

<b>11</b>	CKD の治療総論	50
<b>12-1</b>	生活指導・食事指導：成人	52
	コラム⑩ 栄養指導における基準とすべき「体重」をめぐる諸問題	56
<b>12-2</b>	生活指導・食事指導：小児	57
<b>13-1</b>	血圧管理：成人	61
<b>13-2</b>	血圧管理：小児	71
<b>14</b>	糖尿病患者の管理	73
<b>15</b>	脂質管理における注意	76
<b>16</b>	貧血管理	79
<b>17</b>	CKD に伴う骨・ミネラル代謝異常における注意	82
	コラム⑪ CKD 患者のビタミン D 欠乏	83
	コラム⑫ FGF23	83
	コラム⑬ CKD 患者の骨粗鬆症の評価と治療	83
<b>18</b>	CKD における尿酸管理	84
<b>19</b>	高 K 血症, 代謝性アシドーシスの管理	87
	コラム⑭ 偽性高 K 血症	89
<b>20</b>	尿毒症毒素の管理	90
<b>21</b>	造影剤検査の注意点	91
	コラム⑮ ビグアノイドと造影剤	93
<b>22</b>	CKD における薬物治療の注意	94
	付表：腎機能低下時の薬剤投与量	100
	主要式一覧	129
	索引 (事項, 薬剤)	131

CKD 診療ガイド—治療のまとめ	前見返し
eGFR 男女・年齢別早見表	後見返し

# CKD 患者診療のエッセンス 2012

1. CKD (慢性腎臓病) とは, 腎臓の障害 (蛋白尿など), もしくは GFR (糸球体濾過量) 60 mL/分/1.73m<sup>2</sup> 未満の腎機能低下が 3 カ月以上持続するもの, である.
2. 推算 GFR (eGFR) は以下の血清クレアチニンの推算式 (eGFR<sub>creat</sub>) で算出する. るいそうまたは下肢切断者などの筋肉量の極端に少ない場合には血清シスタチン C (eGFR<sub>cys</sub>) の推算式がより適切である.

男性

$$eGFR_{creat}(\text{mL/分/1.73m}^2) = 194 \times Cr^{-1.094} \times \text{年齢}^{-0.287}$$

$$eGFR_{cys}(\text{mL/分/1.73m}^2) = (104 \times Cys - C^{-1.019} \times 0.996^{\text{年齢}}) - 8$$

女性

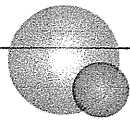
$$eGFR_{creat}(\text{mL/分/1.73m}^2) = 194 \times Cr^{-1.094} \times \text{年齢}^{-0.287} \times 0.739$$

$$eGFR_{cys}(\text{mL/分/1.73m}^2) = (104 \times Cys - C^{-1.019} \times 0.996^{\text{年齢}} \times 0.929) - 8$$

3. CKD の重症度は原因 (Cause : C), 腎機能 (GFR : G), 蛋白尿 (アルブミン尿 : A) による CGA 分類で評価する.
4. CKD は, CVD (心血管疾患) および ESKD (末期腎不全) 発症の重要なリスクファクターである.
5. CKD 患者の診療には, かかりつけ医と腎臓専門医の診療連携が重要である.
6. 以下のいずれかがあれば腎臓専門医へ紹介することが望ましい.
  - 1) 尿蛋白 0.50 g/gCr 以上 または検尿試験紙で尿蛋白 2+ 以上
  - 2) 蛋白尿と血尿がともに陽性 (1+ 以上)
  - 3) 40 歳未満                      GFR 60 mL/分/1.73m<sup>2</sup> 未満  
40 歳以上 70 歳未満          GFR 50 mL/分/1.73m<sup>2</sup> 未満  
70 歳以上                        GFR 40 mL/分/1.73m<sup>2</sup> 未満
7. CKD の治療にあたっては, まず生活習慣の改善 (禁煙, 減塩, 肥満の改善など) を行う.
8. CKD 患者の血圧の管理目標は 130/80 mmHg 以下である.

9. 高齢者においては 140/90 mmHg を目標に降圧し、腎機能悪化や臓器の虚血症状がみられないことを確認し、130/80 mmHg 以下に慎重に降圧する。また、収縮期血圧 110mmHg 未満への降圧を避ける。
10. 糖尿病患者および 0.15g/gCr 以上 (アルブミン尿 30 mg/gCr 以上) の蛋白尿を有する患者において、第一選択の降圧薬は ACE 阻害薬とアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) である。
11. 蛋白尿が 0.15 g/gCr 未満の非糖尿病患者の降圧には、降圧薬の種類を問わない。
12. 高度蛋白尿 (0.50 g/gCr 以上) を呈する若年・中年の患者では、尿蛋白 0.50 g/gCr 未満を目標として RAS 阻害薬を使用して治療する。
13. ACE 阻害薬や ARB 投与時には、血清クレアチニン値の上昇 (eGFR の低下) や高 K 血症に注意する。
14. 糖尿病では血糖を HbA1c6.9% (NGSP) 未満に管理する。
15. CKD では CVD の予防を含めて LDL コレステロールは 120 mg/dL 未満にコントロールする。
16. CKD 患者の貧血では、消化管出血などを除外し、フェリチン 100 ng/mL 以上または TSAT20% 以上で鉄が不足していないことを確認する。
17. 腎性貧血に対する赤血球造血刺激因子製剤 (erythropoiesis stimulating agent: ESA) を使用した治療の目標値は、Hb10~12 g/dL である。
18. CKD ステージ G3a より、血清 P, Ca, PTH, ALP のモニターを行い、基準値内に維持するよう、適切な治療を行う。
19. CKD ステージ G3a より、高 K 血症、代謝性アシドーシスに対する定期的な検査を行う。
20. CKD 患者には腎障害性の薬物投与を避け、腎排泄性の薬剤は腎機能に応じて減量や投与間隔の延長を行う。

※腎機能の評価は 18 歳以上である。



# 小児CKD患者診療のエッセンス2012

1. 日本人小児の酵素法による血清クレアチニン (Cr) の基準値が作成され、これを使用して腎機能異常者の評価が可能である。暫定的ではあるが%表示の eGFR は計算可能であり、例えば2歳以上11歳以下の小児については、
$$eGFR (\%) = (0.3 \times \text{身長 (m)}) / \text{患者の血清 Cr 値} \times 100$$
で表される。
2. 学校検尿において異常が判明した患児の現時点での専門医紹介基準は以下のとおりである。
  1. 早朝尿蛋白および尿蛋白・クレアチニン比 (g/gCr) がそれぞれ
    - 1+程度, 0.2~0.4 g/gCr は, 6~12 カ月程度で紹介
    - 2+程度, 0.5~0.9 g/gCr は, 3~6 カ月程度で紹介
    - 3+程度, 1.0~1.9 g/gCr は, 1~3 カ月程度で紹介ただし, 上記を満たさない場合も含めて, 下記の2~6が出現・判明すれば, 早期に専門医に相談または紹介する。
  2. 肉眼的血尿 (遠心後肉眼的血尿を含む)
  3. 低蛋白血症: 血清アルブミン 3.0 g/dL 未満
  4. 低補体血症
  5. 高血圧 (白衣高血圧は除外する)
  6. 腎機能障害の存在
3. 小児の進行したCKDの多くは先天性腎尿路疾患 (CAKUT) であり学校検尿では発見されにくい。
4. CAKUTの発見には, 乳幼児期のスクリーニングが必須であり, 3歳児検尿はその一端を担っている。
5. CAKUTの場合, 腎機能予後に影響を与える尿路異常 (特に下部尿路異常) の治療は小児泌尿器科医と協力して積極的に行う。
6. 運動制限は, 運動することが患児に何らかの不利益をもたらす場合を除き行わない。「学校検尿のすべて (2012)」のなかに, 小児の生活指導指針が示されている。

7. 小児では原則としてたんぱく質制限を行わない。小児の栄養管理は、栄養が成長に影響することを念頭において行うことが重要である。特に嘔吐などで経口摂取が進まない乳児には、一時的に強制的な経管栄養および胃瘻管理も考慮する。
8. 小児の血圧の基準値は各年齢で異なる。各年齢の90パーセンタイルを超える場合高血圧と判断する。治療介入を要する小児の高血圧は二次性であることが多いため、器質的疾患の存在を考えて精査する。
9. 小児の正確な血圧測定を行うためには、年齢よりも体格に合わせたマンシェットの選択が必要である。
10. 腎機能が正常の1/2 (GFR: 60mL/分/1.73m<sup>2</sup>未滿) となったら、小児腎臓専門医がさまざまな合併症に注意して管理し、将来の腎代替療法を含め患者・家族と生涯のイメージを共有する。
11. 小児科医は、早期から移行 (transition) を意識して介入する必要がある。自律/自立した成人患者となることを目標にフォローアップする。

## 13-1 血圧管理：成人

- CKDにおける降圧の意義は、CKD進行の抑制、およびCVD発症や死亡のリスクの軽減にある。
- 降圧目標は診察室血圧 130/80 mmHg 以下とする。
- 血圧管理は、家庭血圧や 24 時間自由行動下血圧 (ABPM) の測定により血圧日内変動も考慮して行う。
- 特に 65 歳以上の高齢者 CKD では、病態に応じて過剰降圧を回避し、血圧日内変動も考慮したテーラーメイドの降圧療法を行う。
- 降圧療法では、まず生活習慣の改善、特に減塩 (3 g/日以上 6 g/日未満) が重要である。
- 糖尿病合併 CKD 患者、および軽度以上の蛋白尿 (尿蛋白量 0.15 g/gCr 以上) を呈する糖尿病非合併 CKD 患者では、降圧薬は RAS 阻害薬 (ARB, ACE 阻害薬) を第一選択薬とする。
- 正常蛋白尿 (尿蛋白量 0.15 g/gCr 未満) の糖尿病非合併 CKD 患者では、降圧薬の種類を問わないので、患者の病態に合わせて降圧薬を選択する。
- RAS 阻害薬、利尿薬の投与開始後は eGFR, 血清 K をモニタリングする。その際 eGFR については、投与開始 3 カ月後までの時点で前値の 30%未満の低下は、薬理効果としてそのまま投与を継続してよい。
- 一方、eGFR の 30%以上の低下がみられる場合、血清 K が 5.5 mEq/L 以上に上昇する場合には該当の降圧薬を減量あるいは中止して腎臓・高血圧専門医にコンサルトする。また、特に高齢者では原則として収縮期血圧 110 mmHg 未満への過剰降圧がみられる場合には、該当の降圧薬を減量あるいは中止して経過を観察する。
- 降圧薬を服用中の患者で、食事摂取ができない、嘔吐している、下痢をしている、あるいは発熱など脱水になる危険があるときには、急性腎障害 (AKI) 予防の観点から、これらの降圧薬を中止して速やかに受診するように患者に指導する。

