

筑波大学

博士（医学）学位論文

Study of Protective Effects of Histamine on the Pathophysiology of Heart and Kidney Dysfunctions

(低分子アミン ヒスタミンの
心腎機能障害に及ぼす保護的効果についての検討)

2 0 1 6

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

野 口 和 之

目次

論文概要	4
第1章 背景	9
第2章 材料・方法	12
第3章 結果	30
第4章 考察	39
謝辞	45
参考文献	46
図表	51
略語一覽	65

論文概要

○ 論文題目

Study of Protective Effects of Histamine on the
Pathophysiology of Heart and Kidney Dysfunctions

(低分子アミン ヒスタミンの心腎機能障害に及ぼす
保護的効果についての検討)

○ 指導教員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 山縣 邦弘 教授

(所属) 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

(氏名) 野口 和之

目的： 近年，医療費の増大が大きな問題となっているが，その理由の一つとして心血管病や慢性腎臓病といった疾患の増加が挙げられる．これらの疾患をつなぐものとして，最近「心腎連関」という病態が注目を集めている．本研究は，この心腎連関病態の疾患モデル動物となり得る心不全モデルマウスの腎障害の解析からスタートし，疾患メカニズムの一端を解明することを目的とした．

対象と方法： C57BL/6J 系統，10-12 週齢のオスマウスを用いて，最近報告された新規高血圧心不全モデル（ANS モデル）を作製した．同モデルが腎機能障害を併発することを確認し，心腎連関と類似した病態と考えられる同モデルを用いて，血中物質の変化の解析や，薬剤の投与を行うことで，心臓・腎臓障害の変化を確認した．これらの結果より，心腎連関の病態メカニズムに関わる因子を同定し，その病態に果たす役割を検討した．また，分子細胞学・分子生物学的メカニズムの解明のために，HEK293T 細胞を用いて，細胞内遺伝子発現・タンパク合成・シグナル伝達の解析を行った．

結果： ANS モデルが心機能障害に加えて，腎機能障害・蛋白尿・尿細管障害をきたすか検討し，同モデルが心腎連関の病態モデルマウスとなり得ることを

確認した。また、ANS モデルの血中において、低分子アミンの一つであるヒスタミンが、対照群と比較して 2 倍程度に上昇することが判明した。生体内でヒスタミン合成酵素を欠失した HDC-KO マウスの ANS モデルでは、心臓・腎臓病態が増悪しており、ヒスタミンは ANS モデルの病態において保護的な作用を持つことが示唆された。ヒスタミン受容体 (H1-H3 受容体) の特異的アンタゴニストを投与し、薬理的にヒスタミンの作用を阻害した ANS モデルにおいて、H3 受容体アンタゴニストの投与群で病態が最も増悪した。H3 受容体アンタゴニスト投与により、ANS モデルの心腎病態は改善したことから、ヒスタミンは H3 受容体を介して ANS モデルの病態に保護的に作用していると考えられた。マウス AT1 受容体を安定発現した HEK293T 細胞において、マウス H3 受容体を過剰発現させ、アンジオテンシン II と H3 受容体アゴニストを添加すると、AT1 受容体 MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) シグナル経路下流の ERK のリン酸化が著明に亢進した。BiFC アッセイを用いて、AT1 受容体と H3 受容体に、蛍光タンパクである Venus タンパクの断片を組み込み、HEK293T 細胞上に過剰発現させたところ、HEK293T 細胞上で蛍光を発していた。このことから、両者は HEK293T 細胞において、ヘテロダイマーを形成する可能性が考えられた。

考察： 心腎連関のメカニズム解明は、臨床的にも社会的にも喫緊の課題であるが、その一助となる病態モデル動物は、手技的困難・高度設備が必要・致死率の高さなどから報告が少なかった。本研究において、再現が容易な心不全モデルである ANS モデルが、心腎連関のモデルマウスとなり得ることが示された。また、ANS モデルの血中で増加していたヒスタミンは、ヒトの CKD 患者でも増加することがこれまでに報告されていたが、その生理的意義については不明であった。CKD 患者では高率に心血管病も併発・増悪することを考えると、本研究の結果から、ヒスタミン上昇の要因は、心・腎病変に対する生体の防御機構である可能性がある。加えて、本研究で H3 受容体と AT1 受容体が、細胞上でヘテロダイマーを形成し、シグナルを制御している可能性が示唆された。GPCR 同士の二量体形成による生体活動の制御は、近年報告の増加とともに、徐々に明らかとなってきた。これら GPCR 同士のクロストークが、心腎連関のような臓器間クロストークの基盤となっている可能性がある。

結論： ヒスタミンは H3 受容体を介して心腎連関の病態に保護的に作用していると考えられる。また、H3 受容体は、アンジオテンシンの主要な標的受容体である AT1 受容体とヘテロダイマーを形成し、生体内において AT1 受容体下流のシグナルや局在を変化・調節することで心腎連関の病態メカニズムに関

与している可能性が示唆された。ヒスタミンとその受容体は、今後心腎関連病態の新たな因子として、重要な治療ターゲットとなる可能性が示された。

第1章 背景

現在我が国の医療費は年々増加を続け、2016年現在には年間40兆円にも到達し、財政を脅かす大きな問題となっている[1]。特に循環器系疾患をはじめとした心血管病は、その大きな割合を占めている。心血管病は重症化しやすく、多大な医療資源を割かれるのに加え、患者のQuality of Life (QOL) も大きく損なう。国際的腎疾患研究組織であるKDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) のガイドラインでは、慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease; CKD) が心血管病の大きなリスクファクターと報告している[2]。CKDとは、腎障害を示唆する所見 (検尿異常、画像異常、血液異常、病理所見など) の存在、および糸球体濾過量 (Glomerular Filtration Rate; GFR) 60 mL/min/1.73 m² 未満のいずれか、または両方が3カ月以上持続する状態であり、末期腎不全 (End Stage Kidney Disease; ESKD) のリスクファクターであることが報告されている[3, 4]。末期腎不全に至った患者は血液透析・腹膜透析・腎移植といった腎代替療法の導入が生命維持のために必須となり、この治療にも多大な医療資源と費用が割かれている[5]。このように、心臓と腎臓の障害は、臨床的にも社会的にも大きな問題となっており、疾患克服とそのための病態メカニズムの解明が各方面から切望されている。このメカニズムの一端において、近年注目を集めているのが

「心腎連関」と呼ばれる病態である[6]。これは心臓と腎臓の一方の臓器が傷害を受けると、もう一方の臓器にも障害が出現・増悪するという病態である。具体的には CKD の患者は高率に心不全や虚血性心疾患を発症し、逆に心不全の患者では CKD を合併している率が高いといった例が挙げられる[7]。双方の臓器は、ともに血管を介して密につながり、生体内において循環機能の調節を担っている。これまでの報告から、レニン・アンジオテンシン系や交感神経系、炎症、酸化ストレス等がこの病態に関与しているとされているが、その詳細な疾患メカニズムには依然として不明な点が多い[8-11]。

疾患メカニズムの解析には、疾患モデル動物を用いた検討が有用だが、これまでに心腎連関病態の疾患モデルはほとんど報告がない[12, 13]。2013 年、Tsukamoto らが興味深い高血圧誘導性による心不全の疾患モデルマウスを報告した[14]。このモデルマウスは ANS モデルと呼ばれ、昇圧ホルモンであるアンジオテンシン II を持続投与 (A)、片腎摘出 (Unilateral Nephrectomy) (N)、食塩水 (Salt) の飲水投与 (S) を併用することで約 6 週間の期間で高度の心機能低下や心肥大を引き起こし、心不全を発症させるモデルである。アンジオテンシン II による圧負荷、食塩投与による容量負荷、片腎摘出によって腎臓の機能単位ネフロンが減少するという三重の負荷がこの病態を引き起こしていると考えられているが、著者はこのモデルが心臓と腎臓、双方に傷害を与えることで、

心腎連関に類似した病態をきたしているのではないかと考えた。しかし、これまでに ANS モデルに腎機能低下や尿蛋白といった、腎障害が起きているとの報告はないため、その実証が必要であると考えられた。

以上のことから、著者は心腎連関という病態について、この ANS モデルが心腎連関の前臨床的病態モデルマウスになり得ると考え、腎障害の有無について検討を行った。その後、同モデルにおいて、生理学、生化学および分子生物学的手法を用いて解析を行い、モデルマウスの病態、ひいては心腎連関の疾患メカニズムを明らかにすることを本研究の目的とした。

第 2 章 材料・方法

動物実験

本研究において、動物実験は、国立大学法人筑波大学動物実験委員会の承認の元に実施し、筑波大学動物実験取扱規定と日本文部科学省管轄下にある日本学術会議の動物実験の適正な実施に向けたガイドラインに従って行った。

マウス

マウスは、筑波大学生命領域学際研究センター (TARA) -SPF 実験室内において、22°C、湿度 40-60%、明暗周期 12 時間ごとの環境下にて飼育した。野生型マウスは、日本クレアより購入した C57Bl/6J マウスの 10-12 週齢のオスを用いた。ヒスチジン脱炭酸酵素欠失 (HDC-KO) マウスは国立大学法人東北大学の大津 浩教授より提供された HDC-KO マウス[15]を TARA-SPF で繁殖、同一の遺伝学的背景を持つマウスで、野生型 HDC アレルをホモで持つ個体を野生型 (HDC-WT)、HDC 活性を欠失したアレルをホモで持つ個体を HDC-KO とし、HDC-WT および HDC-KO の 10-12 週齢のオスを用いて検討を行った。

ANS モデル

ANS モデルは、Tsukamoto らが報告した原法[14]に、若干の修正を加えて作製した。はじめに、28 日間用浸透圧ポンプ (Alzet 社 Osmotic Pump #1004) を用意した (ポンプの流速は平均 0.11 $\mu\text{l/h}$ であり、1 日投与量は 2.64 $\mu\text{l/day}$ に相当する)。次に、アンジオテンシン II (ペプチド研究所 Angiotensin II (Human) Code: 4001) を生理食塩水 (0.9%NaCl) に溶解し、1.2 mg/kg/day 相当 (体重 25 g のマウスを想定し、最終濃度 13.5 mg/mL) の溶液を作製し、ポンプにこの溶液 100 μL を充填したものを準備した。また、薬剤併用投与群についてはそれぞれ H1 受容体アンタゴニスト (H1RB) Cetirizine Dihydrochloride (東京化成工業 C2316) 10mg/kg/day, H2 受容体アンタゴニスト (H2RB) Ranitidine Chloride (Wako 185-01564) 20mg/kg/day, H3 受容体アンタゴニスト (H3RB) Carcinine Ditrifluoroacetate (TOCRIS 2211) 20mg/kg/day, H3 受容体アゴニスト (H3RA) Immethridine Dihydrobromide (TOCRIS 2315) 10mg/kg/day 相当のマウス投与量となるよう、生理食塩水を用いて溶解し、濃度を調節した溶液を調製した。

マウスに、10%ソムノペンチル (共立製薬) 40mg/kg 相当を腹腔注射することとで麻酔をかけ、左側腹部を剃毛した後、ポピドンヨードで手術部位皮膚の消毒を行った。その後外科的に左腎を摘出し、創部を絹糸を用いて縫合した。その後肩甲骨の間を剃毛のうえ切開し、準備した浸透圧ポンプを挿入した。薬剤併用投

与群の個体には、薬剤を充填した浸透圧ポンプを別にもう一つ挿入した。皮膚クリップを用いて挿入部位を閉創した後、覚醒までホットプレート上で保温を行った。同時に飲水ボトルの内容を生理食塩水（大塚薬品工業）に変更することで、食塩水の飲水投与を行った（原法では 1.0%食塩水）。なお、ANS モデルの対照として、Sham も作製した。Sham は腎臓を外科的に露出させるだけに留め、浸透圧ポンプには溶媒である生理食塩水を充填し、飲水は通常のマウス飲料水を投与した。

ANS モデルは心機能解析群と腎機能解析群の 2 群を作製し、作製時、2 週間後、4 週間後にそれぞれ心エコー検査や畜尿などの解析を行い、4 週後の解析終了後にペントバルビタールを用いて全身麻酔下に採材を行った。

