

## 84. 受容体結合蛋白による腎臓病克服と腎起点の抗加齢制御

田村 功一

横浜市立大学 医学部 循環器・腎臓・高血圧内科学

Key words : 高血圧, 腎臓病, 水・電解質代謝, 受容体, 情報伝達系

### 緒言

高血圧は世界中で最も一般的にみられる慢性疾患である。その病因は複雑であり、遺伝や環境因子が複雑に関連している。高血圧を引き起こすメカニズムを完全に解明することは困難であるものの、レニン-アンジオテンシン系が極めて重要な役割を担っていることが知られている。組織レニン-アンジオテンシン系のうち、腎尿細管での1型アンジオテンシンII受容体(AT1受容体)シグナル伝達の活性化は、高血圧で認められる腎ナトリウム処理の変化と密接に関連することが示唆されている。Guytonの仮説によると、高血圧は、動脈圧に起因する腎ナトリウム排泄の不適切な抑制によって生じるとされている。すなわち、腎尿細管でのAT1受容体シグナル伝達の病的活性化が腎ナトリウム処理異常を引き起こし、その結果、体液量の調節異常が生じ、これが高血圧の発症につながると考えられる。研究代表者らは、世界で初めて特異的AT1受容体結合蛋白質としてAT1 receptor-associated protein (ATRAP)の単離同定に成功している。研究代表者らは、ATRAPが培養細胞においてAngIIなどの病的刺激によるAT1受容体の過剰活性化を選択的に抑制すること、および慢性的刺激下のマウスにおいて組織ATRAP発現の変化が血圧を含むベースラインの心血管腎臓機能に影響を及ぼすことなく各種臓器障害に影響を与えることを報告している[1~7]。これら集積しつつある新知見に基づき、研究代表者ら、組織ATRAPの発現低下は、ベースラインの生理学的AT1受容体シグナル伝達に顕著な影響を及ぼさない特定の刺激によって、組織AT1受容体の病的活性化を亢進させるという仮説を立てた。ATRAPは腎尿細管に沿って豊富に分布している。そこで、本研究では遺伝子工学的手法により作製に成功したATRAP遺伝子特異的欠損マウス[ATRAPノックアウト(ATRAPKO)マウス]において、慢性腎臓病(CKD)の病態が血圧制御や腎ナトリウム代謝に及ぼす影響を検討した。本研究結果から、CKD病態における、循環血漿量の増加は、腎機能(GFR)低下の程度に依存しているというよりも、腎ATRAP発現の減少を起源とする尿細管でのN再吸収亢進が本質であり、CKDでの腎障害進展と腎機能低下を伴う腎性老化の進行には腎でのATRAP低下が重要である可能性が示された。

### 方法および結果

#### 1. マウス系統(C57BL/6, 29/Sv)に依存した、CKD病態(5/6腎摘、RK: Remnant kidney model)における高血圧発症の有無と腎ATRAP発現との関連性検討

C57BL/6マウス、129/Svマウスに対して5/6腎摘(RK)及びSham手術を行い検討した。C57BL/6及び129/Svマウスにおける5/6腎摘(RK)の検討では、腎障害に抵抗性を示すC57BL/6と比較して、129/Svマウスは血圧上昇ならびに腎障害を呈しやすい系統であることが報告されている。本研究では、5/6腎摘(RK)の術後4週後に評価したところ、C57BL/6及び129/Svマウスともに、Sham手術群と比較して5/6腎摘(RK)では、クレアチニン・クリアランスの低下を認めたが、C57BL/6マウスでは5/6腎摘後に血圧上昇を認めないものの、129/Svマウスでは5/6腎摘(RK)群において有意な血圧上昇を認めた(図1)。C57BL/6及び129/Svマウスでの5/6腎摘における血圧調節の相違の機序の検討のために腎でのmRNA発現解析では、5/6腎摘により、C57BL/6では腎ATRAP発現増加を示し、一方、129/Svでは腎ATRAP発現減少がみられた。腎組織での免疫組織学的検討においても、同様に、5/6腎摘により、C57BL/6では腎ATRAP発現増加を示し、一方、129/Svでは腎ATRAP発現減少が認められた。

