、他の SP の関与については検討できていなかった。

5 週齢の DS ラットを、0.3% NaCl 食 (NS), 8.0% NaCl 食 (HS), HS+SP 阻害薬メシル酸カモスタット投与 (0.1% 混餌投与, HS+CM) の 3 群に分け、経時的に収縮期血圧、24 時間蓄尿を行い、5 週後に sacrifice した。尿蛋白は 1 日尿蛋白定量および銀染色により評価した。各種 Na 輸送体および関連分子の発現量を real-time PCR で評価した。尿中 SP 活性は SP 特異的な合成基質を使用した double layer fluorescent zymography (DLFZ) 法で観察した⁽⁹⁾。また尿中のプラスミノゲン/プラスミン、プロスタシン排泄の変化を Western blotting (WB) で評価した。さらに経時的な ENaC subunit の活性化を評価するため、尿エクソソームを用いて Western blotting を行った。尿エクソソームは ExoQuick-TC (System Biosciences) を用いて回収し、尿クレアチニン補正したエクソソーム蛋白を WB に使用した。

2.2 食塩感受性高血圧ラットにおいて SP 阻害薬による糸球体保護効果の検討

CM はその降圧効果に先行して著明な尿蛋白減少効果を発揮したため、上記の DS ラットのサンプルを使用し糸球体障害を評価した。PAS (periodic acid Schiff) 染色による糸球体硬化の評価、WT-1 蛍光免疫染色による糸球体上皮細胞 (ポドサイト) 障害の評価、TUNEL 染色による糸球体内アポトーシスの評価および各種腎障害マーカーの mRNA 発現を real-time PCR で評価した。

2.3 食塩感受性高血圧ラットにおけるトラネキサム酸の降圧・腎保護効果の検討

本研究において、食塩負荷 DS ラットの尿中でプラスミノゲン/プラスミンの排泄亢進を認め、また糸球体にプラスミノゲン/プラスミンの沈着を認めたため、プラスミンの病

態への関与を検証するためプラスミン阻害薬を用いて検討を行った。まず、臨床でも使用されているプラスミン阻害薬であるトラネキサム酸(TA)を使用した。

5週齢のDSラットを、8.0% NaCl食(HS)、HS+トラネキサム酸(0.5 mg/ml 飲水投与, HS+TA)の2群に分け、経時的に収縮期血圧、24時間蓄尿を行い、5週後にsacrificeした。尿中のプラスミノゲン/プラスミン、プロスタシンをDLFZ法とWBで評価した。

2.4 食塩感受性高血圧ラットにおけるプラスミン阻害薬YO-2の降圧・腎保護効果の検討

次にプラスミン特異的に酵素活性阻害作用をもつ合成プラスミン阻害薬YO-2(神戸学院大学薬学部 津田裕子教授より分与)を用いて検討を行った⁽¹⁰⁾。

5週齢のDSラットを、0.3% NaCl食(NS)、8.0% NaCl食(HS)、HS+プラスミン阻害薬YO-2(4 mg/kg/day 連日腹腔内投与, HS+YO-2)の3群に分け、経時的に収縮期血圧、24時間蓄尿を行い、5週後にsacrificeした。尿中のプラスミノゲン/プラスミン、プロスタシンをDLFZ法とWBで評価した。尿エクソソーム中のENaC γ をWestern blottingで評価した。また、YO-2の腎保護作用を、2.1.1と同様に評価した。

2.5 アルドステロン負荷マウスにおけるSP阻害薬と尿細管特異的プロスタシンKOの効果

C57BL/6Jに浸透圧ポンプを用いてアルドステロン(40 μ g/day, 浸透圧ポンプ)およびCM(90 mg/kg/day, 皮下徐放ペレット)を持続皮下投与し、アルドステロンによる尿中プロスタシン排泄とENaC γ の活性化、これらに対するCM

の効果の評価した。さらにドキシサイクリン誘導性に腎尿細管にCreリコンビナーゼを発現するPax-8/LC-1のシステムを用いて尿細管プロスタシンKOマウスを作製し⁽¹¹⁾、尿細管プロスタシンのアルドステロン投与によるENaC γ 活性化への影響を評価した。

2.6 アドリアマイシン投与マウスにおける尿中SPおよびENaC γ 活性化の評価

マウス(C57BL/6J, BALB/c)の尾静脈よりアドリアマイシン10 mg/kgを単回投与し、蛋白尿を伴うCKDモデルマウスを作製した。経時的に24時間蓄尿を行い、尿蛋白排泄、尿中SP活性、尿中プラスミノゲン/プラスミンおよびプロスタシンの排泄を評価した。

2.7 高血圧と蛋白尿を呈するCKD患者尿中のSP評価

熊本大学病院の倫理委員会承認後に腎臓内科外来通院中の蛋白尿と高血圧を伴うCKD患者の尿を採取し、尿中SP活性・排泄量をDLFZ法とWBで評価を行った。

3. 研究結果

3.1 食塩感受性高血圧ラットにおいて尿中SPによるENaC γ 活性化が高血圧に及ぼす影響とSP阻害薬の降圧効果の検討

NS, HS, HS+CMの3群で体重と食餌摂取量に差を認めなかった。HSとHS+CM群では同程度に尿量が増加し、食塩負荷により血液中のアルドステロンは同等に抑制されていた。HS群では経時的に血圧上昇と尿蛋白の増加を認めた(Fig. 1)。real-time PCRでは、食塩負荷によりENaC γ のmRNA発現亢進を認めたが、他の主たるNa輸送体および関連分子の発現量に変化は認めなかった(Fig. 2)。

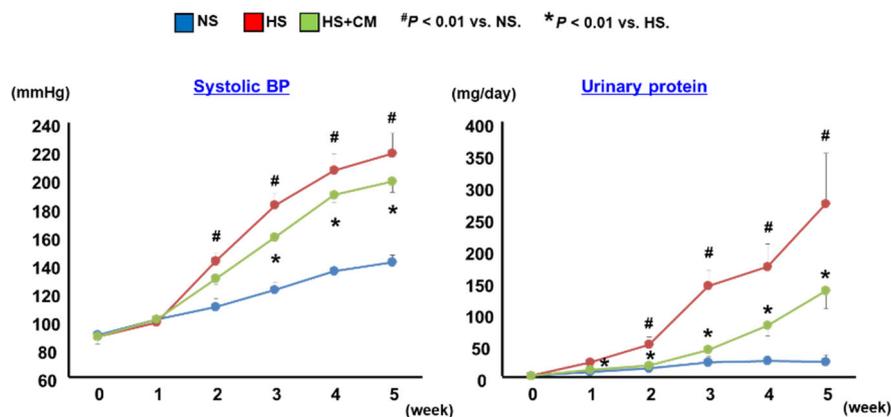


Fig. 1 The effect of camostat on blood pressure and urinary protein excretion in DS rats with HS diet

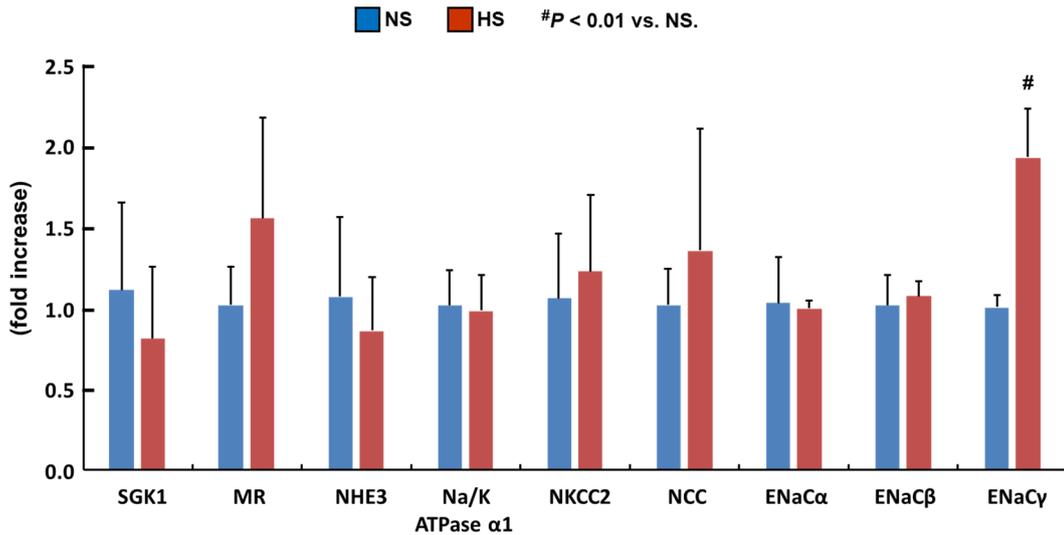


Fig. 2 The effects of HS diet on mRNA expression of sodium transporters and related-molecules in the kidney of DS rats

尿の銀染色でも、経時的な尿蛋白排泄の増加を認めた。また、食塩負荷 1~2 週後より尿中プラスミノゲン/プラスミンおよびプロスタシンの排泄亢進、ザイモグラフィーではプラスミンの活性化を認めた(先行実験の WB でプラスミンであることを確認済)(Fig. 3)。

腎集合尿細管で活性化された ENaC は Nedd-4 によりユビキチン化されプロテオソームにおいて分解されるが、一部は尿エクソソーム中に排泄されるため、尿サンプルを用いて ENaC の活性化を評価する手法が報告されている⁽¹²⁾。

尿エクソソームを回収し、ENaCγの WB を行うと、尿蛋白排泄・尿中 SP 活性が亢進する後半に ENaCγの排泄亢進を認め、さらに SP による活性型のバンドを検出した(Fig. 3)。HS+CM 群では収縮期血圧の上昇および尿蛋白排泄が抑制されていた(Fig. 1)。さらに CM により尿中プラスミン活性、尿プラスミノゲン/プラスミンおよびプロスタシン排泄が抑制され、HS によって誘導された尿エクソソーム中の ENaCγの活性化も抑制されていた(Fig. 4)

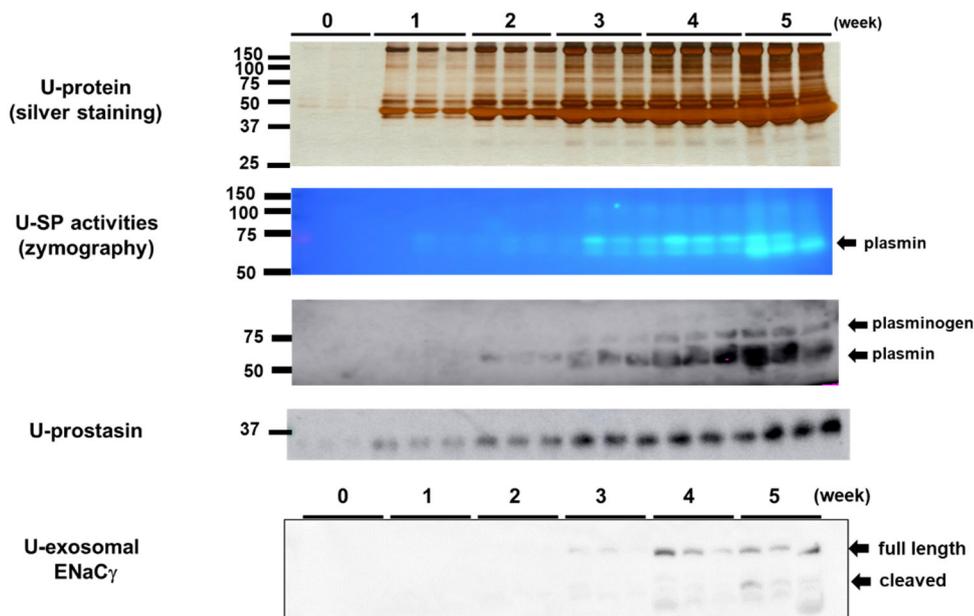


Fig. 3 The effects of HS diet on urinary SPs and exosomal ENaCγ in DS rats

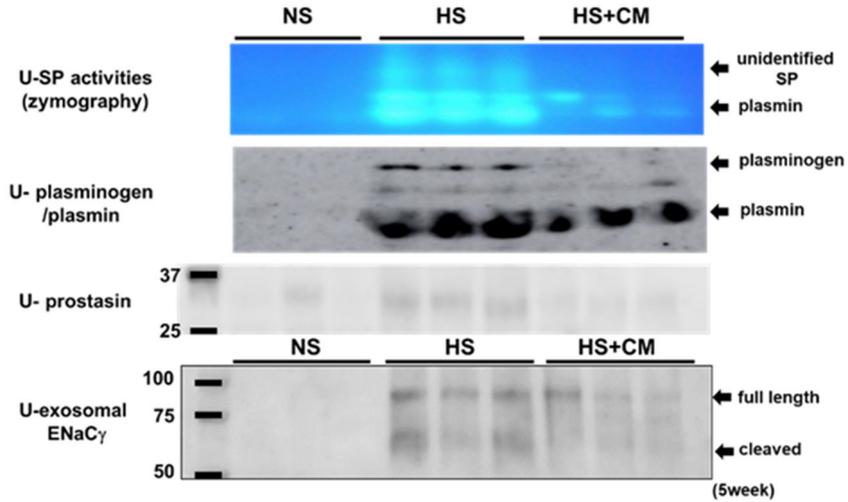


Fig. 4 The effects of camostat on urinary SPs and exosomal ENaCγ in DS rats with HS diet

3. 2 食塩感受性高血圧ラットにおいて SP 阻害薬による糸球体保護効果の検討

CM はこれまでの当教室の報告と同様に降圧効果に先行して尿蛋白を著明に減少させており^(6, 13), セリンプロテアーゼは ENaC 活性化による高血圧以外の作用で糸球体障害を誘導していると考えられた。近年, 障害糸球体から漏出したプラスミンが糸球体上皮細胞を直接障害するとの報告もあり⁽¹⁴⁾, 糸球体障害について評価を行った。HS 群の糸球体では蛍光免疫染色でプラスミノゲン/プラスミン

の沈着が確認できた。また PAS 染色では糸球体硬化像を認め, ポドサイトのマーカーである WT-1 が減少していた。CM 投与群ではこれらの変化が抑制されていた (**Fig. 5**)。CM による糸球体上皮細胞保護効果の機序を解明するため, アポトーシスと腎障害マーカーの評価を行った。CM は HS による糸球体内のアポトーシス細胞増加, 腎組織中の cleaved caspase-3 の亢進, IL-1β, TNF-α, Fas, Fibronectin 等の腎障害マーカーの mRNA 発現亢進を抑制した (**Fig. 6**)。

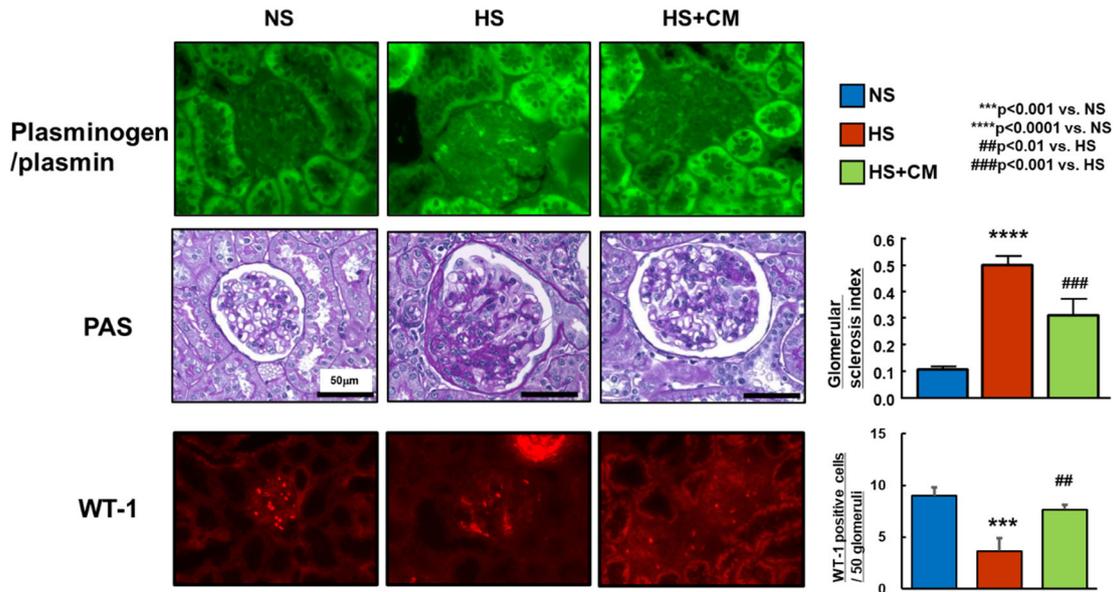


Fig. 5 The effects of camostat on glomerular plasminogen/plasmin, glomerular sclerosis, and kidney injury markers in DS rats with HS diet

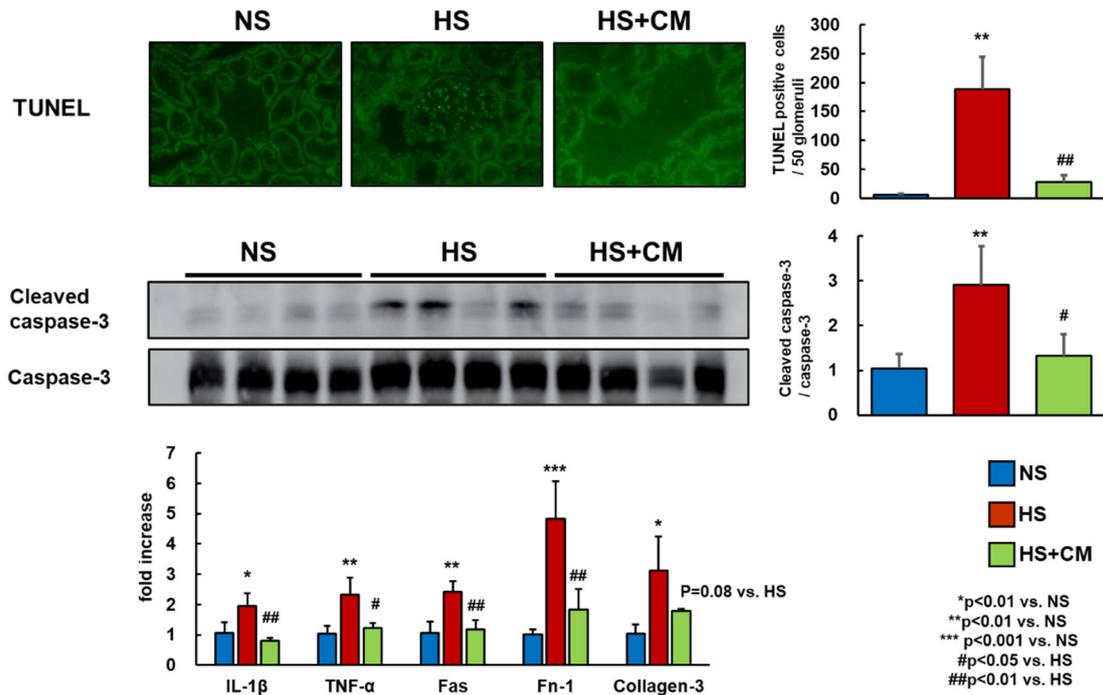


Fig. 6 The effects of camostat on renal apoptosis in DS rats with HS diet

3. 3 食塩感受性高血圧ラットにおけるプラスミン阻害薬 トラネキサム酸の降圧・腎保護効果の検討

トラネキサム酸の飲水投与は、HS 群で上昇・増加した収縮期血圧、1 日尿蛋白量、尿中プラスミン活性・排泄、尿中プロスタシン排泄に影響を及ぼさなかった (Fig. 7)。

3. 4 食塩感受性高血圧ラットにおける合成プラスミン阻 害薬 YO-2 の降圧・腎保護効果の検討

合成プラスミン阻害薬 YO-2 は HS による収縮期血圧の

上昇と尿蛋白排泄亢進を抑制し、腎重量の増加、血清 K の低下も有意に抑制した (Fig. 8)。また CM と同様に、HS による尿中プラスミン活性化、尿プラスミノゲン/プラスミン排泄、尿エクソソーム中の ENaCγ の活性化を抑制した (Fig. 9)。さらに YO-2 は CM と同様に HS による糸球体硬化、ポドサイト (WT-1) の減少、糸球体内のアポトーシス細胞増加、腎組織中の cleaved caspase-3 の亢進、腎障害マーカーの mRNA 発現亢進を抑制した (Fig. 10-11)

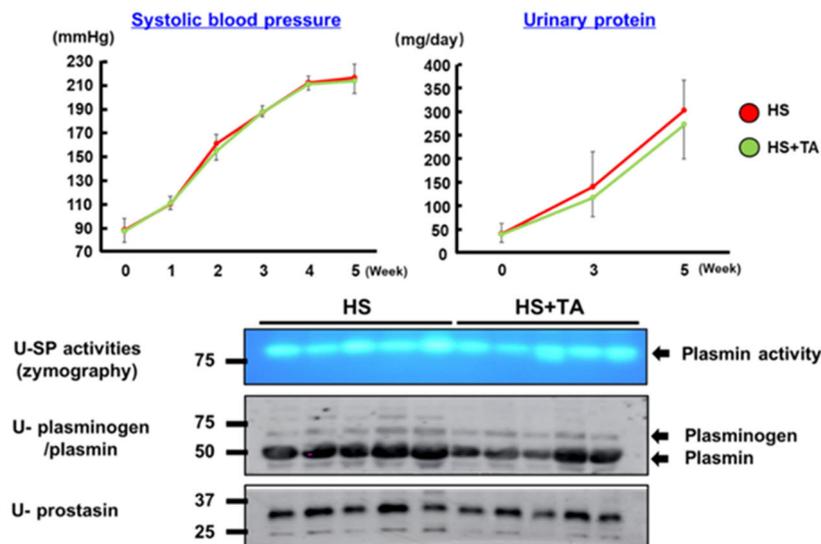


Fig. 7 The effects of Tranexamic acid in DS rats with HS diet

	NS	HS	HS+YO-2
BW (g)	276 ± 18	250 ± 16	250 ± 23
Kid Wt/BW (mg/g)	8.4 ± 0.5	11.8 ± 0.7 #	10.9 ± 0.7 *
BUN (mg/dL)	17.9 ± 0.9	25.8 ± 3.5 #	28.4 ± 2.0
Cr (mg/dL)	0.28 ± 0.03	0.36 ± 0.08 #	0.35 ± 0.07
Na (mEq/L)	144.3 ± 2.1	148.9 ± 1.1 #	147.6 ± 1.2
Cl (mEq/L)	99.3 ± 2.8	101.3 ± 2.4	100.9 ± 2.9
K (mEq/L)	3.8 ± 0.2	3.5 ± 0.3 #	3.8 ± 0.2 *

$P < 0.05$ vs. NS.

* $P < 0.05$ vs. HS.

