

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590957
 研究課題名（和文）腎臓における V1a 受容体を介したバゾプレッシン作用制御機序の解明と利尿薬の開発
 研究課題名（英文）Analysis of the action and the mechanism of vasopressin via V1aR in the kidney, and the search for the new antidiuretic peptide.
 研究代表者
 中山 裕史（NAKAYAMA YUSHI）
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教
 研究者番号：00363531

研究成果の概要：

抗利尿ホルモン（AVP）の、腎臓におけるバゾプレッシン V1a 受容体（V1aR）-V2 受容体（V2R）を介した体液量の調節メカニズムを明らかとし、また V1aR 欠損マウスを用いて、V1aR が RAS 系及び V2R-AQP2 系をも活性化していることを示した。また V1aR 欠損マウスでは 型腎尿細管性アシドーシスを生じている可能性を示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：バゾプレッシン、バゾプレッシン V2 受容体、バゾプレッシン V1a 受容体
 プロモーター活性、SP-1 モチーフ、アシドーシス

1. 研究開始当初の背景

抗利尿ホルモン（AVP）は腎バゾプレッシン V2 受容体（V2R）-アクアポリン 2 系を介して体液量の調節に重要な役割を担うことは良く知られている。しかし、腎集合尿細管、ヘンレの太い上行脚の管腔側に発現するバゾプレッシン V1a 受容体（V1aR）の生理的役割については、十分に解明されていない。私たちは、血液中の AVP と尿中の AVP が V2R と V1aR を介した相互作用を有し、体液量の厳密な維持調節に貢献していると考えている。

2. 研究の目的

私たちは V1a 受容体の活性化が、PKC 情報伝達系を介して V2 受容体の遺伝子発現を抑制することを報告している。この研究結果は、慢性腎不全患者において、尿量確保のために存在する V2 抑制機構の仮説を裏づけする。この V2 受容体の転写発現抑制に関わる物質が、実際に腎不全状態において尿量を保つ上で重要な役割を果たす蛋白質と考えられる。本研究は新たな利尿薬の開発に繋がるものと考えられる。そこで得られた蛋白質を、将来的に新たな利尿薬として臨床にフィードバックさせることを目的とする。

3. 研究の方法

LLCPK1細胞系列を用いたV2Rプロモーター活性の検討。PKC活性化薬(PMA)及び阻害薬(スタウロスポリン)に対する反応を各種deletionとmutation seriesベクターで測定し、PKC情報伝達に重要と考えられる配列を絞り込んでいく。

動物実験を用いての*in vivo*の検討には尿中AVPの測定ができる系の確立が必要となる。V1aに特異的な抗体を用いて尿中のV1aの測定を行う系を確立し、V1a受容体蛋白の発現量を検討する。Microdissection法を用いて、腎臓の各ネフロンセグメントに単離し、V1a受容体、V2受容体の遺伝子発現量を検討する。V1aR欠損マウス(V1aR^{-/-})を用いて、V1aRの酸塩基平衡における役割について検討を行う。

4. 研究成果

私達の検討においてV2Rプロモーター上のSP1がV1aからの刺激に重要な役割を果たすことが明らかとなった。またV1aR欠損マウスを用いた実験では、マクラデンサ細胞内V1aRがレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系を活性化し、間接的にV2R-AQP2系をも活性化していることが示された。血液中のAVPと尿中のAVPがそれぞれV2RとV1aRを介した相互作用を有し、体液量の迅速で厳密な維持調節に貢献していると考えられた。またV1aRは体液の酸塩基平衡に関与していることが指摘されてはいるものの、V1aRの酸塩基平衡に対する生理的役割を直接的に示した報告はないため、今回私たちは、V1aR欠損マウス(V1aR^{-/-})を用いてV1aRの酸塩基平衡における役割について検討した。血液ガス分析では野生型(WT)とV1aR^{-/-}間の動脈血pHに差は認められなかったが、V1aR^{-/-}において有意なpO₂の上昇とpCO₂の低下、HCO₃⁻の低下が認められ、V1aR^{-/-}では呼吸性代償を伴った代謝性アシドーシスを生じていた。