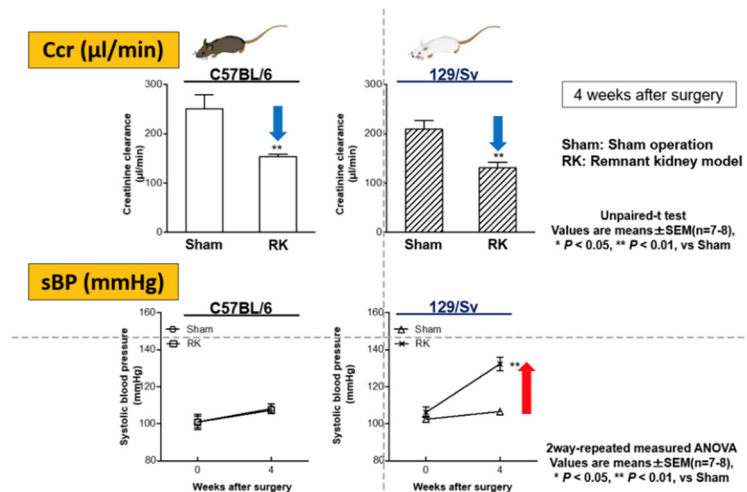


図1. マウスでの5/6腎摘(RK)による慢性腎臓病(CKD)病態でのマウス系統間での血圧変化の相違  
 Ccr ( $\mu\text{l}/\text{min}$ ): クレアチニン・クリアランスで評価される腎機能、sBP (mmHg): 収縮期血圧  
 C57BL/6: C57BL/6系統マウス、129/Sv: 129/Sv系統マウス

## 2. CKD病態での高血圧抵抗性C57BL/6系統における組織ATRAP発現低下がCKD病態での高血圧発症に与える影響と機序検討 [C57BL/6系統全身性ATRAPノックアウトマウス(ATRAPKO)を用いた検討]

発生光学的手法を用いて、相同的遺伝子組み換え法により、ATRAP遺伝子特異的欠損マウス [ATRAPノックアウト(KO)マウス] を作製し、5/6腎摘(RK)にともなう血圧変動や腎機能、水電解質代謝の変化について検討した。そして5/6腎摘(RK)に伴う慢性腎臓病病態における腎でのナトリウム代謝系や血圧調節系の異常の状態、および内在性ATRAPの病態生理学的意義について検討を加えた。その結果、5/6腎摘により、野生型C57BL/6(WT)マウスでは血圧に明らかな変化が見られなかったが、一方、ATRAPKOマウスでは有意な血圧上昇が認められ、CKD合併高血圧を発症したと考えられた(図2)。次に、ATRAPKOマウスにおいて有意な血圧上昇が認められた5/6腎摘(RK)術後4週の時点で解析したところ、クレアチニン・クリアランスで評価された腎機能障害の程度は、野生型C57BL/6(WT)マウスとATRAPKOマウスは同等であったが、Evans blue法にて測定した循環血漿量測定したところ、5/6腎摘を行ったATRAPKOマウスにおいて有意な循環血漿量の増加を認め、CKD合併高血圧の機序と考えられた。よって、腎機能障害だけでは循環血漿量の増加をきたさず、ATRAPが欠損することで初めて循環血漿量が増加することが示された。