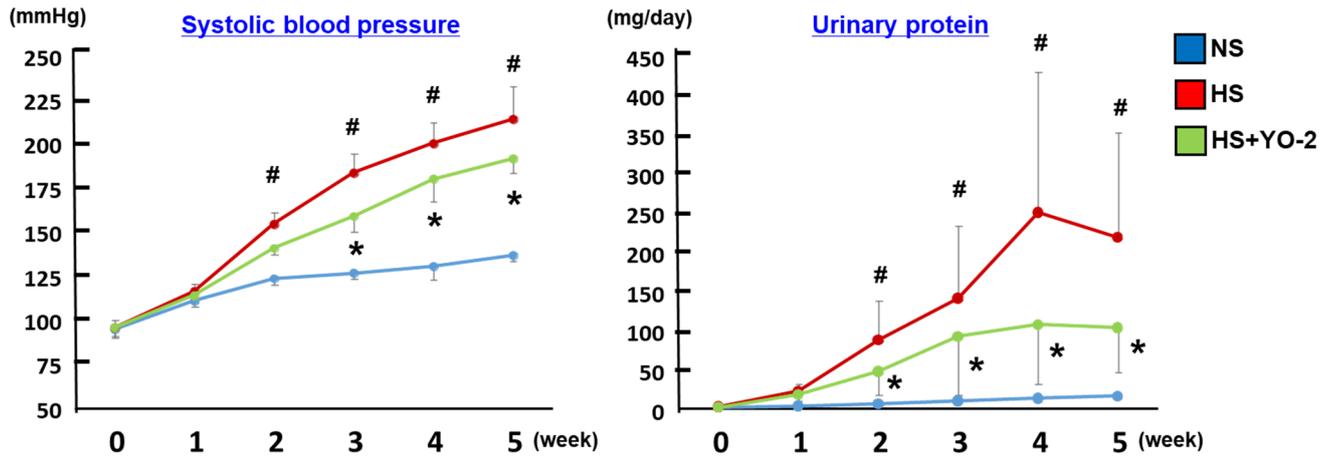


Fig. 8 The effects of YO-2 in DS rats with HS diet

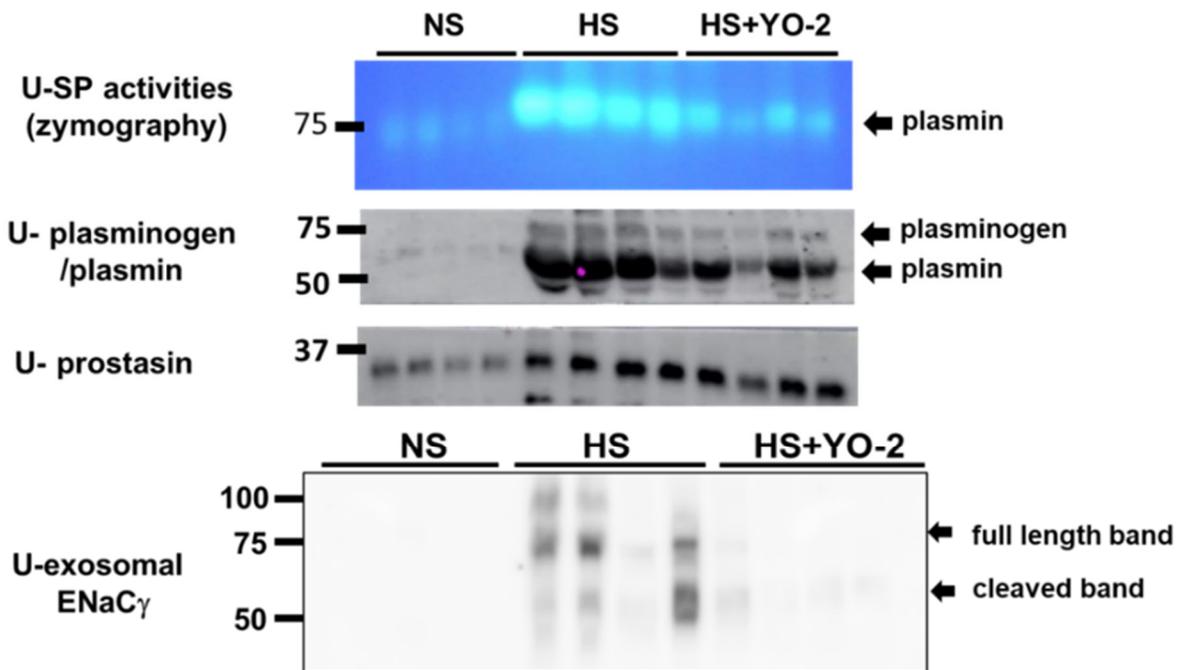


Fig. 9 The effects of YO-2 on urinary SPs and exosomal ENaC γ in DS rats with HS diet

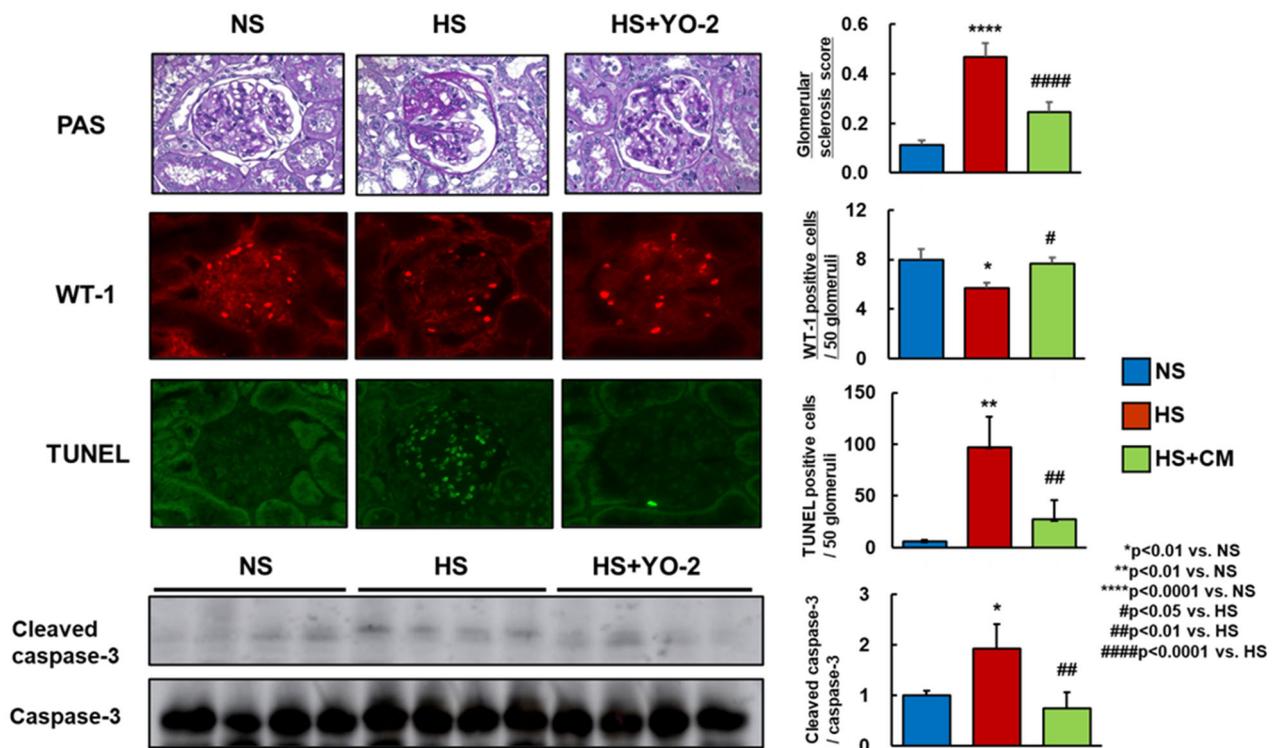


Fig. 10 The effects of YO-2 in DS rats with HS diet

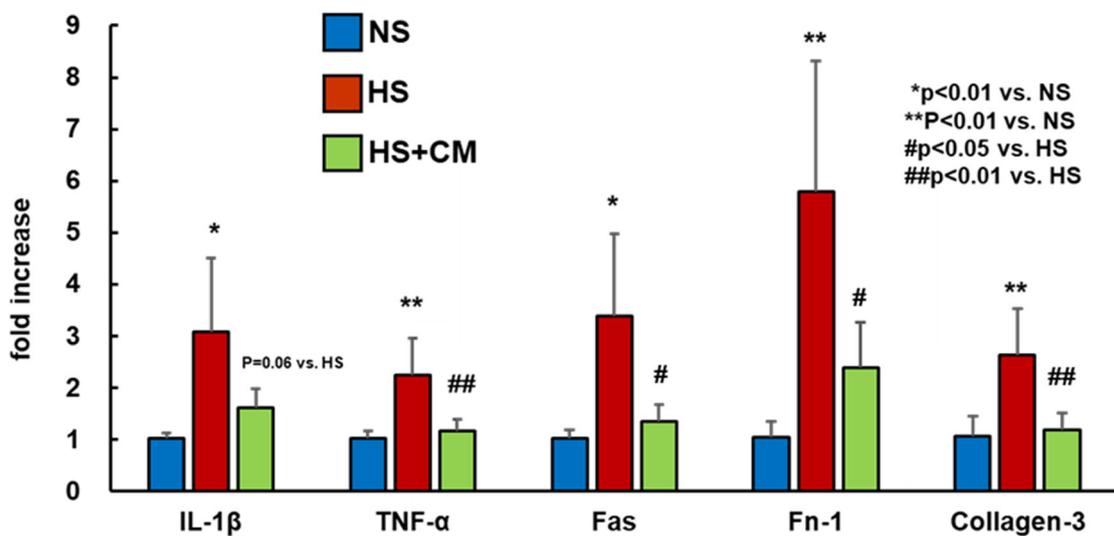


Fig. 11 The effects of YO-2 on kidney injury markers in DS rats with HS diet

3. 5 アルドステロン負荷マウスにおける SP 阻害薬と尿管管特異的プロスタシン KO の効果

マウスにおいても Dahl ラットと同様の現象を再現できれば、今後候補 SP のノックアウトマウスを用いた検討が行え

るため、C57BL6/J マウスを用いて検討を行った。まず、ENaC の発現変化・SP による活性化を確認することが容易であるアルドステロン負荷モデルで検討を行った。アルドステロン負荷ラットと同様⁽¹⁵⁾にアルドステロン持続皮下投

与により ENaC γ の SP による切断・活性化を認めた。しかし、アルドステロン負荷ラットとは異なり尿中のプロスタシンの排泄亢進を認めなかった (Fig. 12A)⁽¹⁵⁾。このモデルにカモスタットを持続皮下投与したが、ENaC γ の SP による切断・活性化を抑制することはできず、尿中電解質への影響も認めなかった (Fig. 12A)。次に尿細管特異的プロスタシン KO マウス (TKO) を作製した。ドキシサイクリン飲水投与により腎組織中および尿中のプロスタシン発現の減少が確認できた。しかし、flox マウスと TKO では同様にアルドステロンによる ENaC γ の切断・活性化を認め、尿細管プロ

スタシン KO では ENaC γ の活性化が抑制されなかった (Fig. 12B)。

3. 6 アドリアマイシン投与マウスにおける尿中 SP および ENaC γ 活性化の評価

続いて、C57BL6/J にアドリアマイシンを投与し、ネフローゼモデルの作製を試みた。しかし、C57BL6/J はアドリアマイシンへの感受性が低いことが報告されており、今回の実験でもネフローゼ症候群を誘導できなかった。そのため、尿中 SP 活性の亢進や、プラスミノゲン排泄亢進も認めなかった (Fig. 13)。

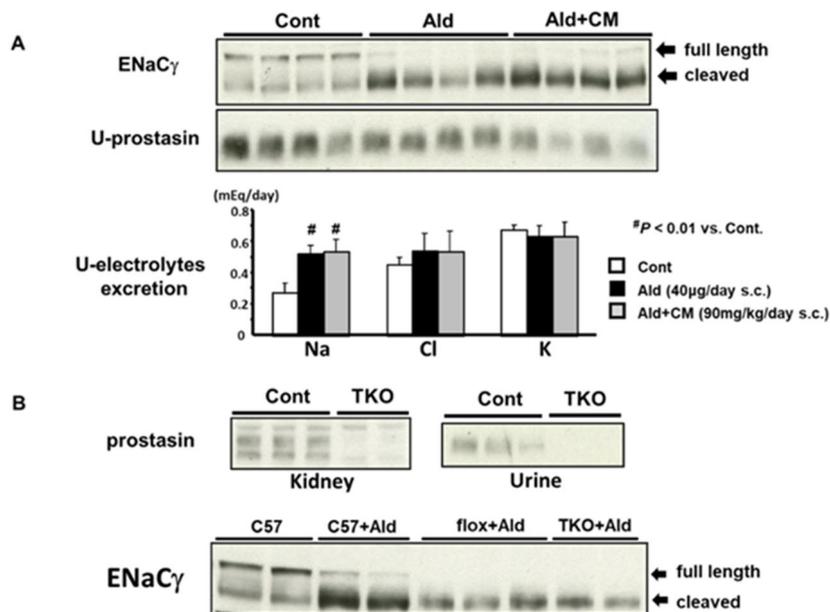


Fig. 12 The effects of camostat on ENaC γ in aldosterone-infused C57BL6j mice

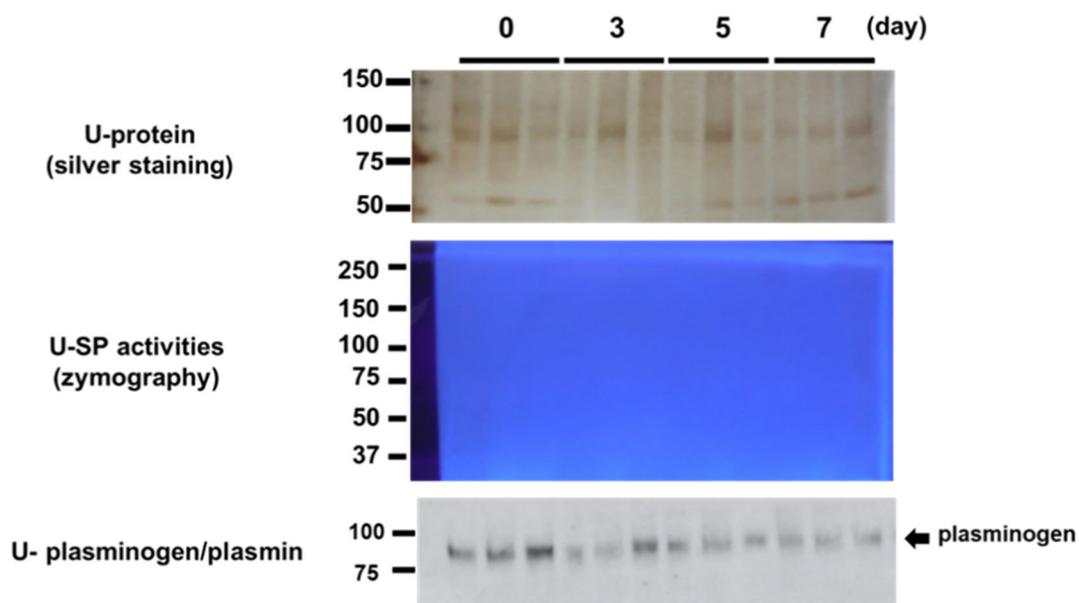


Fig. 13 The effects of Adriamycin on C57BL6j mice

次にアドリアマイシンに対して感受性の高い BALB/c を用いて検討を行った。アドリアマイシン投与 7 日目以降は多量の尿蛋白排泄を認め、それに伴い尿中プラスミンを主とする SP の活性化、尿中プラスミノゲン/プラスミンの排泄亢進を認めた。しかしながら、ネフローゼ状態においても尿プロスタシンの排泄に有意な変化は認めなかった (Fig. 14)。

3. 7 高血圧と蛋白尿を呈する CKD 患者の尿中 SP 評価

最後に高血圧と蛋白尿を呈する CKD 患者の尿中で DS ラットと同様の SP 変化が確認できるかについて検討を行った。対照群と比較し、CKD 患者尿中ではプラスミンを主とする SP 活性の亢進を認め、尿中プラスミノゲン/プラスミン、プロスタシンの排泄が亢進しており、DS ラットと同様の所見を認めた (Fig. 15)。

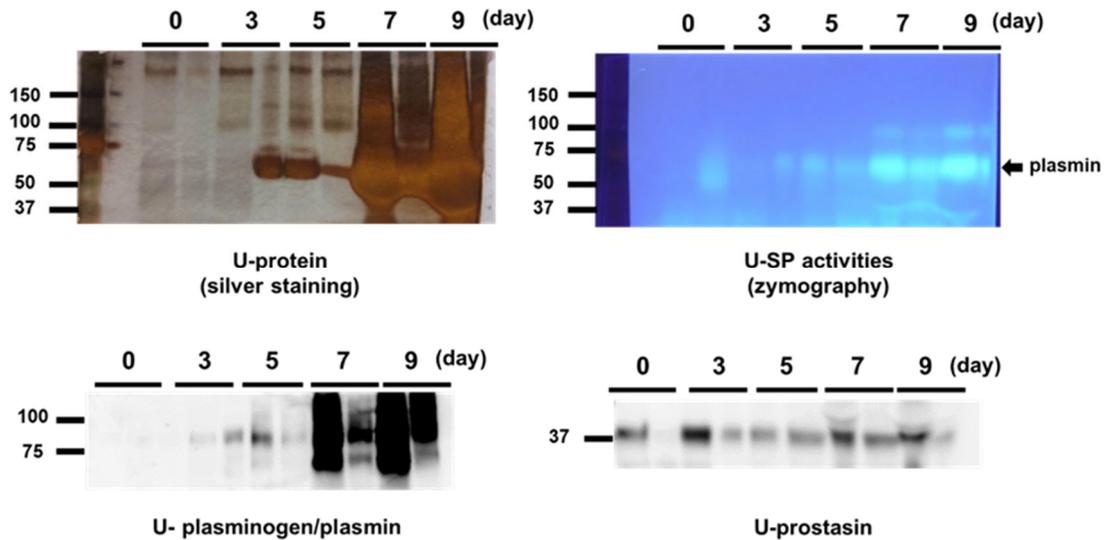


Fig. 14 The effects of Adriamycin on BALBc mice

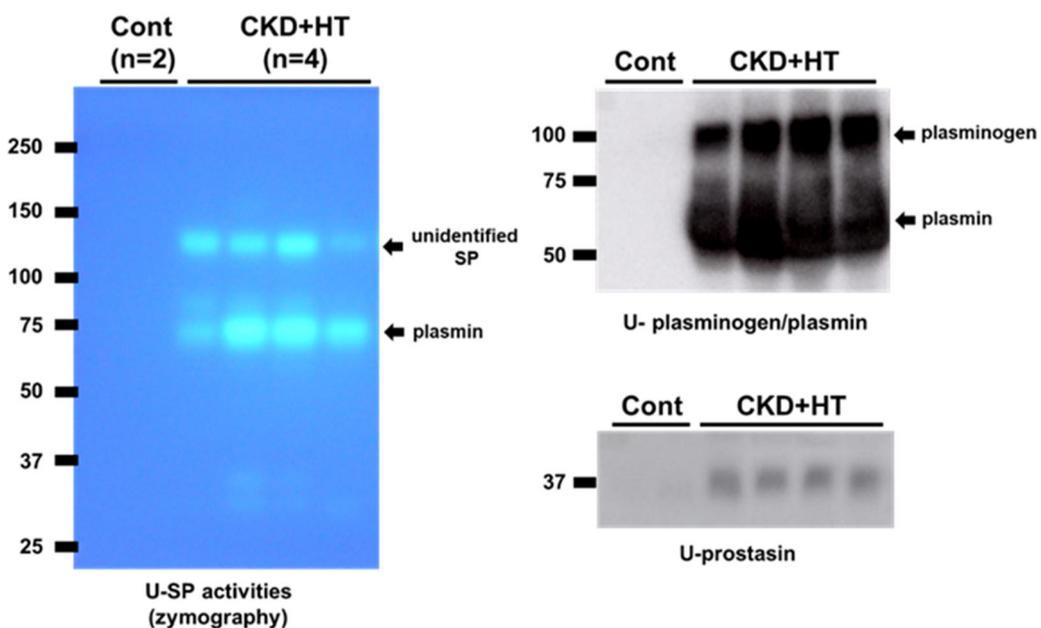


Fig. 15 The urinary SPs in the proteinuric CKD patients with hypertension

4. 考 察

ENaCは γ subunitの細胞外ループがSPにより切断され活性型 ENaC となり、この系は生理的には主としてアルドステロンにより調整されている。近年、高度蛋白尿を呈するCKDにおいて、尿蛋白に伴い糸球体から漏出した血液中の SP が、尿細管管腔内でアルドステロン非依存的にENaCを活性化することが報告されている。Sveninngsenらは、候補 SP としてネフローゼ症候群患者・ラットの尿からプラスミンを同定した⁽¹⁶⁾。すなわち、肝臓で産生された循環血液中のプラスミノゲンが糸球体障害により尿中へ漏出し、尿細管に発現するuPAによって活性型のプラスミンとなり、プラスミンが ENaC γ を切断・活性化するという機序である。同グループはヒトにおいても、ネフローゼ症候群を呈する小児慢性糸球体腎炎、進行した糖尿病性腎症、妊娠高血圧腎症などで蛋白尿に伴い尿中プラスミン排泄・活性が亢進し、患者の尿は *in vitro* の系で ENaC を活性化すること、その作用はプラスミンの阻害薬である α 2-プラスミンインヒビターで抑制されることなどを報告している⁽¹⁷⁻²⁰⁾。この機序はネフローゼ症候群において、アルドステロン非依存的な Na 貯留の一因と考えられている。

本研究において、高度蛋白尿を呈する食塩感受性高血圧モデルラット(DS ラット)において、プラスミンを主とする尿中 SP の排泄・活性亢進と尿エクソソーム中 ENaC γ の活性化を伴う高血圧を認めた。これらの変化は広域 SP 阻害薬メシル酸カモスタット(CM)で抑制された。さらに、CMはこれまでの当教室の報告と同様に降圧効果に先行して尿蛋白を減少させたため、SP は血圧非依存性に糸球体障害を誘導している可能性が考えられた。これまでの研究において食塩感受性高血圧では腎組織中のプラスミンの活性が亢進し腎障害を誘導している可能性や⁽¹³⁾(助成研究 1532)、CMが糸球体上皮細胞(ポドサイト)のアポトーシスを抑制するとともに尿蛋白減少効果を持つことを報告しているが(J Pharmacol Sci 2021. 146: 192-199. 助成研究 1632)、プラスミンの糸球体への作用は確認できていなかった。本研究では、食塩負荷 DS ラットの糸球体にプラスミノゲン/プラスミンが沈着しており、この変化は CM で抑制されていた。さらに CM は糸球体内のアポトーシス細胞を減少させ、ポドサイト保護効果を呈したことから、CM はプラスミンを抑制することで糸球体保護効果を発揮している可能性が考えられた。

次に、食塩感受性高血圧および糸球体障害へのプラスミンの関与をより詳細に調べるため、2 種類のプラスミン阻害薬を用いて検討を行った。トラネキサム酸は臨床でも使用されるプラスミン阻害薬であり、線溶系が亢進した易出血状態で止血効果を発揮する。プラスミノゲン/プラスミンはリジン結合部位を持ち、フィブリンのリジン基と結合することでフィブリンを分解し線溶作用を持つ。トラネキサム酸はリジン類似の構造を有しており、プラスミノゲン/プラスミンとフィブリンの相互作用を競合的に阻害するが、プラスミンの酵素活性を直接阻害する作用は弱い⁽²¹⁾。一方で、YO-2 はプラスミンの酵素活性中心を直接阻害するため、その作用はフィブリンを介さない⁽¹⁰⁾。本研究では、トラネキサム酸は食塩負荷 DS ラットの高血圧と尿蛋白を抑制しなかったが、YO-2 はカモスタットと同様に血圧上昇、尿中プラスミン活性、ENaC γ 活性化、ポドサイト・糸球体障害を抑制した。プラスミンによる ENaC 活性化や糸球体障害においてはプラスミン/フィブリンの相互作用の関与は報告されておらず、このため DS ラットの ENaC 活性化と糸球体障害はトラネキサム酸では抑制されず、プラスミンの酵素活性を直接阻害する YO-2 および CM により抑制されたと考えられる。

本研究においては当科がこれまで検討を重ねてきたプロスタシンの尿細管特異的 KO マウスを作製して検討を行った。これまでにアルドステロン負荷ラットでは尿中プロスタシンの排泄亢進と ENaC γ の活性化を認め、CM は尿中プロスタシン排泄と ENaC γ の活性化を抑制し、尿中 Na 排泄を増加させることを報告している⁽¹⁵⁾。しかしマウスにおいてアルドステロンは ENaC γ の活性化を誘導するものの、尿中プロスタシン排泄は増加せず、CM による尿中プロスタシン排泄や ENaC γ 活性化の抑制効果を認めることができなかった。さらに尿細管特異的プロスタシン KO マウスにおいてもアルドステロンによる ENaC γ の活性化を抑制することができなかった。この KO マウスを用いて、蛋白尿によるアルドステロン非依存的な ENaC γ 活性化について検討を試みたが、C57BL6/J マウスはアドリアマイシン耐性であり、ネフローゼを誘導することができなかった。BALB/c マウスではアドリアマイシンにより著明な尿蛋白の増加と尿中 SP 排泄亢進を認めたため、今後は BALB/c バックグラウンドの KO マウスの作製を検討している。

近年、他研究施設からも ENaC 活性化作用を有する候補 SP のノックアウトマウスを用いた研究結果が報告されている。血漿カリクレインは *in vitro* では ENaC 活性化作用が報告されており、アドリアマイシン投与マウスでは尿蛋白と相関して尿中へ排泄される。しかし、ノックアウトマウスではコントロールと同様に Na 貯留を呈し、*in vivo* では ENaC 活性化に関与していない可能性が報告された⁽²²⁾。興味深いことに、uPA のノックアウトマウスでは、ネフローゼで尿中に漏出したプラスミノゲンがプラスミンへと活性化されないにもかかわらず、コントロールと同等に Na 貯留を来した⁽²³⁾、さらにプラスミノゲンノックアウトマウスにおいてもネフローゼによる Na 貯留はコントロールと同様に認めることが報告され、uPA-プラスミノゲンの系がネフローゼ症候群における ENaC 活性化の主たる SP カスケードではない可能性が示唆されている⁽²⁴⁾。一方で、別のグループからの報告では、ネフローゼ症候群マウスに uPA の中和抗体を投与すると、尿中プラスミノゲンがプラスミンへと活性化されず、ENaC の活性化と Na 貯留が抑制された⁽²⁵⁾。いずれにしても、これらのネフローゼ症候群マウスの Na 貯留は ENaC 阻害薬アミロライドや、広域 SP 阻害薬アプロチニンで抑制されることから、SP-ENaC の系が重要であることは間違いないようである⁽²⁶⁾。SP は凝固系に代表されるように複数の SP がカスケードを介して他の SP を活性化するため、ENaC 活性化に重要であり降圧治療の真の標的となる SP が単一であるか、複数の SP が相互に作用して ENaC を活性化しているかについては、今後さらなる検討が必要である。また、本研究では私達の過去の報告との比較で、アルドステロンによる SP・プロスタシンの動態と SP 阻害薬の ENaC 抑制効果がラットとマウスで異なることが判明した。DS ラットと CKD 患者の尿中 SP は同様の現象を確認したが、ラットで得られた知見がヒトに応用できるかは今後の臨床研究での検討が必要である。