### 1. CKD における降圧の意義

- 高血圧は CKD の原因となり、既存の CKD を悪化させる。逆に、CKD は高血圧の原因となり、既存の高血圧を悪化させる。このように高血圧と CKD は悪循環を形成する。
- CKD における降圧の第 1 の意義は、CKD の進行を抑制し、ESKD (末期腎不全) への進展を防止あるいは遅延させることである。
- CKD における降圧の第 2 の意義は、心腎連関による CVD (心血管疾患) の発症・進展を抑制することである。
- 高血圧は CVD の強力な危険因子であるため、

降圧療法は直接 CVD の発症・進展抑制に寄与する。

### 2. CKD における降圧目標

- メタ解析では診察室血圧にて 130/80 mmHg 程度までは到達した血圧値が低いほど GFR の低下速度が遅くなることが示されている (図 30)。
- 日本人の高リスク高血圧患者を対象とした介入研究のサブ解析では、CKD 患者 (尿蛋白定性 1+ 以上、あるいは血清クレアチニン > 1.3 mg/dL) においては試験期間中のすべての収縮期血圧帯で CKD 合併高血圧患者のほうが CKD

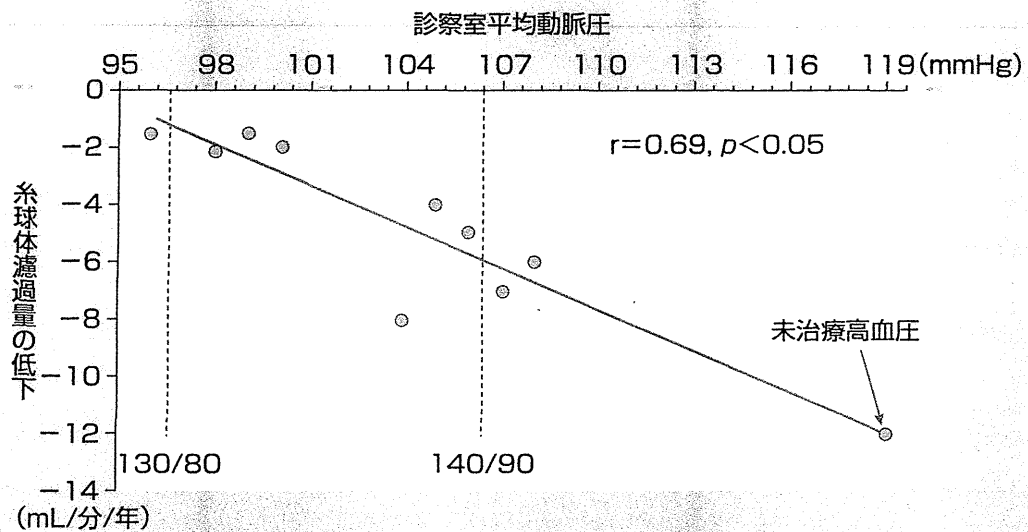


図 30 GFR の低下速度と到達した診察室血圧値の関係 (メタ解析)

高血圧患者を対象とした臨床試験, ならびに未治療高血圧患者における平均動脈圧と GFR 変化量との関係における相関性を示している。

(Bakris GL, et al. Am J Kidney Dis 2000 ; 36 : 646-661. より引用, 改変)

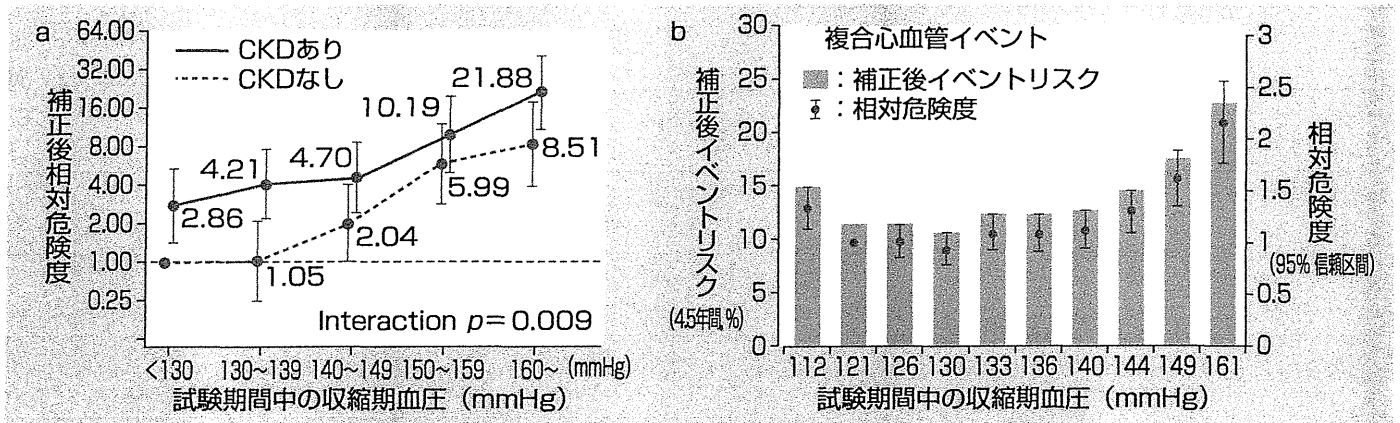


図 31 診察室血圧のコントロール別の CVD 発症リスク

(a) Ogihara T, et al. Hypertens Res 2009 ; 32 : 248-254. (b) Sleight P, et al. J Hypertens 2009 ; 27 : 1360-1369. より引用, 改変

非合併高血圧患者よりも CVD 発症のリスクが高く (図 31a), 海外の CVD 高リスク患者を対象とした介入研究のサブ解析では降圧後の収縮期血圧 130 mmHg 近辺が CVD 発症のリスクが最も低かった (図 31b)。

- アフリカ系米国人の腎硬化症患者を対象とした介入研究においては, 蛋白尿合併症例 (尿蛋白/クレアチニン比 >0.22 g/gCr, 尿蛋白量 >

0.30 g/日に相当) では厳格降圧群 (目標平均動脈圧 92 mmHg 未満 (125/75 mmHg 未満に相当)) のほうが緩徐降圧群 (目標平均動脈圧 107 mmHg 未満 (140/90 mmHg 未満に相当)) よりも CKD の進行抑制が認められた。しかし, 蛋白尿非合併例では厳格降圧群と緩徐降圧群は同等であった。

- この研究を含めて, 糖尿病非合併 CKD 患者を

対象とした3つの介入研究を合わせたメタ解析では、蛋白尿の影響も含めたCKDの進行抑制について、厳格降圧群(目標血圧125~130/75~80 mmHg未滿)の緩徐降圧群(目標血圧140/90 mmHg未滿)に対する優位性は認められなかった。

- よってCKDにおいて診察室血圧は、糖尿病合併CKD患者および糖尿病非合併CKD患者の両者において、130/80 mmHg以下を降圧目標とする。
- ただし、高齢者CKDにおける降圧療法のエビデンスは十分でなく、高齢者CKDにおける最終的な降圧目標も130/80 mmHg以下とするが、特に高齢者においては後述のようにCKDにおける動脈硬化性腎動脈狭窄症合併が高率であることが報告されており、暫定目標血圧、降圧速度の面から細心の注意が必要である。
- 過度の降圧は腎機能を悪化させる可能性があり、特に65歳以上の高齢者では診察室血圧にて収縮期血圧110 mmHg未滿への降圧は避ける。
- ただし、高度蛋白尿(尿蛋白量0.50 g/gCr以上)を呈することが多い腎炎の若年・中年の患者では、尿蛋白量を指標として、RAS阻害薬を第一選択薬とした降圧治療を行う。そして、正常蛋白尿~軽度蛋白尿(尿蛋白量0.50 g/gCr未滿)を目標として、注意深くRAS阻害薬を増量していく際には、必ずしも収縮期血圧110 mmHg未滿を避ける必要はない。

### 3. 降圧の速度

- CKDにとって厳格な降圧は必要ではあるが、2~3カ月かけて経過を観察しながら、降圧目標値を達成するよう緩徐な降圧治療を計画しなければならない。
- 脳梗塞や狭心症・心筋梗塞などのCVDをすでに合併している患者では、過度の降圧によりCVDを増悪させ、かえって死亡率が高まることも懸念される。

- 特に高齢者では急激な降圧は腎機能を悪化させる危険がある。高齢者ではCKD患者の5~22%が動脈硬化性腎動脈狭窄症を合併すると報告されている。
- また、高齢者では動脈硬化性腎動脈狭窄症の可能性もあるために、RAS阻害薬の初期量は少量から開始し、4週間~3カ月の間隔で時間をかけて増量する。そして高齢者のCKD患者では蛋白尿の程度にかかわらず140/90 mmHgを暫定目標血圧として、腎機能の悪化や臓器の虚血症状がみられないことを確認後に最終降圧目標を130/80 mmHg以下として慎重に降圧する。

### 4. 血圧日内変動評価の重要性

- 夜間高血圧や早朝高血圧などの血圧日内変動の異常は、CKDを悪化させる危険因子である。その診断には、家庭血圧あるいは24時間自由行動下血圧(ABPM)の測定が重要である。また、逆に、CKDは血圧日内変動の異常の原因となる。このように高血圧における血圧日内変動の異常とCKDは悪循環を形成する。特にCKD患者に多くみられる夜間高血圧はCKD進行のみならずCVDのリスクを増加させる。
- 患者には朝晩の2回の家庭血圧を測定して記録し、来院時に持参してもらう。朝の家庭血圧は起床後1時間以内、排尿後、座位1~2分の安静後、服薬前、朝食前とする。また、晩の家庭血圧は就床前、座位1~2分の安静後とする。測定回数はそれぞれ1~3回とする。そして診察室血圧と家庭血圧、さらには可能であればABPMを参考に、血圧日内変動を把握して、降圧薬の服用時間の調整を含めた、血圧の管理および治療の計画を立てる。
- 睡眠時無呼吸症候群(sleep apnea syndrome : SAS)の患者では夜間高血圧、早朝高血圧を呈する頻度が高いことが報告されており、SASのスクリーニングと治療もCKDにおける血圧日内変動改善のために重要である。



