

学位論文の要旨

**Blood Pressure Elevation of Tubular Specific (P)RR Transgenic
Mice
and Lethal Tubular Degeneration
due to Possible Intracellular Interactions between
(P)RR and Alternative Renin Products**

(尿細管特異的(P)RR トランスジェニックマウスにおける血圧上と
(P)RR と Alternative Renin の細胞内相互作用による
致死的尿細管変性の可能性

Sae Saigo

西郷 紗絵

2022年9月

Cardio-Renal Medicine
Yokohama City University Graduate School of Medicine
横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 病態制御内科学

**Doctoral Supervisor: Kouichi Tamura, M.D., Ph.D.,
Professor**

(指導教員：田村 功一 教授)

学位論文の要旨

Blood Pressure Elevation of Tubular Specific (P)RR Transgenic Mice and Lethal Tubular Degeneration due to Possible Intracellular Interactions between (P)RR and Alternative Renin Products

(尿細管特異的(P)RR トランスジェニックマウスにおける血圧上と(P)RR と Alternative Renin の細胞内相互作用による致死的尿細管変性の可能性)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8745386/>

1. 序論

1998年に Nguyen が、かねてから発見されていた *Atp6ap2* が更に大きな 350 個のアミノ酸から成る 39kDa のタンパク質の一部であることを発見し、レニンとプロレニンの両者に結合する受容体としてプロレニン受容体((P)RR)と名付けた。(P)RR は初めヒトの腎臓で発見され、(プロ)レニンと結合して、不活性酵素であるプロレニンを活性化し、レニンやプロレニンが(P)RR に結合すると、受容体から細胞内シグナルが惹起されることが報告され、レニンアンギオテンシン系(RAS)の一部として生理活性を持っていると考えられていた。(P)RR の遺伝子は X 染色体の短腕に位置しており、その翻訳産物であるタンパクは、350 個のアミノ酸からなる分子量 9.2kDa の一回膜貫通型タンパクで多機能であり、腎臓や心臓、脳、網膜、胎盤、免疫系などの様々な臓器に分布し、生体では多角的な機能を持っているということが判明した。(Nguyen et al., 2002) また、(P)RR タンパクは細胞膜に局在しており、全長型(P)RR は、Furin (Cousin et al., 2009) などのプロセッシング酵素によって、膜貫通領域および C 末端領域を含む *Atp6ap2* と、可溶性(P)RR として切断された N 末端成分である 3 つの形態が存在し、それぞれが様々な機能をもっているということが判明した。RAS の一部として機能しているのであれば、RAS 亢進によってもたらされる様々な疾患の治療標的になりうるとして(P)RR は研究対象となっていた。市原らは、(プロ)レニンのプロセグメントを模倣したタンパク (decoy peptide) を用いて、(プロ)レニンを拮抗し、アンギオテンシノーゲンからアンギオテンシン I の産生を抑制しようと試みた(Ichihara et al., 2004)。decoy peptide によって RAS の活性化は抑制されたとされたが、後続する研究により、このペプチドは実際のところ生体内では容易に分解されることがわかり、(P)RR の拮抗が創薬の標的となることについて、いまだ現実的ではない(Danser, 2015)(Peters, 2017)。

Ramkumar らは腎尿細管における(P)RR 遺伝子の機能を調べるために、腎尿細管特異的(P)RR ノックアウトマウスを作成し、その表現型を調べた(Ramkumar et al., 2015).Ramkumarらの遺伝子改変マウスは、(P)RRの局所的ノックアウトであって全身性にノックアウトしていないことから、(P)RR 遺伝子除去に伴う致命的な影響は免れた。このマウスは、血圧は食塩摂取量に影響を受けず、アンギオテンシンⅡ投与による血圧上昇反応が野生型マウスに比べて低下していた。その原因として、野生型マウスに比べ、腎臓の ENaC 発現が低下していることが一因であると考えられた。本研究では、単離した腎集合管において、野生型マウスではプロレニンの投与は ENaC の活性を高めたが、腎尿細管特異的(P)RR ノックアウトマウスでは、その現象はみられなかった。この Ramkumar の結果を更に検証すべく我々は独自に開発した、C57BL6 マウスの腎尿細管に、Ksp-Cadherin プロモーターを用いて (P)RR 遺伝子を尿細管上皮特異的に過剰発現させた遺伝子改変動物((P)RR-TG マウス)を実験対象にして、(P)RR の血圧制御や RAS との関係について検討を行った。