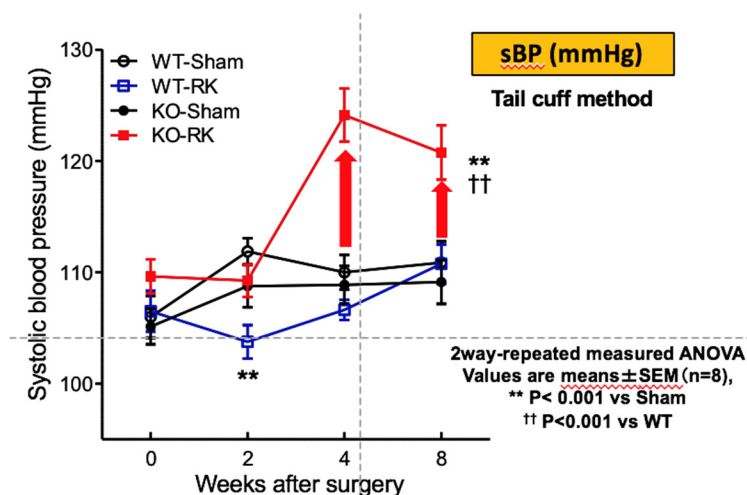


図2. 野生型マウス(WT)と異なりATRAPKOマウス(ATRAPKO)では5/6腎摘(RK)により高血圧を発症  
 sBP (mmHg): 収縮期血圧、WT-Sham: 野生型マウス-シャム手術群、WT-RK: 野生型マウス-5/6腎摘群、  
 KO-Sham: ATRAPKOマウス-シャム手術群、KO-RK: ATRAPKOマウス-5/6腎摘群

5/6 腎摘 (RK) における両群マウス間での循環血漿量の相違をもたらす機序について検討するために、腎における  $\text{Na}^+$  トランスポーター発現を解析したところ、*ATRAP*KO マウスでは、5/6 腎摘による腎での NHE3 ( $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchanger)、NKCC2 ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter)、リン酸化活性化型 NCC (p- $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  cotransporter) の発現は、野生型 WT マウスと比較して同等であった (図 7)。一方、腎での ENaC (上皮型  $\text{Na}^+$  transporter) については、5/6 腎摘を行った *ATRAP*KO マウスにおいて有意な  $\alpha$  ENaC ( $\text{ENaC}\alpha$  サブユニット) の発現増強が認められた (図 3)。

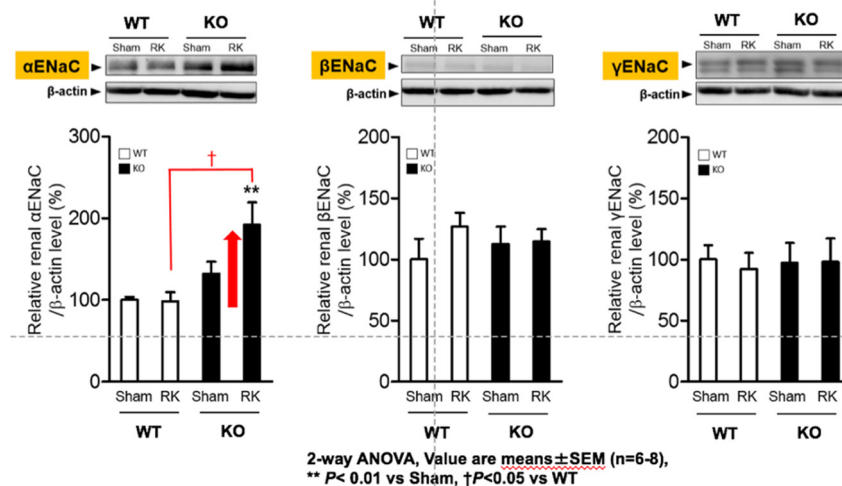


図 3. 野生型マウス (WT) と異なり *ATRAP*KO トマウス (*ATRAP*KO) では 5/6 腎摘 (RK)