## 5. 生活習慣の改善と減塩

- 高血圧治療では、生活習慣の改善が必要である(表 24)。
- 減塩は特に重要である。1 日食塩摂取量を 3 g/日以上 6 g/日未満にするように指導する。減塩により RAS 阻害薬の降圧効果が増強される。
- 高齢者における過度な塩分制限は食欲を低下させ、脱水から腎機能を悪化させることがある。
- 食塩制限が困難なときには利尿薬を少量から併用してもよい。サイアザイド系利尿薬 (CKD ステージ G1~G3) や長時間作用型ループ利尿薬 (CKD ステージ G4~G5) を併用することで、食塩排泄を促進できる。しかし、腎機能低下、低 K 血症や高尿酸血症、糖・脂質代謝異常、脱水に対する注意が必要である。

## 6. RAS 阻害薬の腎保護効果

- RAS 阻害薬は他のクラスの降圧薬に比較して尿蛋白減少効果に優れており、RAS 阻害薬による腎保護効果は糸球体高血圧の程度が強いほど、つまり尿蛋白・アルブミン排泄量が多いほど期待できる。
- 日本人の高リスク高血圧患者を対象とした介入研究のサブ解析でも、CKD 患者のうちステージ G4 かつ尿蛋白定性 1+以上の患者群においてのみ、RAS 阻害薬投与群のほうが Ca 拮抗薬投与群よりも CVD 発症が少なかった。
- 尿蛋白量の評価にあたっては、アルブミン定量精密測定 (尿中アルブミン/尿中クレアチニン比, mg/gCr) についての現行の保険適用は、糖尿病患者に対して、「糖尿病または早期糖尿病性腎症患者であって微量アルブミン尿を疑うもの (糖尿病性腎症第 1 期または第 2 期のものに限る) に対して行った場合に、3 カ月に 1 回に限り算定できる」とされている。したがって、糖尿病合併 CKD での糖尿病性腎症第 3 期 A (顕性腎症前期) 以降および糖尿病非合併 CKD で

表 24 生活習慣の修正項目

1. 減塩	3 g/日以上 6 g/日未満
2. 食塩以外の栄養素	野菜・果物の積極的摂取* コレステロールや飽和脂肪酸の摂取を控える 魚 (魚油) の積極的摂取
3. 減量	BMI [体重 (kg) ÷ 身長 (m) <sup>2</sup> ] が 25 未満
4. 運動	心血管疾患 (CVD) のない高血圧患者が対象で、中等度の強度の有酸素運動を中心に定期的に (毎日 30 分以上を目標に) 行う
5. 節酒	エタノールで男性 20~30 mL/日以下、女性 10~20 mL/日以下
6. 禁煙	

生活習慣の複合的な修正はより効果的である。

\*重篤な腎障害を伴う患者では高 K 血症をきたすリスクがあるので、野菜・果物の積極的摂取は推奨しない。

糖分の多い果物の過剰な摂取は、特に肥満者や糖尿病などのカロリー制限が必要な患者では勧められない。

(日本高血圧学会編。生活習慣の修正。高血圧治療ガイドライン 2009: 31-36. より引用, 改変)

は、尿蛋白定量 (尿蛋白/Cr 比, g/gCr) を行う。

- 2 型糖尿病では、介入研究において腎症前期 (I 期) の正常アルブミン尿患者に対する RAS 阻害薬投与が早期腎症 (微量アルブミン尿) への進展を抑制することも報告された (図 32)。したがって糖尿病合併 CKD では、アルブミン尿の有無にかかわらず RAS 阻害薬を第一選択薬とする。
- ただし、アルブミン尿・蛋白尿が認められない、高齢の CKD ステージ G3a 以降の糖尿病合併 CKD 患者では、RAS 阻害薬投与により腎機能障害が増悪することがあるので注意する。
- 2 型糖尿病では高血圧がなくとも、RAS 阻害薬を使用することで腎症進展抑制効果が得られる可能性があるが、一般に 130/80 mmHg 未満の

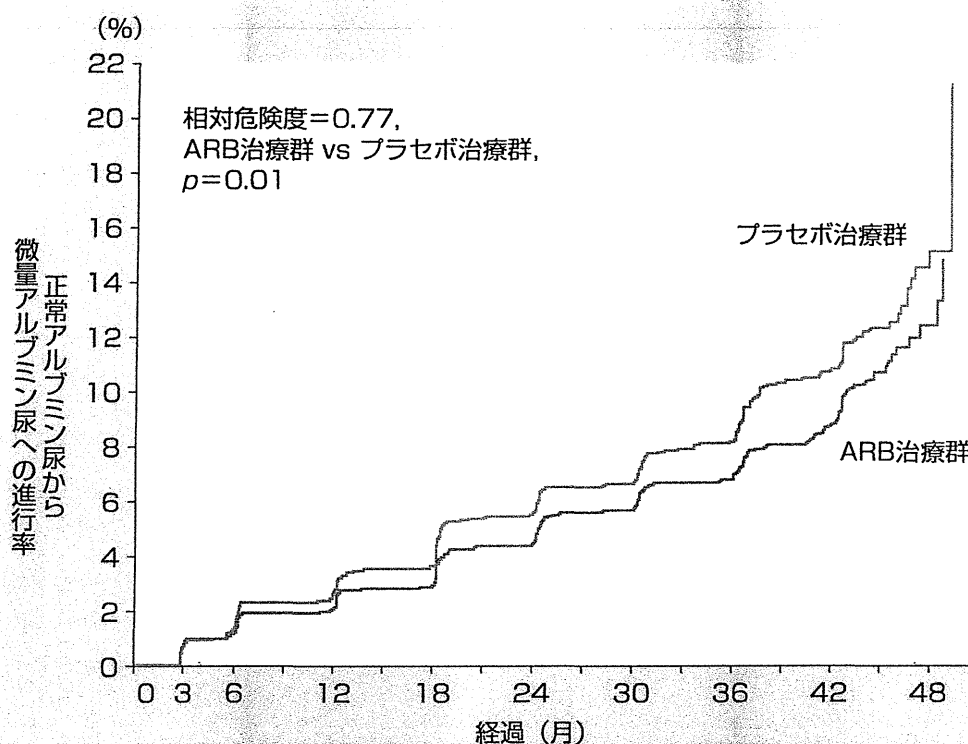


図 32 RAS 阻害薬は糖尿病性早期腎症への進行を抑制する

(Haller H, et al. N Engl J Med 2011 ; 364 : 907-917. より引用, 改変)

正常血圧では保険診療として認められていない。

- 一方、糖尿病非合併 CKD では、ある程度の蛋白尿を認める場合に、RAS 阻害薬による腎保護効果が期待される (図 33)。したがって、軽度以上の蛋白尿 (尿蛋白量 0.15 g/gCr 以上) 合併高血圧症例では、RAS 阻害薬を第一選択薬として積極的に使用すべきである。

## 7. 降圧目標を達成するための降圧療法と併用療法

- 厳格な降圧を達成するために 3～5 剤の降圧薬の併用が必要な場合がある。
- CKD における降圧薬は、前述のように、糖尿病合併 CKD 患者においては、アルブミン尿の有無にかかわらず、RAS 阻害薬を第一選択薬とする。一方、糖尿病非合併 CKD 患者においては軽度以上の蛋白尿 (尿蛋白/クレアチニン比 0.15 g/gCr 以上) を認める場合に RAS 阻害薬を第一選択薬とする (図 34)。
- 正常蛋白尿 (尿蛋白量 0.15 g/gCr 未満) の糖尿病非合併 CKD 患者においては、RAS 阻害薬の優位性は証明されておらず、降圧薬の種類を問わないので、患者の病態に合わせて降圧薬を選択する (図 34)。
- 第一選択薬を使用し、降圧目標が達成できないときには併用療法が必要である。例えば RAS 阻害薬を第一選択薬として降圧目標が達成できないときには、第二選択薬として長時間作用型 Ca 拮抗薬、サイアザイド系利尿薬 (CKD ステージ G1～G3)、長時間作用型ループ利尿薬 (CKD ステージ G4～G5) による併用療法を考慮する (図 34)。
- 血圧の季節による変動にも注意し、夏季の過剰降圧、冬季の降圧不良がないように、降圧薬の

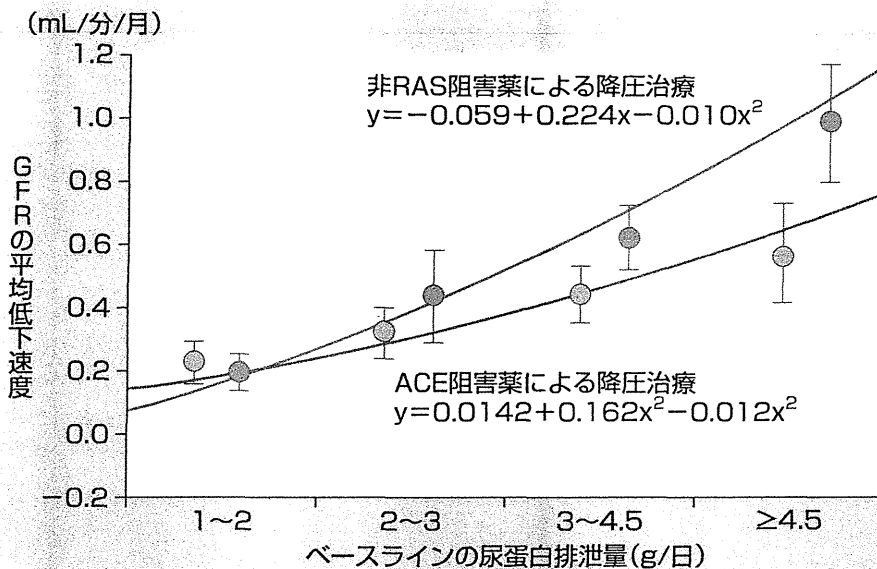


図 33 糖尿病非合併 CKD 患者における RAS 阻害薬の効果はベースラインの尿蛋白量に依存する

尿蛋白 1 g/日以上を有する糖尿病非合併 CKD 患者を対象とした研究において、ベースラインの尿蛋白量の程度と降圧薬の種類による GFR の低下速度を比較した。

