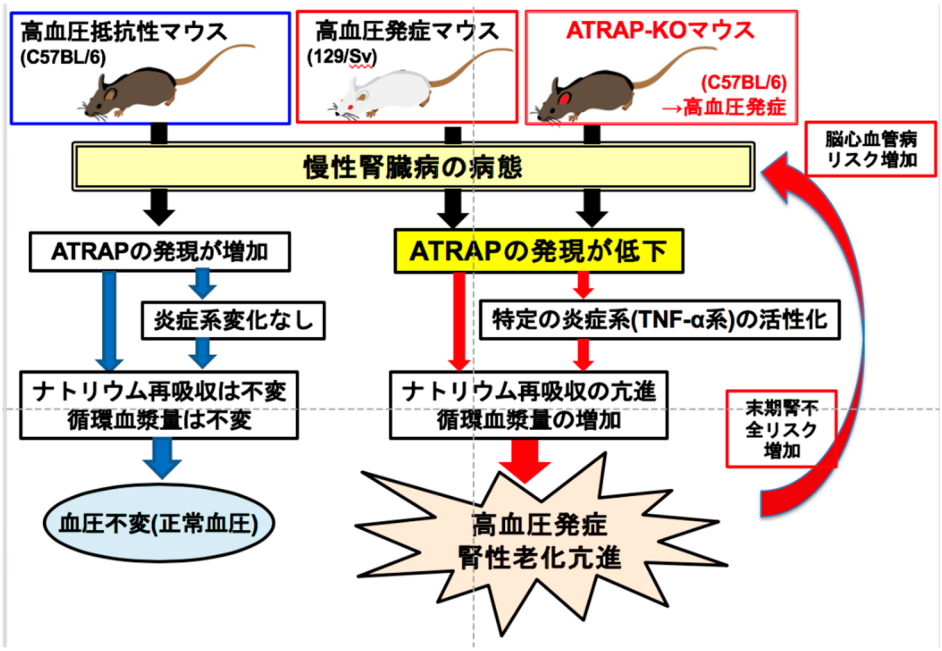
84　受容体結合蛋白による腎臓病克服と腎起点の抗加齢制御	田村　功一

【目的】特異的 AT1 受容体結合蛋白質として世界で初めて単離同定に成功した AT1 receptor-associated protein（ATRAP）は、心血管細胞や脂肪細胞において病的刺激による AT1 受容体情報伝達系の過剰活性化を選択的に抑制する機能があり、慢性病的刺激下マウスでは組織での ATRAP 発現の変化は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の程度に影響するという仮説を立てている。腎臓において ATRAP は腎尿細管に沿って豊富に分布していることから、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（*ATRAP*-KO）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。

【方法】以下の 1～3 の検討を行った。1. マウス系統（C57BL/6、129/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。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（*ATRAP*-KO）を用いた検討］。3. C57BL/6 系統全身性 *ATRAP* ノックアウトマウス(*ATRAP*-KO)での 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。

【結果】本研究での研究成果として、CKD 病態においては、正常では豊富に存在する腎尿細管 ATRAP が低下することで、AT1 受容体-TNF-α-αENaC を介した経路の過剰活性化が起こり、循環血漿量の増加を介した 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細管での Na^+再吸収亢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。

ATRAP は慢性腎臓病悪化の主役である高血圧発症の鍵分子である可能性
～ATRAP 減少による CKD 合併高血圧のメカニズム～



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、レニンー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。組織レニンー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、および慢性病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（*ATRAP*-KO）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。本研究成果から、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。

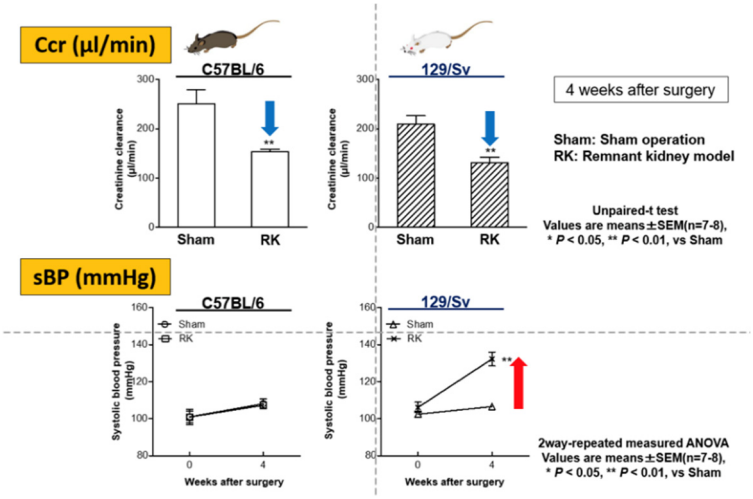


図 1. マウスでの 5/6 腎摘（RK）による慢性腎臓病（CKD）病態でのマウス系統間での血圧変化の相違
Ccr（μl/min）：クレアチニン・クリアランスで評価される腎機能、sBP（mmHg）：収縮期血圧
C57BL/6：C57BL/6 系統マウス、129/Sv：129/Sv 系統マウス

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（*ATRAP*-KO）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、*ATRAP*-KO 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、*ATRAP*-KO 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 *ATRAP*-KO 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 *ATRAP*-KO 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。