により腎での  $\alpha$  ENaC 発現が増加

WT-Sham : 野生型マウス-シャム手術群

WT-RK : 野生型マウス-5/6 腎摘群, KO-Sham : *ATRAP*KO マウス-シャム手術群

KO-RK : *ATRAP*-KO マウス-5/6 腎摘群

### 3. C57BL/6 系統全身性 *ATRAP* ノックアウトマウス (*ATRAP*KO) の CKD 病態における高血圧発症における炎症系の関与についての検討

CKD 病態の動物モデルである 5/6 腎摘を行った *ATRAP*KO マウスでの有意な ENaC ( $\alpha$  サブユニット) の発現増強における免疫・炎症系の関与について検討したところ、野生型 WT マウスと比較して *ATRAP*KO マウスでは、5/6 腎摘による腎での  $\text{TNF-}\alpha$  発現増加の増強が認められた (図 9)。そこで、5/6 腎摘 (RK) 群の *ATRAP*KO マウス(KO-RK) に対して、 $\text{TNF-}\alpha$  阻害分子標的薬エタネルセプト (ETN) 及び vehicle の生理食塩水の腹腔内投与を行い検討した (図 10)。その結果、5/6 腎摘 (RK) 術後 4 週の時点で  $\text{TNF-}\alpha$  阻害分子標的薬エタネルセプト (ETN) は、5/6 腎摘による *ATRAP*KO マウスでの高血圧発症を抑制し、これは腎での  $\alpha$  ENaC 発現増加の抑制をともなっていた (図 4)。

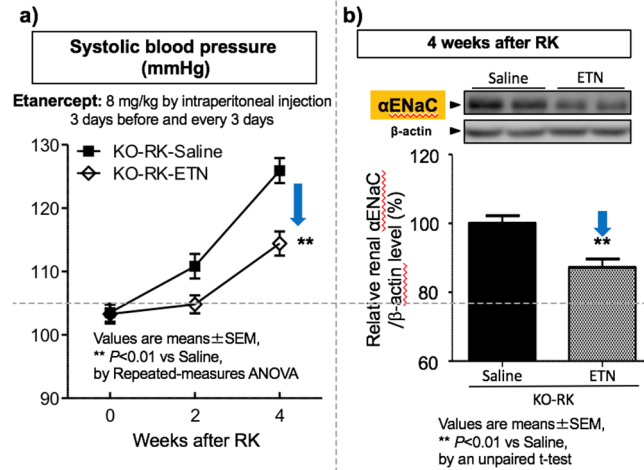


図 4. TNF- $\alpha$  阻害分子標的薬エタネルセプト (ETN) は、*ATRAP*-KO における 5/6 腎摘による高血圧と腎  $\alpha$  ENaC 発現増加を抑制

Saline : 対照として ETN と同条件にて生理食塩水を腹腔内投与 ; ETN : TNF- $\alpha$  阻害分子標的薬エタネルセプト (8 mg/kg) を腹腔内投与 ; KO-RK-Saline : *ATRAP* ノックアウトマウス-5/6 腎摘-生食投与群 ; KO-RK : *ATRAP* ノックアウトマウス-5/6 腎摘-エタネルセプト投与群

a) TNF- $\alpha$  阻害分子標的薬エタネルセプト (ETN) は、*ATRAP*-KO における 5/6 腎摘による血圧上昇を抑制、b) TNF- $\alpha$  阻害分子標的薬エタネルセプト (ETN) は、*ATRAP*-KO における 5/6 腎摘による腎  $\alpha$  ENaC 発現の増加を抑制。

## 考 察

本研究において通常飼育下におけるベースラインの状態において *ATRAP*-KO マウスの血圧には有意な変化がみられなかった。しかし、*ATRAP*-KO マウスでは、野生型 WT マウスと比べて、5/6 腎摘 (RK) 術後には循環血漿量が増加しており、それとともなって 5/6 腎摘 (RK) による CKD 合併高血圧が認められた。*ATRAP*-KO マウスでの CKD 合併高血圧に関与する機序については、5/6 腎摘により腎機能低下が引き起こされた場合、野生型 C57BL/6 マウスでは、腎 *ATRAP* の代償的発現増加が生じるが、*ATRAP*-KO マウスでは、*ATRAP* 低下による腎での AT1 受容体活性が上昇し  $\alpha$  ENaC の活性化による  $\text{Na}^+$  再吸収促進が引き起こされると考えられる。また、同時に腎での TNF- $\alpha$  経路活性化を介して  $\alpha$  ENaC の活性化による  $\text{Na}^+$  再吸収促進をもたらしていると考えられる。これら一連の結果から、CKD 病態において腎での *ATRAP* が低下することで、AT1 受容体-TNF- $\alpha$ - $\alpha$  ENaC を介した経路の活性化が起これ、循環血漿量の増加による CKD 合併高血圧を引き起こされ、腎性老化が進行することが明らかになった。すなわち、CKD 病態における、循環血漿量の増加は、腎機能 (GFR) 低下の程度に依存しているというよりも、むしろ、腎 *ATRAP* 発現の減少を起源とする尿管での  $\text{Na}^+$  再吸収促進がその本質であり、CKD における腎障害進展と腎機能低下にともなう腎性老化の進行には腎組織における *ATRAP* 低下が重要である可能性が示された。