図中の 2 つの方程式は、ベースラインの尿蛋白量の程度ごとに各降圧薬群（青丸は ACE 阻害薬、赤丸は非 RAS 阻害薬を示す）別の GFR 低下速度をプロットし、それらをつないだ曲線を表している。

(Ruggenenti P, et al. Nat Rev Nephrol 2009 ; 5 : 436-437. より改変, 引用)

調整を行うことも必要である。

### 1) 長時間作用型 Ca 拮抗薬

長時間作用型 Ca 拮抗薬は、動脈硬化が進行して血圧変動の大きい CVD ハイリスク症例や、Ⅲ度高血圧（第一選択薬投与前および第一選択薬投与開始後において収縮期血圧 180 mmHg 以上、あるいは拡張期血圧 110 mmHg 以上）症例に推奨される。長時間作用型 Ca 拮抗薬の併用により、eGFR を低下させることなく厳格な降圧と血圧変動の抑制が可能となる。一部の L 型 Ca チャンネル阻害作用に加えて N 型や T 型 Ca チャンネル阻害作用なども併せもつ長時間作用型 Ca 拮抗薬では、尿蛋白減少作用が認められることが報告されている。

### 2) サイアザイド系利尿薬 (CKD ステージ G1~G3), 長時間作用型ループ利尿薬 (CKD ステージ G4~G5)

サイアザイド系利尿薬は、浮腫を呈するなど体

液過剰の症例に推奨される。CKD ステージ G1~G3 におけるサイアザイド系利尿薬の併用は、尿蛋白減少効果を増強する。ただし、併用する場合には eGFR の低下に十分注意する必要がある。CKD ステージ G4~G5 において長時間作用型ループ利尿薬併用時には、効果不十分な場合には長時間作用型ループ利尿薬とサイアザイド系利尿薬の両者の併用も認められるが、eGFR の低下や低 K 血症には十分注意する必要がある。

### 3) ARB と ACE 阻害薬の併用

顕性アルブミン尿・高度蛋白尿症例において ARB と ACE 阻害薬が併用される場合があり、尿中アルブミン・尿蛋白減少効果に優れることが報告されている。しかし、併用する場合には eGFR の低下や、血清 K 上昇、および過剰降圧に十分注意する必要がある。両者の併用投与は原則として腎臓・高血圧専門医によってなされるべきである。

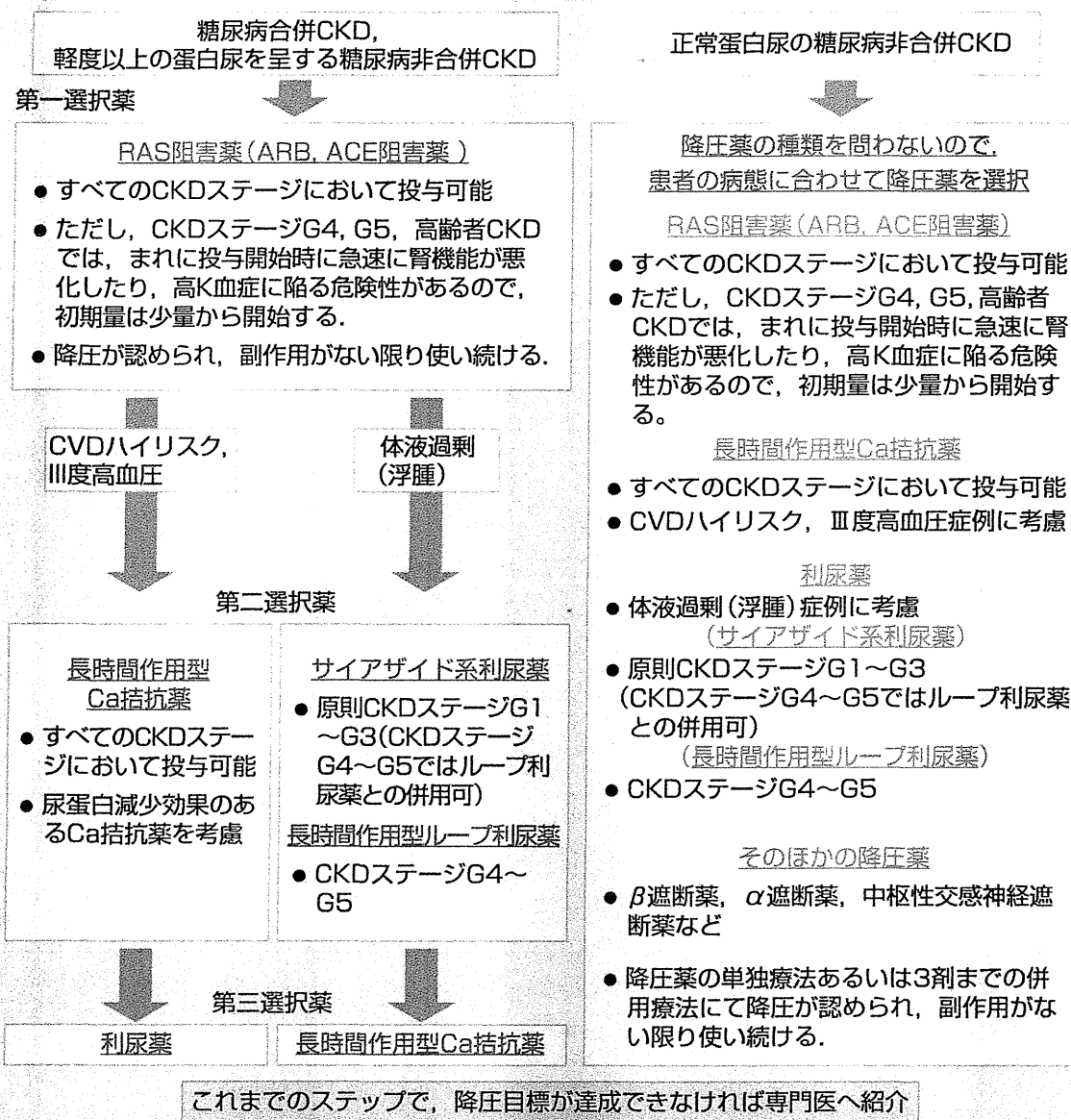


図 34 CKD 合併高血圧に対する降圧薬の選択

## 4) アルドステロン拮抗薬

尿蛋白量が多い症例でアルドステロン拮抗薬が併用される場合があるが, 併用する場合には特に高K血症の危険性が増加する. そのために併用投与がなされる場合には, 腎臓・高血圧専門医によって, きわめて慎重になされるべきである.

## 5) 直接的レニン阻害薬 (DRI), および DRI と他

の RAS 阻害薬 (ARB, ACE 阻害薬) との併用  
DRI は腎血流量増加作用があり, eGFR を低下させることなく尿蛋白減少効果に優れていることが報告されているが, 他の RAS 阻害薬 (ARB, ACE 阻害薬) と異なり CKD 合併高血圧におけるエビデンスはまだ不十分であり, 投与する場合に

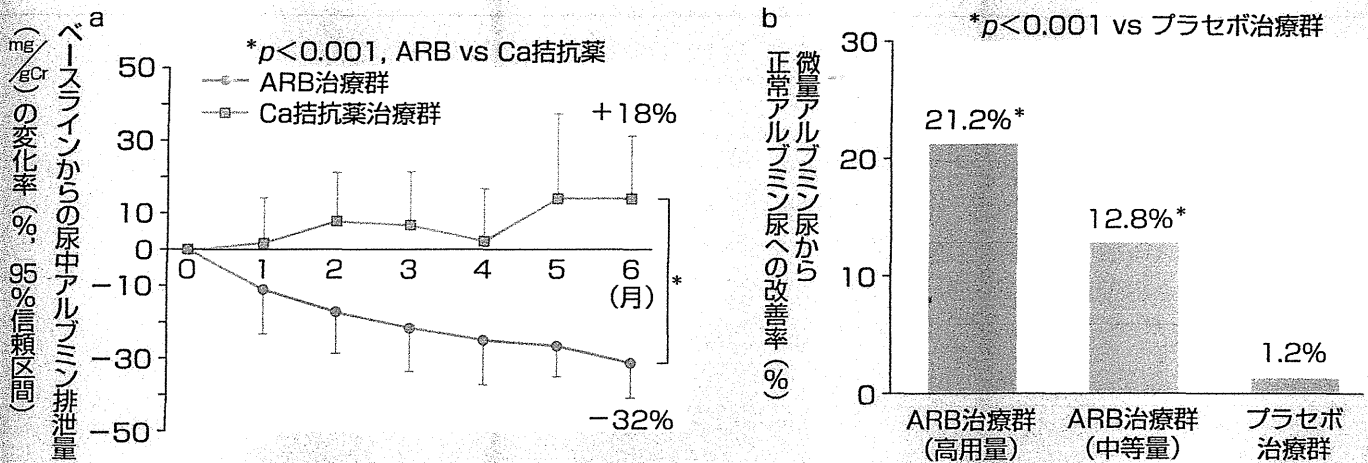


図 35 RAS 阻害薬は糖尿病性早期腎症を改善する

(a) Shiga Microalbuminuria Reduction Trial (SMART) Group. Diabetes Care 2007 ; 30 : 1581-1583. より引用  
 (b) Makino H, et al. Diabetes Care 2007 ; 30 : 1577-1578. より作図

は eGFR 低下, 血清 K 上昇, および過剰降圧に注意する必要がある。また, 糖尿病合併およびステージ G3a 以降 (eGFR 60 mL/分/1.73 m<sup>2</sup> 未満) の CKD 患者においては, DRI と他の RAS 阻害薬 (ARB, ACE 阻害薬) の併用を避けることを推奨する。