血清電解質においてはNa、Cl濃度に差は認めなかったが、K濃度はV1aR^{-/-}において有意な増加を認めた。尿分析においては総酸排泄量に有意差は認めないものの、V1aR^{-/-}はWTに比し尿pHの低下と尿中アンモニア排泄量の減少、摘定酸度の増加を認めた(Fig. 1、2、3、4)。これらの結果より、V1aR^{-/-}においては尿中アンモニア排泄量低下に起因する潜在的な酸排泄能の低下があることが疑われた。NH₄Clの自由飲水による酸負荷試験を行ったところ、V1aR^{-/-}で動脈血中HCO₃⁻濃度の著明な低下を生じ、pHも低下傾向を示した。酸負荷前と同様に、血清K濃度の増加も持続していた。尿中総酸排泄量は、尿中アンモニア排泄不良を反映してV1aR^{-/-}で明らかかな低下を生じていた。これにより、V1aR^{-/-}

は尿中アンモニア排泄不良を原因とした、代謝性アシドーシスを生じていることが明らかとなった。

Fig. 1

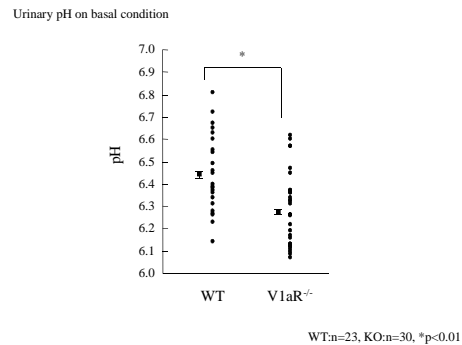


Fig. 2

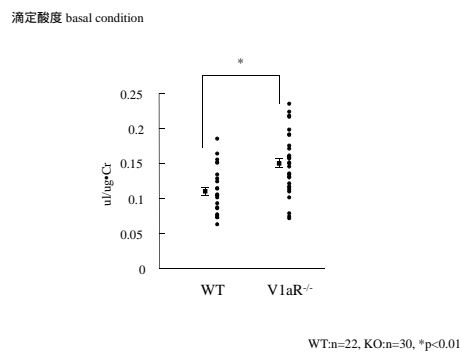


Fig. 3

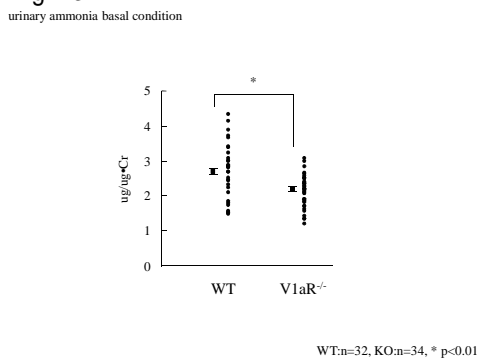
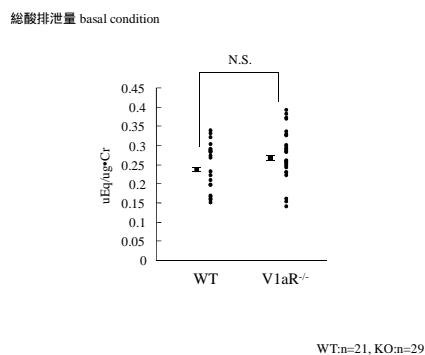


Fig. 4



以前私たちが報告した V1aR^{-/-}におけるレニン - アンジオテンシン - アルドステロン系の抑制と、今回明らかとなった高 K 血症、尿中酸排泄能低下から考えられる臨床病態として、型腎尿細管性アシドーシス (RTA) が挙げられる。V1aR^{-/-}に合成副腎皮質塩類代謝ホルモン剤のフルドコロチゾン (フロリネフ) を投与したところ、動脈血ガス分析で生じていた呼吸性代償を伴う代謝性アシドーシスは消失し、血清 K 濃度は WT に比し有意な低下を認めた。尿分析においては、WT に比し V1aR^{-/-}で著明な尿 pH の上昇と尿中摘定酸度の低下、尿中アンモニア排泄の増加を伴った総酸排泄量の増加を示した。(Fig. 5、6、7、8)

Fig. 5

urinary pH treated with fludro.