心機能解析

心機能解析については心エコー（Vevo 社）を用いて ANS モデル作製時、2 週間後、4 週間後に心機能測定を行った。心エコーは動物用吸入麻酔薬イソフルラン（DS ファーマアニマルヘルス）を用いて全身麻酔をかけ、呼吸数が 50-70/分となるよう麻酔深度を調節した上で測定した。測定後、ソフトを用いての解析を行い、左室内径収縮率（%Left Ventricular Fractional Shortening; LVFS）を計算した。

畜尿

腎機能測定群のマウスは ANS 処置前・2 週後・4 週後に 3 日間の畜尿を行った。また、処置前畜尿の前に 3 日間畜尿用の代謝ケージに入れることで馴化を行った。馴化からの回復には通常ケージに戻して最低 3 日間の期間を設けた。畜尿は代謝ケージで 1 日馴化した後に 24 時間 2 回の畜尿を行った。1 日目の畜尿は通常蓄尿とし、尿量を計測した後に 1mL 分を 1.5mL チューブに分注した。畜尿 2 日目は、カテコラミン採取用の塩酸蓄尿を行った、1 日目の尿量をもとに、終濃度 0.02-0.04 規定となるように量を計算した 4 規定の HCl を採尿ボトルに滴下し、2 日目の畜尿を開始した。2 日目の畜尿も尿量を測定した後に 1mL 分を 1.5mL チューブに分注した。分注した尿は、10000 rpm で 2 回スピンドウンを行い、最終的に 200 μ L の尿を 3 本採取し、液体窒素で冷凍後、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

質量分析用試薬

ヒスタミンと (R)(-)- α -メチルヒスタミン二塩酸塩、ブラジキニンフラグメント 1-7 はシグマアルドリッチ社 (St. Louis, MO, USA) から購入した。MALDI-MS 純度の 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHBA) マトリクスは島津ジーエルシー

社 (Kyoto, Japan) から購入した。AccQ-Tag Ultra-Fluor™ 誘導体化試薬キットは Waters 社 (Milford, MA, USA) から購入した。安定同位体ラベルヒスタミン (histamine- $\alpha, \alpha, \beta, \beta$ -d4 (d4-ヒスタミン)) の塩酸塩は CDN アイソトープ社 (Quebec, Canada) から購入した。溶媒及び全ての試薬は HPLC (High Performance Liquid Chromatography) グレードのものを用いた。

血漿サンプルの調製

マウスをペントバルビタールによる全身麻酔下において固定し、下大静脈から全血を採取した。血液抗凝固剤にはヘパリンを用いた。次に、得られた血液を遠心分離 (4°C, 3000 rpm, 10 分間) に供し、上清の血漿を回収した。血漿は直ちに液体窒素で凍結し、測定までの間-80°Cで保存した。

血漿からのアミンの抽出

蛍光検出 HPLC 分析に供するために、100 μ L の血漿に対し、内部標準物質として 0.6 nmol の α -メチルヒスタミンを加えた後、500 μ L の 0.4N HClO₄ を加え、ボルテックスにて攪拌して 15 分間氷上で静置した。次に、遠心分離 (4 °C, 13000 rpm, 30 分間) によりタンパク質を沈殿させ、560 μ L の上清を回収した。上清は 560 μ L の 5N NaOH にてアルカリ化し、食塩飽和 1-ブタノールを 1 mL

を添加した。室温，13000 rpm，10 分間の遠心分離を行い，有機層を回収した。

500 μL の 0.1 N NaOH を加えて攪拌の後，遠心分離（室温，13,000 rpm，10 分間）を行い，再び有機層を回収した。400 μL の 0.1N HCl と 700 μL の n-ヘプタンを加え，5 分間振盪の後，室温，13000 g，10 分間の遠心分離を行い，水層にアミンを抽出した。回収したアミンは遠心エバポレーターにて乾固し，後述の AQC 誘導体化反応を行った。

LC-MS/MS 分析にあたっては，メタノールクロロホルム抽出法を行った。内部標準物質としては 1 nmol の d4-ヒスタミンを 100 μL の血漿に加えた。400 μL のメタノールと 100 μL のクロロホルムを血漿サンプルに加え，ボルテックスにて攪拌し，総量が 900 μL となるように Milli-Q 水を添加した。4 $^{\circ}\text{C}$ ，13000 g，10 分間の遠心分離を行った後，上清の水層を回収して後述の LC-MS/MS (Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry)分析に用いた。

AQC 誘導体化反応

蛍光検出 HPLC 用にアミン抽出を行った血漿サンプルは，10 μl の Milli-Q 水と，10 μL の AccQ-Tag Ultra ホウ酸バッファーを加え，予めアセトニトリルに溶解させた 10 μL の AccQ-Fluor 試薬を加えた後，速やかに 10 秒間攪拌し，遮光して 1 分間静置することで誘導体化反応を行った。AccQ-Fluor 試薬は，ア

ミノ酸分析用に開発された誘導体化試薬で、6-aminoquinolyl carbamile (AQC) 基が第 1 級または第 2 級のアミノ基と反応し、安定な蛍光性の誘導体を生成する。誘導体化の後、混合液は遠心エバポレーターにて乾固し、30 μ L の 0.1% TFA (trifluoroacetic acid) にて溶解して分析用バイアルへ移し、後述の蛍光検出 HPLC 分析に供した。

蛍光 HPLC 分析条件

装置は Nexera X2 超高速液体クロマトグラフィーシステム（島津製作所）を用いた。AQC 化したサンプルは COSMOSIL 2.5 μ NAP 分析カラム（Nacaltesque, Kyoto, Japan）にて分離した。カラム温度は 40°C、流速は 0.25 mL/min、また、移動相 A には 0.1% TFA、移動相 B には TFA を 0.1% 含むメタノールを用いた。溶出条件は、移動相 B の割合が 0% (0 - 10 min), 0% から 30% (10 - 40 min), 30% から 100% (40 - 40.5 min), 100% (40.5 - 50.5 min), 100% から 0% (50.5 - 51 min), 0% (51 - 66 min) となるようグラジエント溶出を行った。測定は蛍光検出器（島津製作所）により行い、励起波長 250nm、蛍光波長 475 nm で検出した。目的ピークを分取した後、後述の質量分析解析に供した。同定のための再分析には、市販のヒスタミンを上記と同様に AQC 誘導体化反応を行い、溶出時間を比較した。

MALDI-QIT-TOF/MS 分析

レーザーイオン化四重極イオントラップ飛行時間型質量分析装置 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Quadrupole Ion Trap - Time-of-Flight Mass Spectrometer ;MALDI-QIT-TOF/MS)を用いた解析において MS1 と MS2 スペクトルは Axima Resonance 質量分析計 (Shimadzu-Biotech, Kyoto, Japan) を用い, 窒素レーザー (337 nm) にて測定した. データの取得とアサインメントには Launchpad software (Shimadzu Biotech) を用いた. DHBA マトリクスは 0.06%の TFA を含む 40%アセトニトリルに 1% (w/v) となるよう溶解して用いた. 単離して減圧乾固したアミンを Milli-Q 水 2.5 μ L にて溶解した後, 0.5 μ L 分を 0.5 μ L のマトリクス溶液と共に MALDI-プレート (Kratos analytical, Manchester, UK) に滴下し, サンプルマトリクス共結晶を形成させるために室温にて乾燥した. MS1 と MS2 の両方のモードで, イオンは 2 つの電極間で電荷を印加されることで引き出され, 加速電圧 10 kV で TOF チューブ内に放出される. コリジョンガスにはアルゴンを用いた. マススペクトルはレーザー強度 90 で窒素レーザーを 200 回照射した合計値から得た. 衝突誘起解離 (collision-induced dissociation : CID) の制御値は 200 とした. 外部キャリブレーションはブラジキニンフラグメント 1-7 (monoisotopic mass of [(M+H)⁺ =

757.4]) と DHBA マトリクス (monoisotopic mass of [(M+H)⁺ = 155.03]) を標準試薬として用いた。同定のための再分析には、AQC 誘導体化された市販のヒスタミンを上記と同様に蛍光 HPLC で分取し、減圧乾固させたものについて MS1 と MS2 スペクトルを測定した。

LC-MS/MS 分析

LC-MS/MS 分析は、トリプル四重極型質量分析計 LC-MS-8050-Nexera X2 超高速液体クロマトグラフィーシステム (島津製作所) を用いた。解析はポジティブ・エレクトロスプレーイオン化・多重反応モニタリング (multiple-reaction monitoring: MRM) モードで行った。カラムには SeQuant ZIC-HILIC カラム (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3.5 μm) を使用し、サンプルに由来するカラムへの汚染を防ぐ目的で、ZIC-HILIC guard-fitting カラム (内径 1.0 mm, 長さ 14 mm, Millipore 社) をカラムのインレット前部に接続した。移動相 A として 0.1% ギ酸を、また移動相 B として 0.1% を含むアセトニトリル混合溶媒をそれぞれ使用した。流速は 0.2 mL/min, カラムオーブンは 50°C の条件で分析を行った。分離のグラジエント条件は以下のように行った: 0~1.0 分 (%B = 95) → 1.0~10.0 分 (%B = 95→5) → 10.0~18.0 分 (B% = 5) → 18.0~18.1 分 (%B = 5→95) → 18.1~25.0 分 (%B = 95)。

MS/MS 部の最適化は以下のように行った. ヒーティングブロック温度:400℃, 脱溶媒管 (DL) 温度 : 250℃, イオン化部温度 : 300℃, イオン化電圧 : 4.0 kV, 60 V, ヒーティングガス (空気) 流量 : 10 L/min, ネブライザーガス (窒素) 流量 : 3 L/min, ドライイングガス (窒素) 流量 : 10 L/min, CID (アルゴン) ガス圧力 : 230 kPa. 定量のための各物質の測定イオン (プリカーサーイオン→プロダクトイオン) には以下を用いた : ヒスタミン (112.20 > 95.10), d4-ヒスタミン (116.20 > 99.10). 各測定イオンの設定は, それぞれのプリカーサーイオンスキャンおよびプロダクトイオンスキャンにより行った. 全ての分析及びデータプロセッシングには, LabSolutions ver. 5.60 ソフトウェア (島津製作所) を用いた.

検量線

検量線作成用標準溶液として, 分析直前にストック溶液からそれぞれヒスタミン及び d4-ヒスタミンを, 5.0, 7.5, 10.0, 25.0 pmol/インジェクション及び 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 pmol/インジェクションとなるように蒸留水で希釈することにより調製した. ヒスタミンの検量線作成にあたり, 血漿サンプルは内部標準として 1 nmol の d4-ヒスタミンをスパイクし, 上記の方法で LC-MS/MS 分析を行った.