#### 6) そのほかの降圧薬

$\beta$  遮断薬,  $\alpha$  遮断薬, 中枢性交感神経遮断薬などは, CKD におけるエビデンスはない。しかし, これらの降圧薬も降圧による CKD 進行抑制効果は期待できる。

### 8. 尿蛋白減少と eGFR 維持による CKD 進行抑制と CVD 発症予防の効果

- 蛋白尿・アルブミン尿の増加と eGFR の低下は腎機能障害進行の重要な予測因子である。
- 一般住民や CKD 患者を対象としたコホート研究のメタ解析の結果では, 尿蛋白量と eGFR の両者が CKD 進行や CVD 発症と死亡に関連していることが示されている。また, 高齢高血圧患者を対象とした本邦での介入試験のサブ解析で

も, 蛋白尿と eGFR 低下の両者が独立して CVD と関連していることが示されている。

- 現在までの介入試験やコホート試験の結果からは, CKD における降圧療法においては, 持続的に蛋白尿・アルブミン尿を減少させるとともに, eGFR 低下を最小限にとどめることが, CKD 進行抑制と CVD 発症予防のために重要であると考えられる。
- 特に糖尿病合併 CKD では正常アルブミン尿への改善は CVD 発症予防につながる事が報告されており, RAS 阻害薬は, ほかの降圧薬に比して蛋白尿・アルブミン尿減少効果に優れている。RAS 阻害薬治療による CKD の進行抑制は, 蛋白尿・アルブミン尿減少効果と密接に関連している。日本人の微量アルブミン尿を呈する 2 型糖尿病合併高血圧患者を対象とした介入研究においても, RAS 阻害薬によるアルブミン尿減少効果, 微量アルブミン尿から顕性アルブミン尿への進行抑制効果, および微量アルブミン尿から正常アルブミン尿への改善効果が示されている (図 35)。
- RAS 阻害薬により蛋白尿・アルブミン尿を改善

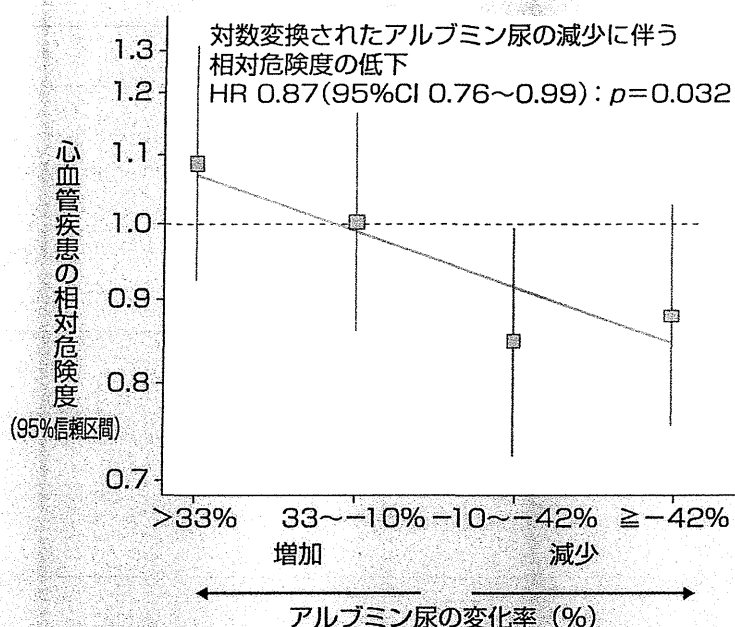


図 36 糖尿病性腎症患者への RAS 阻害薬投与によるアルブミン尿減少効果 (6 カ月後) は独立して CVD 抑制効果に関与する (Holtkamp FA, et al. Eur Heart J 2011; 32: 1493-1499. より引用, 改変)

することで, CVD 発症を減らすことができることも報告されている (図 36)。

- 就寝前の降圧薬の服用は, CVD 発症を約 70% 抑制するという報告がある。これには, 特に夜間血圧の降圧による血圧日内変動の改善とそれに伴う尿蛋白減少の関与が考えられる。
- 服用時間の調整を行っても蛋白尿・アルブミン尿の減少が十分でない場合には, 低血圧や腎機能低下などの副作用に注意しながら, 最大投与量までの RAS 阻害薬の増量を考慮する。ただし, eGFR の低下, 血清 K の上昇, および過剰降圧に十分注意する必要がある。特に, ACE 阻害薬は腎排泄性のものが多く, 増量時には体内蓄積による副作用 (腎機能低下, 高 K 血症, 貧血) に注意する。

## 9. 降圧薬投与時の注意事項

- CKD 患者に RAS 阻害薬, 利尿薬を投与すると,

過剰降圧, eGFR の低下, あるいは血清 K の上昇 (利尿薬単独投与時あるいは複数の利尿薬併用時には血清 K の低下) がみられることがある。したがって, 家庭血圧測定を推奨するとともに, RAS 阻害薬, 利尿薬の開始後は診察室血圧, eGFR や血清 K を 2 週間~1 カ月以内に測定し, その後もモニタリングする。しかし, 投与開始 3 カ月後の時点までの前値の 30% 未満の eGFR 低下は, 薬理効果としてそのまま投与を継続してよい (例: eGFR 60 mL/分/1.73 m<sup>2</sup> の患者なら, 治療後 eGFR 43 mL/分/1.73 m<sup>2</sup> までの低下を許容範囲と考える) (図 37)。

- CKD ステージ G4~G5 では, RAS 阻害薬の初期量は少量から慎重に開始する。また, 高齢者 CKD においても, RAS 阻害薬の初期量は少量から開始し, 4 週間~3 カ月の間隔で増量する。
- eGFR が前値の 30% 以上低下した場合, 血清 K が 5.5 mEq/L 以上に上昇した場合には, 薬剤

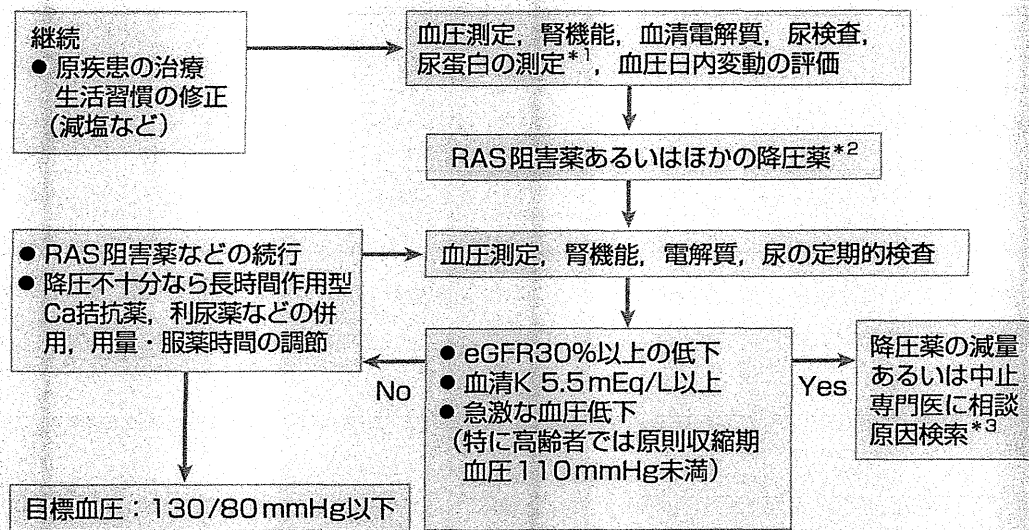


図 37 慢性腎臓病（CKD）を合併する高血圧の治療計画

\*1アルブミン定量精密測定（尿中アルブミン/尿中クレアチニン，mg/gCr）は糖尿病または早期糖尿病性腎症患者であって微量アルブミン尿を疑うもの（糖尿病性腎症第1期または第2期のものに限る）に対して行った場合に、3カ月に1回に限り算定できる。したがって、糖尿病合併CKDの糖尿病性腎症第3期A（顕性腎症前期）以降および糖尿病非合併CKDでは、尿蛋白定量（尿蛋白/尿中クレアチニン比，g/gCr）を行う。

\*2糖尿病合併CKD患者、軽度以上の蛋白尿（0.15 g/gCr以上）を呈する糖尿病非合併CKD患者ではRAS阻害薬を第一選択薬とする。一方、正常蛋白尿（0.15 g/gCr未満）の糖尿病非合併CKD患者では、降圧薬の種類を問わないので、患者の病態に合わせて降圧薬を選択する。CKDステージG4～G5、高齢者CKDではRAS阻害薬は少量から開始し、特に高齢者CKDでは4週間～3カ月の間隔で時間をかけて増量する。

\*3原因：腎動脈狭窄，NSAIDs，心不全，脱水，尿路異常など。

を減量するか中止して、腎臓・高血圧専門医にコンサルトする。また、特に高齢者では投与後2週間～1カ月以内に原則として収縮期血圧110 mmHg未満への過剰降圧がみられた場合には該当の薬剤を減量するか中止して経過を観察する（図37）。

●RAS阻害薬あるいは利尿薬投与中におけるeGFRの過度な低下の原因には、

- 1) 動脈硬化性腎動脈狭窄症（特に両側性）
- 2) 非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)やシクロスポリン投与
- 3) 心不全
- 4) 脱水（特に高齢者では夏場や下痢，食思不振時）

5) 尿路異常（特に水腎症）などなどがある。これらの可能性のあるときには、慎重に投与するか投与を控える。

●降圧薬を服用中の患者で、食事摂取ができない、嘔吐している、下痢をしている、あるいは発熱など脱水になる危険があるときには、急性腎障害（acute kidney injury：AKI）予防の観点から、これらの降圧薬を中止して速やかに受診するように患者に指導する。

●特に高齢者では上記に加えて夏場の脱水に注意が必要である。また、他院で腰痛などのためにNSAIDsを投与されていることもある。そのような薬剤を投与されていないかを確認する。



# Upstream Stimulatory Factors 1 and 2 Mediate the Transcription of Angiotensin II Binding and Inhibitory Protein\*

Received for publication, January 7, 2013, and in revised form, April 30, 2013. Published, JBC Papers in Press, May 7, 2013, DOI 10.1074/jbc.M113.451054

Miyuki Matsuda<sup>‡</sup>, Kouichi Tamura<sup>‡1</sup>, Hiromichi Wakui<sup>‡</sup>, Akinobu Maeda<sup>‡</sup>, Masato Ohsawa<sup>‡</sup>, Tomohiko Kanaoka<sup>‡</sup>, Kengo Azushima<sup>‡</sup>, Kazushi Uneda<sup>‡</sup>, Sona Haku<sup>‡</sup>, Yuko Tsurumi-Ikeya<sup>‡</sup>, Yoshiyuki Toya<sup>‡</sup>, Yohei Maeshima<sup>§</sup>, Akio Yamashita<sup>¶</sup>, and Satoshi Umemura<sup>‡</sup>

From the <sup>‡</sup>Department of Medical Science and Cardiorenal Medicine, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama 236-0004, the <sup>§</sup>Department of Medicine and Clinical Science, Okayama University Graduate School of Medicine Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, 700-8558, and the <sup>¶</sup>Department of Molecular Biology, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama 236-0004, Japan

**Background:** Regulation of angiotensin II type 1 receptor-interacting and inhibitory protein (ATRAP/Agtrap) is important in pathophysiology.

