

第5回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

大島賞受賞講演

# 高血圧・高血圧関連心血管腎臓病における アンジオテンシン受容体結合因子の 病態生理学的意義の解明

The pathophysiological role of angiotensin receptor-binding protein  
in hypertension and kidney disease

涌井 広道

Hikomichi WAKUI

## はじめに

種々の病的刺激の持続による慢性的な細胞・組織の酸化ストレス増加や炎症反応亢進とそれらに伴う代謝系への悪影響によって、高血圧、腎臓病、心血管病などが発症・進展する。特に、組織局所における1型アンジオテンシン受容体(AT1受容体)情報伝達系の過剰活性化がもたらす組織レニン・アンジオテンシン系(RA系)の異常亢進状態は、高血圧、腎臓病、心血管病を進展させる機序として重要である。同時に、RA系自体は生物の進化の過程で獲得されたように、生体内の水・電解質代謝や循環系の恒常性維持、および臓器発生・分化にとっては重要な生理的調節系である。例えば、全身性アンジオテンシノーゲン欠損マウス、レニン欠損マウス、AT1受容体欠損マウスなどの発生段階からのRA系欠損マウスでは、生下時からの異常な低血圧と腎などの器官形成異常、臓器機能異常が報告されている。したがって、臓器の発生・形態形成や恒常的生理機能維持を担うAT1受容体系の生理的情報伝達系活性への遮断を回避し、同受容体系の病的な過剰活性化のみを機能選択的に効率のかつ安全に抑制することも重要と考えられる。

一方、「AT1受容体機能活性化に対する内在性抑制機構」としては、従来からは2型アンジオテンシン受容体(AT2受容体)やアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)、アンジオテ

ンシン-(1-7)、mas受容体などがあげられるが、AT1受容体への直接結合機能制御分子として、ATRAP(AT1 receptor-associated protein)が世界で最初にクローニングされた。

## AT1受容体に結合する新規因子(ATRAP)の単離同定

マウス腎から作製されたcDNAライブラリーを用いてAT1受容体C末端の細胞質内ドメインをbaitとしてyeast two-hybrid systemによる遺伝子クローニングを行い、AT1受容体に特異的に結合する因子としてATRAPが単離同定された。ATRAPは、160残基のアミノ酸から成る18kDaの低分子蛋白であり、特異的にAT1受容体に結合し、AT2受容体、エンドセリンETB受容体、あるいはカテコールアミンβ2受容体などには結合しないと考えられる。

## ATRAPのドメイン構造

コンピュータによる立体構造予測では、マウスATRAPのアミノ酸配列の解析から、N末端は細胞外ドメインであり、N末端側に3つの膜貫通ドメインを持つとともに、C末端側には細胞質内ドメインを持つという珍しい構造上の特徴を有すると予測された。また、欠画変異体を用いた検討により、ATRAPの110~122番目のアミノ酸残基のC末端細胞質内ドメインとAT1受容体の339~359番目のアミ

ノ酸残基のC末端細胞質内ドメインが直接結合すると考えられた。

### ATRAP の生体内組織分布

最初に、ATRAP 蛋白質発現の検出のためにポリクローナル抗 ATRAP 抗体を作製した。Western blot 解析においては *in vitro* transcribed/translated ATRAP 蛋白質、培養細胞に遺伝子導入された ATRAP 蛋白質、および細胞・組織に発現している内在性 ATRAP 蛋白質について、予想通り約 18kDa の単一バンドの検出に成功し、これらのバンドは抗原ペプチド吸収試験において消失することから、ATRAP 蛋白質に由来する特異的なバンドであると考えられた。そして、ATRAP の組織発現分布についての検討では、AT1 受容体と同様に、脳、腎、心、血管、脂肪などの全身諸臓器に幅広く内在性発現を認めることを明らかにした。