組織からの total RNA 抽出

採材した心臓・腎臓はまず液体窒素にて凍結処理した。凍結した臓器を Multi-Beads Shocker (Yasui Kikai Co.) で 2,000 rpm, 10 秒にて破砕後、粉末の一部に ISOGEN II (ニッポンジーン) を 1 mL 添加した。再度, Multi-Beads Shocker で試料と ISOGEN II を攪拌した後、試料破砕液を 1.5 mL チューブに移し、14000rpm, 15 分の遠心分離を行い、上清 800 μ L を回収した。続いて 320 μ L のジエチルピロカーボネート (Diethylpyrocarbonate; DEPC) 処理水 (ナカライテスク) を加え、ボルテックスで攪拌後、14000rpm, 10 分の遠心によって DNA やタンパク質等を沈殿させた。水層の RNA 溶液を回収し、等量のイソプロパノール (Wako) を加えて RNA を沈殿させ、70%エタノールで洗浄後、42 μ L の DEPC 処理水に溶解した。2 μ L を吸光度計 (BECKMAN COULTER DU®730 with Nano Vetto) にて濃度測定した後、DEPC 処理水 (ナカライテスク) で 1 μ g/ μ L に調製した。抽出した Total RNA サンプルは使用時まで、-80°C にて保管した。

逆転写反応による cDNA の作製

ゲノム DNA を除去するために、5 μ g の total RNA に 1U の RQ1 Rnase-Free

DNase (Promega) を添加し、37°Cで 30 分間反応させた。フェノール・クロロフォルム処理による除タンパク後、エタノール沈殿を行った。ReverTraAce® (TOYOBO), 及びランダムプライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した (ABI, Gene Amp® PCR System 9700)。

逆転写は Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa) を用いて、以下のサーマルサイクルで行った。

- ・ 30°C 10 min / 42°C 90 min / 99°C 5 min / 20°C hold

Real-time PCR

Real-time PCR には、逆転写した cDNA および CYBR Premix ExTaq II (TaKaRa #RR081A) を用いた。Thermal Cycler Dice Real Time System を用いて以下のサーマルサイクルで増幅と測定を行った。

- ・ 95°C 10sec
- ・ 95°C 5sec / 60°C 30sec 40-42cycles
- ・ 95°C 15sec / 60°C 30sec / 95°C 15sec (Disociation)

なお、プライマーの配列については以下に一覧を記載した。

- ・ mouse Nppa (ANP) Fw: GGTAGGATTGACAGGATTGGAG
- ・ mouse Nppa (ANP) Rv: GCAGAATCGACTGCCTTTTC

- mouse Nppb (BNP) Fw: GGGCTGTAACGCACTGAAG
- mouse Nppb (BNP) Rv: ACTTCAAAGGTGGTCCCAGAG
- mouse LCN2 (NGAL) Fw: ACGGACTACAACCAGTTCGC
- mouse LCN2 (NGAL) Rv: AATGCATTGGTCGGTGGGG

クレアチニンクリアランス

腎機能測定群では腎機能の指標として 4 週目のクレアチニンクリアランスを測定した。算出は 4 週目の尿検体と同一個体採材後の血漿を用いて行った。

尿中クレアチニン測定にはクレアチニンテストワークキット（和光製薬工業）を用いた。原尿を精製水で 5 倍希釈し、キット解説書通りに操作を行い、X-MARK (Bio-RAD) を用いて OD=540nm で吸光度を測定した後、解析ソフト MPM_6 (Bio-RAD) を用いて濃度を算出した。

血中クレアチニン測定には Fuji ドライケムシステム FDC7000V (富士フィルム) を用いた。凍結した血漿を氷上で融解し、3000rpm で 1 分間スピンドウンした後、検体をドライケム用クレアチニン測定カートリッジに滴下し、測定した。

腎機能の指標として、ANS4 週目でのクレアチニンクリアランス (Creatinine clearance; Ccr) を算出した。Ccr は、測定した血中クレアチニン、尿中クレアチニン、尿量、および体表面積から以下の算出方法を用いて算出した。なお、体表

面積は Du-Bois の式を用いて体重より算出した.

$$\text{Surface Body Area(m}^2\text{)} = 96.47 + 1.577 \times \text{BW(g)}$$

$$\text{Ccr (mL/min /m}^2\text{)} = \frac{\text{Ucr(mg/dL)} \times \text{UV(mL)}}{\text{Scr(mg/dL)} \times 1440(\text{min})} / (96.47 + 1.577 \times \text{BW(g)})$$

尿中アルブミン測定

尿中アルブミンは ANS モデルの作製時 (0w), 2 週後 (2w), 4 週後 (4w) の各尿検体を, レビスアルブミンマウス ELISA キット (シバヤギ社 #AKRAL-121) を用いて測定した. はじめに専用希釈液を用いて 0w の検体を 50 倍, 2w を 200 倍, 4w を 400 倍に希釈した後にキットの説明書通りに反応を行い, X-MARK を用いて, 測定波長 450nm, 副波長 620nm における吸光度を測定した後, 解析ソフト MPM_6 を用いて濃度を算出した. その後, 濃度と尿量から尿中アルブミンの 1 日排泄量を算出した.

細胞培養と遺伝子導入

ヒト胎児腎臓由来細胞株の HEK293T 細胞, または HA-AT1a 安定発現 HEK293T 細胞は, 10% Fetal Bovine Serum (FBS) とペニシリン/ストレプトマイシン (SIGMA) を含む, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, WAKO) を培地とし, 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した. 各種発現ベクター

は、コラーゲンコートした 6 ウェルプレート (IWAKI) および ϕ 35mm の培養細胞用シャーレ (60 μ -Dish, ibidi) に培養細胞を播種してから 24 時間後に、各々 1 μ g 相当のプラスミド DNA を Opti-MEM 150 μ L, GeneJuice™ Transfection Reagent (Novagen) 4 μ L を用いてリポフェクション法により細胞に導入した。その後上清を Serum free medium に交換し、4 時間の血清フリーな飢餓状態を設け、アンジオテンシン II (1 μ M)・ヒスタミン (1 μ M)・Immethridine Dihydrobromide (H3 受容体アゴニスト) (1 nM) などのリガンドを添加して 10 分間の刺激を行った後に Lysis buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5% glycerol, 1 mM EDTA, 1x protease inhibitor) 100 μ L を用いてサンプルを回収した。

発現ベクターの構築

哺乳類細胞発現ベクター Venus-N1, VN-N1 及び VC-N1 は発現ベクター pEGFP-N1 (Clontech) の Kpn I サイトと Not I サイトの間に位置する Green Fluorescent Protein (GFP) の配列を切り出し, Venus (1-288 a.a.), Venus の N 末端側断片 (VN; 1-173 a.a.) 及び C 末端側断片 (VC; 155-288 a.a.) をコードする配列を導入した。マウス AT1a 受容体と H3 受容体は, GenScript 社 (東京) に依頼して作製した cDNA を鋳型とし, EcoR I と Sal I の制限酵素部

位を付加したプライマーを用いて PCR 法により増幅させ、BiFC 用のベクターに組み込むことにより、AT1a-Venus, -VN, -VC および H3R-Venus, -VN, -VC をそれぞれ構築した。

Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Assay

AT1 と H3R の BiFC assay 用ベクターは、トランスフェクションされた細胞で赤色に励起される蛍光を示す遺伝子導入コントロール (mCherry ベクター) と共トランスフェクションし、24 時間後に、1mL の 1×HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, GIBCO) で 2 回洗浄を行い、3.7%のホルムアミドを用いて室温で 15 分間固定を行った。その後、固定液は 1×HBSS に置換し、共焦点顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i, Olympus) を用いて、EYFP のフィルターで蛍光を観察した。

ウエスタンブロット解析

2x SDS sample buffer 40 μ L を添加した後に、G 蛋白共役型カップリング受容体 (G-Protein Coupling Receptor; GPCR) 変性のため 37°C で 30 分、および 99°C で 5 分間煮沸することで変性させたサンプルを、10%アミドゲルによる SDS-PAGE 法を用いて、200V で 42 分間電圧をかけ、セミドライ法を用いて

PDVF メンブレンに転写した. このメンブレンを blocking buffer (5% skim milk/ TBS(20 mM Tris/ pH 7.5, 150 mM NaCl)) 中で室温下に 45 分間振盪すること
で抗原のブロッキングを行った後, 目的のタンパク質を認識する一次抗体で室
温・60 分間の反応処理を行った. その後, TBST(0.1 % Tween20/ TBS)で洗淨
し, horseradish peroxidase (HRP) 結合二次抗体を反応させた後に, 再度 TBST
で洗淨. その後 Luminata™ Western HRP Substrate (MILLIPORE) で蛍光
発色させた後, X-film を用いて検出した.

ウエスタンブロット解析に用いた一次抗体は以下に示す.

- Anti-HA (3F10) (Roche) (1:1000 with 5% Skim milk)
- Anti-ERK2 (1B3B9) (Millipore) (1:1000 with 5% Skim milk)
- Anti-Phospho-ERK (#9101) (Cell Signaling) (1:1000 with 0.3% BSA)

ウエスタンブロット解析に用いた二次抗体は以下に示す.

- Anti-mouse IgG horseradish peroxidase linked whole antibody (GE Healthcare)
- Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked whole antibody (GE Healthcare)

Statistics Analysis

すべての統計解析は GraphPad Prism4 for Windows (GraphPad Software 社) を用いて行った。2 群間の比較は Mann-Whitney's U test を用いた。3 群以上の多群間比較については、まず One-way ANOVA test を用いて検定した後に、有意差が存在した場合に Tukey's Multiple Comparison test を用いて群間比較を行った。なお、いずれの検定も有意水準=5%として検定を行った。

第3章 結果

3-1. ANS モデルは心機能障害に加えて腎機能障害を生じる。

著者はまず、野生型マウス ANS モデル（以下 WT/ANS）において、Tsukamoto らの報告にある心機能障害の再現性の確認と、腎機能障害の有無について検討を行った。WT/ANS と対照群（以下 WT/Sham）を作製し、両者を計測・比較するパラメータとして、心機能解析群では ANS 作製 0w, 2w, 4w 各時点での%LVFS, 採材時の心重量/体重比, および心臓での心房由来ナトリウム利尿ペプチド (Atrium Natriuretic Peptide; ANP) および脳由来ナトリウム利尿ペプチド (Brain Natriuretic Peptide; BNP) の遺伝子発現を用いた。腎機能解析群では ANS 作製 0w, 2w, 4w での尿中アルブミン, 4w 時点でのクレアチニンクリアランス, および腎尿細管障害の指標として、腎臓での好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin; NGAL) の発現を確認した。

心機能障害の再現については、WT/ANS では報告通り、WT/Sham と比較して有意な%LVFS の経時的低下と心肥大, および ANP・BNP の発現増加を認めた (Fig.1 A-C)。また、腎機能障害については、WT/ANS は WT/Sham と比較して有意にクレアチニンクリアランスの低下, 尿中アルブミンの経時的な増

悪, NGAL の発現上昇を認めた (Fig.1 D-E). 以上の結果より, ANS モデルでは報告されている心機能障害に加えて, GFR の低下やアルブミン尿, 尿細管障害といった腎機能障害をきたすことを確認した. この結果より, 著者は ANS モデルが心腎連関のモデルマウスになり得ると考え, 引き続き同モデルの病態解析を行うこととした.

3-2. ANS モデルでは血中ヒスタミンレベルが増加する.

著者は次に, ANS モデルにおける血中物質の変化を解析した. 中でも著者が注目したのは, 血中アミンの変化である. アミンはアンモニア NH_4 の水素原子が炭化水素基によって置換された物質の総称である. 生体内においてアミンは概日リズムに関与するメラトニン[16]や, 神経伝達物質のアセチルコリン[17]など, 様々な生理活性調節を担っている. なかでもドーパミン (DA), エピネフリン (EP), ノルエピネフリン (NE) などのカテコールアミン類は交感神経系の活性化などを介して, 心腎連関に関与する因子として知られている[18]. 著者は WT/ANS と WT/Sham の血漿よりアミン類を抽出し, UPLC を用いて網羅的に解析, 両者を比較して変化を認めるアミン類を同定することを試みた. その結果, いくつかのピークが同定されたが, ANS モデルと Sham マウスで最も目立つ差異を認めたピークを分取・単離し, MALDI-QIT-TOF/MS で分子量を求めたと

ころ、 m/z 298.8 (水和物) (MS1) であった。さらに CID の結果 AQC 及び 1 分子の水が脱離した m/z 112.27 が生成した (MS2) ことから、この物質がアミノ基を有し、分子量が 111 であることが判明した。そこでデータベース (Human Metabolome Database) を用いてアミノ基をもっている物質を検索した結果、本物質がヒスタミンである可能性が示唆された。そこで、市販のヒスタミンを購入、AQC ラベル化して蛍光 HPLC で分析したところ、溶出位置が一致した。さらにこの AQC-ヒスタミンのピークを分取・単離し、MALDI-QIT-TOF/MS で CID を行ったところ、目的物と同じ m/z 112.27 が生成した (MS2) ことから、この物質がヒスタミンであることが確認された。

このことより、ヒスタミンが WT/ANS の血漿で増加している可能性が示唆された (Fig.2 A)。実際にヒスタミンレベルを LC-MS による質量解析を用いて測定したところ、WT/ANS の血漿において WT/Sham の血漿と比較して 2 倍程度の有意なヒスタミンレベルの上昇が確認された (Fig.2 B)。また、予想に反して WT/ANS と WT/Sham の血漿 NE レベルは差を認めなかった (Data not shown)。これらの結果より、著者はヒスタミンが心腎連関に関与する新たなプレイヤーの一つになり得ると考え、ANS モデルにおけるヒスタミンの作用を検討することとした。

3-3. 生体内でのヒスタミンの欠失は ANS モデルの病態を増悪する.