**Results:** Gene knockdown in cells and unilateral ureteral obstruction in mice indicate that *Usf1* decreases and *Usf2* increases *Agtrap* expression.

**Conclusion:** Interplay between E-box and *Usf1/Usf2* is important for *Agtrap* regulation.

**Significance:** A strategy of modulating the E-box-*Usf1/Usf2* interaction may have novel therapeutic potential.

The angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-associated protein (ATRAP/Agtrap) promotes constitutive internalization of the AT1R so as to specifically inhibit the pathological activation of its downstream signaling yet preserve the base-line physiological signaling activity of the AT1R. Thus, tissue-specific regulation of *Agtrap* expression is relevant to the pathophysiology of cardiovascular and renal disease. However, the regulatory mechanism of *Agtrap* gene expression has not yet been fully elucidated. In this study, we show that the proximal promoter region from –150 to +72 of the mouse *Agtrap* promoter, which contains the X-box, E-box, and GC-box consensus motifs, is able to elicit substantial transcription of the *Agtrap* gene. Among these binding motifs, we showed that the E-box specifically binds upstream stimulatory factor (Usf) 1 and *Usf2*, which are known E-box-binding transcription factors. It is indicated that the E-box-*Usf1/Usf2* binding regulates *Agtrap* expression because of the following: 1) mutation of the E-box to prevent *Usf1/Usf2* binding reduces *Agtrap* promoter activity; 2) knockdown of *Usf1* or *Usf2* affects both endogenous *Agtrap* mRNA and *Agtrap* protein expression, and 3) the decrease in *Agtrap* mRNA expression in the afflicted kidney by unilateral ureteral obstruction is accompanied by changes in *Usf1* and *Usf2* mRNA. Furthermore, the results of siRNA transfection in mouse distal convoluted tubule cells and those of unilateral ureteral obstruction in the afflicted mouse kidney suggest that *Usf1* decreases but *Usf2* increases the *Agtrap* gene expression by binding to the E-box. The results also demonstrate a functional E-box-USF1/USF2 interaction in the human *AGTRAP* promoter, thereby

suggesting that a strategy of modulating the E-box-USF1/USF2 binding has novel therapeutic potential.

Evidence has been accumulating that the activation of angiotensin II (Ang II)<sup>2</sup> type 1 receptor (AT1R) through the tissue renin-angiotensin system plays a pivotal role in the pathogenesis of cardiovascular remodeling and renal injury (1, 2). The intrarenal activation of AT1R has also been proposed to play a role in the regulation of sodium and water reabsorption through constriction of the glomerular arteries, hence a direct effect on renal tubular transport function, and to evoke excessive sodium retention, resulting in hypertension, when thus inappropriately stimulated (3, 4). The C-terminal portion of the AT1R is involved in the control of AT1R internalization independent of G protein coupling, and it plays an important role in linking receptor-mediated signal transduction with the specific biological response to Ang II (5, 6). The AT1R-associated protein (ATRAP/Agtrap) was identified as an interacting molecule with the C-terminal domain of AT1R (7, 8), and previous *in vitro* and *in vivo* studies showed that *Agtrap* promotes constitutive internalization of the AT1R so as to specifically inhibit the pathological activation of its downstream signaling and yet preserve base-line physiological signaling activity (2, 9–17).

Although *Agtrap* is abundantly expressed in the renal nephron tubules, it is also widely expressed in many other cell types and tissues in addition to the kidney. Thus, it is important to elucidate the molecular mechanism of the cell type- and tissue-specific regulation of *Agtrap* gene expression to determine the regulatory machinery for the tissue *Agtrap* level and/or

\* This work was supported in part by a Health and Labor Sciences Research grant, the Japanese Ministry of Education, Science, Sports and Culture, the Salt Science Research Foundation Grant 1134, the Kidney Foundation, Japan, Grant JKFB13-17, and the Novartis Foundation for Gerontological Research (2012).

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 81-45-787-2635; Fax: 81-45-701-3738; E-mail: tamukou@med.yokohama-cu.ac.jp.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: Ang II, angiotensin II; AT1R, angiotensin II type 1 receptor; ATRAP/Agtrap, angiotensin II type 1 receptor-associated protein; mDCT, mouse distal convoluted tubule; USF/Usf, upstream stimulatory factor; UUU, unilateral ureteral obstruction; ODN, oligonucleotide.



## USF1 and USF-2 Regulate Ang II Receptor Interacting Protein

Agtrap activity under both physiological and pathological conditions. The balance of the endogenous expression of Agtrap and AT1R in local tissues is important for the regulation of tissue AT1R signaling. Down-regulation of Agtrap and/or up-regulation of AT1R at local tissue sites together with the resultant pathological activation of the tissue renin-angiotensin system are pathogenetic mechanisms that may be responsible for cardiovascular and renal disease. For example, in Ang II-infused mice and genetically hypertensive rats, the development of hypertension and organ injury, such as cardiac hypertrophy and renal fibrosis, was reportedly accompanied by a decrease in the tissue Agtrap expression without altered AT1R expression (2, 15–19). In addition, we previously showed that serum starvation stimulates *Agtrap* gene expression in mouse distal convoluted tubule cells (mDCT cells) and that Runx3, one of the Runt-related transcription factors, is involved in the transcriptional activation of *Agtrap* gene expression (20). However, the regulatory mechanism of *Agtrap* gene expression in relation to organ injury needs further investigation to elucidate the relationship of the regulation of Agtrap expression with the pathophysiology of cardiovascular and renal disease at the molecular level.

The transcription factors upstream stimulatory factor (USF/Usf) 1 and USF2/Usf2 were originally identified in HeLa cells by biochemical analysis (21, 22). The human cDNA cloning of Usf1 and Usf2 revealed that the Usfs belong to the c-Myc-related family of DNA-binding proteins, which have a helix-loop-helix motif and a leucine repeat, and that USF interacts with its target DNA as a dimer (23). Previous examination of the tissue and cell type distribution of Usf1 and Usf2 revealed that although both are ubiquitously expressed, different ratios of USF homo- and heterodimers are found in different tissues and cell types (24). The results of mouse Usf1 cDNA cloning showed a high level of sequence homology between the mouse and human USF1 genes (25). Previous studies that were undertaken to assign a physiological role to the Usfs *in vivo*, including the disruption of Usf1 and Usf2 genes in mice, revealed that Usf1 and Usf2 play a role in the modulation of glucose and lipid metabolism by modulation of their trans-activating efficiency (26–29). Subsequent studies also showed that Usf1 and Usf2 are involved in the pathophysiology of several metabolic disorders, including familial hypercholesterolemia and diabetic nephropathy (30–33). In this study, we show that the proximal promoter region (–72 to –43) of the mouse *Agtrap* gene contains an “E-box (CANNTG)” sequence, which is a putative binding site for Usf1 and Usf2 that interacts with these transcription factors. It is shown both *in vitro* and *in vivo* that Usf1 decreases and Usf2 increases the *Agtrap* gene expression through their binding to the E-box.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Culture**—The mDCT cells were kindly provided by Dr. Peter A. Friedman (University of Pittsburgh School of Medicine). These cells have been shown to have a phenotype of a polarized tight junction epithelium along with both morphological and functional features retained from the parental cells (14, 34–36). The mDCT cells also express the endogenous AT1R and Agtrap (14). Human embryonic kidney-derived 293

(HEK293) cells were cultured according to the American Type Culture Collection (ATCC) protocol, as described previously (37, 38).

**Animals and Treatment**—Adult C57BL/6 mice were purchased from Oriental Yeast Kogyo (Tokyo, Japan). The procedure of unilateral ureteral obstruction (UUO) was performed using C57BL/6 mice, as described previously (20, 39). Briefly, with the mice under anesthesia, the left ureter was ligated with 4-0 silk at two locations and then cut between the ligatures to prevent retrograde urinary tract infection. Mice that were operated on were sacrificed under anesthesia 7 days after UUO. Sham operation was also performed in which the ureters were manipulated but not ligated. Seven days after the sham operation, mice were sacrificed to obtain control kidneys. The procedures were performed in accordance with the National Institutes of Health guidelines for the use of experimental animals. All of the animal studies were reviewed and approved by the Animal Studies Committee of Yokohama City University.

**Plasmid Construction and Transcriptional Mouse *Agtrap* and Human *AGTRAP* Promoter Assay**—For the analysis of the mouse *Agtrap* promoter, 5022-, 2943-, 2090-, 1272-, 972-, 613-, 453-, 374-, and 222-bp mouse *Agtrap* promoter fragments (–4950, –2871, –2018, –1200, –900, –541, –381, –302, and –150 to +72 of the putative transcriptional start site, respectively) were amplified from C57BL/6J genomic DNA, using the pair of primers indicated in Table 1, and then subcloned into the multicloning sites of pBluescript. A 613-bp *Agtrap* promoter fragment (–541 to +72 of the putative transcriptional start site)-containing plasmid was used as a template to construct mutations in the X-box, E-box, and GC-box by oligonucleotide (ODN)-directed mutagenesis (40–42). The sequences of the oligonucleotide used to create the mutated X-box (X-box mt), mutated E-box (E-box mt), mutated GC-box (GC-box mt), and mutated X- and E-boxes (X/E-box mt) are also shown in Table 1. To normalize transfection efficiency, we employed the Dual-Luciferase Assay System (Promega) for the transcriptional *Agtrap* promoter assay using pGL3-basic plasmid-based luciferase constructs, as described previously (20, 36).