本研究は透析導入や CVD イベント・総死亡のリスクが高い蛋白尿を伴う CKD 患者の食塩感受性高血圧のコントロールとそれによる長期予後改善を目的として行い、このような病態に対してプラスミンを主とする SP を標的とした ENaC 活性抑制による降圧治療の可能性が示唆された。さらに、糸球体から漏出した SP は尿細管の ENaC 活性化のみならず、糸球体障害をさらに増悪させ尿蛋白を増加するという悪循環が形成され、SP 阻害薬はこの連鎖を抑

制すると考えられた。長期的には降圧効果により CVD 発症が抑制できると期待されるが、SP が糸球体に沈着し直接障害を誘導するように、冠動脈や脳血管でも局所的な SP 活性化が生じ、血圧非依存的に CVD を誘導する可能性がある。私達のこれまでの検討で SP 阻害薬は一部降圧非依存的に尿蛋白減少効果を持つことを報告している⁽²⁷⁻²⁹⁾ (J Pharmacol Sci 2021. 146: 192-199. 助成研究 1632)。本研究では一部の HS 群ラットが四肢麻痺症状を呈した後に死亡した。詳細な検討は出来ていないが、脳血管障害により死亡した可能性がある。興味深いことに CM 群ではそのような症状は認めなかった。また、過去の検討で CM は DS ラットの心肥大を抑制することも確認している。今後は SP 阻害薬が高血圧と CKD のみならず CVD を含めた治療薬になる可能性を検討する予定である。

現時点では少数例の検討ではあるが、高血圧と蛋白尿を伴う CKD 患者においても DS ラットと同様に尿中 SP 活性・排泄亢進を確認できた。今後は症例数を増やし、尿中 SP と臨床データの相関を解析するとともに、最終的にはこれらの患者群において SP-ENaC の系を標的とした尿蛋白減少・降圧療法が有用であるかの検討、長期的に CKD 患者の末期腎不全への進行および CVD イベント・死亡の抑制に繋げることができるかの検討が必要である。蛋白尿を伴う高血圧患者の降圧薬としては現在レニン-アンジオテンシン (RA) 系阻害薬が第一選択薬として使用されている。私達は過去に CKD モデルラットにおいて RA 系阻害薬 + CM の併用治療により、単独治療に比べて相加的に尿蛋白減少と腎保護作用を発揮することを報告している⁽²⁸⁾。RA 系阻害薬が糖尿病性腎症などの CKD の進展抑制に果たした役割は大きいものの、未だ進行抑制は十分でなく、SP 阻害薬がヒトにおいても有用な併用薬となるかの検討が必要である。

5. 今後の課題

上に述べた通り、*in vitro* で ENaC の活性化作用を有し、蛋白尿に伴い尿中に検出される SP は当教室からのプロスタシンを含め複数報告されているが、単独の SP のノックアウトマウスでは ENaC 活性化・Na 貯留を抑制することができておらず、生体において真に病態に関与する SP は不明である。私達が使用している DLFZ 法では、DS ラットや CKD 患者の尿中にプラスミン以外の SP を検出しており、これらの SP の同定と尿中 SP 活性化カスケードの解明は、

尿蛋白を伴う CKD の降圧治療の開発に向けて重要であると考えられ、引き続き検討を行っていく。また、これまでの検討からも CM は 8.0% NaCl 食を投与した食塩感受性高血圧モデルラットにおいて特に優れた降圧と尿蛋白減少効果を発揮するが、尿中や組織中の SP 活性化に食塩がどのように作用するかのについては解明できていないため、今後の検討が必要である。考察で述べた通りに、食塩負荷により脳・心臓の局所でも SP 活性化亢進していれば、SP 阻害薬は降圧・腎保護に加えて、CVD 抑制効果を発揮する優れた治療薬になる可能性がある。今後は脳血管障害や虚血性心疾患・心不全モデル動物においても検討を行う予定である。

CKD では CVD イベント等が増加する予後不良の non-dipper 型高血圧が多いことが報告されており、本研究では CKD における ENaC 活性化が血圧の日内リズムに及ぼす影響を検討する予定であったが、現時点では未達成である。近年、食塩負荷 DS ラットでは尿蛋白の出現とともに non-dipper 型高血圧となることが報告されており³⁰⁾、Dahl ラットと蛋白尿を伴う CKD 患者の尿中に同様の SP の変化を認めたことから、SP による ENaC 活性化が血圧日内リズムに影響を与えている可能性がある。今後は DS ラットや CKD 患者において SP-ENaC を標的とした降圧治療法が血圧日内リズムを改善させるかについても検討を行う予定である。

6. 文献

- Ito S, Nagasawa T, Abe M, Mori T. Strain vessel hypothesis: a viewpoint for linkage of albuminuria and cerebro-cardiovascular risk. *Hypertens Res.* 2009;32(2):115-21.
- Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP, Horisberger JD, Rossier BC. An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature.* 1997;389(6651):607-10.
- Carattino MD, Hughey RP, Kleyman TR. Proteolytic processing of the epithelial sodium channel gamma subunit has a dominant role in channel activation. *J Biol Chem.* 2008;283(37):25290-5.
- Artunc F, Worn M, Schork A, Bohnert BN. Proteasuria- The impact of active urinary proteases on sodium retention in nephrotic syndrome. *Acta Physiol (Oxf).* 2019;225(4):e13249.
- Kakizoe Y, Kitamura K, Ko T, Wakida N, Maekawa A, Miyoshi T, et al. Aberrant ENaC activation in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens.* 2009;27(8):1679-89.
- Maekawa A, Kakizoe Y, Miyoshi T, Wakida N, Ko T, Shiraishi N, et al. Camostat mesilate inhibits prostatic activity and reduces blood pressure and renal injury in salt-sensitive hypertension. *J Hypertens.* 2009;27(1):181-9.
- Kimura G, Dohi Y, Fukuda M. Salt sensitivity and circadian rhythm of blood pressure: the keys to connect CKD with cardiovascular events. *Hypertens Res.* 2010;33(6):515-20.
- Rahman A, Hasan AU, Nishiyama A, Kobori H. Altered Circadian Timing System-Mediated Non-Dipping Pattern of Blood Pressure and Associated Cardiovascular Disorders in Metabolic and Kidney Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
- Katunuma N, Le QT, Miyauchi R, Hirose S. Double-layer fluorescent zymography for processing protease detection. *Anal Biochem.* 2005;347(2):208-12.
- Okada Y, Tsuda Y, Tada M, Wanaka K, Okamoto U, Hijikata-Okunomiya A, et al. Development of potent and selective plasmin and plasma kallikrein inhibitors and studies on the structure-activity relationship. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2000;48(12):1964-72.
- Traykova-Brauch M, Schöning K, Greiner O, Miloud T, Jauch A, Bode M, et al. An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice. *Nat Med.* 2008;14(9):979-84.
- Nielsen MR, Frederiksen-Moller B, Zachar R, Jorgensen JS, Hansen MR, Ydegaard R, et al. Urine exosomes from healthy and hypertensive pregnancies display elevated level of alpha-subunit and cleaved alpha- and gamma-subunits of the epithelial sodium channel-ENaC. *Pflugers Arch.* 2017;469(9):1107-19.
- Kakizoe Y, Miyasato Y, Onoue T, Nakagawa T, Hayata M, Uchimura K, et al. A serine protease inhibitor

- attenuates aldosterone-induced kidney injuries via the suppression of plasmin activity. *J Pharmacol Sci.* 2016;132(2):145-53.
14. Raij L, Tian R, Wong JS, He JC, Campbell KN. Podocyte injury: the role of proteinuria, urinary plasminogen, and oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;311(6):F1308-f17.
 15. Uchimura K, Kakizoe Y, Onoue T, Hayata M, Morinaga J, Yamazoe R, et al. In vivo contribution of serine proteases to the proteolytic activation of gammaENaC in aldosterone-infused rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303(7):F939-F43.
 16. Svenningsen P, Bistrup C, Friis UG, Bertog M, Haerteis S, Krueger B, et al. Plasmin in nephrotic urine activates the epithelial sodium channel. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(2):299-310.
 17. Andersen H, Friis UG, Hansen PB, Svenningsen P, Henriksen JE, Jensen BL. Diabetic nephropathy is associated with increased urine excretion of proteases plasmin, prostatic and urokinase and activation of amiloride-sensitive current in collecting duct cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2015;30(5):781-9.
 18. Andersen RF, Buhl KB, Jensen BL, Svenningsen P, Friis UG, Jespersen B, et al. Remission of nephrotic syndrome diminishes urinary plasmin content and abolishes activation of ENaC. *Pediatr Nephrol.* 2013;28(8):1227-34.
 19. Buhl KB, Friis UG, Svenningsen P, Gulaveerasingam A, Ovesen P, Frederiksen-Moller B, et al. Urinary plasmin activates collecting duct ENaC current in preeclampsia. *Hypertension.* 2012;60(5):1346-51.
 20. Buhl KB, Oxlund CS, Friis UG, Svenningsen P, Bistrup C, Jacobsen IA, et al. Plasmin in urine from patients with type 2 diabetes and treatment-resistant hypertension activates ENaC in vitro. *J Hypertens.* 2014;32(8):1672-7.
 21. Wellington K, Wagstaff AJ. Tranexamic acid: a review of its use in the management of menorrhagia. *Drugs.* 2003;63(13):1417-33.
 22. Haerteis S, Schork A, Dorffel T, Bohnert BN, Nacken R, Worn M, et al. Plasma kallikrein activates the epithelial sodium channel in vitro but is not essential for volume retention in nephrotic mice. *Acta Physiol (Oxf).* 2018;224(1):e13060.
 23. Bohnert BN, Daiminger S, Worn M, Sure F, Staudner T, Ilyaskin AV, et al. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) is not essential for epithelial sodium channel (ENaC)-mediated sodium retention in experimental nephrotic syndrome. *Acta Physiol (Oxf).* 2019:e13286.
 24. Xiao M, Bohnert BN, Aypek H, Kretz O, Grahammer F, Aukschun U, et al. Plasminogen deficiency does not prevent sodium retention in a genetic mouse model of experimental nephrotic syndrome. *Acta Physiol (Oxf).* 2020:e13512.
 25. Hinrichs GR, Weyer K, Friis UG, Svenningsen P, Lund IK, Nielsen R, et al. Urokinase-type plasminogen activator contributes to amiloride-sensitive sodium retention in nephrotic range glomerular proteinuria in mice. *Acta Physiol (Oxf).* 2019;227(4):e13362.
 26. Bohnert BN, Menacher M, Janessa A, Worn M, Schork A, Daiminger S, et al. Aprotinin prevents proteolytic epithelial sodium channel (ENaC) activation and volume retention in nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2018;93(1):159-72.
 27. Hayata M, Kakizoe Y, Uchimura K, Morinaga J, Yamazoe R, Mizumoto T, et al. Effect of a serine protease inhibitor on the progression of chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303(8):F1126-35.
 28. Narita Y, Ueda M, Uchimura K, Kakizoe Y, Miyasato Y, Mizumoto T, et al. Combination therapy with renin-angiotensin-aldosterone system inhibitor telmisartan and serine protease inhibitor camostat mesilate provides further renoprotection in a rat chronic kidney disease model. *J Pharmacol Sci.* 2016;130(2):110-6.
 29. Ueda M, Uchimura K, Narita Y, Miyasato Y, Mizumoto T, Morinaga J, et al. The serine protease inhibitor camostat mesilate attenuates the progression of chronic

kidney disease through its antioxidant effects. *Nephron*. 2015;129(3):223-32.

30. Sufiun A, Rahman A, Rafiq K, Fujisawa Y, Nakano D, Kobara H, et al. Association of a Disrupted Dipping Pattern of Blood Pressure with Progression of Renal Injury during the Development of Salt-Dependent Hypertension in Rats. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6).

7. 論文業績および学会発表

(論文業績)

1. Mizumoto T, Kakizoe Y, Nakagawa T, Iwata Y, Miyasato Y, Uchimura K, Adachi M, Deng Q, Hayata M, Morinaga J, Miyoshi T, Izumi Y, Kuwabara T, Sakai Y, Tomita K, Kitamura K, Mukoyama M. A serine protease inhibitor camostat mesilate prevents podocyte apoptosis and attenuates podocyte injury in metabolic syndrome model rats. *J Pharmacol Sci* 2021. 146: 192-199. (助成研究 1632)

(学会発表)

2019 年度

1. アメリカ腎臓学会 Renal Week 2019 ワシントン D.C., アメリカ合衆国 (2019 年 11 月 5 日～10 日) Iwata Y, Kakizoe Y, Deng Q, Nakagawa T, Adachi M, Izumi Y, Kuwabara T, Kitamura K, Mukoyama M. Urinary plasmin plays pathogenic roles for the development of hypertension in Dahl salt-sensitive rats.
2. 第 62 回日本腎臓学会 名古屋国際会議場, 愛知 (2019 年 6 月 21 日～6 月 23 日) 岩田康伸, 柿添豊, 中川輝政, 鄧欽元, 泉裕一郎, 栗原孝成, 安達政隆, 北村健一郎, 向山政志 食塩感受性高血圧においてプラスミンは糸球体障害を誘導する
3. 第 42 回日本高血圧学会総会 京王プラザホテル, 東京 (2019 年 10 月 25 日～27 日)

① 柿添豊, 向山政志 メタボリック症候群や慢性腎臓病におけるホルモン異常と高血圧

② 鄧欽元, 柿添豊, 岩田康伸, 中川輝政, 安達政隆, 泉裕一郎, 栗原孝成, 北村健一郎, 向山政志 食塩感受性高血圧における尿中プラスミンを標的とした降圧療法の検討

4. 23 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 神戸国際会議場, 兵庫 (2019 年 12 月 14 日～15 日) 岩田康伸, 柿添豊, 鄧欽元, 中川輝政, 泉裕一郎, 栗原孝成, 安達政隆, 向山政志 食塩感受性高血圧における尿中プラスミンによる高血圧発症機序
5. 55 回高血圧関連疾患モデル学会 高松センタービル, 香川 (2019 年 11 月 29 日～30 日) 岩田康伸, 柿添豊, 鄧欽元, 中川輝政, 泉裕一郎, 栗原孝成, 安達政隆, 向山政志 食塩感受性高血圧における尿中プラスミンによる高血圧発症機序とその治療法

2020 年度

6. 第 56 回高血圧関連疾患モデル学会(Web) 東京 (2020 年 11 月 14 日～15 日) Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおけるプラスミン阻害薬 YO-2 の降圧・腎保護効果の検討 鄧 欽元, 柿添 豊, 岩田 康伸, 中川 輝政, 泉 裕一郎, 栗原 孝成, 安達 政隆, 津田裕子, 向山 政志

2021 年度

7. 欧州-国際高血圧学会 2021(Web) グラスゴー イギリス (2021 年 4 月 11 日～14 日) Urinary plasmin plays pathogenic roles for the development of hypertension in salt-sensitive hypertension with proteinuria. Yutaka Kakizoe, Qinyuan Deng, Yasunobu Iwata, Masataka Adachi, Terumasa Nakagawa, Yuichiro Izumi, Takashige Kuwabara, Masashi Mukoyama

The Effect of Aberrant ENaC Activation on Salt-Sensitive Hypertension and Blood Pressure Circadian Rhythm in Chronic Kidney Disease.

Yutaka Kakizoe

Department of Nephrology, Kumamoto University Graduate School of Life Sciences

Summary

Background: Chronic kidney disease (CKD) causes the salt-sensitivity and disrupted circadian rhythm of blood pressure. Epithelial sodium channel (ENaC) in the renal collecting duct plays pivotal roles in the regulation of sodium homeostasis and blood pressure. The proteolytic cleavage of ENaC γ by extracellular serine proteases (SPs) is important process for the full activation of this channel. In the setting of CKD with proteinuria, circulating SPs filtered through injured glomerular filtration barrier could activate ENaC, leading to Na retention and hypertension independently of aldosterone. Several SPs such as plasmin, prostaticin and uPA are suggested to be involved in this process. In this study, we evaluated the effects of aberrant ENaC activation by SPs on the salt-sensitive hypertension and altered circadian rhythm of blood pressure in the proteinuric CKD. Furthermore, we elucidated the antihypertensive effect of SP inhibitors.

Methods: Five-week-old Dahl salt-sensitive (DS) rats were divided into normal salt diet (NS), high salt diet (HS) and HS+SP inhibitor (camostat mesilate, CM). After systolic BP measurement and 24h urine collection were performed for 5 weeks, rats were sacrificed. Urinary SPs excretion and ENaC γ activation were evaluated by zymography and western blotting. The antihypertensive effects of plasmin inhibitors (tranexamic acid and YO-2) were elucidated. Urinary excretion of SPs in the proteinuric CKD patients were also studied.

Results: HS diet induced severe hypertension, marked proteinuria and urinary SPs activation as well as the proteolytic activation of urinary exosomal ENaC γ . The treatment with CM and YO-2, but not tranexamic acid, significantly suppressed these changes and mitigated glomerular injuries. Urinary SPs activation was also observed in the proteinuric CKD patients.

Conclusions: Our current study indicates that urinary SPs including plasmin are associated with the pathogenesis of salt-sensitive hypertension and glomerular injury in CKD with proteinuria, and serine protease inhibition could be a novel therapeutic strategy for CKD.

受容体結合蛋白による腎尿細管特異的な2つの作用を介した食塩感受性 高血圧と腎性老化の克服戦略研究

田村 功一¹, 涌井 広道¹, 山下 暁朗², 小豆島 健護¹, 畝田 一司¹, 小林 竜¹

¹横浜市立大学医学部循環器腎臓高血圧内科学, ²横浜市立大学医学部分子細胞生物学

概要

研究目的

本プロジェクト研究では, 1型アンジオテンシン II (Ang II) 受容体 (AT1 受容体) への結合因子として発見した ATRAP について, これまでに明らかにしてきた受容体結合性機能選択的制御作用とは異なる, 腎尿細管における新規な受容体結合非依存的作用の可能性を切り口としたアプローチを試みた。遠位尿細管と同様に高レベル発現が認められる近位尿細管特異的な ATRAP の機能的意義について検討した。

研究方法

1. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) プロモーターを用いての近位尿細管特異的 ATRAP-KO マウスを作製した。得られた近位尿細管特異的 ATRAP-KO マウスを用いて慢性 Ang II 刺激下の血圧調節についての検討を行った。
2. ヒト近位尿細管初代培養細胞に hTERT と CDKN2A をターゲットとした shRNA を共発現させることにより immortalized (i)RPTEC を作製した。その後, 限界希釈法にてクローン化を行い, 性質評価を行った細胞株を cloned (c)RPTEC とした。この新規に樹立した ciRPTEC を用い, ATRAP 発現抑制 (siRNA によるノックダウン=KD) や欠損 (CRISPR-CAS9 によるノックアウト=KO) が SIRT1 発現に与える影響を解析した。

研究結果

1. 野生型マウスと近位尿細管特異的 ATRAP-KO マウスに慢性 Ang II 刺激を加えた結果, テイルカフ法測定血圧・テレメトリーシステム測定血圧の上昇の程度や高血圧性臓器障害の程度は両群において同等であった。また, Ang II 慢性刺激時の積算ナトリウムバランスは両群で同等であり, 慢性 Ang II 刺激下における腎臓でのナトリウム代謝は近位尿細管 ATRAP の発現低下によっても影響を受けないと考えられた。
2. ciRPTEC では, 一過性の ATRAP ノックダウンにより, 定常状態で SIRT1 のタンパク質発現量が有意に低下した。一方, SIRT1 mRNA の発現量に変化は認められなかった。さらに, ATRAP ノックアウト細胞では血清飢餓刺激依存的に SIRT1 タンパク質の発現が有意に低下した。

考察とまとめ

今回の *in vivo* の実験結果からは, 腎近位尿細管特異的な ATRAP の局所的な発現低下は慢性 Ang II 刺激性高血圧を増悪させないことが明らかになった。今回の研究結果と研究代表者らのこれまでの知見から総合的に考察すると, 慢性 Ang II 刺激性高血圧の病態形成において腎近位尿細管 ATRAP が果たす役割は小さく, 腎 ATRAP は主に腎遠位尿細管 ATRAP を介したメカニズムにより慢性 Ang II 刺激性高血圧を抑制する作用を発揮すると考えられた。さらに, *in vitro* における実験結果から, ciRPTEC における一過性の ATRAP 発現低下が Ang II 刺激なしに SIRT1 タンパク質の発現量を低下させることを明らかにした。すなわち, 近位尿細管において ATRAP が Ang II-AT1R シグナル伝達経路と非依存的

に SIRT 1 タンパク質の発現を調節している可能性が示唆された。本研究の結果、全身性 ATRAP-KO マウスを用いての検討では未解明であった、近位尿細管と遠位尿細管の区分特異的な ATRAP の腎尿細管機能制御作用の一端が明らかにされた。今後は近位尿細管 ATRAP の機能やその発現・活性調節機序により焦点を当てて、培養細胞系や動物実験系を含めての多面的な解析を推進していく予定である。

1. 研究の背景と目的

現在なお世界的に増加しつつある高血圧、慢性腎臓病、そして透析・移植が必要なまでに進行し、“不可逆的”とされる末期腎不全は、それ自体、および病態連関機序により引き起こされる高血圧増悪、脳心血管病と相まって、社会が求める健康寿命の延伸にとっての大きな障害である。特に慢性腎臓病・末期腎不全を克服する上での最大の問題は、腎臓の尿細管間質線維化が中核的病態を構成する、“不可逆的”に進行した慢性腎臓病を直接改善できる治療薬がないことであり、重要なアンメット・メディカル・ニーズとなっている。そして、この“不可逆的”段階に進行した慢性腎臓病の新規治療開発のためには、ヒトでの病態を反映する慢性腎臓病モデル動物が必要である。

一方、腎臓の老化過程を制御する機序は、個体寿命調節に関与する機序と共通の分子機構を有している可能性が指摘されている(柏原直樹, 他. *日腎会誌*, 54:68-72, 2012; Sato S, et al. *Nat Commun*, 6:7035, 2015)。加齢による腎臓の組織学的変化は、“不可逆的”に進行した慢性腎臓病における組織学的変化と同じく腎臓の尿細管間質線維化であり、慢性腎臓病は「腎性老化」が加速する病態と捉えることもできる(Schmitt R, et al. *Kidney Int*, 92:569-79, 2017; Shiels PG, et al. *Nat Rev Nephrol*, 13:471-82, 2017)。このように、“不可逆的”な慢性腎臓病での腎機能低下と個体の老化促進・寿命短縮は密接に関連し、前者の治療開発は、「腎性老化」改善による抗加齢制御のための新規治療法につながる可能性がある。

研究代表者は、生活習慣病誘発因子(angiotensin II; Ang II)受容体(AT1 受容体)への新規結合蛋白(ATRAP)の単離・同定に成功し(Daviet L, Tamura K, et al. *J Biol Chem*, 274:17058-62, 1999), ATRAP に独自の機能として、細胞・組織表面に存在する受容体の細胞内取り込み(internalization)を促進し、受容体の生理的な情報伝達系活性には悪影響を与えない反面、臓器障害と関連した病的な情報伝達系過剰活性化に対して機能選択的な抑制

作用を有することを明らかにしてきた(Tamura K, et al. *Curr Hypertens Rep*, 9: 121-7, 2007; *Curr Pharm Des*, 19:3043-8, 2013)。そして、腎臓尿細管、特に遠位尿細管の ATRAP が遠位尿細管 AT1 受容体-ENaC(上皮型 Na⁺ transporter)系を制御することにより尿細管での Primary な Na⁺再吸収調節を介して循環血漿量を変化させることにより、慢性 Ang II 刺激、高食塩負荷、慢性腎臓病の病的刺激時の血圧調節に関与していることを示してきた(Tamura K, et al. *Curr Med Chem*, 22:3210-6, 2015)。さらに、ATRAP が健常者の腎臓、特に尿細管細胞に高発現を呈するが、慢性腎臓病(IgA 腎症)患者では腎機能障害の進行にともない腎臓近位尿細管 ATRAP 発現が低下すること(Masuda S, Tamura K, et al. *Am J Physiol Renal Physiol*, 299:F720-31, 2010)、また全身性 ATRAP ノックアウトマウスでは加齢に伴い、腎臓の線維化がより亢進し、長寿遺伝子として知られる SIRT1 の腎臓での発現量が Ang II 刺激非依存的に低下する(Uneda K, Tamura K, et al. *J Am Heart Assoc*, 6: e006120, 2017)ことなど、腎臓近位尿細管 ATRAP の発現と慢性腎臓病の病態との関連を示唆する可能性も示してきた。

本研究では、現在までの予備的研究成果を基に、ATRAP 活性化による食塩感受性高血圧および不可逆的慢性腎臓病の克服・腎臓起点の抗加齢制御のための革新的新規治療開発へ向けて、腎尿細管区分特異的な ATRAP の二つの独自機能、すなわち、受容体結合性機能選択的制御作用、および受容体結合非依存的抗線維化・抗老化作用について基礎的検討を行った。