著者は引き続き、ヒスタミンが ANS モデルに及ぼす作用を検討するため、ヒスタミンを体内で欠失するマウスを用いて検討を行った。ヒスタミンは、マウス生体内では必須アミノ酸であるヒスチジンを基質としてヒスチジン脱炭酸酵素 (Histidine Decarboxylase; HDC) により合成される[15]。著者は HDC 機能を体内で欠失し、ヒスタミンを合成することのできない HDC-KO マウスを用いて ANS モデルを作製 (HDC-KO/ANS) し、同一の遺伝的背景で HDC 機能を持つ HDC-WT マウスを用いた ANS モデル (HDC-WT/ANS) と比較することで、ANS モデルにおけるヒスタミンの作用を心機能・腎機能のパラメータを用いて解析することとした。

結果は興味深いことに、%LVFS の経時的変化・心肥大・クレアチニンクリアランス・尿中アルブミン・NGAL の発現の項目において、HDC-KO/ANS において HDC-WT/ANS と比較して、有意に増悪を認めた (Fig.3 A, B, D-F)。ANP と BNP の心臓での発現は両群で有意な差はなかった (Fig.3 C)。これらの結果より、ANS モデルにおいてヒスタミンが体内で欠失する状態では、心機能・腎機能の両者において、病態増悪の要因となり得ると考えられた。このことは心腎関連病態において、ヒスタミンが生体において保護的な役割を担っているという可能性を示唆すると考えられた。

3-4. ヒスタミン H3 受容体の阻害は ANS モデルにおいて病態を増悪させる.

著者は、ヒスタミンの欠失が ANS モデルにおいて病態を増悪させるメカニズムについて解析を行った。ヒスタミンには現在 H1-H4 の 4 つの受容体サブタイプが報告されており [19]、著者はこのうち心臓・腎臓・交感神経系など心腎連関と関連の深い場所に発現している H1, H2, H3 の 3 つの受容体について、どの受容体が最大の責任受容体であるかを検討した。著者は、H1-H3 各受容体のアンタゴニスト (HRB) として、H1 受容体アンタゴニスト (H1RB) Cetirizine Dihydrochloride, H2 受容体アンタゴニスト (H2RB) Ranitidine Chloride, H3 受容体アンタゴニスト (H3RB) Carcinine ditrifluoroacetate, および対照として生理食塩水を ANS モデルに同時に投与し、薬理的に各受容体の作用を阻害し、これら 4 群の心機能・腎機能を比較することで、ANS モデルの病態がどのように変化するのかを確認した。

結果は、H3 受容体阻害薬の投与群 (WT/ANS/H3RB) において、生食投与群 (WT/ANS/Vehicle) と比較して有意に%LVFS の経時的低下、クレアチニンクリアランスの著しい低下を認めた (Fig.4 A, D)。H2 受容体阻害薬投与群 (WT/ANS/H2RB) では、ANS 作製後 2w での%LVFS が、WT/ANS/Vehicle と比較して有意に改善していたが、4w の時点での%LVFS は、

WT/ANS/H2RB と WT/ANS/Vehicle で有意な差は認めなかった (Fig.4 A).

また, H1 受容体阻害薬投与群 (WT/ANS/H1RB) についても, クレアチニンクリアランスにおいて, WT/ANS/Vehicle と比較して有意に低下を認めたが, その増悪の程度は WT/ANS/H3RB の方がより強かった (Fig.4 D). 心重量/体重比, 心臓 ANP/BNP 発現, 尿中アルブミン, および腎臓 NGAL 発現についてはいずれの群も有意な差は認めなかった (Fig.4 B, C, E, F).

これらの結果より, ANS モデルにおいてヒスタミンが保護的に作用しているのは H3 受容体を介した作用である可能性が高いと考えられた.

3-5. ヒスタミン H3 受容体アゴニストの投与は ANS モデルの病態を改善する.

続いて著者は, WT/ANS モデルに H3 受容体アゴニスト (H3RA) Immethridine Dihydrobromide を投与することで (WT/ANS/H3RA), WT/ANS/Saline と比較して病態の改善が認められるかの検討を行った. 興味深いことに, WT/ANS/H3RA では, %LVFS, 心重量/体重比, 尿中アルブミン, 腎臓 NGAL 発現で WT/ANS/Saline と比較して有意に改善を認めた (Fig.5 A, B, E, F). また, クレアチニンクリアランスについても改善の傾向

を認めた ($P=0.06$) (Fig.5 D). なお, 心臓での ANP/BNP 発現は差を認めなかった (Fig.5 C).

この結果と H3RB 投与群での心機能・腎機能の有意な増悪を併せると, ヒスタミンは H3 受容体を介して ANS モデルの心臓・腎臓病態に保護的に作用していると考えられた.

3-6. ヒスタミン H3 受容体の過剰発現は HEK293T 細胞において AT1 受容体の下流にあるシグナルを変化させる.

これまでの結果から, ヒスタミンが H3 受容体を介して ANS モデルにおける心腎病態に関与することが示唆された. 著者は, ANS モデルに対してアンジオテンシン II の大量負荷を行っていることから, H3 受容体刺激による心腎病態保護の分子メカニズムとして, アンジオテンシン II の標的受容体である AT1 受容体と H3 受容体の相互作用に着目した. AT1 受容体はレニン・アンジオテンシン系における主要なターゲットとして広く認知されている [20, 21]. 著者はこの AT1 受容体が安定発現している遺伝子組み換え HEK293T 細胞に対して, ヒスタミン H3 受容体を過剰発現させ, AT1 受容体下流の代表的シグナルである, Extracellular Signal-regulated Kinase; ERK のリン酸化シグナルの変化を検討した.

まず、H3 受容体に蛍光蛋白である Venus 蛋白を付けた蛋白を HEK293T 細胞にトランスフェクションし、蛍光を観察したところ、H3 受容体が細胞膜と細胞質ともに局在し、発現していることを確認した (Date not shown). 続いて同細胞にアンジオテンシン II, ヒスタミン, H3 受容体アゴニストを添加した後、Western Blotting を用いて ERK1/2 のリン酸化レベルを確認した. H3 受容体を発現していない細胞 (Fig.6 Left) では、アンジオテンシン II を添加すると、ERK1/2 のリン酸化レベルは上昇したが、ヒスタミンを添加しても ERK1/2 のリン酸化レベルは上昇しなかった. さらに、AT1 受容体と H3 受容体をともに発現した細胞ではアンジオテンシン II, ヒスタミン, H3 受容体アゴニストの単独添加で ERK1/2 のリン酸化レベルは若干上昇した. 興味深いことに、アンジオテンシン II と H3 受容体アゴニストを添加したサンプルで ERK1/2 のリン酸化レベルが著しく上昇していることを確認した (Fig.6 B Right). この結果は、AT1 受容体と H3 受容体は相互作用によって ERK1/2 のリン酸化レベルを制御し、それによって、心腎関連病態に対して保護的に作用するという可能性を示唆している.

3-7. ヒスタミン H3 受容体は HEK293T 細胞において AT1 受容体とヘテロダイマーを形成する.

ヒスタミン H3 受容体と AT1 受容体の共発現によって、細胞における AT1 下流のシグナルが変化することが明らかとなったが、著者はこの相互作用について、両者がともに G 蛋白共役型カップリング受容体 (GPCR) であるという点に着目した。著者は H3 受容体が AT1 受容体と二量体 (ヘテロダイマー) を形成し、AT1 下流のシグナルを変化しているという仮説を立て、ヘテロダイマー形成の有無について検証を行うこととした。検証の手段として著者は Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Assay を用いた。BiFC アッセイは近年、分子間における二量体の形成を検出するツールとして用いられている [22]。H3 受容体および AT1 受容体の C 末端側に、蛍光蛋白の一種である Venus 蛋白を Full length (VF) で組み込んだプラスミド (AT1-VF, H3-VF) と、Venus 蛋白を N 末端側 (VN) および C 末端側 (VC) の 2 つに分割し、それぞれを組み込んだプラスミド (AT1-VN・AT1-VC, H3-VN・H3-VC) を作製し、HEK293T 細胞に過剰発現させた。結果、AT1-VN/H3-VC のダブルトランスフェクションをした細胞と、その逆の組み合わせである AT1-VC/H3-VN のダブルトランスフェクション細胞の両者において、Venus 蛋白による蛍光を確認した。なお、蛍光は細胞膜、細胞質いずれにも確認された (Fig.7)。このことから、両受容体は HEK293T 細胞においてヘテロダイマーを形成することが示された。

第4章 考察

心腎連関病態は様々な因子が深く絡み合った、非常に複雑な病態であると考えられている。その病態の解析が難しい理由の一つとして、病態を反映した良い病態モデルがほとんど存在しないということが挙げられる。これまでに検討された心腎連関モデルマウスとしては、片腎摘出+心筋梗塞モデル[23]、5/6腎摘+心筋梗塞モデル[24]、アドリアマイシン投与モデルラット[25]などがあるが、いずれも手技が難しく、侵襲も大きく、生存率が低いことから再現が簡便といえないのが問題であった。今回著者が検討を行った ANS モデルマウスは手技も簡便であり、心不全となる個体差が少ないことから有望な高血圧誘導性心不全モデルとして報告されたモデルであるが、これまでの報告では心機能傷害にのみ着目されており、腎障害に対しては報告が皆無であった。今回、著者は本研究を通じてこのモデルが心機能低下に加え、腎機能低下・高度アルブミン尿・尿細管障害といった CKD に類似した状態を呈することを確認した。つまり ANS モデルは心血管病変+CKD という心腎連関病態に類似した病態を示しており、心腎連関の簡便な病態モデルマウスとして有望な候補と考えられる。

本研究で著者は、ヒスタミンが ANS モデルの血中で上昇していることを確

認し、ヒスタミンが欠失した HDC-KO マウスでは、ANS モデルの病態が増悪することを示した。ここで、ヒトの疾患におけるヒスタミンについての報告を見ると、ヒスタミンはこれまでに慢性腎不全、血液透析患者、腹膜透析患者、ネフローゼ症候群といった CKD 患者で上昇することが報告されている[26-28]。これまでに、CKD 患者の血中ヒスタミンの増加は、患者がきたす搔痒感の原因物質の一つとして注目されていたが、このヒスタミンレベルの増加が持つ生理的意味についてはこれまで不明であった。CKD が心血管病変のハイリスクファクターであることは明らかであり、本研究の結果より、この CKD 患者のヒスタミンレベルの上昇は、心腎連関病態に対する生体の調節機構の一端として起きている可能性がある。

これまでに、ヒスタミンは H2 受容体を介して、マウスの心血管病を増悪させる可能性が報告され[29]、実際に臨床の場面でも H2 受容体アンタゴニストが心不全の病態を改善するという報告がなされている[30]。一方で、ヒスタミンの欠失は虚血性心疾患の病態を増悪させるという報告もある[31]。これらの報告より、ヒスタミンはその結合する受容体のサブタイプによって、生体内で保護的にも傷害的にも作用することが考えられる。本研究では、ヒスタミンが H3 受容体を介して心収縮力や心肥大、蛋白尿や尿細管障害などの心腎連関病態に保護的に作用する可能性を見出した。このメカニズムを解明する一つの手