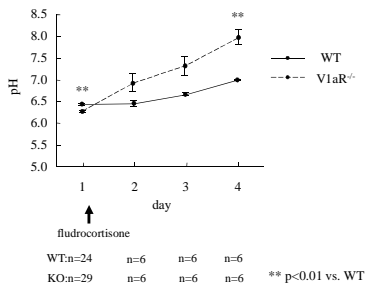


Fig. 6

摘定酸度 treated with fludro

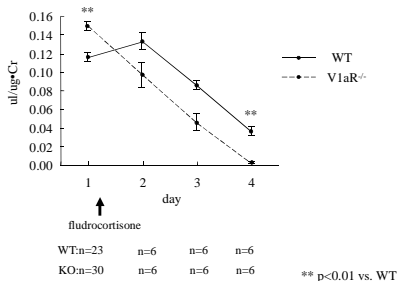


Fig. 7

urinary ammonia treated with fludro

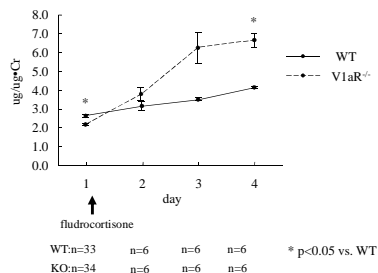
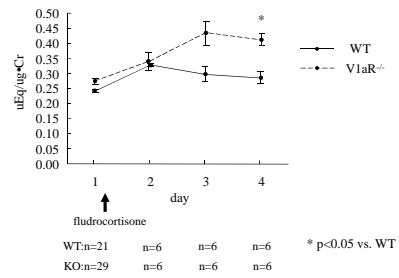


Fig. 8

総酸排泄量 treated with fludro



以上より、V1aR の欠損は低レニン低アルドステロンに伴う型 RTA を生じることが示された。しかしながら、V1aR^{-/-}に対するフルドコロチゾン投与は WT に比し有意な血清 K 濃度の低下と極端な尿のアルカリ化、尿中アンモニアの排泄を引き起こしており、これは型 RTA のみでは説明がつかない現象である。V1aR^{-/-}の欠損は単純なアルドステロンの不足と共にアルドステロンへの過剰反応も生じていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Izumi, Y., Nakayama, Y., Tomita, K. et al. Regulation of V2R transcription by hypertonicity and V1aR - V2R signal interaction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295; 1170-1176, 2008. 査読有り
2. Nakayama, Y., Tomita, K., Nonoguchi, H. et al. Long-term observation of renal function on combination therapy with prostaglandin and angiotensin-converting enzyme inhibitor for chronic kidney disease. *Clin Nephrol.* 69; 402-407, 2008. 査読有り
3. Aoyagi, T., Izumi, Y., Nakayama, Y., Tomita, K. et al. Vasopressin regulates the renin-angiotensin-aldosterone system via V1a receptors in macula densa cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295; F100-107, 2008. 査読有り
4. Nonoguchi, H., Nakayama, Y., Tomita, K. et al. Long-term plasma levels and dose modulation of alacepril in patients with chronic renal failure. *Hypertens Res.* 31; 29-36, 2008. 査読有り

5. Nonoguchi, H., Nakayama, Y., Tomita, K. et al. The MAXIMA trial. Lancet. 371; 299-300, 2008. 査読有り
6. Nakayama, Y., Nonoguchi, H., Tomita, K. et al. Different mechanisms for the progression of CKD with ACE gene polymorphisms. Nephron, 111:c240-c246, 2008. 査読有り
7. Nonoguchi, H., Nakayama, Y., Tomita, K. et al. Low-responders to angiotensin II receptor blockers and genetic polymorphism in angiotensin-converting enzyme. Clin Nephrol. 68; 209-215, 2007. 査読有り
8. Nonoguchi, H., Nakayama, Y., Tomita, K. et al. Target haemoglobin concentrations in chronic kidney disease. Lancet. 369;1517, 2007. 査読有り
9. Naruse, M., Nakayama, Y., Tomita, K. et al. A novel method for dry weight assessment in hemodialysis patients: utilization of inferior vena cava flat ratio to correct for individual variations in vessel diameter. Ther Apher Dial. 11; 42-48, 2007. 査読有り
10. Izumi, Y., Nakayama, Y., Tomita, K. et al. Downregulation of vasopressin V2 receptor promoter activity via V1a receptor pathway. Am J Physiol Renal Physiol. 292; F1418-1426, 2007. 査読有り

〔学会発表〕(計 2件)

1. Nakayama, Y., Tomita, K. et al.
Renoprotection by Inhibition of GSK3 in Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy; the New Approach for Reduction of Proteinuria through TGF-1 Pathway.
2008年11月8日、米国腎臓学会、フィラデルフィア、U.S.A
2. Nakayama, Y., Tomita, K. et al.
The Different Mechanism of the Progression of CKD in II/DI and DD Patients with ACE Gene Polymorphism.
2007年11月3日、米国腎臓学会、サンフランシスコ、U.S.A

〔図書〕(計 1件)

1. 共著：中山裕史
EBM 腎臓病の治療 (中外医学社、2008,154-166)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 裕史 (NAKAYAMA YUSHI)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教
研究者番号：00363531

(2)研究分担者

富田 公夫 (TOMITA KIMIO)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号：40114772

(3)連携研究者