2. 研究方法

in vivo の実験系において、我々は慢性 Ang II 刺激性高血圧における腎近位尿細管 ATRAP の機能的役割についての検討をおこなった。腎近位尿細管に発現特異性が高いと報告されている phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) プロモーターによる発現制御を利用して、Cre/loxP システムを用いて、近位尿細管特異的

ATRAP ノックアウトマウスを作成した。腎における ATRAP の発現を、免疫染色およびレーザーマイクロダイセクション法を用いて、野生型マウスと近位尿細管特異的 ATRAP-KO マウスとで比較検討を行った。次に、野生型マウスと近位尿細管特異的 ATRAP-KO マウスに浸透圧ポンプを用いて Ang II (1,000 ng/kg/min) 2 週間にわたる慢性刺激実験を行い、テイルカフ法にて両群の血圧を測定した。さらに詳細な検討を行うため、Ang II 投与による心肥大の程度(心体重比)の評価、Ang II 投与中のテレメトリーシステムを用いた観血的な血圧測定および代謝ケージを用いたナトリウムバランスの評価を行った。また、野生型マウスと近位尿細管特異的 ATRAP-KO マウスに浸透圧ポンプを用いて、より低用量の Ang II (600 ng/kg/min) 2 週間にわたる慢性刺激実験を行い、両群の血圧をテイルカフ法で測定した。

さらに、*in vitro* の実験系において、ヒト近位尿細管細胞における ATRAP 発現量が、長寿遺伝子産物 SIRT1 の発現調節に与える影響を検討した。最初に、ヒト近位尿細管初代培養細胞に hTERT と CDKN2A をターゲットとした shRNA を共発現させることにより immortalized (i)RPTEC を作成した。その後、限界希釈法にてクローン化を行い、クローン化不死亡近位尿細管細胞株を 12 種類取得した。得られた細胞株のうち、近位尿細管としての性質を、マーカーである SGLT2 と DPP4 の発現量を RT-qPCR 法により解析、さらに蛍光免疫染色することで行った。さらに、ATRAP と AT1 受容体の発現量についても RT-qPCR 法で解析した。SGLT2 及び DPP4 を発現し、かつ十分な AT1 受容体と ATRAP の発現を認めた細胞株を cloned (c)iRPTEC とし、その後の解析を行った。この ciRPTEC では、SGLT2 の発現量に対する遠位尿細管マーカーである Calbindin1 と AQP2 の発現量を比較し、遠位尿細管のマーカーの発現が極めて少ないことを確認した。この ciRPTEC をもちいて、Ang II 刺激や血清飢餓刺激を行い、ATRAP および SIRT1 発現量に与える影響を検討した。さらに、ATRAP 発現抑制 (siRNA によるノックダウン=KD) や欠損 (CRISPR-CAS9 によるノックアウト=KO) を加えて検討した。

3. 研究結果

近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスの作製

Ang II 刺激性高血圧における近位尿細管の病態生理

学的役割を検討するため、我々はまず、*Pepck-Cre* を用いて Cre/loxP システムにより、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスを作製した。この近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスの腎臓における ATRAP 蛋白の発現および分布を確認するため、抗 ATRAP 抗体と特異的なネフロンマーカーを使用して免疫組織化学染色を行った。特異的ネフロンマーカーとして、主に遠位尿細管に発現しているカルシウム結合蛋白であるカルビンディン D に対するモノクローナル抗体と、近位尿細管管腔側に特異的に発現しているメガリンに対するモノクローナル抗体を用いた。これらの抗体で連続切片を免疫染色したところ、野生型マウスと比較して近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスの腎近位尿細管において特異的に ATRAP の免疫染色の減衰を認めた(図 1)。

Ang II 刺激が近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスの非観血的血圧、心拍数、体重に及ぼす影響

Ang II 刺激性高血圧における近位尿細管 ATRAP の機能的役割について検証した。週齢を合わせた近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスを次の 4 つのグループに振り分けた。(1) 近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスに vehicle を投与した群、(2) 近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスに Ang II (1,000 ng/kg/min) を投与した群、(3) 野生型マウスに vehicle を投与した群、(4) 野生型マウスに Ang II (1,000 ng/kg/min) を投与した群。ベースラインにおける近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスの収縮期血圧は野生型マウスと同等であった(繰返しのある 2 元配置分散分析法, $F=0.2744$, $P=0.6092$)。また、Ang II を 2 週間投与すると、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスで有意かつ同程度に収縮期血圧が増加した(近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスに vehicle を投与した群 vs 近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスに Ang II を投与した群, 繰返しのある 2 元配置分散分析法, $F=4.845$, $P=0.0450$; 野生型マウスに vehicle を投与した群 vs 野生型マウスに Ang II を投与した群, 繰返しのある 2 元配置分散分析法, $F=5.945$, $P=0.0299$; 近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスに Ang II を投与した群 vs 野生型マウスに Ang II を投与した群, 繰返しのある 2 元配置分散分析法, $F=0.1014$, $P=0.7548$) (図 2)。

Ang II を投与した時の収縮期血圧の変化量も近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスで同等であった(図 2)。その一方で、4 群間で心拍数に違いは認めなかった。Ang II を 2 週間投与すると、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスで同程度に投与期間中の体重増加が抑制された(図 2)。

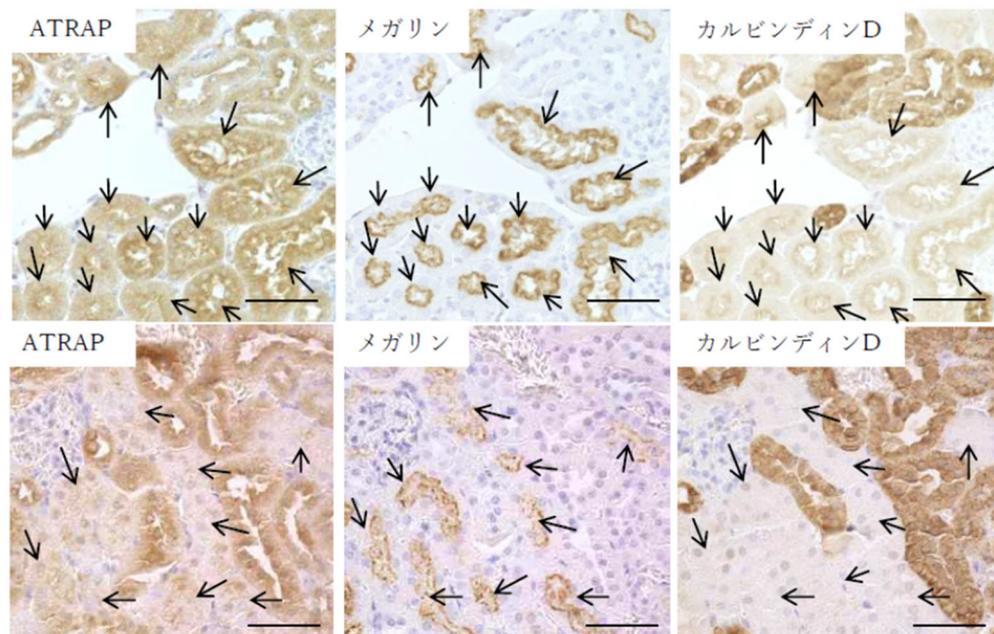
低用量の Ang II 刺激が野生型マウスと近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスの血圧に及ぼす影響

Ang II 刺激性高血圧における近位尿細管 ATRAP の病態生理学的役割をさらに検証するため、低用量の Ang II (600 ng/kg/min) を用いて追加の実験を行った。我々は、Ang II (600 ng/kg/min) を投与した時の近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスの血圧をテイルカフ法で測定し、比較した。週齢を合わせた近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスを以下の 4 群に振り分けた。(1) 近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスに vehicle を投与した群、(2) 近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスに Ang II (600 ng/kg/min) を投与

した群、(3) 野生型マウスに vehicle を投与した群、(4) 野生型マウスに Ang II (600 ng/kg/min) を投与した群、Ang II (600 ng/kg/min) を 2 週間投与すると近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスで有意かつ同程度に収縮期血圧が増加した。

Ang II 刺激が近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスの心肥大に及ぼす影響

心肥大は血圧上昇と密接な関係にあるため、我々はさらに近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスの心体重比について検証をおこなった。Ang II (1,000 ng/kg/min) を 2 週間投与すると、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスとで有意かつ同程度に心体重比が増加した。この結果は、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスとで Ang II を投与した時の血圧上昇が同程度であることを支持する結果である。



上段；野生型マウス
下段；近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウス

図 1 野生型マウスと近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスの腎皮質における ATRAP 蛋白の発現分布。左列；抗 ATRAP 抗体による染色で同定した尿細管における ATRAP 発現を示す腎皮質切片。中央；近位尿細管マーカーである抗メガリンモノクローナル抗体で染色した連続切片、右列；遠位尿細管マーカーである抗カルビンディン D モノクローナル抗体で染色した連続切片。矢印は近位尿細管を示す。倍率；400 倍。

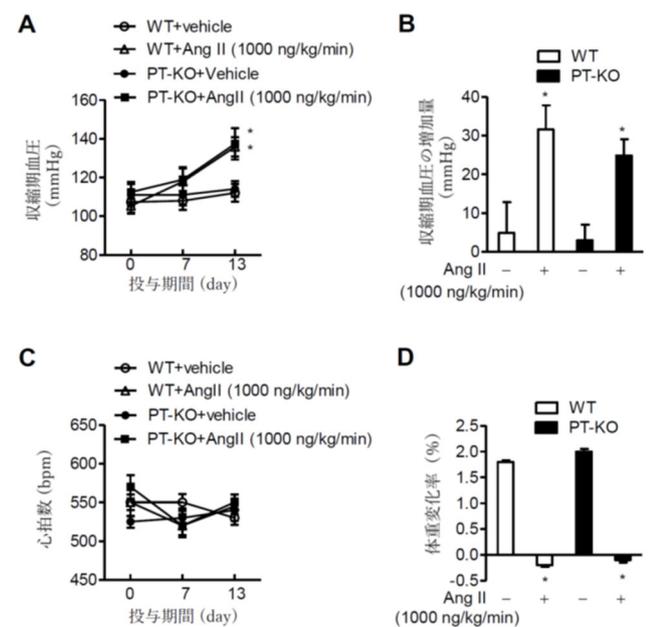


図 2 Ang II (1,000 ng/kg/min) 投与が、野生型マウスと近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスの非観血的血圧、心拍数、体重に及ぼす影響。(A) テイルカフ法により測定した Ang II (1,000 ng/kg/min) を投与が、野生型マウス (WT) と近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウス (PT-KO) の収縮期血圧に及ぼす影響。値は平均値±標準誤差。各群 N=7-8 匹ずつ。* $P < 0.05$ vs vehicle 投与群。(B) vehicle または Ang II (1,000 ng/kg/min) を 2 週間投与した時の収縮期血圧の増加量。値は平均値±標準誤差。各群 N=7-8 匹ずつ。* $P < 0.05$ vs vehicle 投与群。(C) Ang II (1,000 ng/kg/min) 投与が心拍数に及ぼす影響。値は平均値±標準誤差。各群 N=7-8 匹ずつ。(D) vehicle または Ang II (1,000 ng/kg/min) を 2 週間投与した時の体重変化量。値は平均値±標準誤差。各群 N=7-8 匹ずつ。* $P < 0.05$ vs vehicle 投与群。

Ang II 刺激が近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスの観血的血圧に及ぼす影響

我々は、テレメトリーシステムを用いて近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスにおける Ang II 投与の観血的な血圧に及ぼす影響を厳格に比較検討した。24 時間平均収縮期血圧は、Ang II (1,000 ng/kg/min) を 2 週間投与すると、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスとで有意かつ同程度に増加した (近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスに Ang II を投与した群 vs 野生型マウスに Ang II を投与した群、繰り返しのある 2 元配置分散分析法, $F=0.04280$, $P=0.8407$)

(図 3)。また、Ang II (1,000 mg/kg/min) を 2 週間投与すると平均収縮期血圧は日中だけでなく、夜間も近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスとで有意かつ同程度に増加した。同様に、24 時間平均拡張期血圧は、Ang II (1,000 ng/kg/min) を 2 週間投与すると、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスとで有意かつ同程度に増加した (近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスに Ang II を投与した群 vs 野生型マウスに Ang II を投与した群、繰り返しのある 2 元配置分散分析法, $F=0.02541$, $P=0.8769$)。また、Ang II (1,000 mg/kg/min) を 2 週間投与すると平均拡張期血圧は日中だけでなく、夜間も近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスとで有意かつ同程度に増加した。

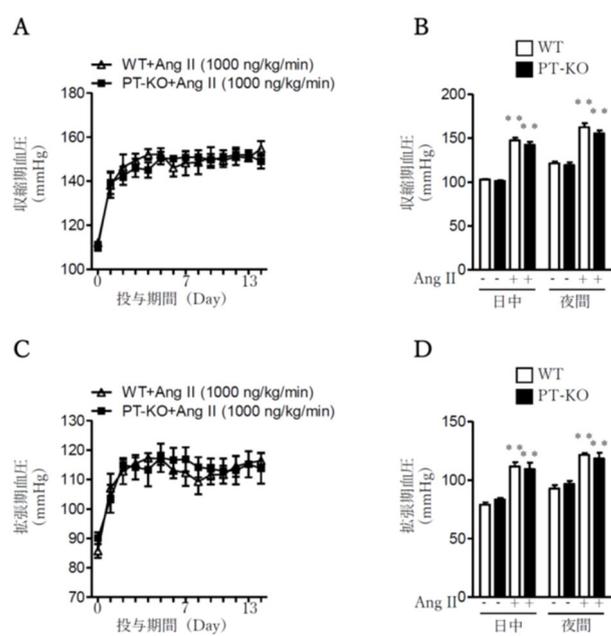


図 3 テレメトリーシステムを用いて測定した、Ang II (1,000 ng/kg/min) 2 週間投与中の 24 時間平均収縮期血圧 (A) と拡張期血圧 (C)。日中と夜間における、Ang II (1,000 ng/kg/min) 2 週間投与前後の平均収縮期血圧 (B) と平均拡張期血圧 (D)。WT; 野生型マウス, PT-KO; 近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウス。Ang II; アンジオテンシン II。値は平均値±標準誤差。各群 N=6 匹ずつ。** $P < 0.01$ vs Ang II 投与前の血圧値。

Ang II 刺激が近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスのナトリウムバランスに及ぼす影響

さらに、我々は Ang II (1,000 ng/kg/min) 投与中のナトリウムバランスを、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスとで比較した。Ang II を投与期間である 2 週間の積算ナトリウムバランスは、近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウスと野生型マウスとで同等であった (近位尿細管特異的 ATRAP 欠損マウス vs 野生型マウス, 153.3 ± 141 vs 194.7 ± 62.1 mmEq/day₁₋₁₃, $P=0.9075$, 対応のない *t* 検定) (図 4)。

不死化クローン化近位尿細管細胞の作製

ヒト近位尿細管細胞における ATRAP の機能を分析するために、不死化 RPTEC を作製した。次に、この不死化 RPTEC のクローン化を行い、得られた 12 クローンから mRNA を抽出して、近位尿細管マーカーである SGLT2 および DPP4 の発現量を RT-qPCR 法で評価した。得られた 12 のクローン細胞株のうち、1C-8, 2B-1 および 2F-5 は、SGLT2 mRNA 発現が高かった (図 5)。これら 3 つのクローン細胞株の中で、2B-1 が DPP4 は最も高い mRNA 発現を示した。次に、これらのクローン細胞株における ATRAP および AT1 受容体 mRNA 発現量を解析した。12 クローンすべてで ATRAP 発現を認め、2B-1 で最も高い内在性 AT1 受容体発現を認めた (図 5)。次に近位尿細管マーカーに対する遠位尿細管マーカーの発現比を不死化前の RPTEC と 2B-1 のクローン化不死化細胞株と比較した。不死化前 RPTEC は腎臓近位尿細管マーカーの SGLT2 と遠位尿細管マーカーのカルビンディン 1 およびアクアポリン 2 の両方を発現し、遠位尿細管細胞が混入している可能性が示唆された。一方、2B-1 クローン化不死化細胞株では、SGLT2 と比較して、カルビンディン 1 およびアクアポリン 2 mRNA 発現量が極めて低いことを確認した。さらに 2B-1 クローン化不死化細胞株の Ang II 刺激に対する反応性も評価した。近位尿細管特異的な Na チャネル NHE3 mRNA 発現量が既報通り、Ang II 濃度依存的に上昇することを観察した。以上の結果から 2B-1 クローン化不死化細胞株を clonal immortalized RPTEC (ciRPTEC) としてこの先の実験系に用いた。

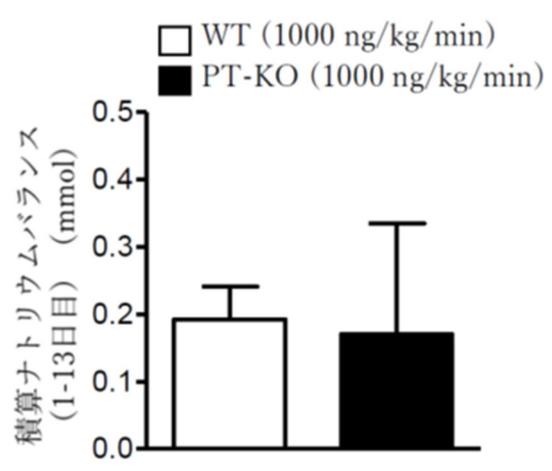


図 4 アンジオテンシン II (1,000 ng/kg/min) を 2 週間投与した時の積算ポジティブナトリウムバランス。WT; 野生型マウス, PT-KO; 近位尿細管特異的 ATRAP ノックアウトマウス。値は平均値±標準誤差。各群 N=6 匹ずつ。

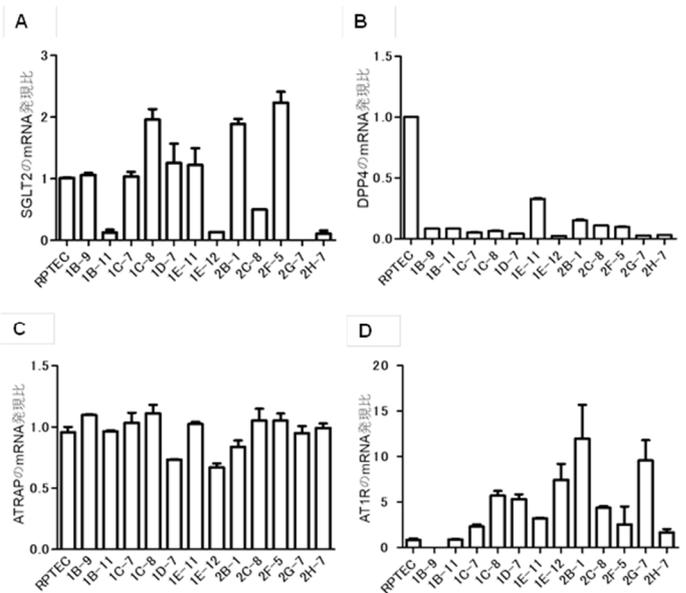


図 5 12 クローンの不死化近位尿細管細胞株 (ciRPTEC) における RT-qPCR を用いた各遺伝子 mRNA 発現比。(A) SGLT2, (B) DPP4, (C) ATRAP, (D) AT1 受容体 (AT1R)。各遺伝子発現は 18S リボソーム RNA 発現量によって補正した。RPTEC mRNA 発現量を 1 として各クローン細胞株の遺伝子発現量を相対的に評価した。各群 N=3。値は平均±標準誤差を表す。RPTEC; 不死化前のヒト近位尿細管細胞。

不死化クローン化近位尿細管細胞の免疫蛍光染色

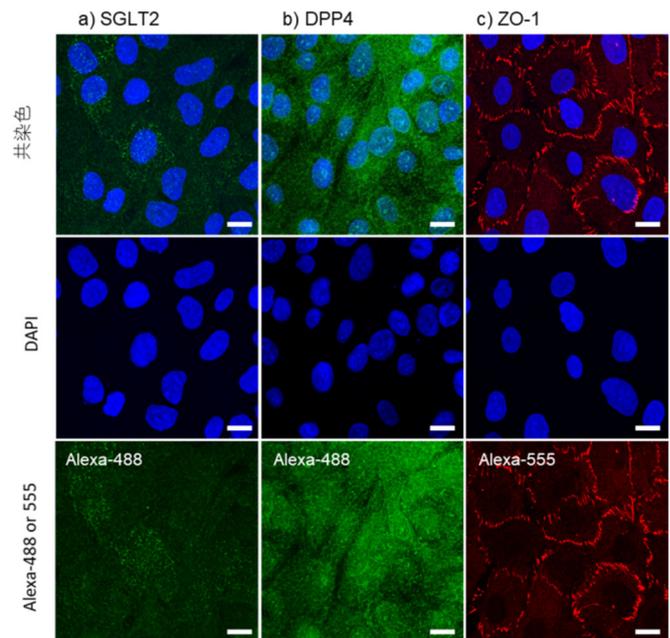
蛍光免疫染色により ciRPTEC の SGLT2 と DPP4 のタンパク質発現を確認した(図 6)。さらに上皮細胞マーカーの ZO-1 の発現も観察した。また、位相差顕微鏡を用いて ciRPTEC の細胞形態を観察した(図 7)。蛍光免疫染色に用いた SGLT2 および DPP4 の抗体を用いて、ciRPTEC のタンパク質発現についてもウエスタンブロット法で確認した(図 7)。

不死化クローン化近位尿細管細胞の病的刺激に対する反応性

ciRPTEC に対する Ang II 刺激が、ATRAP および SIRT1 mRNA 発現量にどのような影響を与えるか評価した。ciRPTEC では、Ang II 刺激により ATRAP mRNA 発現量が有意に低下した(図 8)。一方で SIRT1 mRNA 発現量には変化を認めなかった(図 8)。また、SIRT1 と ATRAP の発現量を上昇させる刺激として、血清飢餓刺激がこれまで報告されている(Shang L, et al. *J Cell Mol Med*, 13(10): 4176-84, 2009; Matsuda M, Tamura K, et al. *Physiol Genomics*, 43 : 884-894, 2011)。そこで本研究でも ciRPTEC に対する血清飢餓刺激による、ATRAP および SIRT1 mRNA 発現量に与える影響について評価した。その結果、血清飢餓刺激により ATRAP および SIRT1 mRNA 発現量は有意に上昇した(図 8)。

ATRAP ノックダウンを行った際の不死化クローン化近位尿細管細胞における SIRT1 の発現量変動及び SIRT1 タンパクの半減期への影響

ciRPTEC において、siRNA を用いた ATRAP ノックダウンを行い、SIRT1 の発現量へ与える影響を評価した。ciRPTEC において ATRAP ノックダウンにより、ATRAP mRNA およびタンパク質発現量は減少した(図 9)。また、血清飢餓刺激により ATRAP mRNA 発現量が増加した。一方、ATRAP タンパク質発現量については血清飢餓刺激で変化は認めなかった(図 9)。SIRT1 については、ATRAP ノックダウンで mRNA 発現量は変動しなかったが、タンパク質発現量は有意に減少した。ATRAP ノックダウンの有無に関わらず、血清飢餓刺激によって SIRT1 mRNA 発現量が増加した。しかし、SIRT1 mRNA の発現量増加に関わらず、タンパク質発現量は変化を認めなかった。次に、ATRAP ノックダウンが SIRT1 タンパクの安定性に影響を与えるかどうかを評価するために、タンパク質合成阻害剤



a-c) スケールバー ; 20µm.