がかりとして、AT1 受容体を安定発現した HEK293T 細胞において、H3 受容体を同時に過剰発現させ、アンジオテンシン II と H3 受容体アゴニストを同時に添加することで、AT1 受容体シグナルにおける、ERK1/2 のリン酸化が相乗的に亢進することを示した。ERK は AT1 受容体シグナルの古典的経路である MAPK 下流に位置し、細胞増殖の制御などに関与するとされている。AT1 受容体は、心臓においては心筋・冠動脈・心臓交感神経系など、腎臓においては糸球体・尿細管・動脈・腎交感神経系などに存在し、アンジオテンシン II の刺激により、MAPK 経路下流の ERK1/2 が活性化する。ERK1/2 の活性化は腎臓の障害に対して、傷害的にも保護的にも作用することが報告されている[32-34]。また、H3 受容体はマウスやラットで心臓・腎臓交感神経終末や腎尿細管などにおいて発現が報告されている[35][36]ことから、特に交感神経系や腎尿細管で AT1 受容体と近接し、AT1 受容体と H3 受容体の相互作用のメカニズムは、本研究の最後に示した AT1/H3 受容体ヘテロダイマーに由来する可能性がある。近年、GPCR は同一または異なる GPCR と二量体（ホモ/ヘテロダイマー）を形成し、その局在や機能を生体内で変化・調節しているという報告がなされている[37, 38]。加えて、細胞内ドメインの一つである脂質ラフトにおいて、G タンパクなどのシグナル因子を集積させることによって、効率的なシグナル伝達の間として機能するという報告[39]などから、アンジオテンシン II や

ヒスタミンなどのリガンド刺激で AT1 受容体・H3 受容体が局在を変化させ、発現密度が増加した結果、二量体を形成する可能性を高めている可能性もある。

本研究にはいくつか未検討の課題が残されている。第一に、ANS モデルでは腎機能低下と高度蛋白尿を呈することが示されたが、その形態変化による病理学的解析については未検討である。腎機能低下は主に尿細管障害、高度蛋白尿は糸球体の傷害が病態に寄与していることが予想されるが、実際その検討はなされていない。今後 ANS モデルの心・腎組織の Masson Trichrome 染色による線維化・傷害の評価や、腎糸球体の電子顕微鏡切片の観察などによる形態学的評価も必須と考えられる。

第二に、本研究において HEK293T 細胞上で AT1 受容体と H3 受容体のヘテロダイマー形成の可能性が示されたが、生体の組織においてこのような二量体形成が実際に起きているか否かについては、今後確認が必要である。現時点での解析手法として、組織切片上で二量体形成の可能性のある 2 つの受容体に特異的な抗体を用い、両者が二量体を形成する際に 2 次抗体が特異的シグナルを発生する in situ PLA (Proximity Ligation Assay) 法を用いて、組織内における受容体間の相互作用を検出することを検討している。この手法では、従来の蛍光を用いた Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET,

Bioluminescence Resonance Energy Transfer; BRET アッセイや共免疫沈降法

とは異なり，内在性の受容体相互作用や局在を検出することが可能であり

[40]，同法を用いて組織切片上で信号が検出できれば，AT1/H3 受容体が生体内においても実際にヘテロダイマーが形成していることの証明になると考えられる．

最後に最も重要な課題として，ANS モデルにおける血中ヒスタミンの増加は，心腎連関病態の原因か結果か，そして増加した血中ヒスタミンはどこで産生されたものか，という疑問がある．本研究では，ANS モデルの作製 4 週目における血漿を採取して血中ヒスタミンレベルの定量を行ったが，病態が進行した状態での血中ヒスタミン量であるため，病態に対する生体の保護機構としてヒスタミンの産生が増加してくるのか，病態によってヒスタミンの代謝が障害された結果，増加したヒスタミンが保護作用を持っているのかは非常に興味のあるところである．今後，まだ病態があまり進行していない状態である，処置 2 週目の ANS モデルを用いてヒスタミン量の解析を行うことで，ある程度の解答が得られることを期待している．また，ヒスタミンの合成酵素である HDC は，運動などによる刺激で発現が変化するという報告もあり[41]，HDC の心臓や腎臓での発現変化や酵素活性の変化を測定することで，心腎連関病態におけるヒスタミンの産生部位についても何らかの示唆が得られると考えられ

る.

本研究において、著者は AT1 受容体と H3 受容体によるヘテロダイマー形成の可能性が示唆される結果を得たが、このようなクロストークは、生体において、ミクロでは細胞膜上の受容体レベルから、マクロでは心臓と腎臓、すなわち「心腎連関」のように臓器間に至るまで活発に行われていることは想像に難くなく、この関係性を一つ一つ解明していくことで疾患の克服につながる可能性が開けるだろう。本研究はそのような臓器間クロストークの新たなプレイヤーとして、低分子アミンであるヒスタミンに焦点を当てるきっかけとなり得ると考える。

謝辞

本研究を行うにあたり，御指導を賜りました筑波大学医学医療系教授 山縣邦弘先生，ならびに筑波大学生命領域学際研究センター教授 深水 昭吉 先生に厚く御礼を申し上げます。また，直接的に御指導頂きました，筑波大学生命領域学際研究センター講師 石田 純治 先生に厚く御礼を申し上げます。また，本研究のために貴重な遺伝子改変マウスを快く提供していただきました東北大学工学部教授 大津 浩 先生に感謝申し上げます。加えて，御自身の仕事でお忙しい中にも関わらず，数々の助言を賜りました筑波大学生命環境系 加香 孝一郎 先生，金 俊達 先生をはじめとした筑波大学生命領域学際研究センター 深水研究室，ならびに谷本研究室の皆様心から感謝致します。

参考文献

- [1] L. 厚生労働省 Ministry of Health, and Welfare. Japan. (2016) 平成 26 年度 医療費の動向. 2016, http://www.mhlw.go.jp/topics/medias/year/14/dl/iryouhi_data.pdf#search='%E5%8C%BB%E7%99%82%E8%B2%BB+2015%E5%B9%B4%E5%BA%A6'.
- [2] A. S. Levey, P. E. de Jong, J. Coresh, M. El Nahas, B. C. Astor, K. Matsushita, R. T. Gansevoort, B. L. Kasiske, and K. U. Eckardt. (2011) The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int*, **80**(1), 17-28: 10.1038/ki.2010.483.
- [3] K. Iseki, Y. Ikemiya, C. Iseki, and S. Takishita. (2003) Proteinuria and the risk of developing end-stage renal disease. *Kidney Int*, **63**(4), 1468-1474: 10.1046/j.1523-1755.2003.00868.x.
- [4] K. Iseki. (2005) Factors influencing the development of end-stage renal disease. *Clin Exp Nephrol*, **9**(1), 5-14: 10.1007/s10157-005-0341-3.
- [5] 生. 政金, 滋. 中井, 聡. 尾形, 直. 木全, 規. 花房, 高. 濱野, 建. 若井, 篤. 和田, 孝. 新田, and 日本透析医学会統計調査委員会. (2016) わが国の慢性透析療法の現況(2014 年 12 月 31 日現在). *日本透析医学会雑誌*, **49**(1), 1-34, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2016139287>.
- [6] L. G. Bongartz, M. J. Cramer, and B. Braam. (2004) The cardiorenal connection. *Hypertension*, **43**(4), e14: 10.1161/01.HYP.0000118521.06245.b8.
- [7] M. J. Sarnak, A. S. Levey, A. C. Schoolwerth, J. Coresh, B. Culleton, L. L. Hamm, P. A. McCullough, B. L. Kasiske, E. Kelepouris, M. J. Klag, P. Parfrey, M. Pfeffer, L. Raij, D. J. Spinosa, and P. W. Wilson. (2003) Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Hypertension*, **42**(5), 1050-1065: 10.1161/01.HYP.0000102971.85504.7c.
- [8] A. Tojo, M. L. Onozato, N. Kobayashi, A. Goto, H. Matsuoka, and T. Fujita. (2002) Angiotensin II and oxidative stress in Dahl Salt-sensitive rat with heart failure. *Hypertension*, **40**(6), 834-839, <http://hyper.ahajournals.org/content/hypertensionaha/40/6/834.full.pdf>.
- [9] J. Himmelfarb, P. Stenvinkel, T. A. Ikizler, and R. M. Hakim. (2002) The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia.

- Kidney Int, **62**(5), 1524-1538: 10.1046/j.1523-1755.2002.00600.x.
- [10] M. Arici and J. Walls. (2001) End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: is C-reactive protein the missing link? *Kidney Int*, **59**(2), 407-414: 10.1046/j.1523-1755.2001.059002407.x.
- [11] C. Heymes, J. K. Bendall, P. Ratajczak, A. C. Cave, J. L. Samuel, G. Hasenfuss, and A. M. Shah. (2003) Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol*, **41**(12), 2164-2171, http://ac.els-cdn.com/S0735109703004716/1-s2.0-S0735109703004716-main.pdf?_tid=e57a3b88-7a47-11e6-8ba2-00000aacb35d&acdnat=1473836169_333ad71d8897296c7d048bca80af2d3f.
- [12] M. K. Szymanski, R. A. de Boer, G. J. Navis, W. H. van Gilst, and H. L. Hillege. (2012) Animal models of cardiorenal syndrome: a review. *Heart Fail Rev*, **17**(3), 411-420: 10.1007/s10741-011-9279-6.
- [13] T. D. Hewitson, S. G. Holt, and E. R. Smith. (2015) Animal Models to Study Links between Cardiovascular Disease and Renal Failure and Their Relevance to Human Pathology. *Front Immunol*, **6** 465: 10.3389/fimmu.2015.00465.
- [14] Y. Tsukamoto, T. Mano, Y. Sakata, T. Ohtani, Y. Takeda, S. Tamaki, Y. Omori, Y. Ikeya, Y. Saito, R. Ishii, M. Higashimori, M. Kaneko, T. Miwa, K. Yamamoto, and I. Komuro. (2013) A novel heart failure mice model of hypertensive heart disease by angiotensin II infusion, nephrectomy, and salt loading. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **305**(11), H1658-1667: 10.1152/ajpheart.00349.2013.
- [15] H. Ohtsu, S. Tanaka, T. Terui, Y. Hori, Y. Makabe-Kobayashi, G. Pejler, E. Tchougounova, L. Hellman, M. Gertsenstein, N. Hirasawa, E. Sakurai, E. Buzas, P. Kovacs, G. Csaba, A. Kittel, M. Okada, M. Hara, L. Mar, K. Numayama-Tsuruta, S. Ishigaki-Suzuki, K. Ohuchi, A. Ichikawa, A. Falus, T. Watanabe, and A. Nagy. (2001) Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells. *FEBS Lett*, **502**(1-2), 53-56, http://ac.els-cdn.com/S0014579301026631/1-s2.0-S0014579301026631-main.pdf?_tid=f3f5e3ae-94df-11e5-be0c-00000aab0f6c&acdnat=1448612709_cbd53734e8cb6959c7eef22e2edbf3d6.
- [16] W. P. Williams, 3rd, D. E. McLin, 3rd, M. A. Dressman, and D. N. Neubauer. (2016) Comparative Review of Approved Melatonin Agonists for the Treatment of Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorders. *Pharmacotherapy*: 10.1002/phar.1822.
- [17] H. Higashida, S. Yokoyama, C. Tsuji, and S. I. Muramatsu. (2016) Neurotransmitter release: vacuolar ATPase V0 sector c-subunits in possible gene or cell therapies for Parkinson's, Alzheimer's, and psychiatric diseases. *J Physiol Sci*: 10.1007/s12576-016-0462-3.