さらに、近年、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することが明らかとなり、社会に求められている健康寿命延伸において、“不可逆的”に進行した慢性腎臓病の克服の重要度はさらに増している。研究代表者は *ATRAP* について、これまでに明らかにしてきた従来機能としての腎臓遠位尿管における受容体機能選択的制御作用に加えて、腎臓近位尿管における新規な受容体結合非依存的機能 (腎臓線維化抑制作用、抗加齢制御作用) を有する可能性を見出している。そのため今後は、この新機能を含む尿管区分的な 2 つの作用に着目し、『1) 独自に作製した動物モデルやヒト組織を利用した、食塩感受性高血圧および腎臓病進行の不可逆化・腎臓起点的老化促進の分子機序における尿管区分的な *ATRAP* の従来機能と新機能の意義の解明、2) *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・腎臓起点的抗加齢制御のための革新的新規治療開発に向けた尿管 *ATRAP* 発現・機能調節分子の同定』をさらに進めていく予定である [8~10]。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、横浜市立大学 医学部 循環器・腎臓・高血圧内科学の涌井広道講師、畝田一司助教である。

## 文 献

- 1) Tamura K, Wakui H, Azushima K, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Ohki K, Haruhara K, Kinguchi S, Matsuda M, Yamashita A, Umemura S. Angiotensin II type 1 receptor binding molecule ATRAP as a possible modulator of renal sodium handling and blood pressure in pathophysiology. *Curr Med Chem*. 2015;22(28):3210-6. Review. PMID: 26295465
- 2) 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*. 2015 Mar 19;4(3):e001594. doi: 10.1161/JAHA.114.001594. PMID: 25792129
- 3) 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*. 2017 Mar 6;6(3). pii: e004488. doi: 10.1161/JAHA.116.004488. PMID: 28264860
- 4) Ohki K, Wakui H, Azushima K, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Haruhara K, Kinguchi S, Matsuda M, Ohsawa M, Maeda A, Minegishi S, Ishigami T, Toya Y, Yamashita A, Umemura S, Tamura K. ATRAP expression in brown adipose tissue does not influence the development of diet-induced metabolic disorders in mice. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 21;18(3). pii: E676. doi: 10.3390/ijms18030676. PMID: 28335584
- 5) 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*. 2018 Feb;269:236-244. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.01.013. Epub 2018 Jan 12. PMID: 29407599
- 6) 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. Angiotensin II type 1 receptor-associated protein inhibits angiotensin II-induced insulin resistance with suppression of oxidative stress in skeletal muscle tissue. *Sci Rep*. 2018 Feb 12;8(1):2846. doi: 10.1038/s41598-018-21270-8. PMID: 29434287
- 7) 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*. 2019 Apr 17;9(1):6201. doi: 10.1038/s41598-019-42657-1. PMID: 30996242
- 8) 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*. 2017 May;91(5):1115-1125. doi: 10.1016/j.kint.2016.10.035. Epub 2017 Jan 10. PMID: 28081856

- 9) 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.* 2017 Jul 27;6(8). pii: e006120. doi: 10.1161/JAHA.117.006120. PMID: 28751545
- 10) 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.* 2019 Apr 16;8(8):e012395. doi: 10.1161/JAHA.119.012395. PMID: 30977419