図 6 蛍光免疫染色による SGLT2, DPP4, ZO-1 の発現上段;細胞核と各タンパク質の共染色,中段;ciRPTEC の核染色,下段;各タンパク質の蛍光染色。(a)SGLT2, (b) DPP4, (c)ZO-1。

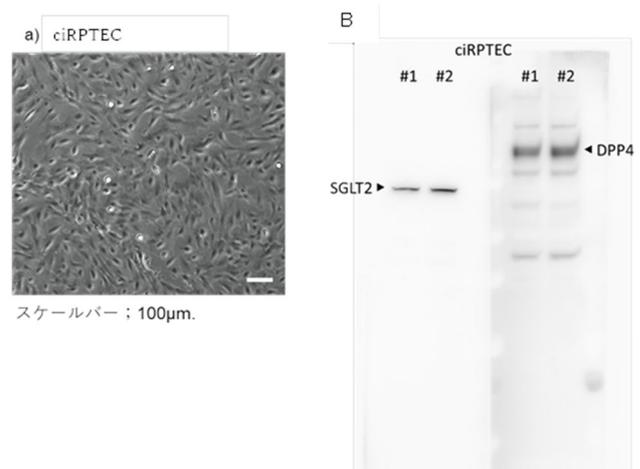


図 7 ciRPTEC の細胞形態とウエスタンブロット法による SGLT2, DPP4 のタンパク質発現の評価。A;通常のディッシュで培養された ciRPTEC の透過画像。EVOS FL システム(Life Technologies)を使用して位相コントラスト画像を観察した。スケールバーは 100µm を示す。B;SGLT2 および DPP4 抗体を用いて、各タンパク質を検出した。矢頭は目的タンパク質の予測された分子量を示す。#1 と #2 は、異なる日に回収した ciRPTEC 全タンパク抽出液を使用した。

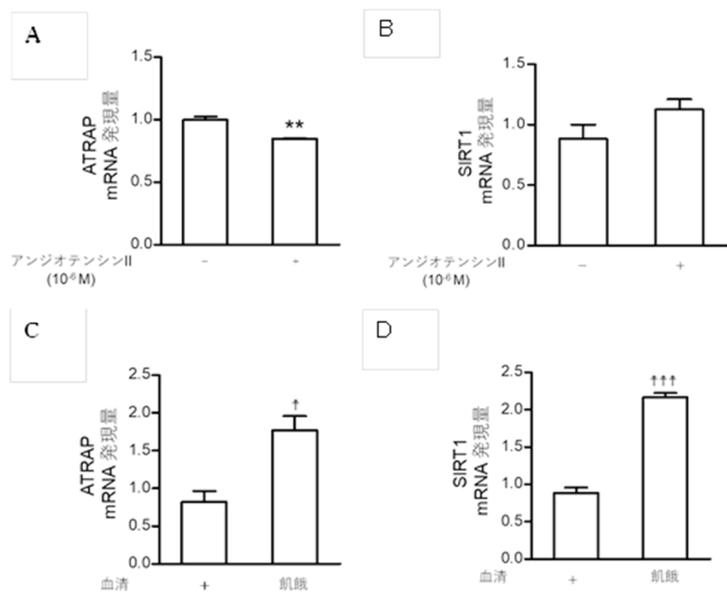


図8 ciRPTECに対するアンジオテンシンII刺激および血清刺激による、ATRAP、SIRT1の発現量変動について (A) アンジオテンシンII刺激に対するATRAP mRNAの発現量変動、(B)アンジオテンシンII刺激に対するSIRT1 mRNAの発現量変動、(C)血清飢餓刺激に対するATRAP mRNAの発現量変動、(D)血清飢餓刺激に対するSIRT1 mRNAの発現量変動。各群 N=3。値は平均値±標準誤差。
 **P=0.01, vs アンジオテンシンII (10⁻⁶M)-。
 † P=0.05, † † † P=0.001 vs 血清+。

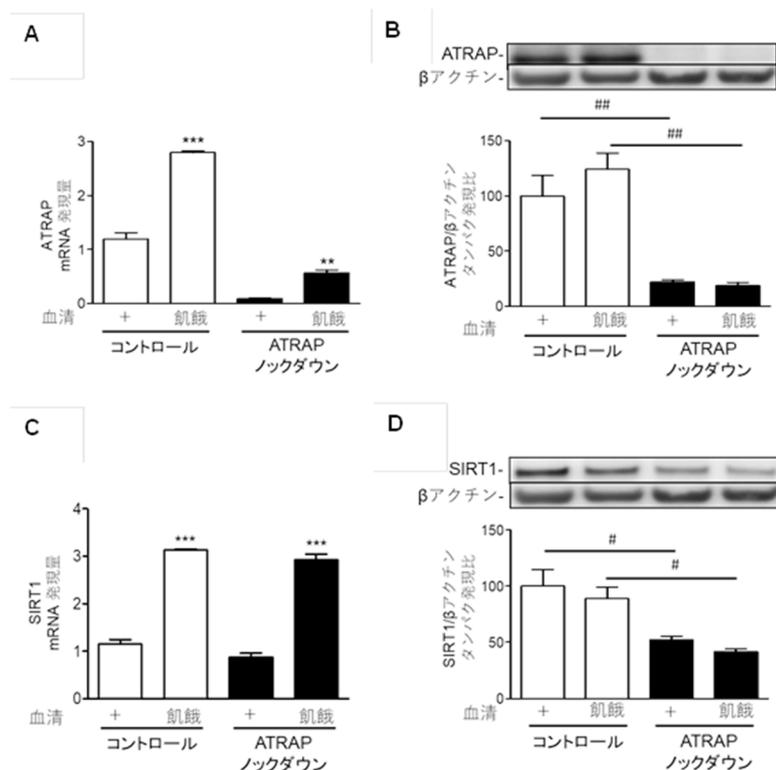


図9 ATRAP ノックダウンによる SIRT1 mRNA, タンパク質の発現量変動及び SIRT1 タンパクの半減期への影響
 ciRPTEC を、コントロール siRNA (コントロール), ATRAP siRNA (ATRAP ノックダウン) で 48 時間処理した後、24 時間の血清飢餓刺激をかけた。(A) 血清飢餓刺激有無での ATRAP mRNA の発現量変動、(B) 血清飢餓刺激有無での ATRAP タンパクの発現量変動、(C) 血清飢餓刺激有無での SIRT1 mRNA の発現量変動、(D) 血清飢餓有無での SIRT1 タンパクの発現量変動、(E) ATRAP ノックダウンによる ciRPTEC の SIRT1 タンパクの半減期解析、ciRPTEC へ siRNA トランスフェクションを行い、48 時間後に新規タンパク質合成を抑制するエメチン処理を行った。エメチン処理の 0, 2, 4, および 8 時間後にそれぞれ細胞を回収した。時間 0 の SIRT1 タンパク発現レベルが ATRAP ノックダウン群で減少したため、0 時間での SIRT1 タンパクの信号強度は露光時間を調整することにより、コントロール群と ATRAP ノックダウン群で同等にした。(A)-(D) は二元配置分散分析によって解析した。値は平均±標準誤差を表す。*P<0.01, ***P<0.001 vs 血清(+), #P<0.05, ##P<0.01 vs コントロール。

であるエメチンを使用して、ATRAP ノックダウン下での ciRPTEC における SIRT1 タンパク質の半減期を評価した。ATRAP のノックダウンは ciRPTEC の SIRT1 タンパクの安定性には影響を与えなかった(図 9)。

ATRAP ノックアウトを行った際の不死化クローン化近位尿細管細胞における SIRT1 の発現量変動

ciRPTEC において、siRNA による ATRAP ノックダウンで、一定量の ATRAP mRNA を特に血清飢餓条件下で保持していた。そのため、CRISPR-CAS9 システムを用いて機能的な ATRAP をノックアウトした際に SIRT1 タンパクの発現量に与える影響を解析した。ATRAP ノックアウト ciRPTEC の作製には、CAS9 とピューロマイシン耐性遺伝

子、およびヒト ATRAP 遺伝子の第4エクソンの3'側のスプライシング部位を標的とする sgRNA (single guide RNA) または非標的 sgRNA を発現するレンチウイルスを用いた。レンチウイルスをそれぞれ ciRPTEC に感染させ、ピューロマイシンによる薬剤選択を行い、ウェスタンブロット法で ciRPTEC の ATRAP タンパクの発現が消失したことを確認した。この際、ATRAP タンパクの欠損は、定常状態または血清飢餓刺激下のいずれにおいても SIRT1 mRNA 発現に影響を与えなかった(図 10)。一方、SIRT1 タンパクの発現量は、ATRAP ノックアウト群において血清飢餓刺激により有意に減少したが、コントロール群では有意な減少は認めなかった(図 10)。

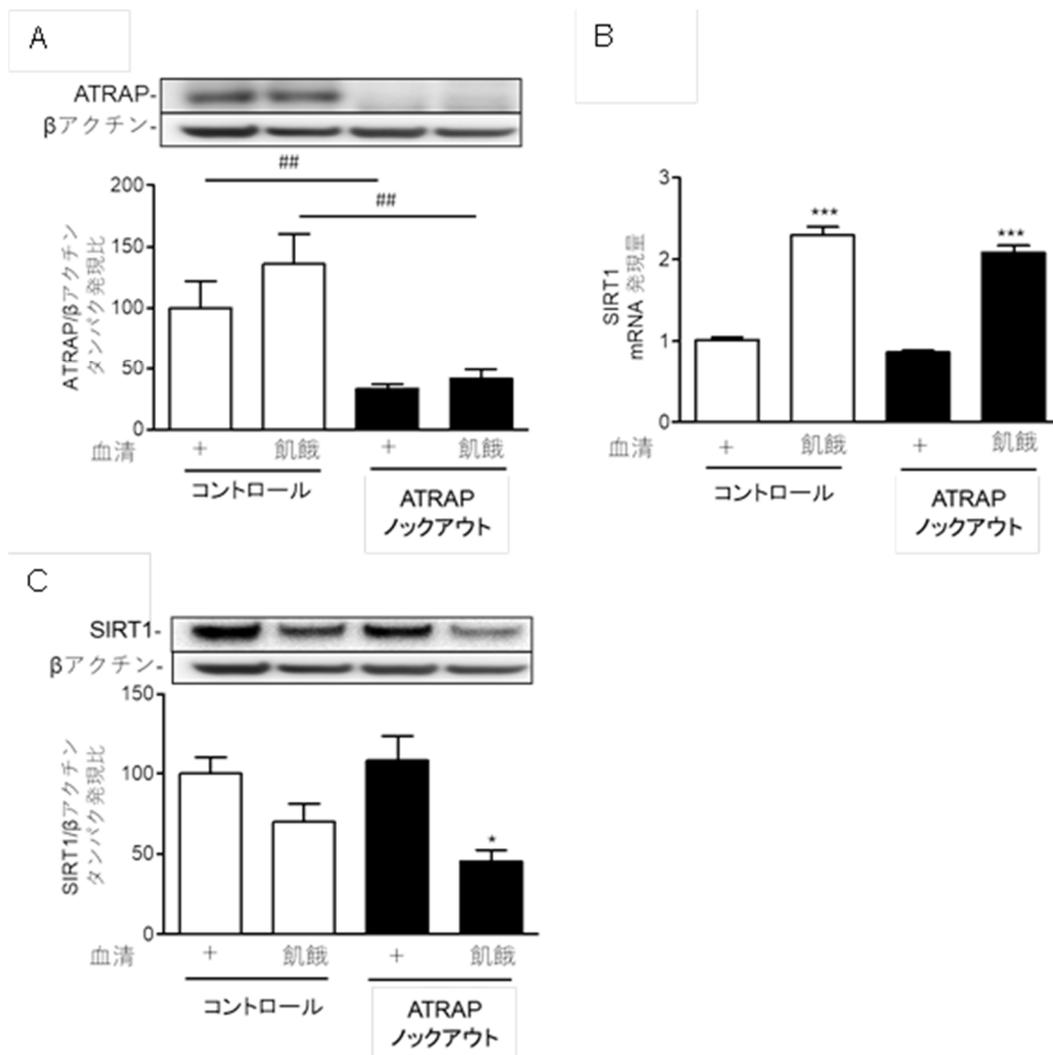


図 10 ATRAP ノックアウトによる SIRT1 mRNA, タンパク発現量の発現量変動 (A) 血清飢餓刺激有無での ATRAP タンパクの発現量変動, (B) 血清飢餓刺激有無での SIRT1 mRNA の発現量変動, (C) 血清飢餓有無での SIRT1 タンパクの発現量変動。ATRAP, SIRT1 タンパクの発現量は β -アクトチンをコントロールとして定量化した。二元配置分散分析によって解析した。値は平均 \pm 標準誤差を表す。* P <0.05, *** P <0.001 vs 血清(+), ### P <0.01 vs コントロール

4. 考 察

in vivo の実験結果からは、腎近位尿細管特異的な ATRAP の局所的な発現低下は慢性 Ang II 刺激性高血圧を増悪させないことが明らかになった。研究代表者らは、これまでに全身性 ATRAP-KO マウスでは慢性 Ang II 刺激によってナトリウム再吸収が増加し、慢性 Ang II 刺激性高血圧が増悪することを報告している。一方で、腎尿細管 ATRAP 高発現マウスでは慢性 Ang II 刺激によるナトリウム再吸収の増加が抑制され、慢性 Ang II 刺激性高血圧が抑制されることも報告している。これらの報告において、慢性 Ang II 刺激下では上皮性ナトリウムチャンネル(epithelial sodium channel; ENaC: 遠位尿細管系の主要なナトリウムチャンネル)の発現亢進が、全身性 ATRAP-KO マウスでは野生型マウスと比較して増強していた。反対に、腎尿細管 ATRAP 高発現マウスでは野生型マウスと比較して、Na⁺-Cl⁻ cotransporter (NCC) や ENaC といった遠位尿細管系の主要なナトリウムチャンネルの慢性 Ang II 刺激による発現亢進が抑制されていた。しかし、近位尿細管系の主要なナトリウムチャンネルである sodium-proton antiporter 3 (NHE3) の発現は、慢性 Ang II 刺激下において、全身性 ATRAP-KO マウスと野生型マウス、あるいは腎尿細管 ATRAP 高発現マウスと野生型マウスとで同等であった。今回の研究結果と研究代表者らのこれまでの知見から総合的に考察すると、慢性 Ang II 刺激性高血圧の病態形成において腎近位尿細管 ATRAP が果たす役割は小さく、腎 ATRAP は主に腎遠位尿細管 ATRAP を介したメカニズムにより慢性 Ang II 刺激性高血圧を抑制する作用を発揮すると考えられる。

in vitro の実験結果から、ciRPTEC における一過性の ATRAP 発現低下が Ang II 刺激なしに SIRT1 タンパク質の発現量を低下させることを明らかにした。すなわち、近位尿細管において、ATRAP が Ang II-AT1 受容体シグナル伝達経路と非依存的に SIRT1 タンパク質の発現を調節していることが示唆された。一方、ATRAP のノックダウンや欠損は SIRT1 mRNA の発現を変化させなかった。ciRPTEC において、SIRT1 タンパク質の発現は、SIRT1 mRNA の発現と必ずしも一致せず、血清飢餓によって SIRT1 mRNA 蓄積を誘導したとしても SIRT1 タンパク質の発現は変化しなかった。このことは、ciRPTEC における SIRT1 タンパク質の存在量が、主にタンパク質新規合成ま

たは安定性のレベルで調節され、mRNA 転写または安定性のレベルでは調節されないことを示すものであると考えられる。SIRT1 は、加齢に伴う慢性腎臓病の病因に関与する分子であり、様々な機序を介して腎臓をはじめ、臓器保護的に働くタンパクである。今回の研究は加齢に伴う腎臓の線維化に ATRAP の関与を示した我々の以前の報告と合わせて、ATRAP が SIRT1 タンパク質発現を調節し、加齢に伴う慢性腎臓病の発症機序にどのように関与しているかのメカニズム解析の一助になると考えられた。

5. 今後の課題

本研究の結果、全身性 ATRAP-KO マウスを用いての検討では未解明であった、近位尿細管と遠位尿細管の区分特異的な ATRAP の腎尿細管機能制御作用の一端が明らかにされた。今後は近位尿細管 ATRAP の機能やその発現・活性調節機序により焦点を当てて、培養細胞系や動物実験系を含めての多面的な解析を推進していく予定である⁽¹⁻²⁷⁾。

6. 文 献

- 1) Daviet L, Lehtonen JY, Tamura K, Griesse 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) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

- 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) 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.
- 10) 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.
- 11) 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*, 43:884-94, 2011.
- 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) Matsuda M, Tamura K, Wakui H, Maeda A, Ohsawa M, Kanaoka T, Azushima K, Uneda K, Haku S, Tsurumi-Ikeya Y, Toya Y, Maeshima Y, Yamashita A, Umemura S. Upstream Stimulatory Factors 1 and 2 Mediate The Transcription of Angiotensin II Binding and Inhibitory Protein. *J Biol Chem*, 288:19238-49, 2013.
- 15) 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.
- 16) Wakui H, Dejima T, Tamura T, Uneda K, Azuma K, Maeda A, Ohsawa M, Kanaoka T, Azushima K, Kobayashi K, Matsuda M, Yamashita A, Umemura S. Activation of angiotensin II type 1 receptor associated protein exerts an inhibitory effect on vascular hypertrophy and oxidative stress in angiotensin II-

- mediated hypertension. *Cardiovasc Res*, 100:511-9, 2013.
- 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) Azushima K, Ohki K, Wakui H, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Haruhara K, Kinguchi S, Matsuda M, Maeda A, Toya Y, Yamashita A, Umemura S, Tamura K. Adipocyte-Specific Enhancement of Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein Ameliorates Diet-Induced Visceral Obesity and Insulin Resistance. *J Am Heart Assoc*. 6(3): e004488, 2017.
 - 21) Uneda K, Wakui H, Maeda A, Azushima K, Kobayashi R, Haku S, Ohki K, Haruhara K, Kinguchi S, Matsuda M, Ohsawa M, Minegishi S, Ishigami T, Toya Y, Atobe Y, Yamashita A, Umemura S, Tamura K. Angiotensin II type 1 receptor-associated protein regulates kidney aging and lifespan independent of angiotensin. *J Am Heart Assoc*, 6: e006120, 2017.
 - 22) Kobayashi R, Wakui H, Azushima K, Uneda K, Haku S, Ohki K, Haruhara K, Kinguchi S, Matsuda M, Ohsawa M, Toya Y, Nishiyama A, Yamashita A, Tanabe K, Maeshima Y, Umemura S, Tamura K. An angiotensin II type 1 receptor binding molecule has a critical role in hypertension in a chronic kidney disease model. *Kidney Int*, 91: 1115-1125, 2017.
 - 23) Ohki K, Wakui H, Kishio N, Azushima K, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Haruhara K, Kinguchi S, Yamaji T, Yamada T, Minegishi S, Ishigami T, Toya Y, Yamashita A, Imajo K, Nakajima A, Kato I, Ohashi K, Tamura K. Receptor-associated protein inhibits angiotensin II-induced insulin resistance with suppression of oxidative stress in skeletal muscle tissue. *Sci Rep*, 8: 2846, 2018.
 - 24) Haruhara K, Wakui H, Azushima K, Kurotaki D, Kawase W, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Ohki K, Kinguchi S, Ohsawa M, Minegishi S, Ishigami T, Matsuda M, Yamashita A, Nakajima H, Tamura T, Tsuboi N, Yokoo T, Tamura K. Angiotensin receptor-binding molecule in leukocytes in association with the systemic and leukocyte inflammatory profile. *Atherosclerosis*, 269: 236-244, 2018.
 - 25) Kinguchi S, Wakui H, Azushima K, Haruhara K, Koguchi T, Ohki K, Uneda K, Matsuda M, Haku S, Yamaji T, Yamada T, Kobayashi R, Minegishi S, Ishigami T, Yamashita A, Fujikawa T, Tamura K. Effects of ATRAP in renal proximal tubules on angiotensin-dependent hypertension. *J Am Heart Assoc*, 8: e012395, 2019.
 - 26) Yamaji T, Yamashita A, Wakui H, Azushima K, Uneda K, Fujikawa Y, Haku S, Kobayashi R, Ohki K, Haruhara K, Kinguchi S, Ishii T, Yamada T, Urate S, Suzuki T, Abe E, Tanaka S, Kamimura D, Ishigami T, Toya Y, Takahashi H, Tamura K. Angiotensin II type 1 receptor-associated protein deficiency attenuates sirtuin1 expression in an immortalised human renal proximal tubule cell line. *Sci Rep*, 9(1):16550, 2019.
 - 27) Wakui H. The pathophysiological role of angiotensin receptor-binding protein in hypertension and kidney diseases: Oshima Award Address 2019. *Clin Exp Nephrol*. 24(4):289-294, 2020.

7. 論文業績

1. Haruhara K, Wakui H, Azushima K, Kurotaki D, Kawase W, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Ohki K, Kinguchi S, Ohsawa M, Minegishi S, Ishigami T, Matsuda M, Yamashita A, Nakajima H, Tamura T, Tsuboi N, Yokoo T, Tamura K. Angiotensin receptor-binding molecule in leukocytes in association with the systemic and leukocyte inflammatory profile. **Atherosclerosis**, 269: 236-244, 2018.
2. Haku S, Wakui H, Azushima K, Haruhara K, Kinguchi S, Ohki K, Uneda K, Kobayashi R, Matsuda M, Yamaji T, Yamada T, Minegishi S, Ishigami T, Yamashita A, Ohashi K, Tamura K. Early Enhanced Leucine-Rich α -2-Glycoprotein-1 Expression in Glomerular Endothelial Cells of Type 2 Diabetic Nephropathy Model Mice. **Biomed Res Int**, 2018: 2817045, 2018.
3. Kinguchi S, Wakui H, Azushima K, Haruhara K, Koguchi T, Ohki K, Uneda K, Matsuda M, Haku S, Yamaji T, Yamada T, Kobayashi R, Minegishi S, Ishigami T, Yamashita A, Fujikawa T, Tamura K. Effects of ATRAP in renal proximal tubules on angiotensin-dependent hypertension. **J Am Heart Assoc**, 8: e012395, 2019.
4. Azushima K, Uneda K, Wakui H, Ohki K, Haruhara K, Kobayashi R, Haku S, Kinguchi S, Yamaji T, Minegishi S, Ishigami T, Yamashita A, Tamura K. Effects of rikkunshito on renal fibrosis and inflammation in angiotensin II-infused mice. **Sci Rep**, 9(1): 6201, 2019.
5. Tamura K, Waki K, Kawai Y, Ueda E, Ishii T, Wakui H. Possible interesting link between dipping status and morning surge for subclinical target organ damage in hypertension. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, 21(9):1295-1297, 2019.
6. Kinguchi S, Wakui H, Ito Y, Kondo Y, Azushima K, Osada U, Yamakawa T, Iwamoto T, Yutoh J, Misumi T, Aoki K, Yasuda G, Yoshii T, Yamada T, Ono S, Shibasaki-Kurita T, Hosokawa S, Orime K, Hanaoka M, Sasaki H, Inazumi K, Yamada T, Kobayashi R, Ohki K, Haruhara K, Kobayashi Y, Yamanaka T, Terauchi Y, Tamura K. Improved home BP profile with dapagliflozin is associated with amelioration of albuminuria in Japanese patients with diabetic nephropathy: the Yokohama add-on inhibitory efficacy of dapagliflozin on albuminuria in Japanese patients with type 2 diabetes study (Y-AIDA study). **Cardiovasc Diabetol**, 18(1): 110, 2019.
7. Yamaji T, Yamashita A, Wakui H, Azushima K, Uneda K, Fujikawa Y, Haku S, Kobayashi R, Ohki K, Haruhara K, Kinguchi S, Ishii T, Yamada T, Urate S, Suzuki T, Abe E, Tanaka S, Kamimura D, Ishigami T, Toya Y, Takahashi H, Tamura K. Angiotensin II type 1 receptor-associated protein deficiency attenuates sirtuin1 expression in an immortalised human renal proximal tubule cell line. **Sci Rep**, 9(1):16550, 2019.
8. Wakui H, Yamaji T, Azushima K, Uneda K, Haruhara K, Nakamura A, Ohki K, Kinguchi S, Kobayashi R, Urate S, Suzuki T, Kamimura D, Minegishi S, Ishigami T, Kanaoka T, Matsuo K, Miyazaki T, Fujikawa T, Yamashita A, Tamura K. Effects of Rikkunshito treatment on renal fibrosis/inflammation and body weight reduction in a unilateral ureteral obstruction model in mice. **Sci Rep**, 10(1):1782, 2020.
9. Tamura K, Yamaji T, Azushima K, Wakui H. Mass clinical survey as a possible population strategy for the better control of hypertension in Japan. **Hypertens Res**, 43(5):463-465, 2020.
10. Wakui H. The pathophysiological role of angiotensin receptor-binding protein in hypertension and kidney diseases: Oshima Award Address 2019. **Clin Exp Nephrol**. 24(4):289-294, 2020.
11. Ueda E, Toya Y, Wakui H, Kawai Y, Azushima K, Fujita T, Saigusa Y, Yamanaka T, Yabuki Y, Mikami T, Goda M, Sugano T, Tamura K. Low-density-lipoprotein apheresis-mediated endothelial activation therapy to severe-peripheral artery disease study: Rationale and study design. **Ther Apher Dial**, 24(5):524-529, 2020.
12. Yamada T, Fujisaki T, Chopra N, Yamaji T, Azushima K, Kobayashi R, Kinguchi S, Urate S, Suzuki T, Abe E,

- Wakui H, Tamura K, Steinberg D. Effect of renin-angiotensin system blockers on contrast-induced acute kidney injury in patients with normal or mild-to-moderate reduced kidney function undergoing coronary angiography: A systematic review and meta-analysis. **Clin Nephrol**. 94(5):227-236, 2020.
13. Ohki K, Wakui H, Uneda K, Azushima K, Haruhara K, Kinguchi S, Urate S, Yamada T, Yamaji T, Kobayashi R, Kanaoka T, Minegishi S, Ishigami T, Fujikawa T, Toya Y, Tamura K. Effects of Erythropoietin-Stimulating Agents on Blood Pressure in Patients with Non-Dialysis CKD and Renal Anemia. **Kidney Dis (Basel)**, 6(4):299-308, 2020.
 14. Yamada T, Ueyama H, Chopra N, Yamaji T, Azushima K, Kobayashi R, Kinguchi S, Urate S, Suzuki T, Abe E, Saigusa Y, Wakui H, Partridge P, Burger A, Bravo CA, Rodriguez MA, Ivey-Miranda J, Tamura K, Testani J, Coca S. Systematic Review of the Association Between Worsening Renal Function and Mortality in Patients With Acute Decompensated Heart Failure. **Kidney Int Rep**, 5(9):1486-1494, 2020.
 15. Suzuki T, Kamimura D, Wakui H, Tamura K. May need more comprehensive approach to residual risks in well controlled hypertensive patients. **Hypertens Res**, 44(2):253-255, 2021.
 16. Yamada T, Wakabayashi M, Bhalla A, Chopra N, Miyashita H, Mikami T, Ueyama H, Fujisaki T, Saigusa Y, Yamaji T, Azushima K, Urate S, Suzuki T, Abe E, Wakui H, Tamura K. Cardiovascular and renal outcomes with SGLT-2 inhibitors versus GLP-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease: a systematic review and network meta-analysis. **Cardiovasc Diabetol**, 20(1):14, 2021.
 17. Kinguchi S, Wakui H, Ito Y, Kondo Y, Azushima K, Osada U, Yamakawa T, Iwamoto T, Yutoh J, Misumi No. 18C4,19C4,20C4 T, Yasuda G, Yoshii T, Haruhara K, Kobayashi Y, Yamanaka T, Terauchi Y, Tamura K. Relationship between basal sodium intake and the effects of dapagliflozin in albuminuric diabetic kidney disease. **Sci Rep**, 11(1):951, 2021.
 18. Ishii T, Kumagai T, Wakui H, Urate S, Tanaka S, Abe E, Suzuki T, Yamaji T, Kinguchi S, Kobayashi R, Haruhara K, Nakamura T, Kobayashi S, Tamura K. Tissue xanthine oxidoreductase activity in a mouse model of aristolochic acid nephropathy. **FEBS Open Bio**, 11(2):507-518, 2021.
 19. Kawai Y, Toya Y, Wakui H, Fujikawa T, Ueda E, Azushima K, Mitsunashi H, Kawano T, Kuji T, Yamaguchi S, Ohnishi T, Tamura K. Comparison of the effects of weekly and biweekly intravenous CERA administration on erythropoiesis: A randomized controlled trial. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, 23(4):870-878, 2021.
 20. Uneda K, Kawai Y, Yamada T, Kinguchi S, Azushima K, Kanaoka T, Toya Y, Wakui H, Tamura K. Systematic review and meta-analysis for prevention of cardiovascular complications using GLP-1 receptor agonists and SGLT-2 inhibitors in obese diabetic patients. **Sci Rep**, 11(1):10166, 2021.
 21. Kawai Y, Toya Y, Wakui H, Fujikawa T, Ueda E, Azushima K, Kinguchi S, Mitsunashi H, Kawano T, Kuji T, Yamaguchi S, Ohnishi T, Tamura K. Comparison of the effects of weekly and biweekly CERA administration on erythropoiesis in hemodialysis patients receiving iron supplementation. **J Pharmacol Sci**, 2021, in press.