### ATRAP による AT1 受容体の internalization

内在性に ATRAP 発現が認められた心筋細胞において、ATRAP の細胞内局在を検討したところ、ATRAP は主に核周囲の小胞膜上(エンドソーム、滑面小胞体、ゴルジ体など)に存在していた。免疫沈降実験では、心筋細胞において ATRAP が AT1 受容体に結合していることが確認された。また、心筋細胞での免疫細胞染色実験の結果、非刺激下において AT1 受容体は主に心筋細胞の細胞膜に存在するのに対して、ATRAP は主に核周囲に存在していたが、心筋細胞をアンジオテンシン II (Ang II) で刺激すると AT1 受容体と ATRAP がともに核周囲のエンドソームで共局在した。さらに、アデノウイルスベクターを用いて ATRAP を高発現させた心筋細胞では、細胞表面の AT1 受容体発現量が減少することが観察された。すなわち、ATRAP は internalization に関与する細胞内膜構造物であるエンドソーム上に主に存在し、細胞内に移動してきた AT1 受容体を持続的に捕捉し続けることにより、結果的に AT1 受容体の internalization を促進すると考えられた。

### 生体での心血管組織における ATRAP の機能

次に、心血管組織における ATRAP 高発現マウスを作製し、生体における ATRAP の機能を検討した。心筋細胞特異的 ATRAP 高発現マウスでは、ベースラインの心機能や心臓の形態は野生型マウスと同等であるものの、Ang II 刺

激による心肥大反応が抑制された。また、血管平滑筋腎 ATRAP 高発現マウスにおいても、ベースラインの心機能や動脈の形態は正常であるものの、Ang II 刺激による動脈硬化反応が抑制された。すなわち、心血管組織における ATRAP は、Ang II 刺激を介した心肥大・動脈硬化反応を抑制すると考えられた。

### 腎における ATRAP の発現分布および機能

腎において、内在性 ATRAP は、近位尿細管から遠位尿細管、集合管にかけて幅広く分布し、一方、糸球体での発現はほとんど認められない。また、IgA 腎症患者において、腎尿細管 ATRAP 発現量と臨床指標との関連性を検討したところ、eGFR の低下とともに腎尿細管 ATRAP 発現量の減少を認めた。Loss-of-function strategy として、ジーンターゲット法により全身性 ATRAP 欠損マウスを作製したが、全身性 ATRAP 欠損マウスの腎の形態は正常で、ベースラインでの腎機能、血圧は野生型マウスと同等であった。しかしながら、全身性 ATRAP 欠損マウスでは、Ang II 刺激時に、ナトリウムバランスの増加とともに高血圧および高血圧関連臓器障害(心肥大・アルブミン尿)の増悪を認めた。さらに、全身性 ATRAP 欠損マウスでは、ベースラインの尿細管ナトリウムチャネル発現に変化はないものの、Ang II 刺激による上皮性ナトリウムチャネル  $\alpha$ ENaC 発現増加の亢進を認めた。次に、Remnant Kidney Model を用いて、慢性腎臓病(CKD)病態下における ATRAP 欠損の影響を検討した。野生型 C57BL マウスは 5/6 腎摘に対して高血圧抵抗性として知られるが、ATRAP 欠損 C57BL マウスでは 5/6 腎摘により高血圧を発症し、さらに、循環血漿量の増加および腎  $\alpha$ ENaC 発現量の増加を認めた。

Gain-of-function strategy として、遠位尿細管優位型 ATRAP トランスジェニックマウスを作製した。遠位尿細管 ATRAP 高発現マウスでは、ベースラインの血圧は変化がないものの、Ang II 刺激時にナトリウムバランスの減少とともに高血圧の抑制を認めた。また、遠位尿細管 ATRAP 高発現マウスでは、Ang II 刺激による腎  $\alpha$ ENaC 発現量の増加の抑制を認めた。さらに、遠位尿細管 ATRAP 高発現マウスでは、高塩分食負荷による血圧上昇の抑制、機能的 ENaC 活性の抑制を認めた。一方、Cre-loxP システムにより近位尿細管特異的 ATRAP 欠損マウスを作製したが、Ang II 刺激による昇圧反応は野生型マウスと同様であった。以上より、腎において、主に遠位尿細管 ATRAP が、アンジオテンシン依存性高血圧、CKD 高血圧、食塩感受性高血圧