- [18] S. Jonsson, M. B. Agic, F. Narfstrom, J. M. Melville, and M. Hultstrom. (2014) Renal neurohormonal regulation in heart failure decompensation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **307**(5), R493-497: 10.1152/ajpregu.00178.2014.
- [19] G. Nieto-Alamilla, R. Marquez-Gomez, A. M. Garcia-Galvez, G. E. Morales-Figueroa, and J. A. Arias-Montano. (2016) The histamine H3 receptor: structure, pharmacology and function. *Mol Pharmacol*: 10.1124/mol.116.104752.
- [20] V. Mollace, M. Gliozzi, A. Capuano, and F. Rossi. (2016) Modulation of RAAS-natriuretic peptides in the treatment of HF: Old guys and newcomers. *Int J Cardiol*: 10.1016/j.ijcard.2016.03.085.
- [21] X. C. Li and J. L. Zhuo. (2016) Recent Updates on the Proximal Tubule Renin-Angiotensin System in Angiotensin II-Dependent Hypertension. *Curr Hypertens Rep*, **18**(8), 63: 10.1007/s11906-016-0668-z.
- [22] J. D. Kim, K. E. Park, J. Ishida, K. Kako, J. Hamada, S. Kani, M. Takeuchi, K. Namiki, H. Fukui, S. Fukuhara, M. Hibi, M. Kobayashi, Y. Kanaho, Y. Kasuya, N. Mochizuki, and A. Fukamizu. (2015) PRMT8 as a phospholipase regulates Purkinje cell dendritic arborization and motor coordination. *Sci Adv*, **1**(11), e1500615: 10.1126/sciadv.1500615.
- [23] R. P. van Dokkum, W. B. Eijkelkamp, A. C. Kluppel, R. H. Henning, H. van Goor, M. Citgez, W. A. Windt, D. J. van Veldhuisen, P. A. de Graeff, and D. de Zeeuw. (2004) Myocardial infarction enhances progressive renal damage in an experimental model for cardio-renal interaction. *J Am Soc Nephrol*, **15**(12), 3103-3110: 10.1097/01.asn.0000145895.62896.98.
- [24] R. Dikow, U. Schmidt, L. P. Kihm, M. Schaiyer, V. Schwenger, M. L. Gross, H. A. Katus, M. Zeier, and S. E. Hardt. (2010) Uremia aggravates left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Nephrol*, **32**(1), 13-22: 10.1159/000313846.
- [25] E. Noiri, N. Nagano, K. Negishi, K. Doi, S. Miyata, M. Abe, T. Tanaka, K. Okamoto, N. Hanafusa, Y. Kondo, N. Ishizaka, and T. Fujita. (2006) Efficacy of darbepoetin in doxorubicin-induced cardiorenal injury in rats. *Nephron Exp Nephrol*, **104**(1), e6-e14: 10.1159/000093258.
- [26] F. Stockenhuber, G. Sunder-Plassmann, and P. Balcke. (1987) Increased plasma histamine levels in chronic renal failure. *N Engl J Med*, **317**(6), 386: 10.1056/nejm198708063170614.
- [27] D. S. Gill, V. A. Fonseca, M. A. Barradas, R. Balliod, J. F. Moorhead, and P. Dandona. (1991) Plasma histamine in patients with chronic renal failure and nephrotic syndrome. *J Clin Pathol*, **44**(3), 243-245.
- [28] F. Stockenhuber, R. W. Kurz, K. Sertl, G. Grimm, and P. Balcke. (1990) Increased

- plasma histamine levels in uraemic pruritus. *Clin Sci (Lond)*, **79**(5), 477-482, <http://www.clinsci.org/content/ppclinsci/79/5/477.full.pdf>.
- [29] T. Luo, B. Chen, Z. Zhao, N. He, Z. Zeng, B. Wu, Y. Fukushima, M. Dai, Q. Huang, D. Xu, J. Bin, M. Kitakaze, and Y. Liao. (2013) Histamine H2 receptor activation exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury by disturbing mitochondrial and endothelial function. *Basic Res Cardiol*, **108**(3), 342: 10.1007/s00395-013-0342-4.
- [30] P. J. Leary, R. J. Tedford, D. A. Bluemke, M. R. Bristow, S. R. Heckbert, S. M. Kawut, E. V. Krieger, J. A. Lima, C. S. Masri, D. D. Ralph, S. Shea, N. S. Weiss, and R. A. Kronmal. (2016) Histamine H2 Receptor Antagonists, Left Ventricular Morphology, and Heart Failure Risk: The MESA Study. *J Am Coll Cardiol*, **67**(13), 1544-1552: 10.1016/j.jacc.2016.01.045.
- [31] L. Deng, T. Hong, J. Lin, S. Ding, Z. Huang, J. Chen, J. Jia, Y. Zou, T. C. Wang, X. Yang, and J. Ge. (2015) Histamine deficiency exacerbates myocardial injury in acute myocardial infarction through impaired macrophage infiltration and increased cardiomyocyte apoptosis. *Sci Rep*, **5** 13131: 10.1038/srep13131.
- [32] M. Ono, Y. Sakao, T. Tsuji, N. Ohashi, H. Yasuda, A. Nishiyama, Y. Fujigaki, and A. Kato. (2015) Role of intrarenal (pro)renin receptor in ischemic acute kidney injury in rats. *Clin Exp Nephrol*, **19**(2), 185-196: 10.1007/s10157-014-0979-9.
- [33] D. E. Choi, J. Y. Jeong, H. Choi, Y. K. Chang, M. S. Ahn, Y. R. Ham, K. R. Na, and K. W. Lee. (2016) ERK phosphorylation plays an important role in the protection afforded by hypothermia against renal ischemia-reperfusion injury. *Surgery*: 10.1016/j.surg.2016.07.028.
- [34] D. Feliers and B. S. Kasinath. (2011) Erk in kidney diseases. *J Signal Transduct*, **2011** 768512: 10.1155/2011/768512.
- [35] R. Levi and N. C. Smith. (2000) Histamine H(3)-receptors: a new frontier in myocardial ischemia. *J Pharmacol Exp Ther*, **292**(3), 825-830, <http://jpet.aspetjournals.org/content/292/3/825.full.pdf>.
- [36] A. Pini, P. L. Chazot, E. Veglia, A. Moggio, and A. C. Rosa. (2015) H receptor renal expression in normal and diabetic rats. *Inflamm Res*: 10.1007/s00011-015-0808-y.
- [37] M. Bellot, S. Galandrin, C. Boullaran, H. J. Matthies, F. Despas, C. Denis, J. Javitch, S. Mazeret, S. J. Sanni, V. Pons, M. H. Seguelas, J. L. Hansen, A. Pathak, A. Galli, J. M. Senard, and C. Gales. (2015) Dual agonist occupancy of AT1-R- α 2C-AR heterodimers results in atypical Gs-PKA signaling. *Nat Chem Biol*, **11**(4), 271-279: 10.1038/nchembio.1766.
- [38] A. Nishimura, C. Sunggip, H. Tozaki-Saitoh, T. Shimauchi, T. Numaga-Tomita, K. Hirano, T. Ide, J. M. Boeynaems, H. Kurose, M. Tsuda, B. Robaye, K. Inoue, and M.

- Nishida. (2016) Purinergic P2Y6 receptors heterodimerize with angiotensin AT1 receptors to promote angiotensin II-induced hypertension. *Sci Signal*, **9**(411), ra7: 10.1126/scisignal.aac9187.
- [39] N. Ishizaka, K. K. Griendling, B. Lassegue, and R. W. Alexander. (1998) Angiotensin II type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation. *Hypertension*, **32**(3), 459-466, <http://hyper.ahajournals.org/content/hypertensionaha/32/3/459.full.pdf>.
- [40] E. Iwabuchi, Y. Miki, K. Ono, Y. Onodera, T. Suzuki, H. Hirakawa, T. Ishida, N. Ohuchi, and H. Sasano. (2016) In situ detection of estrogen receptor dimers in breast carcinoma cells in archival materials using proximity ligation assay (PLA). *J Steroid Biochem Mol Biol*: 10.1016/j.jsbmb.2016.05.022.
- [41] F. Nijima-Yaoita, M. Tsuchiya, H. Ohtsu, K. Yanai, S. Sugawara, Y. Endo, and T. Tadano. (2012) Roles of histamine in exercise-induced fatigue: favouring endurance and protecting against exhaustion. *Biol Pharm Bull*, **35**(1), 91-97, https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/35/1/35_1_91/_pdf.

图表

Figure 1

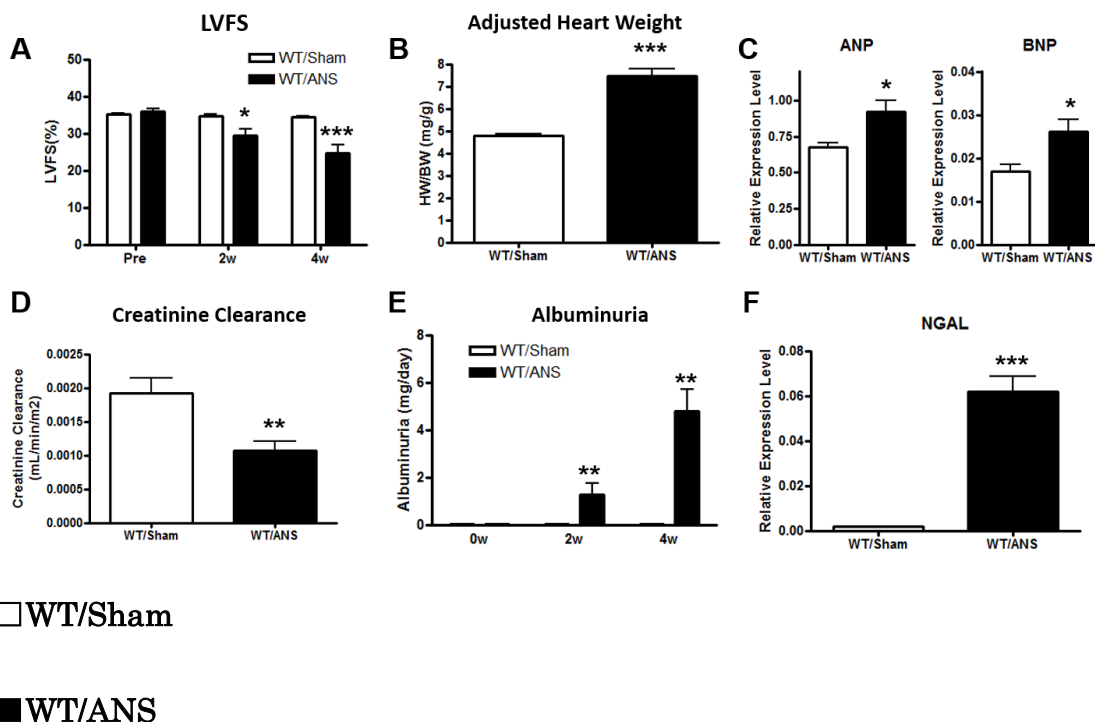


Figure 1. 心機能・腎機能の比較 WT/Sham 対 WT/ANS

A. WT/Sham と WT/ANS における%LVFS の経時的変化(Pre, 2w, 4w).

(WT/Sham; n=5, WT/ANS; n=13, *P<0.05 ***P<0.005).

B. WT/Sham と WT/ANS の 4w での心重量/体重比. (WT/Sham; n=5,

WT/ANS; n=13, ***P<0.005)

C. WT/Sham と WT/ANS の 4w での心臓における ANP, BNP の遺伝子発

現. (WT/Sham; n=8, WT/ANS; n=8, *P<0.05)

D. WT/Sham と WT/ANS の 4w でのクレアチニンクリアランス. (WT/Sham;

n=5, WT/ANS; n=6, **P<0.01)

E. WT/Sham と WT/ANS におけるアルブミン尿の経時的変化(Pre, 2w, 4w)

(WT/Sham; n=4, WT/ANS; n=6, **P<0.01).