Therapeutic Strategy against Salt Hypertension and Renal Aging via Novel Dual Actions of Receptor-binding Molecule

Kouichi Tamura¹, Hiromichi Wakui, Akio Yamashita², Kengo Azushima¹, Kazushi Uneda¹, Ryu Kobayashi

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

Summary

Background:

Angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-associated protein (ATRAP), which was originally identified as a molecule that binds to AT1R, is highly expressed in the kidney. We have shown that ATRAP functions as an endogenous inhibitor that suppresses AT1R hyperactivation at local tissue sites. In addition, we recently demonstrated that ATRAP deficiency exacerbates ageing-associated renal function decline and tubulointerstitial fibrosis using systemic ATRAP knockout mice. As a key mechanism, renal SIRT1 expression was significantly decreased in the aged ATRAP-knockout mice compared to the aged wild-type mice, possibly in an angiotensin-independent manner. The present study was performed to investigate the functional role of ATRAP in proximal tubules using proximal tubule-specific ATRAP knockout (PT-KO) mice and acclonal immortalised human renal proximal tubule epithelial cell line (ciRPTEC).

Methods:

We created proximal tubule-specific ATRAP knockout (PT-KO) mice using the Cre/loxP system with Pepck-Cre, and examined a functional role of proximal tubule ATRAP in angiotensin-mediated hypertension. Normal human RPTEC cells were immortalised by infection with lentivirus expressing hTERT and short hairpin RNA (shRNA) targeting p16 (plenti6_TERT_sh-p16). Then, we cloned the immortalised RPTEC and characterised the cells based on the expression of two proximal tubule markers, SGLT2 and DPP4. ATRAP knockdown and knockout tests were performed using ciRPTEC.

Results:

The BP of PT-KO mice was comparable with that of wild type (WT) mice at baseline. Moreover, the BP was significantly and similarly increased in response to 2 weeks of Ang II infusion in both PT-KO and WT mice. In addition, cumulative sodium balance during Ang II infusion was comparable for PT-KO and WT mice. In ciRPTEC, ATRAP-knockdown significantly reduced the SIRT1 protein expression level in the steady state. On the other hand, there was no significant difference in the expression level of SIRT1 mRNA by ATRAP-knockdown. Furthermore, in ATRAP-knockout cells compared to control cells, SIRT1 protein expression was significantly reduced in a serum starvation-dependent manner.

Conclusion:

We demonstrated that proximal tubule-specific down-regulation of ATRAP did not affect the Ang II-mediated hypertension *in vivo*. The results of *in vitro* study indicated that ATRAP may be one of the molecules involved in regulating the abundance of SIRT1 protein but not SIRT1 mRNA independent of blocking of AT1R signaling.

食塩バランス異常によって生じるサルコペニアの機序解明

西山 成¹, 中野 大介¹, 北田 研人¹, Rahman Asadur¹, 山崎 大輔², 森澤 紀彦³,
Jens M Titze³, Tomas Coffman⁴

¹香川大学医学部薬理学, ²大阪市総合医療センター, ³Cardiovascular and Metabolic disorders, DUKE-NUS
Medical School, Singapore, ⁴Dean, DUKE-NUS Medical School, Singapore

概要 本研究は、我々が最近明らかにした高食塩摂取によるカタボリズムがどのように循環動体の変化や、サルコペニアにつながるのかについて、CKD との病態と合わせて検討した。具体的には、「高食塩摂取によるカタボリズムと交食塩感受性高血圧の病態への関与の解明」、「高食塩摂取によるカタボリズムと交感神経の役割の解明」、「高食塩摂取によるカタボリズムによる循環動態の変化の同定」、「レニン・アンジオテンシン系の役割の解明」、「腎機能低下に伴う食塩バランスの異常に伴うサルコペニアのメカニズムの解明」を実施した。

その結果、正常ラットでは高食塩摂取によってカタボリズムが生じ、循環血行動態の抑制がかかること、すなわち典型的な夏眠反応が生じることを確認した。この反応の中心的な代謝変化は、肝臓での尿素サイクルの活性化によるものであるが、これを制御している肝臓組織内のアルギナーゼ活性は、腎臓の交感神経切除によって抑制されたことから、交感神経の深い関わりが示唆された。一方、ダール食塩感受性ラットでは、腎臓の障害程度に比例して血圧の日内変動が欠如することが明らかとなった。さらに、正常動物では観察されるカタボリズムによる夏眠反応が欠如していたが、腎交感神経の切除によってこの夏眠反応がもとに戻ることが示された。また、腎交感神経切除によって、ダール食塩感受性ラットの生命予防は著明に改善され、RAAS のコンポーネントのうち、キマーゼとMR が食塩感受性高血圧の進展、ならびにそれに伴う腎臓の障害などに深く関わっていることが示唆された。

腎障害を生じた際のカタボリズムとサルコペニア関係についても詳細な検討が実施された。本研究によって、CKD モデルである 5/6Nx ラットでは、体内で無機および有機浸透圧物質を産生・蓄積することにより致命的な脱水を防いでいるのではないかと考えられた。すなわち、腎臓の尿濃縮能が障害されているため、常に体水分が失われているにもかかわらず、腎外の代償性身体反応を引き起こすことによって、体液を保持しているといった生体の変化が生じているのではないかと考えられた。そのような反応は、肝臓における浸透圧物質である尿素やオスモライトの産生によってもたらされ、この代謝要求を支えるために骨格筋から内因性のエネルギーと窒素を供給し続ける必要があると考えられた。

以上、腎障害に伴うサルコペニアの要因の一つとして、体液ロスに対応するための生体メカニズムが重要な要因であると考えられる。このような体内の水分喪失に対する生理的適応は進化的に保存された生存戦略であり、致命的な脱水症状を防ぐために複数の臓器で複雑な生理的・代謝的調整うものとして我々の体内に保存されているものでないかと考えている。

1. 研究の背景と目的

1.1 背景

高齢化に伴って慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) の患者数が世界規模で増加しており、国際的な緊

急課題となっている。一方で最近、CKD 患者では筋肉量が劇的に低下していることが明らかとなり、高齢化に伴うサルコペニアとして死亡率にも関与していることが指摘されており、大きな問題となっている。

これに対してこれまでの申請者による研究により、「腎機能が低下すると、食塩バランスの異常を通じて個体老化を促進する」ことを強く示唆する多くの実験データが得られていた。特に最近我々は、食塩を過剰摂取した場合には、体液量の恒常性を維持するために筋肉の蛋白質分解(筋肉量の減少)を介した肝臓での尿素・内因性の産生(カタボリズム:異化)を生じることを発見し、「腎肝筋ネットワーク」と名付けた(図 1)。腎機能が低下した際にも同様に、「腎肝筋ネットワーク」が作動し、筋肉が自身を分解して尿素を産生し、体液バランスを保つシステムが働いていると考えられる。すなわち、腎障害の早期から相対的な食塩過剰状態になっており、尿素と体液の喪失に対応するために、筋肉が尿素産生を亢進させる結果、サルコペニアが生じるのではないかと考えられた。このように、食塩を過剰に摂取した状態や CKD の病態におけるサルコペニアの詳細な機序が解明されれば、健康寿命延伸に対する全く新しい概念のヘルスプロモーションや治療戦略を生み出すものではないかと考えられる。

1. 2 目的

腎機能低下に伴う食塩バランスの異常に伴うサルコペニアのメカニズムを解明することが、新しい予防・治療法の開発につながると考えられることから、本研究の最終目標は、「異化に伴う筋肉融解」と「CKD における食塩バランスの異常」との関連に着目し、その詳細なメカニズムの探索することを目的とした。特に、申請者らが最近明らかにした高食塩摂取によるカタボリズムがどのように循環動態の変化や、サルコペニアにつながるのかについて、CKD との病態と合わせて検討した。具体的には、本研究期間内に「高食塩摂取によるカタボリズムと交食塩感受性高血圧の

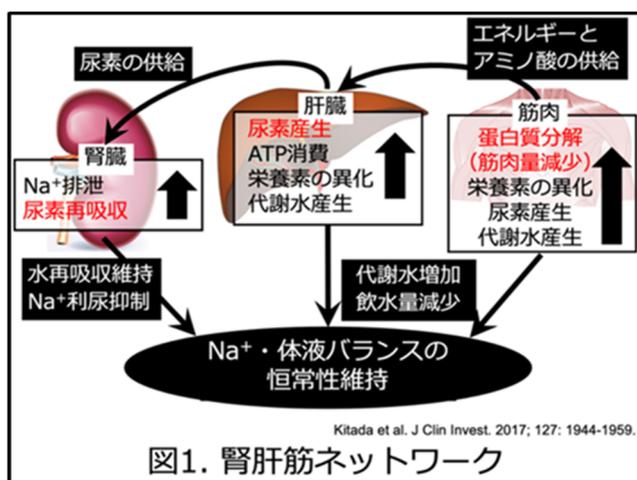


図1. 腎肝筋ネットワーク

病態への関与」、「高食塩摂取によるカタボリズムと交感神経の役割」、「高食塩摂取によるカタボリズムによる循環動態の変化の同定」、「レニン・アンジオテンシン系の役割」を検証した。これらの検証に加え、腎機能低下に伴う食塩バランスの異常に伴うサルコペニアのメカニズムを解明し、新しい予防・治療法の開発にむすびつけることを最終目標としているが、本研究期間内では以下のプロトコールについて検討を実施した。

- 1) 食塩感受性高血圧ラットにおける食塩摂取によるカタボリズムと循環動態の変化、ならびに腎交感神経の関与の検討
- 2) 高食塩で生じるカタボリズムにおける交感神経の役割の検討
- 3) 食塩感受性高血圧ラットが腎障害を生じた際の血圧の日内リズムの変化の検討
- 4) 食塩感受性高血圧の病態におけるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (renin -angiotensin -aldosterone system: RAAS) の関与について検討
- 5) 腎障害を生じた際のカタボリズムと、それに伴うサルコペニアなどの全身の変化の同定

2. 研究方法

Duke 大学シンガポール校との研究体制を構築し、Jens Titze 教授, Tomas Coffman 医学部長, 臨床薬理学北田研人博士と共同プロジェクトを開始した。研究期間中に北田博士は Duke 大学シンガポール校から香川大学医学部薬理学に移動して助教へ就任、森澤博士は香川大学医学部薬理学における博士課程のトレーニング終了後に Duke 大学シンガポール校にポスドクとして就任し、それぞれ研究を実施した。Rahaman 博士と山崎博士は、香川大学医学部薬理学にて研究を担当した(山崎博士は、現在、大阪市総合医療センターにて新型コロナウイルスの対応に従事)。具体的な研究手法としては、各臓器のメタボローム解析を Duke 大学シンガポール校が担当した一方で、全ての動物実験は香川大学で実施した。本研究に際し、肝臓の尿素産生に関わるアルギナーゼ活性を指標としたカタボリズムのモニタリング、テレメリー装置を使用した交感神経活動のモニタリング、腎・肝臓交感神経の切除術などの手技を香川大学で確立した。

2. 1 食塩感受性高血圧ラットにおける長期間高食塩摂取によるカタボリズムと mortality, ならびに腎交感神経の関与の検討(発表論文 3, 7)

高食塩摂取によるカタボリズムによる循環動態の変化を同定する目的で、ラットにテレメトリー装置を装着させ、動脈圧、脈拍、交感神経活動を連続でモニターするシステムを構築した。本システムのコンセプトは無麻酔で拘束のないストレス・フリーでの交感神経活動の測定にあるが、テレメトリーシステムを使用し、これを世界で初めて隔離することに成功した。具体的には、血圧センサーを大動脈に挿入した。腎交感神経に装着する電極を極細ステンレスワイヤーのものに改良し、アースとともに皮下を通じて背部に通し、腎交感神経へアプローチさせ、ラット体内にテレメトリー送信機を留置させた。交感神経の測定は、腎臓に入る腎交感神経に電極をかけ、電気信号を積分計算することによって評価する。今回は、覚醒下で連続モニターする必要があるため、特に電極の装着方法に工夫を施した。

本システムを用い、6週齢の雄性SDラットとダール食塩感受性高血圧ラットにおける高食塩摂取によるカタボリズムと循環動態を検証し、腎交感神経の切除による影響を同定するため、上記プロトコールと同様に、正常食塩食(0.3% NaCl)と水道水を4日間投与し、次に高食塩食(4% NaCl)と水道水を4日間投与し、続けて高食塩食(4% NaCl)と生理食塩水(0.9% NaCl)を4日間投与し、動脈圧、脈拍、交感神経活動を連続でモニターした(n=6)。

これに加え、6週齢の雄性ダール食塩感受性高血圧ラットにおける、長期・高食塩摂取によるカタボリズム・血圧の変化と腎交感神経の切除による影響、ならびに長期予後を検討した。ダール食塩感受性高血圧ラットに偽手術と正常食塩食(0.3% NaCl)+水道水を6週間投与した群(n=6)、偽手術と高食塩食(4% NaCl)+生理食塩水を6週間投与した群(n=6)、腎交感神経切除術と高食塩食(4% NaCl)+生理食塩水を6週間投与した群(n=6)にわけて、食事摂取量と体重の変化、ならびに肝臓アルギナーゼ活性の測定によってカタボリズムを評価した。収縮期血圧は毎週テールカフ法によって測定した。

これとは別の6週齢の雄性ダール食塩感受性高血圧ラットに対し、偽手術と高食塩食(4% NaCl)+生理食塩水を投与した群(n=9)、腎交感神経切除術と高食塩食(4% NaCl)+生理食塩水を投与した群(n=9)にわけ、それぞ

れの生存率を検討した。

2. 2 高食塩で生じるカタボリズムにおける交感神経の役割の検討(未発表データ)

雄性 C57BL/6 マウスに対し正常食塩食(0.3% NaCl)と水道水を投与(n=9)、高食塩食塩食(4% NaCl)と生理食塩水(0.9% NaCl)を40日間連日投与した。別の群において、雄性 C57BL/6 マウスに対し sham ope (n=20)、あるいは両腎交感神経の外科的手術(n=20)を施行し、前実験群と同様に高食塩食塩食(4% NaCl)と生理食塩水(0.9% NaCl)を40日間連日投与した。食事量と体重を連日モニターし、カタボリズムは肝臓の尿素産生に関わるアルギナーゼ活性を指標とした。さらに、これと全く同じプロトコールにて、肝臓交感神経についての検討を実施した。

2. 3 食塩感受性高血圧ラットが腎障害を生じた際の血圧の日内リズムの変化の検討(発表論文 4)

20匹の4週齢雄性ダール食塩感受性ラットを通常食塩食(0.3% NaCl)で2週間維持し、テレメトリーを埋め込んで一週間のリハビリの後、7週齢より、10匹はそのままの通常食塩食(0.3% NaCl)、10匹は高食塩食(8% NaCl)にスイッチし、以後10週間の24時間血圧と蛋白尿の変化を連続測定した。蛋白尿の測定は代謝ゲージによる蓄尿にて検討した。9時から16時までの平均血圧を平均した値を安静時血圧、21時から翌朝4時までの血圧値を活動時血圧とした。10週間観察後、高食塩食投与ダール食塩感受性ラットに対しては、再度、通常食塩食にスイッチし、さらに3週間観察した。

2. 4 食塩感受性高血圧の病態における RAAS の関与について検討(発表論文 1, 2, 5, 6, 8)

腎内レニン・アンジオテンシン系が食塩負荷に伴う肝臓のアルギナーゼ活性や尿素産生に関与しているかどうかについて、食塩とアンジオテンシン I を慢性投与するモデルにキマーゼ阻害薬を投与する実験にて検討した。雄性 C57BL/6 マウスに対し、高食塩食(4% NaCl)と生理食塩水(0.9% NaCl)を投与し、以下の処置を4週間実施した。1) ビークル投与群、2) ビークル+アンジオテンシン I (1 µg/kg/min) 投与群、3) 選択性キマーゼ阻害薬 TEI-F0086 (100 mg/kg/day, p.o.) の3群である。アンジオテンシン I は、浸透圧ポンプを利用して皮下投与した。血圧はテールカフ法にて毎週測定し、4週後にペントバルビタールナトリウム過剰投与にてサクリファイズした後、腎臓を摘出してアン

ジオテンシン II の産生を検討した。

ダール食塩感受性ラットの血圧上昇メカニズムとして、RAAS のうちアルドステロンの受容体であるミネラルコルチコイド受容体 (mineralocorticoid receptor: MR) の関与について検討を行った。5 週齢雄性ダール食塩感受性ラットに対し、正常食塩食 (0.5% NaCl, n=10), 高食塩食 (8% NaCl, n=10), あるいは高食塩食 + MR ブロッカー・エサキセレン (1 mg/kg/day, p.o., n=10) を 6 週間投与した。糸球体と尿細管間質細胞組織をレーザーキャプチャー法によって採取し、それぞれポドサイト障害 (ネフリン・ポドシン) と線維化 (α -SMA, コラーゲン I, TGF- β) マーカーの遺伝子発現を測定した。PAS・Azan 染色により腎障害を、デスミン染色によりポドサイト障害を、4-HNE 染色と NADPH oxidase コンポーネント遺伝子発現により腎臓の酸化ストレスをそれぞれ評価した。

2. 5 腎障害を生じた際のカタボリズムと、それに伴う全身の変化 (未発表データ)

7 週齢の雄性 Wister ラットに対し、偽手術 (n=18), あるいは 5/6 腎摘術 (以下, 5/6 Nx: n=33) を行い、腎障害モデルを作製して、1) 腎障害ラットにおける水分とナトリウムの分布の変化の同定、2) 腎障害ラットにおける肝臓と筋肉のカタボリズムの同定を実施した。メタボロームプロファイル解析として、尿素を除くすべての代謝物 (グルコース, アミノ酸, 脂肪酸, 尿素, メチルグリシン, プリン体など, 主要な代謝成分), 超高性能 LC-MS/MS (UPLC-MS/MS) (Metabolyn; Metabolon Inc., Morrisville, NC) で測定した。グルコース, アミノ酸, 脂肪酸, 尿素, メチルグリシン, プリンの主要な代謝成分は、超高性能 LC-MS/MS (UPLC-MS/MS) (Metabolyn; Metabolon Inc., Morrisville, NC) で測定した。

3. 研究結果

3. 1 食塩感受性高血圧ラットにおける長期間高食塩摂取によるカタボリズムと mortality, ならびに腎交感神経の関与の検討

ダール食塩感受性高血圧ラットにおける高食塩摂取によるカタボリズムと循環動態を検証し、腎交感神経の切除による影響を同定することを目的とした。我々は過去の研究によって、マウスに高食塩を与えてカタボリズムにする

モデルを構築しているが、ラットでの検討はこれまで行われていない。そこで、Sprague-Dawley (SD) ラットを使用して検討した。その結果、4% NaCl 食塩食に生理的食塩水を飲水させることによって、体重の減少を認めた (図 2)。

食事が一定にもかかわらず体重が減少していることから、マウスと同様に高食塩投与によってカタボリズムが生じているものと考え、以後、ラットでも 4% NaCl 食塩食に生理的食塩水を飲水させるモデルを使用することとした。

次に、SD ラットとダール食塩感受性ラットに対し、テレメトリー装置を埋め込み、正常食塩食 (0.3% NaCl) と水道水を 4 日間投与し、次に高食塩食 (4% NaCl) と水道水を 4 日間投与し、続けて高食塩食 (4% NaCl) と生理食塩水 (0.9% NaCl) を 4 日間投与し、動脈圧、脈拍、交感神経活動を連続でモニターした (図 3)。その結果、SD ラットを高食塩状態にしても血圧には有意な変化はなかったが、交感神経活動の減少に伴って心拍数の減少を認めた。これらの反応は、カタボリズムを介した夏眠のような状態になっているものではないかと考えている (図 3 左)。一方、図 3 右に示すダール食塩感受性を高食塩状態にすると、SD ラットで見られた交感神経活動や心拍数の減少は見られず、交感神経活動はむしろ亢進した。その結果、血圧の著名な上昇を認めた。

次に、腎交感神経の切除によってどのような変化が生じるのかについて検討した (図 4)。まず、腎交感神経除神経が正確に実施されているのかについて腎臓組織中のノルエピネフリンを HPLC 法によって測定した。その結果、図 4 左に示すように、腎交感神経除神経後は、腎臓ノルエピネフリン濃度がほぼゼロになった。すなわち、腎交感神経の除神経は、的確に実施されているものと考えられた。

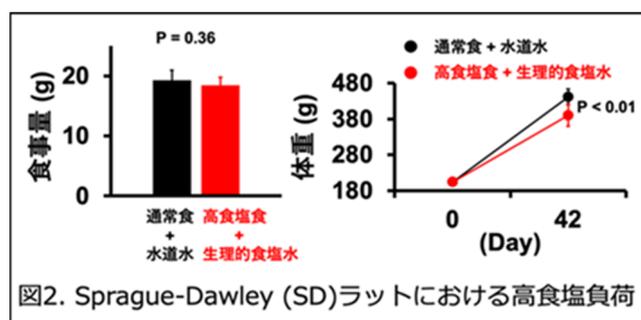


図2. Sprague-Dawley (SD)ラットにおける高食塩負荷

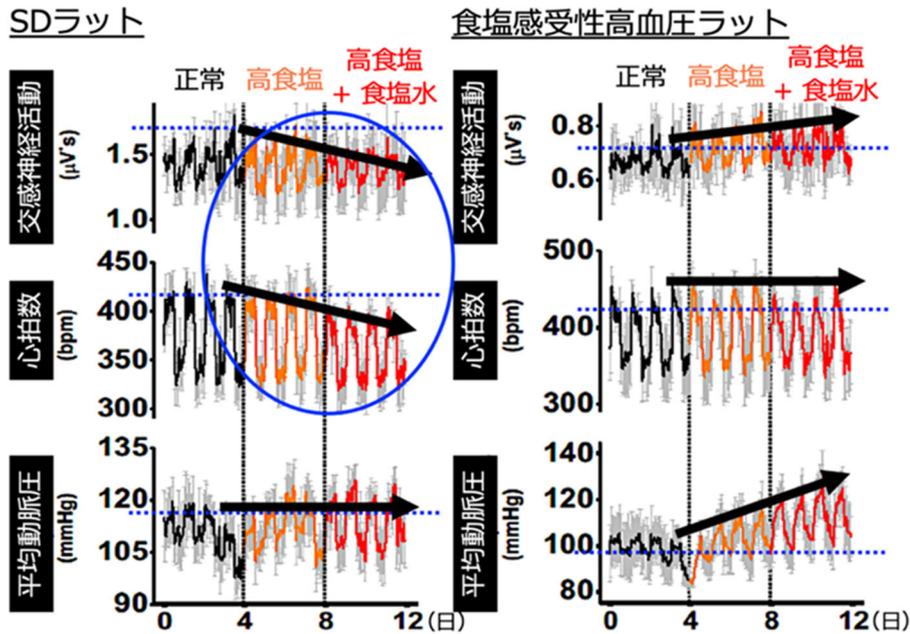


図3. 食塩負荷の変化による血行動態の変化

一方、腎交感神経切除はダール食塩感受性ラットにおける高食塩投与による血圧の上昇に影響を与えなかった(図4右)。

続いて、6週齢の雄性ダール食塩感受性高血圧ラットにおける、長期・高食塩摂取によるカタボリズム・血圧の変化と腎交感神経の切除による影響、ならびに長期予後を検討した。ダール食塩感受性高血圧ラットに偽手術と正常食塩食(0.3% NaCl) + 水道水を投与した群、偽手術と高食塩食(4% NaCl) + 生理食塩水を投与した群、腎交感神経切除術と高食塩食(4% NaCl) + 生理食塩水を投与した群にわけて、血圧の変化を測定したところ、正常食塩投与群と比較し、高食塩投与群では有意な血圧の上昇が認められた。これに対して、腎交感神経切除術は6週間の観察期間では有意な血圧の低下を認めなかった。一方、餌摂取量と体重の変化を評価したところ、餌摂取量は群間で有意な差がなかったにもかかわらず、体重は偽手術と高食塩食(4% NaCl) + 生理食塩水を投与した群で有意に減少していた。このような高食塩による体重減少は、腎交感神経切除術によって抑制されていた。一方、ダール食塩感受性高血圧ラットでは尿素サイクルに関与する肝臓の酵素活性の異常があると報告されているが、本研究でも肝臓のアルギナーゼ活性は群間で有意な差はみられなかった。