2. 実験材料と方法

C57/Bl6J マウスの腎尿細管細胞に Ksp-Cadherin プロモーターを使って(P)RR 遺伝子を高発現させた(P)RR-TG マウスを遺伝子工学的に作製した。10 週齢の雄性の(P)RR-TG マウスと野生型マウス (C57/Bl6J マウス) をそれぞれ薬物日介入群(n=8,n=3), オルメサルタン投与群,アリスキレン投与群(各 n=4),バフィロマイシン投与群(n=5,n=4)に分けて代謝ケージにて 10 日飼育し、体重・収縮期血圧 (tail cuff 法)・尿量・飲水量を測定し、11 日目に sacrifice して腎臓を採取した。また、保有していた結合尿細管に局在するレニン(Alternative Renin)を上皮細胞に強制的に発現させたトランスジェニックマウス(ARen2-TG マウス)を (P)RR-TG マウスと交配した二重トランスジェニックマウス(DT マウス)を得ることに成功しその組織学的検索を行った。

すべての動物実験は横浜市立大学による遺伝子組換え実験計画書の申請・承認、および動物実験センターによる動物実験研究計画書の申請・承認を得て、遺伝子組換え実験および動物実験のガイドラインを遵守して行われた (承認番号 F-A-20-028)

3. 結果

(P) RR-TG マウスは WT マウスと比べて血圧が高く、オルメサルタン,アリスキレンの両方により降圧された。また(P)RR-TG マウスの尿はアルカリ化しており、V-ATPase 阻害薬のバフィロマイシンの投与によりその効果は打ち消された。また尿浸透圧と尿 Na⁺を減少していることが示されこれらは、腎尿細管上の過剰発現された(P)RR トランスジーンが V-ATPase として機能していることを示していた。DT マウスの腎臓では、(P)RR と ARen2 が重複して

高発現している腎皮髄境界に甚大な損傷がみられた。

4. 考察

(P)RR-TG マウスの尿の性状から,(P)RR は RAS としての働きよりも V-ATPase として機能していることが示された。(P)RR は WT マウスよりも高血圧を示し,オルメサルタン,アリスキレンの双方によりともに降圧されたことから,(P)RR-TG マウスの血圧上昇の原因は RAS とは無関係であると考えられるが, (P)RR-TG マウスにおいてバフィロマイシン投与は血圧を下げなかったことから,V-ATPase とも異なった機序により血圧が上昇していると考えられた。また DT マウスの腎皮髄境界における甚大な損傷は(P)RR と ARen2 が細胞内相互作用している可能性を示した。

引用文献

- Ichihara, A., Hayashi, M., Kaneshiro, Y., Suzuki, F., Nakagawa, T., Tada, Y., Koura, Y., Nishiyama, A., Okada, H., Uddin, M.N., Nabi, A.H.M.N., Ishida, Y., Inagami, T., Saruta, T., (2004). Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the “handle” region for nonproteolytic activation of prorenin. *Journal of Clinical Investigation* 114(8), 1128–1135.
- Ishigami, T., Kino, T., Chen, L., Minegishi, S., Araki, N., Umemura, M., Abe, K., Sasaki, R., Yamana, H., Umemura, S., (2014). Identification of bona fide alternative renin transcripts expressed along cortical tubules and potential roles in promoting insulin resistance in vivo without significant plasma renin activity elevation. *Hypertension* 64(1), 125–133.
- Nguyen, G., Delarue, F., Burcklé, C., Bouzahir, L., Giller, T., Sraer, J.-D., (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *Journal of Clinical Investigation* 109(11),1417–1427.
- Ramkumar, N., Stuart, D., Calquin, M., Quadri, S., Wang, S., van Hoek, A.N., Siragy, H.M., Ichihara, A., Kohan, D.E., (2015). Nephron-specific deletion of the prorenin receptor causes a urine concentration defect. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 309(1), F48-56.

論文目録

I. 主論文

Blood Pressure Elevation of Tubular Specific (P)RR Transgenic Mice and Lethal Tubular Degeneration due to Possible Intracellular Interactions between (P)RR and Alternative Renin Products

Sae Saigo, Tabito Kino , Kotaro Uchida , Takuya Sugawara , Lin Chen , Michiko Sugiyama , Kengo Azushima , Hiromichi Wakui , Kouichi Tamura and Tomoaki Ishigami

雑誌名: International Journal of Molecular Sciences. Vol. 23, No. 1, 302, 2021.

II. 副論文

なし

III. 参考論文

なし