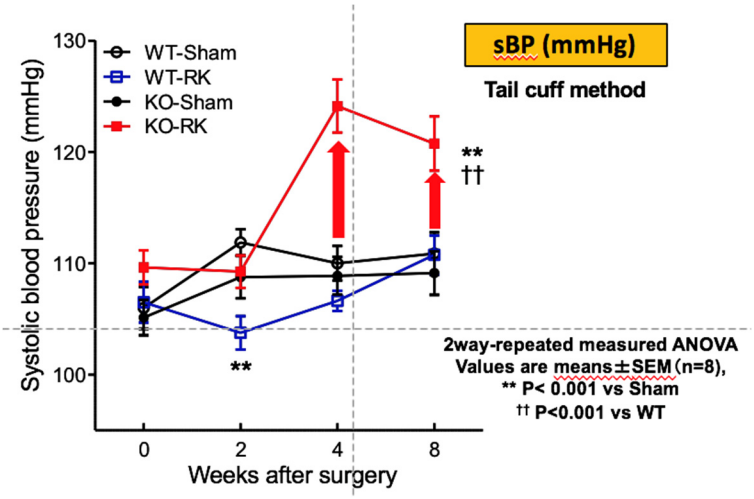


図 2. 野生型マウス（WT）と異なり *ATRAP*-KO マウス（*ATRAP*-KO）では 5/6 腎摘（RK）により高血圧を発症
sBP（mmHg）：収縮期血圧、WT-Sham：野生型マウス-シャム手術群、WT-RK：野生型マウス-5/6 腎摘群、
KO-Sham：*ATRAP*-KO マウス-シャム手術群、KO-RK：*ATRAP*-KO マウス-5/6 腎摘群

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 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（Na^+-H^+ exchanger）、NKCC2（Na^+-K^+-$2Cl^-$ cotransporter）、リン酸化活性型 NCC（p-Na^+-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 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αENaC（ENaCαサブユニット）の発現増強が認められた（図 3）。

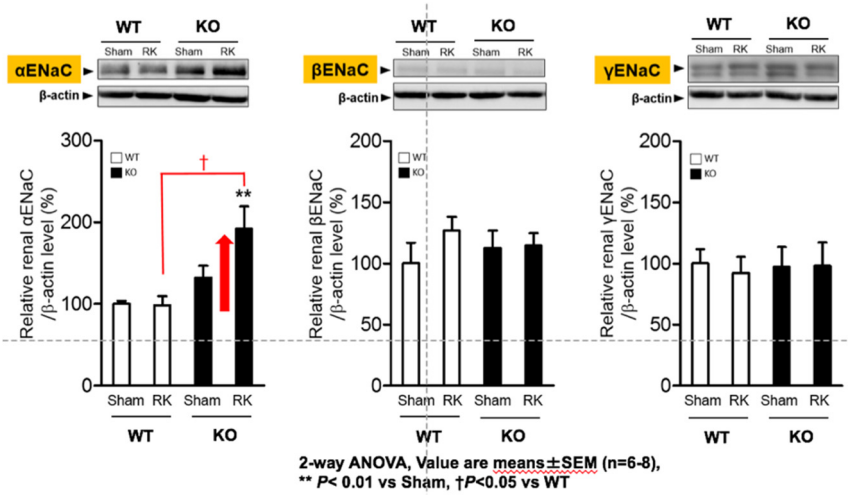


図 3. 野生型マウス（WT）と異なり *ATRAP*KO トマウス（*ATRAP*KO）では 5/6 腎摘（RK）により腎でのαENaC 発現が増加

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（α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 TNF-α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、TNF-α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 TNF-α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αENaC 発現増加の抑制をともなっていた（図 4）。

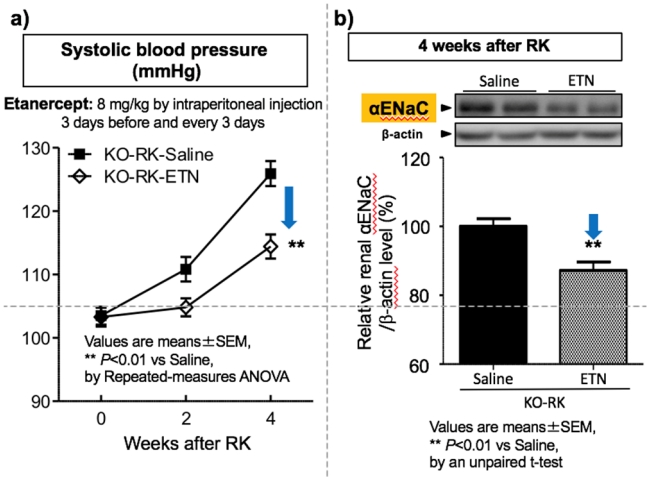


図 4. TNF-α阻害分子標的薬エタネルセプト（ETN）は、ATRAP-KO における 5/6 腎摘による高血圧と腎αENaC 発現増加を抑制

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-α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* ノックアアウトマウス-5/6 腎摘-生食投与群；KO-RK：*ATRAP* ノックアアウトマウス-5/6 腎摘-エタネルセプト投与群

a）TNF-α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-α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αENaC 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）術後には循環血液量が増加しており、それにともなって 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αENaC の活性化による 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-α経路活性化を介してαENaC の活性化による 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-α-αENaC を介した経路の活性化が起こり、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細管での Na^+再吸収亢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細管における受容体機能選択的制御作用に加えて、腎臓近位尿細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、この新機能を含む腎尿細管区分特異的な 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・腎臓起点の老化促進の分子機序における腎尿細管区分特異的な 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・腎臓起点の抗加齢制御のための革新的新規治療開発へ向けた腎尿細管 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