次に、別のダール食塩感受性高血圧ラットに長期間高

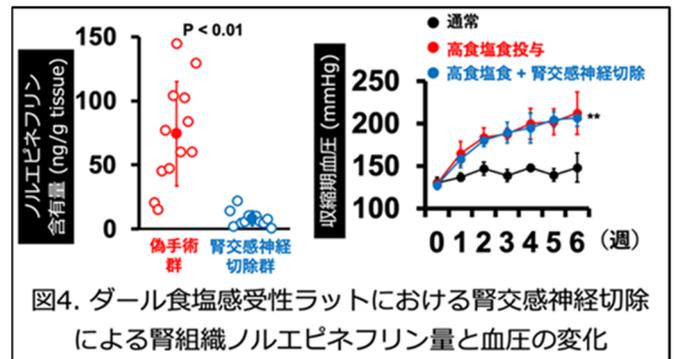


図4. ダール食塩感受性ラットにおける腎交感神経切除による腎組織ノルエピネフリン量と血圧の変化

食塩を投与して生存率を検討したところ、腎交感神経の切除が、有意に生存率を向上させることが明らかとなった(図5)。これらの結果は、食塩感受性高血圧ラットに高食塩を摂取させて高血圧が生じた場合、腎臓の交感神経活性化が血圧とは独立して心血管イベント等が生じて生存率が低下の低下に関与している事、カタボリズムの異常がその病態に関与することを示唆するものである。

3.2 高食塩で生じるカタボリズムにおける交感神経の役割の検討

C57BL/6 マウスにおいて腎交感神経の除神経を実施し、食塩負荷に伴う肝臓のアルギナーゼ活性や尿素産生を評価した。まず、正常マウスに4% NaCl食と生理的食塩水を3週間投与すると、正常食塩食(0.3% NaCl)で水道水を飲んでいる群と比較して、摂食量の増加が見られた。しかし、体重の増加は全く同様であった。一方、ペア・フィーディングにして食事量を一定にすると、

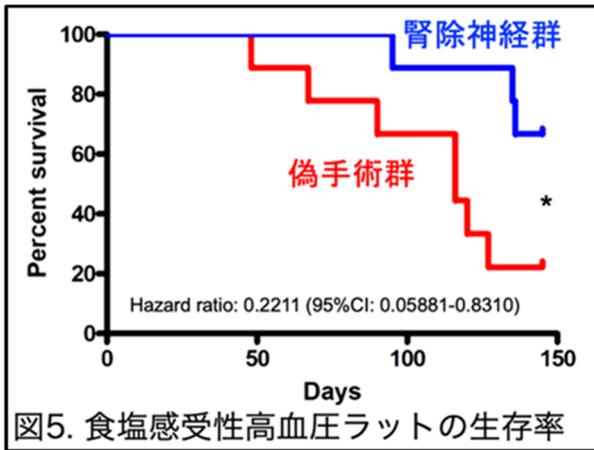


図5. 食塩感受性高血圧ラットの生存率

高食塩+生理的食塩水群は、通常食+水道水群よりも有意を持って体重の減少が見られた。4% NaCl 食と生理的食塩水を3週間投与した場合、通常の食事と水道水の飲水よりも体重が増えない理由としてカタボリズムが生じているのかについて確認するため、次に投与40日後にマウスをサクリし、肝臓組織を摘出して組織中の尿素産生の中心的役割を果たす酵素であるアルギナーゼ活性を測定した。その結果、4% NaCl 食と生理的食塩水を3週間投与すると通常の食事と飲水のマウスと比較して、有意に肝臓組織アルギナーゼ活性が上昇することが確認できた。

次に我々は、腎交感神経の切除が4% NaCl 食と生理的食塩水によって生じるカタボリズムへの影響をについて検討した。まず、腎交感神経の切除が完全に行われているかどうかについて腎組織中のノルエピネフリン含有量を測定することにより検討した。その結果、腎交感神経の切除が完全に行われ、腎組織中のノルエピネフリン含有量がほぼゼロになることを確認した。腎交感神経の切除が完全に行われた状態で4% NaCl 食と生理的食塩水によるカタボリズムを、正常食塩水(0.3% NaCl)と水道水の群と比較した。その結果、図6で示すように、正常では観察される4% NaCl 食と生理的食塩水によって生じる食事量の増加が見られなくなっていた。一方、体重の増加については、餌を自由に摂取させた場合もペア・フィーディングした場合も、4% NaCl 食+生理的食塩水と通常の食事+水道水の間で差は認められなかった(図7)。

さらに、4% NaCl 食と生理的食塩水を3週間投与すると、通常の食事と飲水のマウスと比較して、有意に肝臓組織アルギナーゼ活性が上昇するが、この反応が腎臓の交感神経を切除することによって、見られなくなることが判明した(図8)。

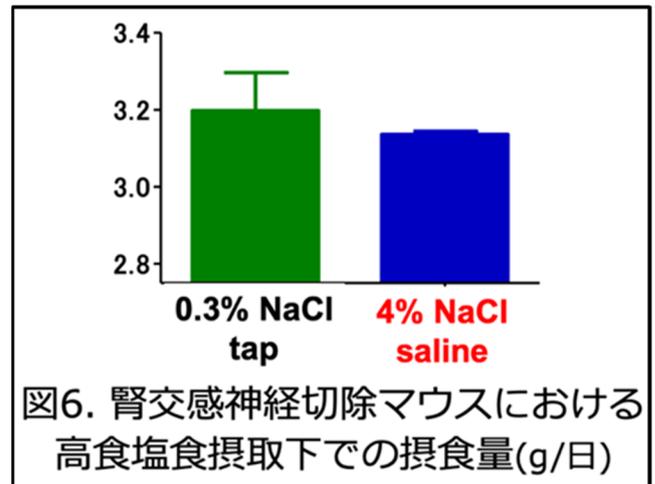


図6. 腎交感神経切除マウスにおける高食塩食摂取下での摂食量(g/日)

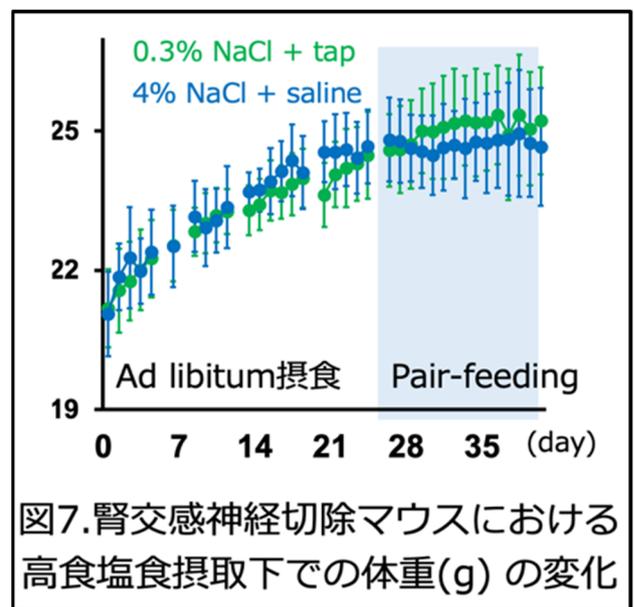


図7. 腎交感神経切除マウスにおける高食塩食摂取下での体重(g) の変化

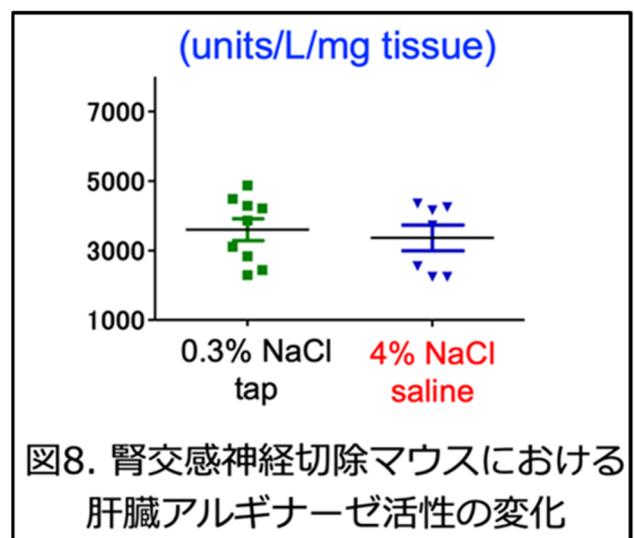


図8. 腎交感神経切除マウスにおける肝臓アルギナーゼ活性の変化

一方, 57BL/6 マウスにおいて肝臓交感神経の除神経を実施し, 4% NaCl 食と生理的食塩水負荷に伴う肝臓のアルギナーゼ活性を評価した。その結果, 肝臓の交感神経線維を外科的に切除(Liver denervation: LDN)すると, 右図に示す通り, 肝臓内のノルエピネフリン濃度は有意に減少したことから, 肝臓の交感神経切除は問題なくされていることが確認できた。しかし, 重篤な黄疸などの肝機能の悪化をはじめとする, 個体状態の極端な悪化が数多く見受けられたため, すべての実験を再度実施することとした。

以上の結果は, 交感神経が何らかのメカニズムによって, 高食塩摂取に伴う肝臓でのカタボリズムを制御していることを示唆するものである。

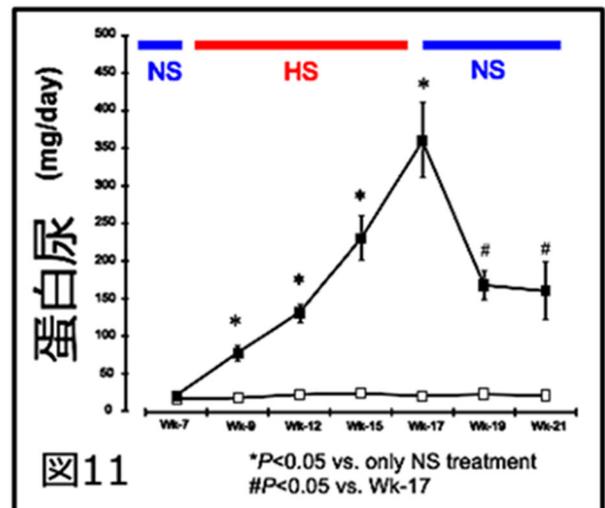
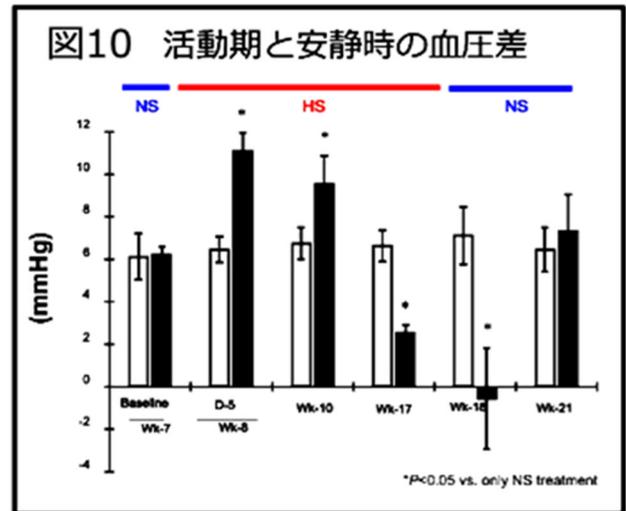
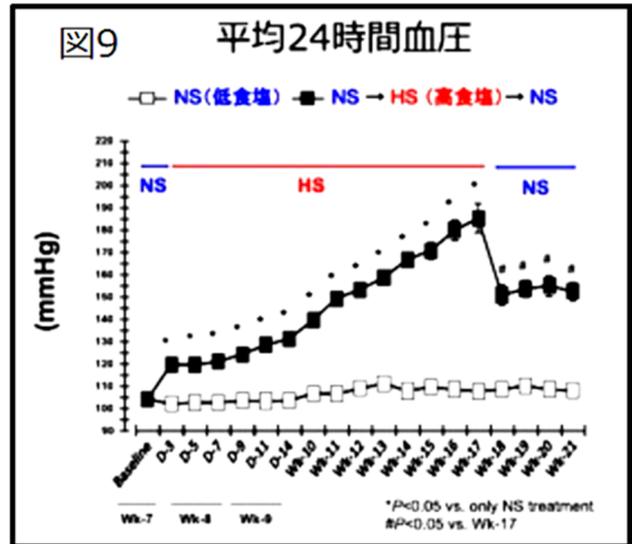
3.3 食塩感受性高血圧ラットが腎障害を生じた際の血圧の日内リズムの変化の検討

ダール食塩感受性ラットに高食塩食を投与すると, 直ちに血圧の上昇が認められた。この血圧の上昇は, 高食塩の投与中に時間依存性に続いたが, 低食塩食にスイッチすると, 低下に転じた。しかし, 血圧は低食塩によって低下するものの, 高食塩投与前の値までには戻らなかった(図9はテレメトリー法で測定した24時間の平均の動脈圧を示す)。一方, 活動期と安静時の12時間ごとの動脈圧の平均値については, 高食塩投与開始の数日後から *extremely dipper* パターンを示したが, 蛋白尿の増加は観察されなかった(図10)。高食塩を投与し続けると血圧がさらに上昇し, 2週後より蛋白尿も観察された(図11)。興味深いことに, 蛋白尿の増加に伴って血圧の日内変動が徐々に減少し, 7週後以後には消失した(*non-dipper* パターン)。14週高食塩投与後に減塩食(0.3% NaCl)に変更すると, 血圧・蛋白尿の低下を伴って血圧の日内変動が回復した。大変興味深いことに, これら観察期間では, 日中と夜間の血圧差が尿中蛋白排泄量と負の相関を示していた。

これらの結果より, ダール食塩感受性高血圧ラットでは, 高食塩投与による *non-dipper* パターンの血圧上昇が蛋白尿の進展に伴って出現するものと考えられた。

3.4 食塩感受性高血圧の病態における RAAS の関与について検討

キマーゼが食塩負荷に伴う高血圧の病態で肝臓のアルギナーゼ活性や尿素産生に関与しているかどうかにつ



いて、食塩とアンジオテンシン I を慢性投与するモデルにキマーゼ阻害薬を投与する実験にて検討した。その結果、キマーゼは食塩負荷に伴う肝臓のアルギナーゼ活性や尿素産生に関与していないことが判明した。

一方、ダール食塩感受性ラットに高食塩食を投与すると、著しい血圧の上昇を伴った蛋白尿、糸球体傷害、尿尿管間質の線維化、ポドサイト障害を生じていた。非ステロイド型 MR ブロッカーであるエサキセレン(ES-3510)は、これらの変化を有意に抑制した。高食塩食で異常を示した各種・腎臓パラメーターに対しても、エサキセレンはいずれも有意に抑制した。以上の結果より、腎内レニン活性が低い食塩感受性高血圧の病態では、アルドステロンの受容体である MR が関与している可能性が示唆された。しかし、エサキセレンは食塩負荷に伴う肝臓のアルギナーゼ活性や尿素産生に影響を与えなかった。

別のモデル動物として、高食塩投与 2 型糖尿病 KKAy マウスにおける病態における MR の関与についても検討した。雄性 11 週齢 2 型糖尿病 KKAy マウスを通常食塩食 (0.3% NaCl, n=5), あるいは高食塩食 (4% NaCl, n=8), 高食塩食 + エサキセレン (1 mg/kg/day, p.o., n=8), or 高食塩食 + スピロラクトン (20 mg/kg/day, p.o., n=7) の 3 群に分け、8 週間維持した。血圧はテールカフ法にて測定し、代謝ゲージにて採尿してアルブミン尿を測定した。また、レーザーキャプチャー法を利用して糸球体ポドシン・ネフリンの遺伝子発現を測定し、腎組織の酸化ストレスは、dihydroethidium 染色にて評価した。その結果、通常食を投与したマウスと比較して、高食塩食を負荷した 2 型糖尿病 KKAy マウスは、よりシビアな高血圧、アルブミン尿、糸球体ポドシン・ネフリンの遺伝子発現の低下、糸球体硬化(糸球体内 Periodic acid-Schiff stain 陽性部位)、腎間質線維化(Asan 陽性部位)、腎組織の酸化ストレス亢進を示した。エサキセレンとスピロラクトンは同様に降圧効果を示したが、スピロラクトンと比較してエサキセレンは、有意に糸球体ポドシン・ネフリンの遺伝子発現の低下とアルブミン尿・腎組織障害を抑制し、腎組織中の抗酸化効果を示した。以上の結果より、高食塩摂取による高血圧合併糖尿病の病態では、アルドステロンの受容体である MR が関与している可能性が示唆された。しかし、エサキセレンは食塩負荷に伴う肝臓のアルギナーゼ活性や尿素産生に影響を与えなかった。

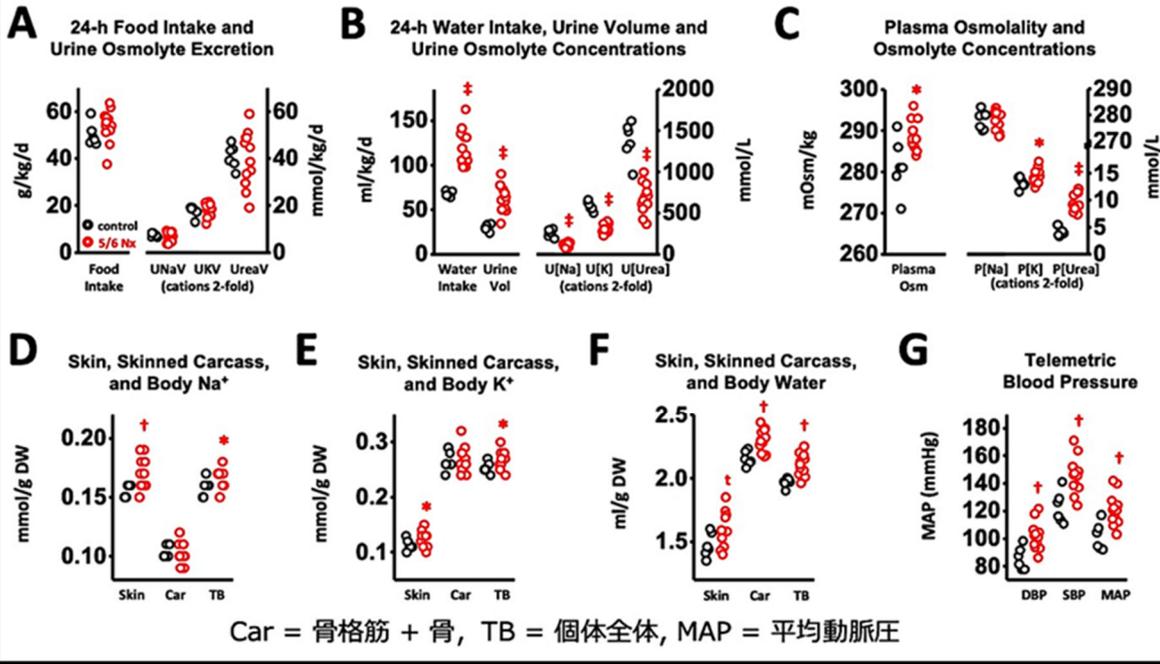
3.5 腎障害を生じた際のカタボリズムと、それに伴う全身の変化

まず、5/6 Nx ラットにおいて、腎機能の低下に伴って尿中の浸透圧物質や水の排泄量が減少する可動かについて検証した(図 12)。その結果、食物摂取量と尿中のオスモライト排泄量は、コントロールラットと 5/6 Nx ラットの間で差がなかった(図 12A)。ところが、5/6 Nx ラットの水分摂取量は持続的に増加し、同時に尿量も倍増した(図 12B)。尿量が増加したため、尿中の Na^+ 、 K^+ 、尿素の浸透圧物質の濃度が低下し(図 12B)、尿中の浸透圧が著しく低下して血漿浸透圧が上昇した(図 12C)。これらの結果は、本腎障害モデルでは尿が濃縮されなくなり、多尿になって体水分が失われやすくなり、それを水分摂取量の増加によって部分的に補ったことを示している。

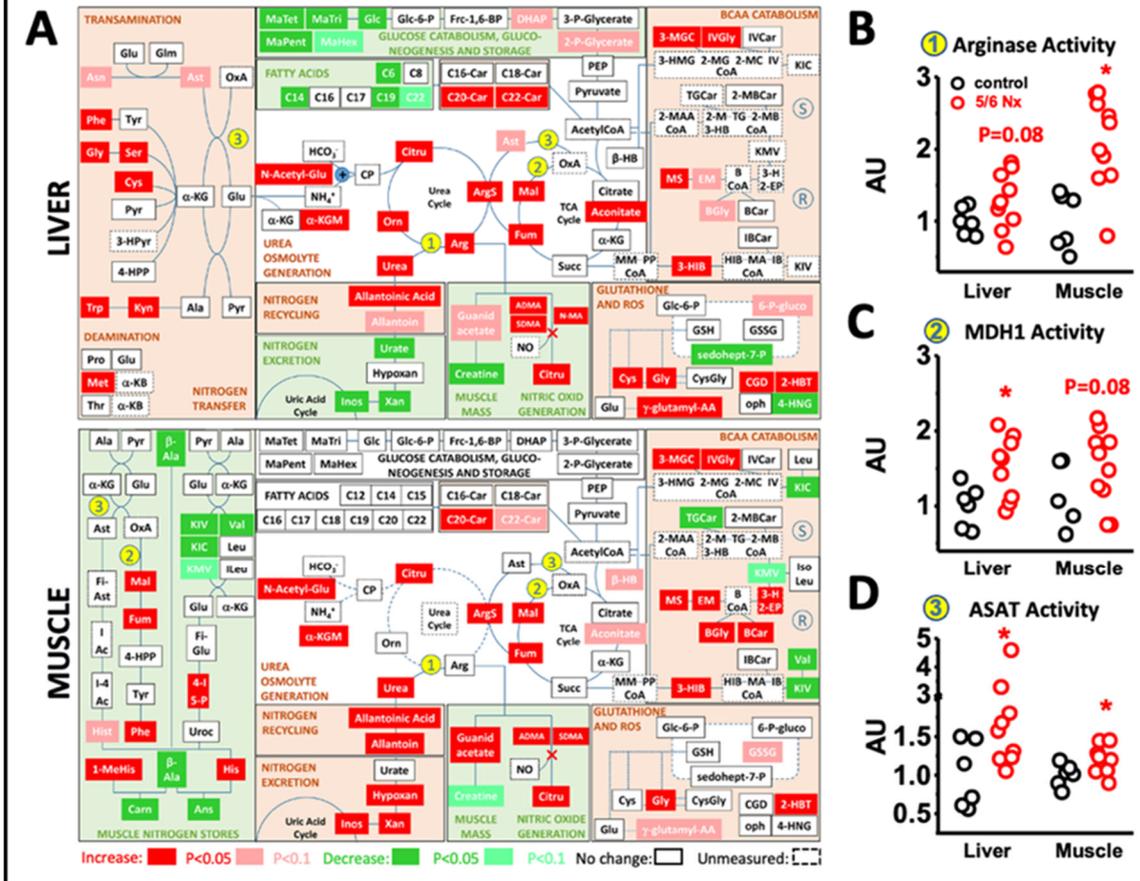
一方、5/6 Nx ラットでは、皮膚および全身の Na^+ および K^+ 含量が増加し(図 12D および 12E)、水分含量も皮膚と全身レベルで増加した(図 12F)。さらに、拡張期、収縮期、平均動脈血圧の上昇が認められた(図 12G)。