For analysis of the human *AGTRAP* promoter, 575-bp *AGTRAP* promoter fragments (–480 to +95 of the putative transcriptional start site, NC\_000001.9) containing two adjacent wild-type or mutated E-box motifs, were gene-synthesized (Eurofins MWG Operon). The human *AGTRAP* promoter assay using the Dual-Luciferase Assay System (Promega) was performed using pGL3- and pGL4.1-basic plasmid-based luciferase constructs (20, 36).

**Real Time Quantitative RT-PCR Analysis**—Total RNA was extracted and purified using the RNeasy kit (Qiagen), and the cDNA was synthesized using SuperScript VILO (Invitrogen). Real time quantitative RT-PCR was performed by incubating the RT product with the TaqMan Universal PCR Master Mix and designed TaqMan FAM<sup>TM</sup> dye-labeled probes for Usf1, Usf2, and Agtrap (Applied Biosystems), and a TaqMan VIC dye-labeled probe as the internal control (18 S rRNA Endogenous Control, Applied Biosystems) in the same reaction mixture (CFX96 system, BIO-RAD), essentially as described previously (20).

## USF1 and USF-2 Regulate Ang II Receptor Interacting Protein

**Immunoblot Analysis**—A 14-amino acid synthetic peptide corresponding to amino acids 148–161 of the C-terminal tail of mouse (DBA/2J) ATRAP was used for the generation of a polyclonal anti-ATRAP antibody (7), and the characterization and specificity of the anti-ATRAP antibody were described previously (9, 15, 43). Antibodies for USF1 (C-20 sc-229, Santa Cruz Biotechnology), USF2 (ab32616, Abcam), TATA-binding protein (ab818[1TBP18], Abcam), and  $\alpha$ -tubulin (ab40742 Abcam) were also used. Immunoblot analysis was performed as described previously (9, 15, 43), and the images were analyzed using a FUJI LAS3000mini Image Analyzer (FUJI Film, Tokyo, Japan).

**Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**—Nuclear extracts from mDCT cells (70–80% confluent, a 15-cm diameter dish) were prepared with a modification of the protocols of Dignam *et al.* (44) and Swick *et al.* (45). The final protein concentration was adjusted to 1 mg/ml. EMSA was performed essentially as described previously (46, 47). Briefly, single-stranded ODN sequences were biotin-labeled at 3'-ends by the manufacturer, annealed to each other, and used as the probe. The ODN sequences for the E-box and mutated E-box (E-box mt) are shown in Table 1. Nuclear extracts (2  $\mu$ g) were incubated on ice in a 20- $\mu$ l EMSA binding reaction mixture containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 4% glycerol, 1  $\mu$ g of BSA, and 1  $\mu$ g of double-stranded poly(dI-dC) in the presence or absence of a specific double-stranded competitor DNA and biotin-labeled DNA probe. The incubation mixture was loaded onto a 5% polyacrylamide mini (7.5  $\times$  9.0 cm) gel in 0.5 $\times$  TBE and electrophoresed at 350 V for 25 min, followed by transfer of DNA from the gel onto nylon membranes (Hybond-N+, GE) by cross-linking the transferred DNA to the membrane and rinsing with the TN buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl). After blocking the incubation with Blocking Reagent (FP1020, PerkinElmer Life Sciences), incubating with streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) conjugate (NEL750, PerkinElmer Life Sciences), and washing (incubation) to remove unreacted excess reagent with PBST (0.05% Tween 20/PBS), the biotin-labeled DNA was visualized by chemiluminescence (Immobilon Western Detection Reagent, Millipore) and analyzed using an LAS3000mini Image Analyzer (FUJI Film, Japan).

**Streptavidin-Biotin Complex Assay**—Streptavidin-biotin complex assay was performed using 3'-biotin-labeled oligonucleotides corresponding to the *Agtrap* E-box and X-box (Table 1), essentially as described previously (28, 48, 49). The streptavidin that was immobilized on agarose CL-4B (85881, Sigma) was pretreated with TN buffer containing 1% BSA and incubated with 50  $\mu$ g of nuclear extracts from mDCT cells on ice in a 200- $\mu$ l EMSA binding buffer for 20 min. After five washing steps with EMSA binding buffer, the streptavidin-biotin-DNA complex was eluted with SDS buffer, and a one-fifth volume was used for immunoblot analysis.

**Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay**—ChIP assay was performed essentially according to the manufacturer's protocol (Active Motif) (50, 51). Briefly, mDCT or HEK293 cells were treated with formalin to cross-link the protein-DNA complexes, and glycine was added to stop the reaction. The cells were lysed with 300  $\mu$ l of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0,

10 mM EDTA, pH 8.0, 1% SDS, protease inhibitor mixture; P8340, Sigma), and the lysates were sonicated using the Bioruptor Sonication System (250 watts, 30 s on and 30 s off/30 cycle; Bioruptor UCD-250, COSMO BIO, Tokyo, Japan) to reduce the DNA fragments. Subsequently, the sonicated lysates were divided into three equal aliquots for immunoprecipitation with specific antibodies, immunoprecipitation with control IgG (rabbit anti-HA antibody; 561, MBL, Japan), and input reference. After immunoprecipitation with an anti-USF1 antibody (C-20 sc-229, Santa Cruz Biotechnology), anti-USF2 antibody (C-20 sc-862, Santa Cruz Biotechnology), anti-SREBP1 antibody (H-160 sc-8984, Santa Cruz Biotechnology), anti-BMAL1 antibody (ab3350, Abcam), or control IgG, DNA was purified from the antibody-bound and unbound input fractions. The anti-USF1 antibody and anti-USF2 antibody used in the ChIP assay were characterized in detail in a previous study (28). Enrichment of the mouse *Agtrap* promoter sequences in the respective bound fractions was estimated by quantitative PCR with the SsoFast EvaGreen system (Bio-Rad) using the primers shown in Table 1 to detect the 134-bp fragment (–65 to +69 of the transcriptional start site).

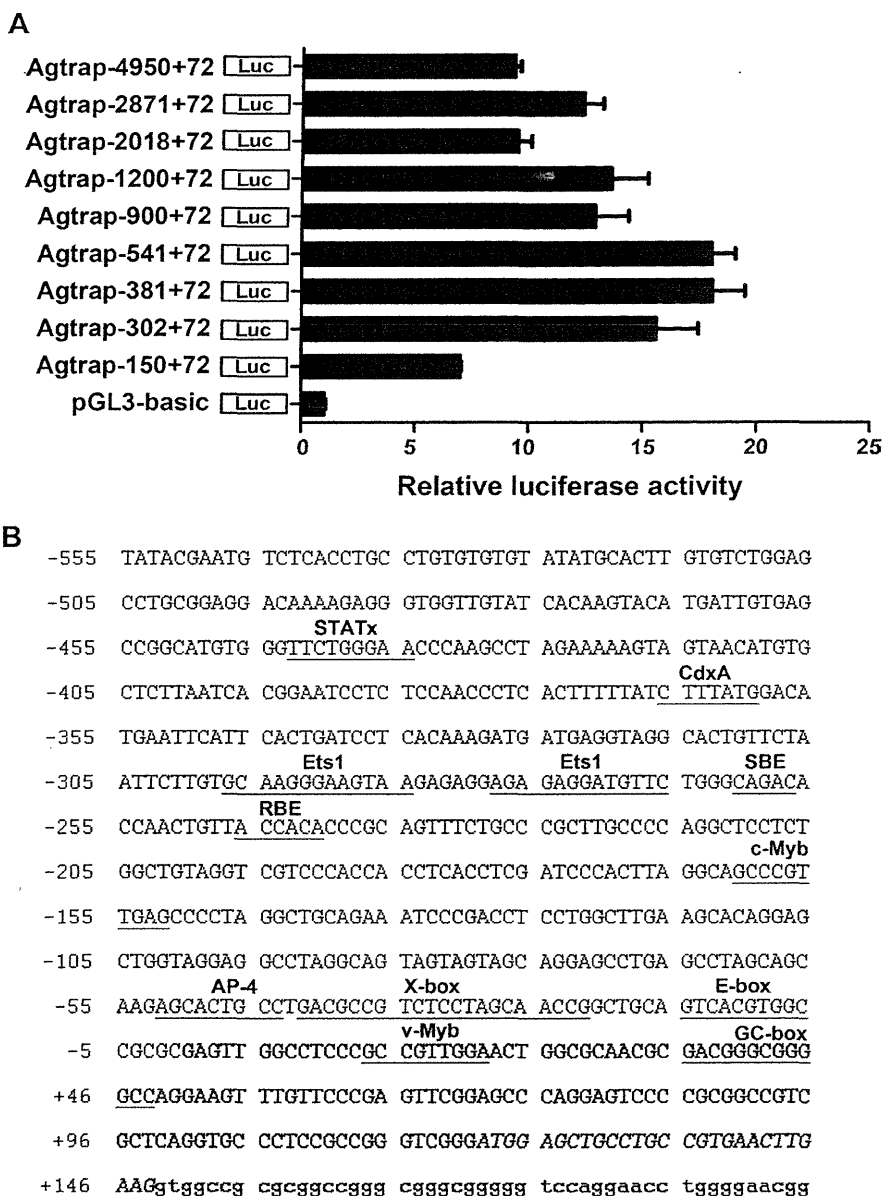
For the ChIP analysis of human *AGTRAP*, HEK293 cells were treated with formalin to cross-link the protein-DNA complexes, and then the cells were lysed with lysis buffer and sonicated to reduce the DNA fragments. After immunoprecipitation with an anti-USF1 antibody, anti-USF2 antibody, anti-SREBP1 antibody, anti-BMAL1 antibody or control IgG, DNA was purified from the antibody-bound and unbound input fractions. Enrichment of the *AGTRAP* promoter or exon3 sequences in the bound fractions was estimated by quantitative PCR using the primers in Table 1 to detect 161- or 102-bp fragments, respectively. The target proteins in the co-immunoprecipitates were also subjected to immunoblot analysis and were visualized by TrueBlot (Affymetrix).