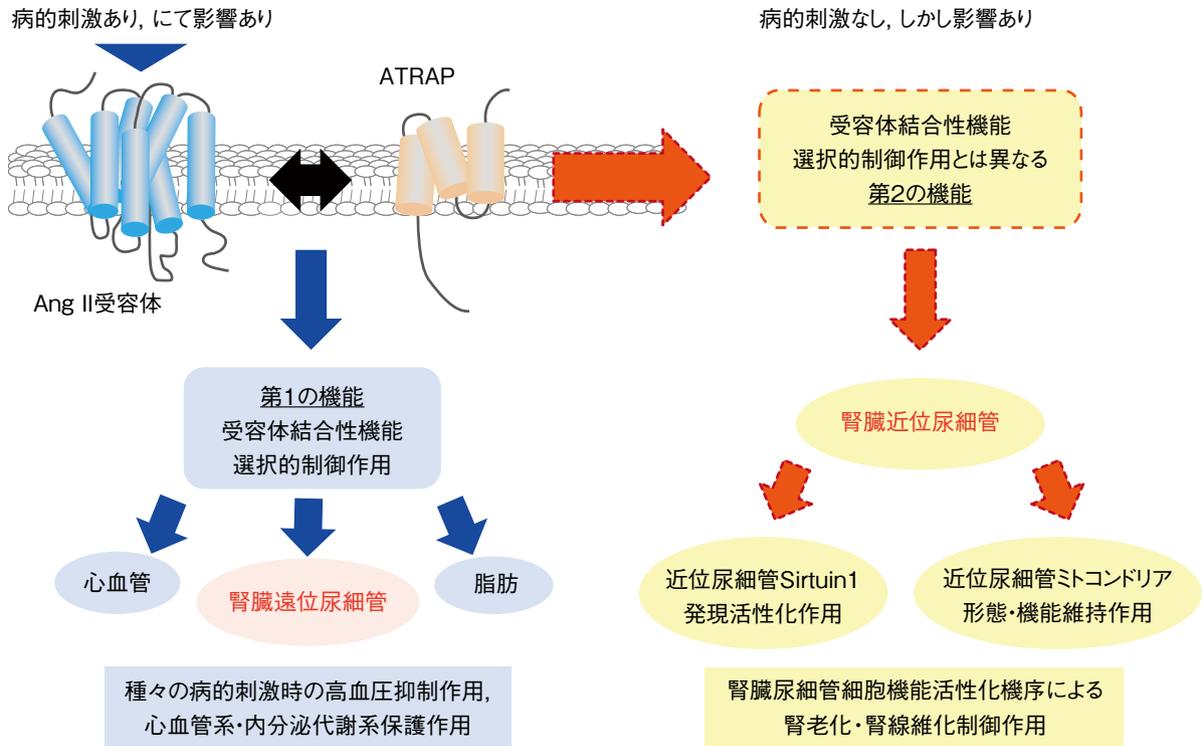


図 ATRAP の2つの機能の可能性

などの病的刺激下での高血圧の発症・進展を抑制する内在性抑制分子である可能性が示唆された。

われわれは、尿細管における ATRAP の機能は近位尿細管と遠位尿細管で異なり、近位尿細管 ATRAP は、受容体結合性機能選択的制御作用とは別の機能を有するとの仮説をたてた。全身性 ATRAP 欠損マウスを用いて、約2年間の長期飼育研究を行った。高齢 ATRAP 欠損マウスの発育・外観は野生型マウスと同等で、加齢に伴う糖脂質代謝プロファイルおよび加齢性心血管障害も野生型マウスと同等であった。しかしながら、高齢 ATRAP 欠損マウスでは、加齢に伴う腎機能低下の増悪および尿細管・間質線維化の亢進を認めた。さらに、高齢 ATRAP 欠損マウスでは、近位尿細管におけるミトコンドリア機能異常および酸化ストレスの増加を認めた。さらに、高齢 ATRAP 欠損マウスの腎では、抗老化分子である Sirtuin 1 の発現低下を認めた。一方、野生型若年マウスへの慢性 Ang II 刺激は、腎 Sirtuin 1 発現に影響を与えなかった。以上より、ATRAP 欠損によ

る腎老化・線維化の促進は、アンジオテンシン非依存性の可能性が考えられた(図)。

おわりに

AT1 受容体直接結合分子として単離同定された ATRAP は、AT1 受容体の constitutive な internalization を促進し、AT1 受容体情報伝達系の過剰活性化を機能選択的に抑制する内在性抑制因子であると考えられた。さらに、腎近位尿細管において、ATRAP はアンジオテンシン非依存性に、腎老化・腎線維化抑制作用を有する可能性が示唆された。ATRAP の分子レベルでの作用機序や発現調節機序についてはまだまだ不明な点が多く、今後の更なる研究の展開が必要である。

利益相反自己申告：申告すべきものなし