このような病態において、水分保持のために肝における浸透圧物質・尿素の生成のため、筋肉のエネルギーと窒素代謝が生じるのかどうかについて検討した。5/6Nx ラットで観察された血漿尿素濃度の上昇(図 12C)は、慢性腎不全における体液の減少が代償的な肝でのカタボリズムを引き起こしたことを示唆している。この仮説を検証するため、尿素サイクルやエネルギー代謝を分析した(図 13)。尿素は有機浸透圧物質であり、体液中に均等に分布しているため、細胞内や細胞外の体液量を優先的に増加させることなく、組織内に水分を保持する。肝臓での尿素生成には、アミノ酸からグルタミン酸への窒素移動とカルバモイルリン酸(CP)合成のための NH_4^+ としての窒素移動が必要である(図 13A)。実際、5/6 Nx ラットにおいて、肝アミノ酸濃度の上昇、 α -ケトグルタミン酸濃度(α -KGM; 肝 NH_4^+ 過剰負荷の指標)の上昇、N-アセチルグルタミン酸濃度(N-Acetyl-Glu)の上昇、アルギナーゼ酵素活性(アルギニンから尿素への窒素移行の律速酵素; 図 13B)の上昇、肝組織中の尿素の含有量が増加することを実証した。同様に、骨格筋の NH_4^+ 過剰負荷、アルギナーゼ活性の上昇、尿素濃度の上昇が見られた(図 13A, 13B)。これらの結果より、慢性腎不全 5/6Nx ラットでは、腎の水分喪失が体水分量を安定させるために、肝および肝外の尿素浸透圧の産

12



13



生・蓄積を増加させるためのカタボリズム代謝変化を引き起こしたのではないかと考えられた。

尿素合成には窒素・アミノ酸が最も重要であるが、5/6 Nx ラットでは摂食量の増加が認められなかった(図 12A)。そこで、筋タンパク質の異化分解が生じているかどうかについて検証した。HCO₃⁻とNH₄⁺からのCP合成に加え、尿素サイクルへの窒素移動はリンゴ酸(Mal)から炭酸オキサロ酢酸(OxA)の生成などに依存しているが、細胞質の酵素であるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT; 図 13A および 13D)によって触媒される。5/6 Nx ラットでは、細胞質でのオキサロ酢酸生成が促進され(図 13C)、ASAT 活性の上昇により炭酸転移が促進され(図 13D)、尿素サイクルへの窒素の移行が増加していることがわかった。このプロセスには、窒素供与体として機能する遊離アミノ酸の利用効率を高めることが必要であると考えられるため、分枝鎖アミノ酸代謝と骨格筋に蓄積されるエネルギー・窒素源として知られるカルノシンとアンセリンの代謝を調べた。

分岐鎖アミノ酸(BCAA)であるイソロイシン(ILeu)、ロイシン(Leu)、バリン(Val)が異化することで、ケト-β-メチルバレレート(KMV)、ケト-イソカプロエート(KIC)、ケト-イソバレレート(KIV)が生成される(図 13A)。BCAA の分解は、BCAA の窒素基がピルビン酸(Pyr)に転移してアラニン(Ala)に、オキサロアセテート(OxA)に転移してアスパラギン酸(Ast)に、あるいはケトグルタル酸(KG)に転移してグルタミン酸(Glu)になることで開始されると考えられる(図 13A)。5/6 Nx ラットの骨格筋では、バリン、KMV、KIC、KIV の量が減少し、BCAA の異化中間体であるβ-ヒドロキシ酪酸などが増加していることがわかった(図 13A)。一方、5/6 Nx ラットではカルノシンとアンセリンが枯渇しただけでなく、筋肉中のアラニンが選択的に生成され、骨格筋から肝臓へのエネルギーと窒素の移動(トランス・アミノーション)が増加したことを示すデータが示された。これらの知見は、5/6 Nx ラットが体液保持のため、筋肉中の BCAA、カルノシン、アンセリンを利用し、肝の尿素浸透圧産生をサポートしていることを示している。このような全身における反応の結果、カタボリズムに伴う筋肉量の減少が生じるのではないかと考えられた。

一方、生体では細胞外および細胞内の水分保持のための尿素浸透圧生成に加え、細胞内の有機浸透圧の生

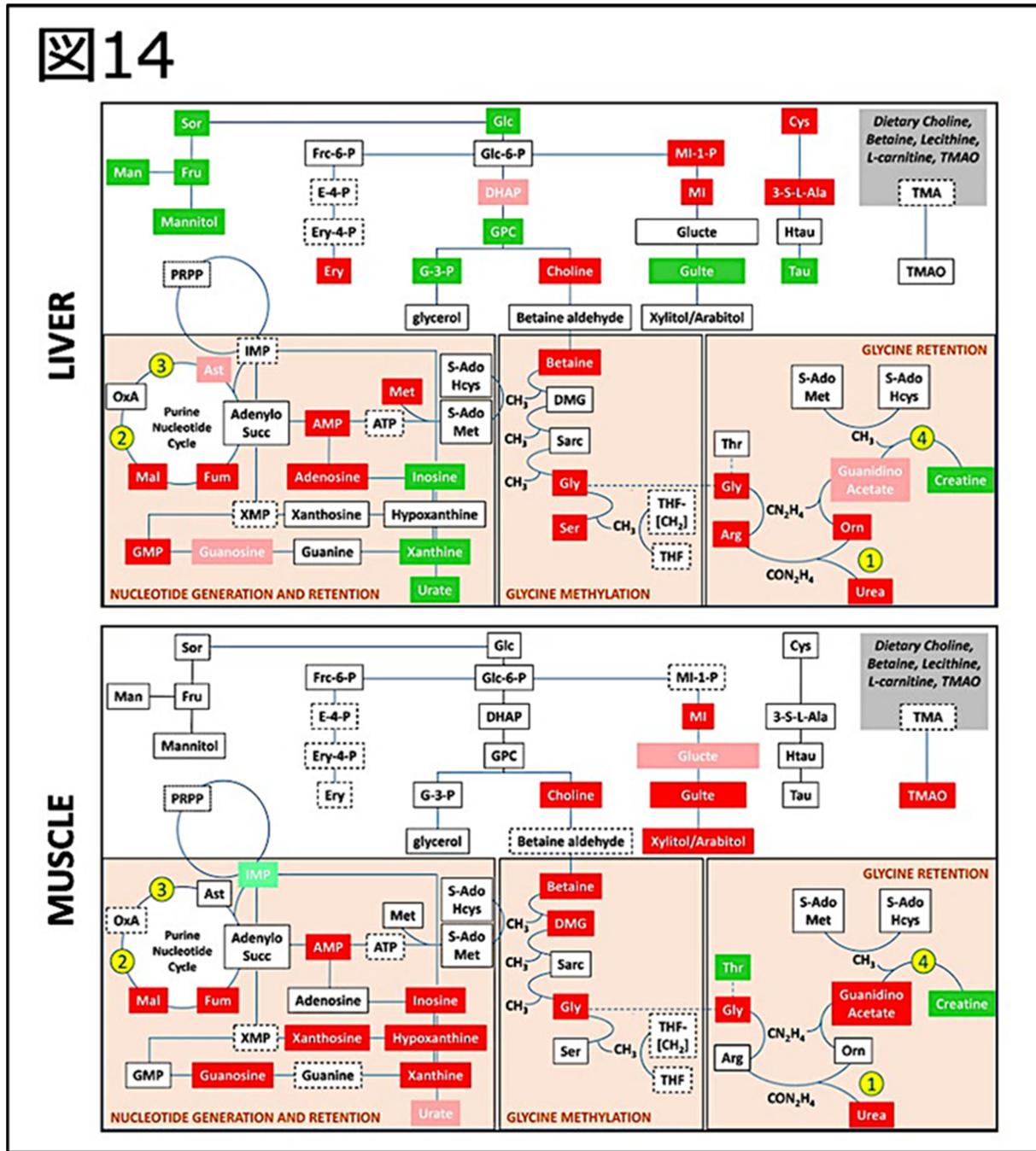
成を増加させることが知られていることから、肝臓のアミノ酸代謝がグリシンメチル化による有機浸透圧生成につながっているのかについて検討した。グリシン(Gly)がメチル化されると、細胞内の水分量を安定化させる3つの重要な有機浸透圧物質が生成される。1-メチル-グリシン(サルコシン)、2-メチル-グリシン(DMG)、3-メチル-グリシン(ベタイン)の3つである(図 14A)。さらに細胞は、テトラヒドロフォレート(THF)依存的にセリン(Ser)をメチル化することでグリシンを活発に合成することができる。5/6 匹の Nx ラットの肝臓では、セリン、グリシン、ベタインの産生が亢進しており(図 14)、有機浸透圧生成のために肝臓でのグリシンのメチル化が亢進していることがわかった。

ベタインの合成にはグリシンが基質として必要である。また、グリシンは肝臓でのクレアチン生成の基質としても機能する。5/6 Nx ラットでは GAMT の酵素活性が低下し、肝クレアチン濃度が低下する一方で、オルニチン、グリシン、アルギニン濃度が上昇し、アルギナーゼによる尿素合成が促進されていた(図 14)。これらオスモライト生成に有利な肝代謝の変化は、骨格筋のエネルギー貯蔵物質クレアチンの肝生成の減少を伴っており、実際、5/6 Nx ラットでは骨格筋量が減少していた。

4. 考 察

本研究は、腎機能低下による食塩バランスの異常が、カタボリズムを介してサルコペニアを生じるメカニズムを明らかにすることを目的としている。それに対して、正常な腎機能における高食塩が生じるカタボリズムについて、特に食塩感受性高血圧と関連して研究を実施した。その結果、正常ラットでは高食塩摂取によってカタボリズムが生じ、循環血行動態の抑制がかかること、すなわち典型的な夏眠反応が生じた。この反応の中心的な代謝変化は、肝臓での尿素サイクルの活性化によるものであるが、これを制御している肝臓組織内のアルギナーゼ活性は、腎臓の交感神経切除によって抑制されたことから、交感神経の深い関わりが示唆された。一方、ダール食塩感受性ラットでは、腎臓の障害程度に比例して血圧の日内変動が欠如することが明らかとなった。さらに、正常動物では観察されるカタボリズムによる夏眠反応が欠如していたが、腎交感神経の切除によってこの夏眠反応がもとに戻ることが示された。したがって、将来的に臨床応用が期待されている高血圧患者に対する腎交感神経カテーテルアブレーション術は、

図14



正常な夏眠反応を誘導し、高血圧患者の心血管イベントの抑制につながる事が期待される。実際、本研究においても、腎交感神経切除によって、ダール食塩感受性ラットの生命予防は著名に改善された。また、近年、食塩感受性高血圧と RAAS の関連が示唆されているが、我々の動物モデルを用いた研究によって、RAAS のコンポーネントのうち、キマーゼと MR が食塩感受性高血圧の進展、ならびにそれに伴う腎臓の障害などに深く関わっていることが示唆された。以上、本研究期間の 3 年間の研究により、

様々な角度から、正常、あるいは食塩感受性高血圧の進展における長期間高食塩摂取によるカタボリズムの同定、ならびに腎交感神経と RAAS の関与がある程度明らかになってきた。

本プロジェクトではさらに、腎障害を生じた際のカタボリズムとサルコペニア関係についても詳細な検討が実施された。CKD では腎機能の低下に伴って尿素、塩分、水分が体内に蓄積するとされている。一方で本研究によって、CKD モデルである 5/6Nx ラットでは、体内で無機および

有機浸透圧物質を産生・蓄積することにより致命的な脱水を防いでいるのではないかと考えられた。すなわち、腎臓の尿濃縮能が障害されているため、常に体水分が失われているにもかかわらず、腎外の代償性身体反応を引き起こすことによって、体液を保持しているといった生体の変化が生じているのではないかと考えられた。そのような反応は、肝臓における浸透圧物質である尿素やオスモライトの産生によってもたらされ、この代謝要求を支えるために骨格筋から内因性のエネルギーと窒素を供給し続ける必要があると考えられる。実際、詳細なメタボロームの解析によって今回得られたデータは、これらの仮説完全にサポートするものであった。以上、腎障害に伴うサルコペニアの要因の一つとして、体液ロスに対応するための生体メカニズムが重要な要因であると考えられる。このような体内の水分喪失に対する生理的適応は進化的に保存された生存戦略であり、致命的な脱水症状を防ぐために複数の臓器で複雑な生理的・代謝的調整を行うものとして我々の体内に保存されているものでないかと考えている。

5. 今後の課題

腎障害で生じるサルコペニアの原因となる「体液保持のための生体防御反応(カタボリズム)」の制御機構は、「夏眠(aestivation)」として知られる反応と酷似している。本3年間のプロジェクト期間内での研究データの内容は、8つの英文誌にて発表したが、まだ発表が完了していない結果も残っているので、今後、より詳細なデータを追加して、発表する必要があると考えている。さらに、老化や生活習慣病から身を守るための生体防御反応として、「夏眠(aestivation)」がどのような役割を果たしているのかについて、さらに研究を重ねる必要がある。

6. 文献

【学会発表:一般演題】

1. Renal Denervation Improves the Survival Rate Independent of Blood Pressure in High Salt-Fed Dahl Salt-Sensitive Rats. Norihiko Morisawa, Kento Kitada, Yoshihide Fujisawa, Daisuke Nakano, Daisuke Yamazaki, Jens Titze and Akira Nishiyama. 18th Asian Pacific Congress of Nephrology, Hong-Kong, 2020. 10. 腎除神経は、長期間の高食塩負荷 Dahl 食塩感受性ラットの心拍数を低下させて生存率を改善する。森澤紀彦。北田研人。藤澤良秀。中野大介。Jens T.

西山成。第 63 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2020.8

2. 5/6 腎摘に伴う腎尿濃縮力低下と体液喪失は、多臓器の体液保持機構を活性化し、体液貯留・血圧上昇を起こす。北田研人。森澤紀彦。中野大介。Jens T. 西山成。第 63 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2020.8
3. Effects of the novel nonsteroidal mineralocorticoid receptor blocker, esaxerenone (CS-3150), on blood pressure and urinary angiotensinogen in low-renin dahl salt-sensitive hypertensive rats. Nishiyama A, Nakako D, Kobori H, Li L. World Congress of Nephrology. 2019, Melbourne, Australia, Apr 2019.
4. Renal denervation attenuates a catabolic state in mice fed high salt. Yamazaki D, Kitada K, Morisawa N, Fujisawa Y, Nakano D, Hitomi H, Titze J, Nishiyama A. American Heart Association Hypertension 2019 Scientific Sessions 2019, New Orleans, U.S.A., Oct 2019.
5. Dahl 食塩感受性高血圧ラットは、高食塩摂取により異常な腎交感神経活性化が生じ、心血管エネルギー消費量が増大する。森澤紀彦, 北田研人, 藤澤良秀, 中野大介, 山崎大輔, 小淵修平, 西山 成。第 42 回日本高血圧学会総会, 東京, 2019 年. 10 月.
6. Dahl 食塩感受性ラットは、高食塩摂取により腎交感神経の過剰な活性化を来し、心拍数が低下しない。森澤紀彦, 北田研人, 藤澤良秀, 中野大介, 山崎大輔, Titze J, 西山 成。第 62 回日本腎臓学会学術総会, 名古屋市, 2019 年. 6 月.
7. 腎臓における新規非ステロイド性選択的ミネラルコルチコイド受容体ブロッカーエサキセレンンの抗酸化作用の検討。西山 成, 中野大介, 小堀浩幸, Lei Li. 第 19 回日本 NO 学会学術集会, 久留米市, 2019 年. 6 月.
8. 食塩感受性高血圧症診断による降圧薬の選択: 食塩感受性ラットにおける ARB と新規非ステロイド性選択 MRB・エサキセレンンの効果。西山 成。第 19 回日本抗加齢医学会総会, 横浜市, 2019 年. 6 月.
9. Dahl 食塩感受性ラットは、高食塩摂取により腎交感神経の過剰な活性化を来し、心拍数が低下しない。

森澤紀彦, 北田研人, 藤澤良秀, 中野大介, 山崎大輔, Titze J, 西山 成 第 62 回日本腎臓学会学術総会, 名古屋, 2019. 6

10. High Salt Intake Induces Catabolism Accompanied By Hepatic Urea Osmolyte Production And Decreases Renal Sympathetic Nerve Activity Morisawa N, Kitada K, Yamazaki D, Nakano D, Fujisawa Y, Nishiyama A. AHA Joint Hypertension 2018, Chicago, Sep 2018.
11. ラットに対する高食塩食投与は腎交感神経活性抑制と肝臓の尿素産生を亢進する。 森澤 紀彦, 北田研人, 山崎 大輔, 藤澤 良秀, 人見 浩史, 中野 大介, Jens Titze, 西山 成 第 61 回日本腎臓学会学術総会, 新潟市, 2018.6
12. Effects of the selective chymase inhibitor, TEI-F00806, on intrarenal renin-angiotensin system in salt-treated angiotensin I-infused hypertensive mice Tuba Ansary, Yoshihide Fujisawa, Maki Urushihara, Sayaka Nagata, Hidenori Urata, Daisuke Nakano, Hirofumi Hitomi, Shoji Kagami, Akira Nishiyama 第 61 回日本腎臓学会学術総会, 新潟市, 2018.6
13. キマーゼによる腎臓局所アンジオテンシン II 産生による高血圧の進展。 西山 成, 中野大介, 人見浩史, アンサリーチュバ. 第 22 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 宮崎市, 2018.4
14. Loss of Urine Concentration and Subsequent Dehydration Characterizes Hypertension in Rats with Chronic Renal Failure. Johannes K, Kitada K, Marton A, Daub S, Morisawa N, Zhang Y, Pedchenko T, Zhao Y, Klein JD, Bailey JL, Cordasic N, Hilgers KF, Sands JM, Nishiyama A. Gordon Research Conference, Ventura, Feb 2018.
15. Renal denervation prevents high salt-induced body weight loss. Yamazaki D, Kitada K, Morisawa N, Fujisawa Y, Nakano D, Hitomi H, Titze J, Nishiyama A. ISN Frontiers meeting / Kidney disease & cardiovascular disease 2018, Shinjuku/Tokyo, Feb 2018.
16. High salt intake induces catabolism and decreases renal sympathetic nerve activity in rats. Morisawa N, Kitada K, Yamazaki D, Fujisawa Y, Titze J, Nishiyama A ISN

Frontiers meeting / Kidney disease & cardiovascular disease 2018, Shinjuku/Tokyo, Feb 2018.

【学会発表:シンポジウム・特別講演】

1. 皮膚におけるナトリウム貯留と電解質調節. 西山成, 北田研人. 第 63 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2020.8. シンポジウム
2. Renoprotective effects of nonsteroidal MR blockers (MRBs). Nishiyama A. Asian Pacific Congress of Hypertension 2019, Brisbane, Australia, Nov 2019. シンポジウム
3. New concept of salt and blood pressure. Nishiyama A. Scientific meetings of the Indonesian Society of Hypertension, Jakarta, Indonesia, 2019. Invited special lecture.
4. 食塩過剰摂取で生じるカタボリズム. 西山 成. 第 19 回日本NO学会学術集会, 久留米市, 2019 年. 6 月. シンポジウム
5. 食塩感受性高血圧の新しい機序. 西山 成. 第 42 回日本高血圧学会総会, 東京, 2019 年. 10 月. シンポジウム
6. ナトリウムと高血圧の病態生理学. 西山 成, 森澤紀彦, 北田研人. 第 42 回日本高血圧学会総会, 東京, 2019 年. 10 月. シンポジウム
7. 塩の摂り過ぎで生じる全身の異常。 西山 成 第 39 回日本妊娠高血圧学会学術集会, 大阪, 2018. 11 月. 特別講演

【論文】

1. Rahman A, Sawano T, Sen A, Hossain A, Jahan N, Kobara H, Masaki T, Kosaka S, Kitada K, Nakano D, Imamura T, Ohsaki H, Nishiyama A. Cardioprotective Effects of a Nonsteroidal Mineralocorticoid Receptor Blocker, Esaxerenone, in Dahl Salt-Sensitive Hypertensive Rats. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 19;22(4):2069.
2. Wan N, Rahman A, Nishiyama A. Esaxerenone, a novel nonsteroidal mineralocorticoid receptor blocker (MRB) in hypertension and chronic kidney disease. *J Hum Hypertens.* 2021 Feb;35(2):148-156.
3. Morisawa N, Kitada K, Fujisawa Y, Nakano D, Yamazaki D, Kobuchi S, Li L, Zhang Y, Morikawa T,

- Konishi Y, Yokoo T, Luft FC, Titze J, Nishiyama A. Renal sympathetic nerve activity regulates cardiovascular energy expenditure in rats fed high salt. *Hypertens Res.* 2020 Jun;43(6):482-491.
4. Sufiun A, Rahman A, Rafiq K, Fujisawa Y, Nakano D, Kobara H, Masaki T, Nishiyama A. Association of a disrupted dipping pattern of blood pressure with progression of renal injury during the development of salt-dependent hypertension in rats. *Int J Mol Sci.* 2020, 21(6). pii: E2248.
 5. Bhuiyan AS, Rafiq K, Kobara H, Masaki T, Nakano D, Nishiyama A. Effect of a novel nonsteroidal selective mineralocorticoid receptor antagonist, esaxerenone (CS-3150), on blood pressure and renal injury in high salt-treated type 2 diabetic mice. *Hypertens Res.* 2019 Jun;42(6): 892-902.
 6. Li L, Guan Y, Kobori H, Morishita A, Koboara H, Masaki T, Nakano D, Nishiyama A. Effects of the novel nonsteroidal mineralocorticoid receptor blocker, esaxerenone (CS-3150), on blood pressure and urinary angiotensinogen in low-renin Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2019 Jun;42(6): 769-778.
 7. Yamazaki D, Konishi Y, Morikawa T, Kobara H, Masaki T, Hitomi H, Osafune K, Nakano D, Kittikulsuth W, Nishiyama A. Failure to confirm a SGLT2 inhibitor-induced hematopoietic effect in non-diabetic rats with renal anemia. *J Diabetes Investig.* 2019 Dec 27. doi: 10.1111/jdi.13205.
 8. Effects of the selective chymase inhibitor TEI-F00806 on the intrarenal renin-angiotensin system in salt-treated angiotensin I-infused hypertensive mice. Ansary TM, Urushihara M, Fujisawa Y, Nagata S, Urata H, Nakano D, Hirofumi H, Kitamura K, Kagami S, Nishiyama A. *Exp Physiol.* 2018 Nov;103(11):1524-1531. doi: 10.1113/EP087209.

【その他】

1. 天寿の天敵, 血圧と糖尿病のクスリについての最近の話題. 西山 成. 第92回日本薬理学会年会市民公開講座, 大阪. 2019. 03.
2. 生活習慣病のお薬の話題: 百寿の天敵, 高血圧と糖尿病のクスリについての最近の話題. 西山 成. 三木町市民公開講座, 香川. 2019. 10.

Mechanism of Sarcopenia Induced by Inappropriate Sodium Intake

Akira Nishiyama

Kagawa University

Summary

In the present study, we have investigated how catabolism is induced by high salt intake which leads to circulatory changes and sarcopenia during the progression of CKD. Specifically, we have investigated the specific roles of high salt intake, renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in high salt-induced catabolism and associated changes. Data have shown that high salt intake induces catabolism and circulatory hemodynamic depression in normal rats, i.e., a typical aestivation response. The central metabolic change in this response is the activation of the urea cycle in the liver, which is associated with arginase activation. These responses were suppressed by renal sympathectomy, suggesting a significant involvement of the sympathetic nervous system. On the other hand, in Dahl salt-sensitive rats, dipping changes in blood pressure was absent in proportion to the degree of kidney damage. Furthermore, the catabolism-induced aestivation response observed in normal animals was absent, but this response was restored by renal denervation. In addition, renal denervation markedly improved survival rate. Specific roles of chymase and mineralocorticoid receptor in the development of salt-sensitive hypertension and its associated renal damage were also shown. Specific relationship between catabolism and sarcopenia in the setting of renal injury was also examined in detail. Data have indicated that the CKD model rats may prevent lethal dehydration by producing and accumulating inorganic and organic osmolytes in the body. In other words, the urine concentrating capacity of the kidney is impaired and the body is constantly losing water, but the body retains fluid by triggering extrarenal compensatory body responses. Such a response may be induced by the production of osmotic substances such as urea and osmolytes in the liver, which requires a continuous supply of endogenous energy and nitrogen from skeletal muscle to support this metabolic demand. In conclusion, biological mechanisms to cope with fluid loss may be an important factor in the pathogenesis of sarcopenia associated with renal failure.

プロジェクト助成研究報告書（医学）
Project Research Report (Medical Science)

2022年3月
March, 2022

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団
The Salt Science Research Foundation

〒106-0032 東京都港区六本木7-15-14 塩業ビル
Engyo Bldg. 7-15-14 Roppongi, Minatoku, Tokyo 106-0032, Japan

Tel. 03-3497-5711 Fax. 03-3497-5712
URL <https://www.saltscience.or.jp>

I S B N 9 7 8 - 4 - 9 0 2 1 9 2 - 5 8 - 2

助成研究報告書

医学プロジェクト研究(2018-2020)

食塩バランスと生体機能

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団