F. WT/Sham と WT/ANS の 4w での腎臓における NGAL の遺伝子発現.

(WT/Sham; n=8, WT/ANS; n=8, ***P<0.005)

Figure 2

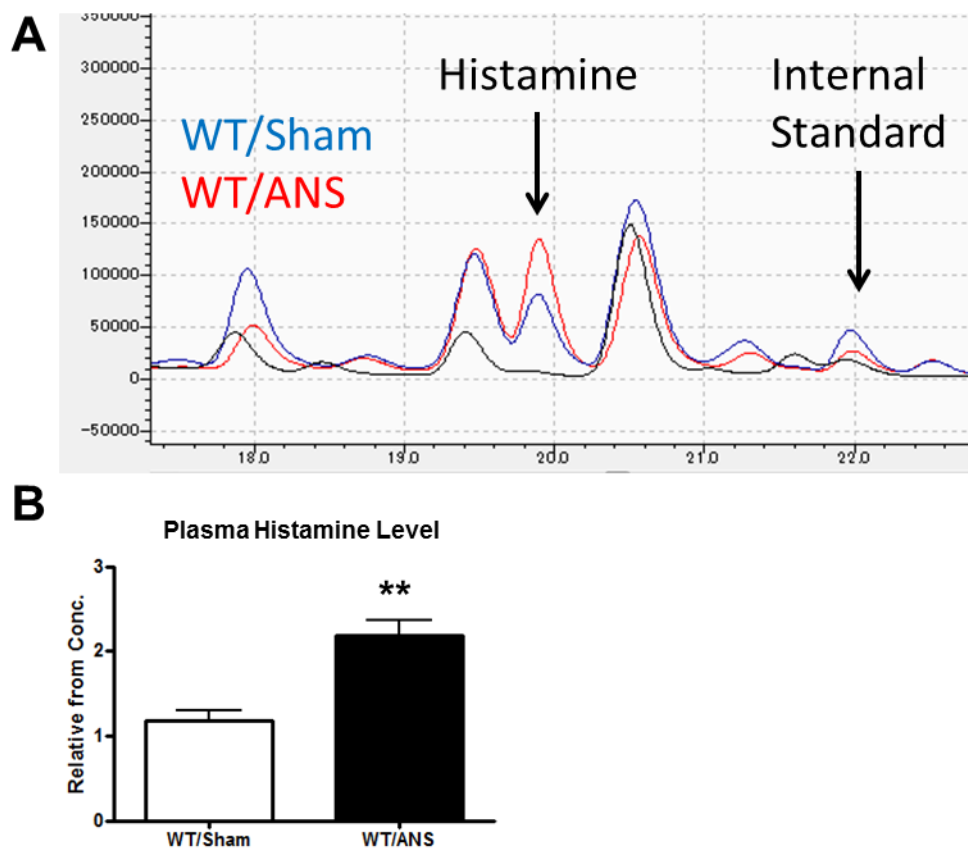


Figure 2. WT/Sham 対 WT/ANS の血中アミン分析

A. WT/Sham と WT/ANS の血漿を用いて UPLC で解析した血中アミン分析.

図は代表的なものを示した.

B. LC-MS を用いた血漿ヒスタミンレベルの定量分析結果. ヒスタミンのピーク

面積を内部標準物質のピーク面積で補正している. (WT/Sham and

WT/ANS; n=6, **P<0.01)

Figure 3

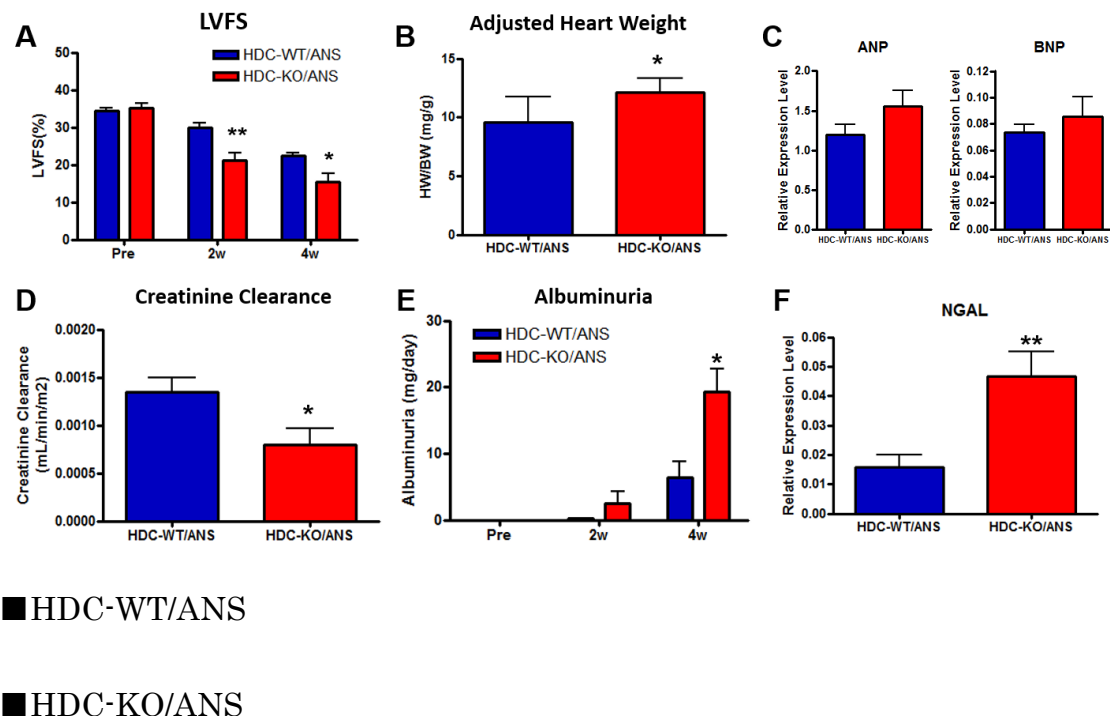


Figure 3. 心機能・腎機能の比較 HDC-WT/ANS 対 HDC-KO/ANS

A. HDC-WT/ANS と HDC-KO/ANS における%LVFS の経時的変化(Pre, 2w, 4w). (Both groups; n=9, *P<0.05, **P<0.01).

B. HDC-WT/ANS と HDC-KO/ANS の 4w での心重量/体重比. (HDC-WT/ANS; n=9, HDC-KO/ANS; n=9, *P<0.05)

C. HDC-WT/ANS と HDC-KO/ANS の 4w での心臓における ANP, BNP の遺伝子発現. (Both groups; n=9, no significance)

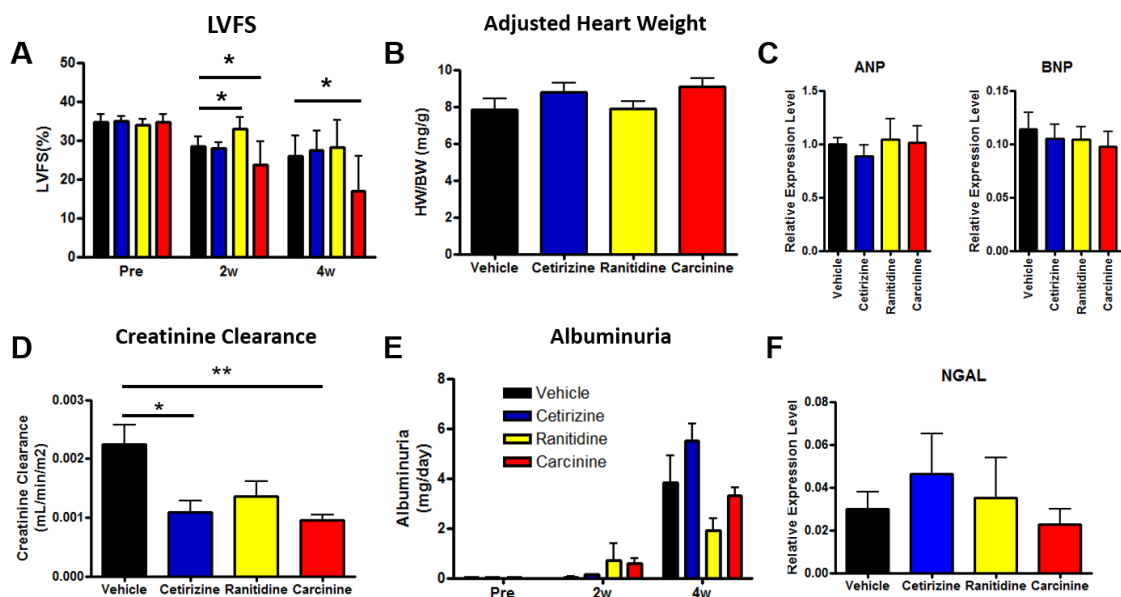
D. HDC-WT/ANS と HDC-KO/ANS の 4w でのクレアチンクリアランス.

(HDC-WT/ANS; n=5, HDC-KO/ANS; n=7, *P<0.05)

E. HDC-WT/ANS と HDC-KO/ANS におけるアルブミン尿の経時的変化(Pre, 2w, 4w) (HDC-WT/ANS; n=5, HDC-KO/ANS; n=7, *P<0.05).

F. HDC-WT/ANS と HDC-KO/ANS の 4w での腎臓における NGAL の遺伝子発現. (Both groups; n=6, **P<0.01)

Figure 4



■生理食塩水（溶媒）

■Cetirizine Dihydrochloride（H1 受容体アンタゴニスト）

■Ranitidine Chloride（H2 受容体アンタゴニスト）

■Carcinine Ditrifluoroacetate（H3 受容体アンタゴニスト）

Figure 4. 心機能・腎機能 各ヒスタミン受容体アンタゴニスト投与 WT/ANS

群での比較

A. WT/ANS/Vehicle と各 WT/ANS/HRB における%LVFS の経時的変化(Pre,

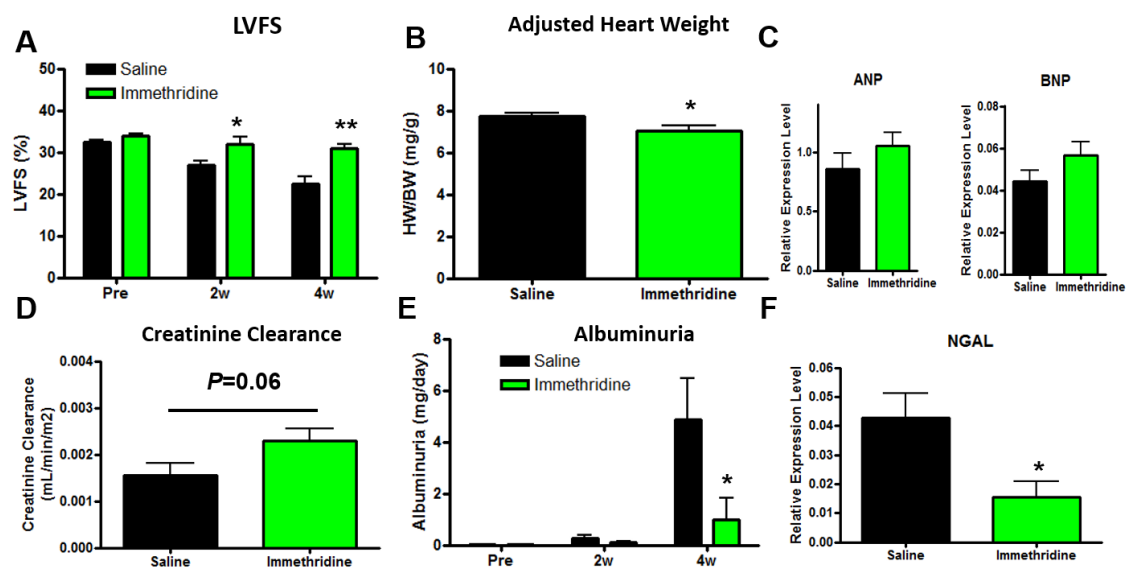
2w, 4w). (Each group; n=9, *P<0.05, compared to WT/ANS/Vehicle).

B. WT/ANS/Vehicle と各 WT/ANS/HRB の 4w での心重量/体重比. (Each

group; n=9, no significance)

- C. WT/ANS/Vehicle と各 WT/ANS/HRB の 4w での心臓における ANP, BNP の遺伝子発現. (WT/ANS/Vehicle, WT/ANS/Ranitidine, and WT/ANS/Carcinine; n=6, WT/ANS/Cetirizine; n=5, No significance)
- D. WT/ANS/Vehicle と各 WT/ANS/HRB の 4w でのクレアチンクリアランス. (Each group; n=5, *P<0.05, **P<0.01, compared to WT/ANS/Vehicle)
- E. WT/ANS/Vehicle と各 WT/ANS/HRB におけるアルブミン尿の経時的変化 (Pre, 2w, 4w) (Each group; n=5, no significance).
- F. WT/ANS/Vehicle と各 WT/ANS/HRB の 4w での腎臓における NGAL の遺伝子発現. (WT/ANS/Vehicle, WT/ANS/Ranitidine, and WT/ANS/Carcinine; n=6, WT/ANS/Cetirizine; n=5, No significance).