**Statistical Analysis**—All the quantitative data are expressed as the means  $\pm$  S.E. For comparisons between groups, Student's *t* test was employed. Differences were considered to be statistically significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

**Determination of the Minimal Mouse *Agtrap* Promoter**—To determine the minimal region required for basal activity of the core promoter of the *Agtrap* gene, the 5-kb promoter region upstream of its transcriptional start site was isolated. Then, we generated a series of luciferase reporter plasmids containing the various *Agtrap* proximal promoter regions, which are illustrated in Fig. 1A. To determinate the minimal *Agtrap* promoter, we transfected these plasmids into mDCT cells, and luciferase activity was measured. Although the luciferase activity was gradually increased by the deletion from –4950 to –541, further deletion, *i.e.* from –381 to –150, resulted in a decrease in the luciferase activity of the *Agtrap* reporter constructs (Fig. 1A). Consistent with this finding, this region contains two important *Agtrap* regulatory elements, the SMAD-binding element (–261 to –257) and the Runt-binding element (–246 to –241) (20). Intriguingly, the promoter region from –150 to +72 maintained the luciferase activity of the *Agtrap* reporter constructs. This suggested that this region contains important

### USF1 and USF-2 Regulate Ang II Receptor Interacting Protein



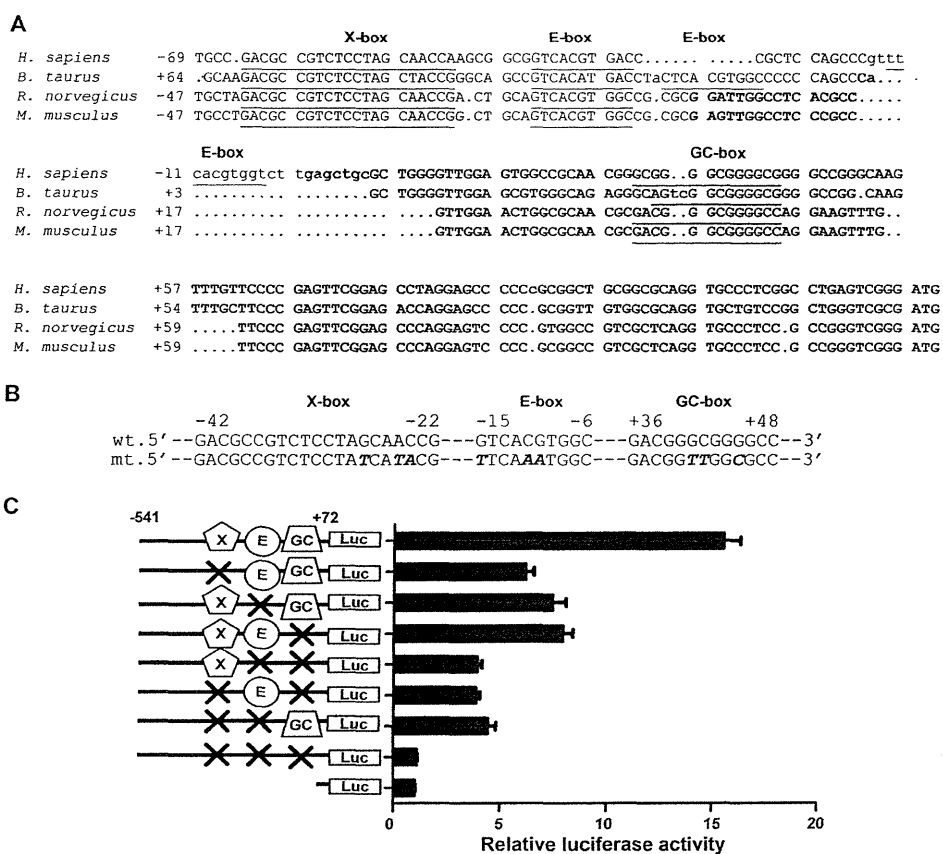
**FIGURE 1. Identification of mouse *Agtrap* promoter region.** *A*, functional analysis of the mouse *Agtrap* promoter in mDCT cells. The *Agtrap* promoter-luciferase constructs were transiently transfected into mDCT cells, and luciferase assay was performed. The relative luciferase activities were calculated relative to those achieved with the promoterless control plasmid (pGL3-basic). Data are expressed as the means  $\pm$  S.E. ( $n = 4$ ). *B*, nucleotide sequence of the mouse *Agtrap* promoter region and putative transcription factor-binding motifs. The nucleotides are numbered at the left with the putative initiation site of transcription designated as +1. The untranslated and translated nucleotides of exon 1 are designated by the bold letters and the bold italic letters, respectively. The nucleotides in a portion of intron 1 are indicated by the small letters.

regulatory elements for *Agtrap* gene transcription. To identify the candidate transcription factors involved in *Agtrap* gene transcription, we next performed a computational sequence analysis of the *Agtrap* proximal promoter region using TFSEARCH: Searching Transcription Factor-binding Sites software and identified the consensus binding motifs for several transcription factors (Fig. 1B).

**Functional Involvement of X-box, E-box, and GC-box in the Proximal Mouse *Agtrap* Promoter Activity**—Among the consensus binding motifs of the transcription factors listed in Fig. 1B, there are highly homologous sequences of the X-box (5'-GTCCCTAGCAAC-3') (52), E-box (5'-CATGTG-3' or 5'-CANNTG-3'), and GC-box (5'-GGAGGGGGGG(A/C)GG-

3') (53), which are highly conserved in mammals (Fig. 2A). To examine the functional role of these conserved elements in the regulation of *Agtrap* gene transcription, we mutated the core binding sequences of the X-box, E-box, and GC-box in the *Agtrap* promoter, X-box mt, E-box mt, and GC-box mt (Fig. 2B). Although the promoter region from -541 to +72 of the putative transcriptional start site of the *Agtrap* gene exhibited substantial luciferase activity in mDCT cells, site-directed mutations of the X-box, E-box, or GC-box decreased the luciferase activity to  $39.7 \pm 2.5\%$  (X-box mt),  $48.2 \pm 4.1\%$  (E-box mt), and  $51.2 \pm 3.0\%$  (GC-box mt) of that achieved with the wild-type promoter, respectively (Fig. 2C). Mutations of any two of the three consensus motifs further decreased the lucif-

### USF1 and USF-2 Regulate Ang II Receptor Interacting Protein



**FIGURE 2. Involvement of the X-box, E-box, and GC-box regions in the transcriptional activation of the mouse *Agrap* promoter in mDCT cells.** A, alignment of the proximal regions of the human (*Homo sapiens*), cow (*Bos taurus*), rat (*Rattus norvegicus*), and mouse (*Mus musculus*) *Agrap* genes. The nucleotides are numbered at the left with the putative initiation site of transcription designated as +1. The putative transcription factor binding motifs are indicated with underlines. B, construction of site-directed mutations in the X-box, E-box, and GC-box in the mouse *Agrap* promoter sequence. Wild-type sequences (wt) and mutated sequences (mt) are shown. C, effects of mutations in the X-box, E-box, and GC-box on the transcriptional activity of the mouse *Agrap* promoter (-541 to +72 of the transcriptional start site)-luciferase hybrid gene in mDCT cells. The relative luciferase activities were calculated relative to those achieved with the promoterless control plasmid. Data are expressed as the means  $\pm$  S.E. ( $n = 4$ ).

erase activity (E-box/GC-box mt,  $25.3 \pm 1.4\%$ ; X-box/GC-box mt,  $24.7 \pm 1.3\%$ ; X-box/E-box mt,  $28.6 \pm 2.4\%$ ) relative to that achieved with the wild-type promoter, whereas mutation of all three motifs reduced the luciferase activity almost to the background reference level (X-box/E-box/GC-box mt,  $7.2 \pm 0.3\%$ ). These results indicate that the three binding motifs of the X-box, E-box, and GC-box are important for the basal transcriptional activity directed by the minimal *Agrap* promoter and suggest that these binding motifs independently modulate the promoter activity of the *Agrap* gene.

**Identification of the E-box as a Transcription Factor-binding Site in the Mouse *Agrap* Promoter**—Among the X-box, E-box, and GC-box in the *Agrap* proximal promoter, the canonical E-box is a target for many genes involved in pathophysiological conditions such as diabetic nephropathy and fibrotic disease (33, 54, 55). Therefore, we focused on the functional characterization of the E-box in the regulation of the *Agrap* promoter. To determine whether the E-box is capable of binding transcription factors, nuclear extracts were prepared from mDCT cells (Fig. 3A), and EMSA analysis was performed with an *Agrap* promoter fragment (-72 to -43) probe containing the E-box but not the X-box or GC-box (Table 1). The E-box probe formed a DNA-protein complex (Fig. 3B, lanes 8 and 12), and

the formation of the complex was completely impaired by the addition of an excess amount of the unlabeled probe with a wild-type sequence (Fig. 3B, lanes 5-7), but not by a mutated probe (Fig. 3B, lanes 9-11). These results indicate that there are nuclear factors that bind to the E-box sequence of the *Agrap* promoter.

**Specific Binding of *Usf1* and *Usf2* to the E-box of the Mouse *Agrap* Promoter**—Several candidate transcription factors, including *Usf1*, *Usf2*, *BMAL1/Arnt1*, and *Srebf1*, are reported to be capable of binding to the E-box sequence. Among these factors, *Usf1*, *Usf2*, and *BMAL1/Arnt1*, but not *Srebf1* mRNA, were detectably expressed on RT-PCR and immunoblot analyses in mDCT cells (data not shown). We then examined whether *Usf1*, *Usf2*, and/or *BMAL1* interact with the E-box of the *Agrap* promoter using a biotin-labeled E-box probe and X-box probe. These biotin-labeled probes were individually mixed with the nuclear extracts of mDCT cells and pulled down using streptavidin-Sepharose. The results showed that substantial amounts of *Usf1* (43 kDa) and *Usf2* (44 kDa) proteins from nuclear extracts were pulled down with the biotin-labeled E-box, but not the X-box, of the *Agrap* promoter (Fig. 4A). However, no binding of *BMAL1* to the biotin-labeled E-box or X-box in the *Agrap* promoter was observed.