Figure 5



■生理食塩水（溶媒）

■Immethridine Dihydrobromide（H3 受容体アゴニスト）

Figure 5. 心機能・腎機能 WT/ANS/Saline 対 WT/ANS/Immethridine の比較

A. WT/ANS/Saline と WT/ANS/Immethridine における%LVFS の経時的変化

(Pre, 2w, 4w). (Both groups; n=9, *P<0.05, **P<0.01).

B. WT/ANS/Saline と WT/ANS/Immethridine の 4w での心重量/体重比.

(Both groups; n=9, *P<0.05).

C. WT/ANS/Saline と WT/ANS/Immehridine の 4w での心臓における ANP,

BNP の遺伝子発現. (Both groups; n=6, No significance)

D. WT/ANS/Saline と WT/ANS/Immethridine の 4w でのクレアチニンクリアランス. (Both groups; n=5, No significance, P=0.06).

E. WT/ANS/Saline と WT/ANS/Immethridine におけるアルブミン尿の経時的変化(Pre, 2w, 4w) (Both groups; n=5, *P<0.05).

F. WT/ANS/Saline と WT/ANS/Immethridine の 4w での腎臓における NGAL の遺伝子発現. (Both groups; n=6, *P<0.05).

Figure 6

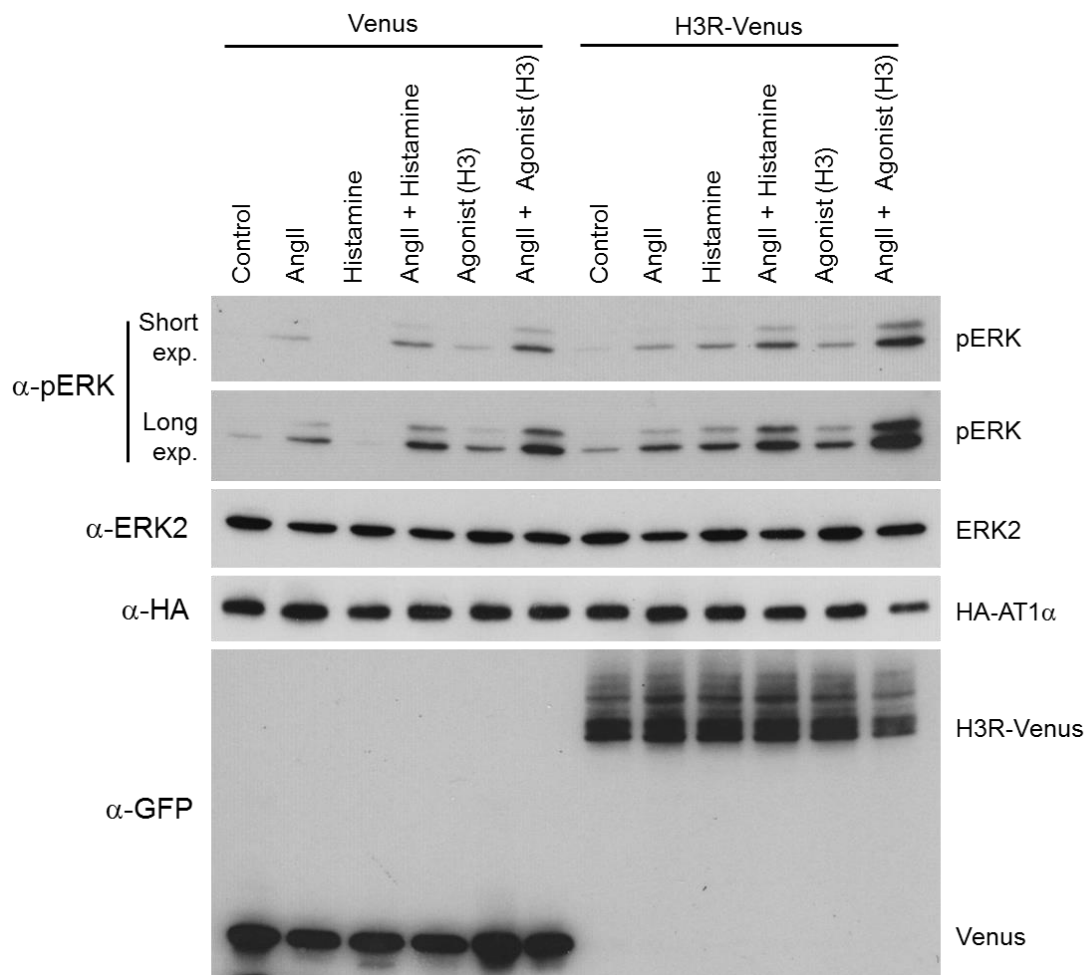


Figure 6. AT1 受容体安定発現 HEK293T 細胞における各種リガンド刺激による ERK リン酸化レベルの変化

H3 受容体を発現していない群（左側）では、AngII/ヒスタミンや AngII/H3 アゴニスト投与でも ERK のリン酸化はほとんど亢進しない。H3 受容体過剰発現群（右側）ではヒスタミン単独添加でも AngII 単独添加とほぼ同じレベルの ERK の活性化を認める。AngII/ヒスタミンの添加では ERK のリン酸化レベル

は両者の相加的な程度にしか上昇しないが、AngII/H3 アゴニストの添加では ERK のリン酸化レベルは相乗効果的に上昇している。

Figure 7

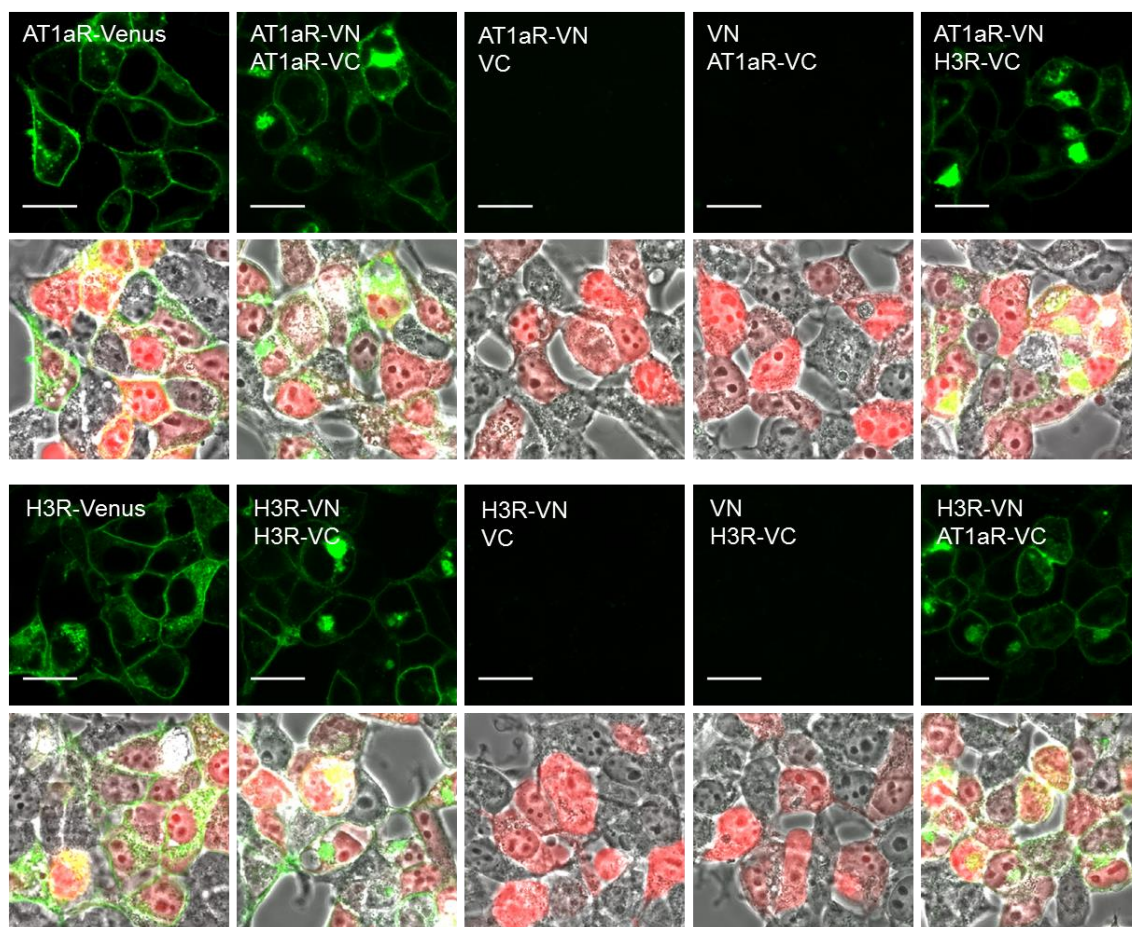


Figure 7. AT1 受容体と H3 受容体を用いた BiFC アッセイ

Full length の Venus 蛋白を組み込んだ AT1 受容体および H3 受容体（もっとも左の列）を発現した HEK293T 細胞は細胞膜および細胞質に蛍光を認める。

対して，Venus の N 末端側または C 末端側の断片を組み込んだ受容体を細胞に発現させ，対となる断片のみを組み込んだベクターをトランスフェクションしても，単独では蛍光を発しない（左 3・4 番目の列）．同一の受容体に

Venus の N 末端側または C 末端側の断片を組み込んだものを共発現させると (左 2 番目の列) , AT1 受容体, H3 受容体ともに細胞は蛍光を発する (つまり, AT1 受容体, H3 受容体はホモダイマーを形成し得る) . 最後に, 異なる受容体に Venus の N 末端側または C 末端側の断片をそれぞれ組み込んだものを共発現させると (右の列) , HEK293T 細胞は細胞膜・細胞質に蛍光を発する. このことより AT1 受容体と H3 受容体は非常に近接して発現, すなわちヘテロダイマーを形成している可能性が高いことがわかる.

なお, 細胞にトランスフェクションされると赤い蛍光を発する mCherry タンパクを同時に共トランスフェクションすることで, トランスフェクション効率を確認するとともに, Venus の緑色の蛍光を確認できなくても, 細胞内にベクターがきちんとトランスフェクションされている証明のポジティブコントロールの代わりとしている (全列下段の赤い蛍光) .

略語一覽

- AQC; Aminoquinolyl carbamile
- BiFC; Bimolecular fluorescence complementation
- BRET; Bioluminescence resonance energy transfer
- Ccr; Creatinine clearance
- CID; collision-induced dissociation
- CKD; Chronic kidney disease
- DA; Dopamine
- DEPC; Diethylpyrocarbonate
- DHBA; Dihydroxybenzylamine
- DMEM; Dulbecco's modified Eagle's medium
- ELISA; Enzyme-linked immunosorbent assay
- EP; Epinephrine
- ERK; Extracellular signal-regulated kinase
- ESKD; End stage kidney disease
- FBS; Fetal bovine serum
- FRET; Fluorescence resonance energy transfer
- GFR; Glomerular filtration rate

- GPCR: G-protein coupling receptor
- HBSS; Hanks balanced salt solution
- HDC; Histidine decarboxylase
- HPLC; High performance liquid chromatography
- HRP; Horseradish peroxidase
- KDIGO; Kidney Disease Improving Global Outcomes
- LC-MS/MS; Liquid chromatography - tandem mass spectrometry
- %LVFS; %Left ventricular fractional shortening
- MALDI-QIT-TOF/MS; Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization -

Quadrupole Ion Trap - Time-of-Flight Mass Spectrometer

- MAPK; Mitogen-activated protein kinase
- MRM; multiple-reaction monitoring
- NE; Norepinephrine
- NGAL; Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
- PLA; Proximity ligation assay
- QOL; Quality of life
- SPF; Specific-pathogen free
- TFA; Trifluoroacetic acid