

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590953

研究課題名(和文)

腎傍糸球体におけるレニン分泌制御機構：細胞間コミュニケーションの役割

研究課題名(英文)

Role of intercellular communication in the control of renin secretion

研究代表者

姚 建 (YAO JIAN)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：50303128

研究成果の概要(和文)：腎傍糸球体細胞からのレニン産生・分泌は血圧、血流量の恒常性維持に重要な役割を果たしている。レニンの分泌は神経、血管作動物質、成長因子、サイトカインなど多くの因子のパラクライン作用により調節されている。しかし、隣接する細胞間でシグナル分子の直接的な遣り取りを司るギャップ結合の役割は、まだ十分に解明されていない。本研究はレニン分泌の調節においてギャップ結合の役割を解明するものである。得られた成果は：1) レニン分泌細胞において、機能的なギャップ結合が存在することを証明した。2) ギャップ結合阻害によってレニン産生と分泌を刺激する分子である COX-2 の発現レベルが上昇した。3) 低カルシウム刺激によるレニン産生の亢進は、ギャップ結合ヘミチャネルの開放と機能を深く関連していることが初めて明らかになった。以上の結果から、ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションがレニンの産生と分泌に極めて重要な役割を果たしているが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：Renin plays an important role in the maintenance of blood pressure and renal blood flow. A lot paracrine factors such as neurotransmitters, vasoactive materials, growth factors and cytokines have been shown to be implicated in the control of renin. However, our understanding about the mechanisms of the gap junction-mediated direct intercellular communication in renin secretion is still lacking. Here, we investigated the role of gap junctions in the control of renin production in juxtaglomerular cells. Our results demonstrated that: 1) there are abundant connexins and functional gap junctions in renin-secreting cells; 2) dysfunction of gap junctions with gap junction blockers stimulated the expression of COX<sub>2</sub>, an important signal molecule implicated in the stimulation of renin synthesis and production; and 3) the opening of gap junction hemichannels under low calcium conditions activated the renin-stimulating cAMP signaling pathway. Our results thus implicate gap junctions as an important regulator of renin secretion and production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：生理学、腎臓、シグナル伝達、レニン、ギャップ結合

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内の電解質の恒常性維持、血圧維持はレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系により制御されている。腎におけるレニン-アンジオテンシン系は主に傍糸球体装置で作動している。傍糸球体装置は二つの大きな反応調節機構を介してその調節を行っている。一つは尿細管の内腔からの情報を緻密斑-糸球体外メサンギウム細胞-輸入細動脈平滑筋と伝え、レニン細胞からのレニン分泌を調節する。もうひとつは輸入細動脈の血流の変化により輸入細動脈の張力が変化し、レニン分泌を調節する。このためには同一の細胞は個々の細胞がバラバラに刺激に対して反応するのではなく、同期して刺激に反応すること。また異なった細胞間でも秩序だった情報伝達が行われることが非常に重要であると考えられる。しかし、この精巧な細胞間相互作用、細胞間情報伝達機構についてはほとんど解明されていない。

(2) レニン産生細胞間及びレニン産生細胞と隣接細胞間（血管内皮細胞、平滑筋細胞、糸球体外メサンギウム細胞）にはギャップ結合が非常に多く存在している。レニン産生細胞のギャップ結合蛋白であるコネクシン 40 ノックアウトマウスはレニン依存性高血圧になることが報告されている。またトランスジェニックマウスによる実験から、コネクシンの発現量とアイソフォームがレニンの合成と分泌に深く関わっていることが示唆された。しかしギャップ結合がどのようにしてレニンの産生、分泌を調節しているかその詳細は未だ明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究はレニン分泌の調節においてギャップ結合の役割を解明するものである。

## 3. 研究の方法

(1) 傍糸球体領域のギャップ結合蛋白の性状検索： 傍糸球体細胞、および輸入動脈領域の細胞におけるギャップ結合蛋白、コネクシン 37,40,43 の局在を市販の抗血清を用いて免疫組織学的に検索した。

(2) *In vitro* 傍糸球体レニン産生細胞の単離とその初代培養： ラット腎皮質を細切、酵素処理し単離細胞を得た。単離細胞を Percoll を用いた密度勾配遠心法により分画し、レニン産生細胞が豊富な細胞分画を抽出し、培養した。レニン産生細胞間シグナル伝達にコネクシンが関与しているか否かを免疫組織化学、色素伝播法を用いて確認した。

(3) レニンの分泌におけるギャップ結合の

役割： ①培養レニン産生細胞において、レニン分泌を促進物質及び抑制する物質は、コネクシンの発現レベルが影響しているか否かを Western blot を用いて調べた。②レニン分泌におけるギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションの役割を調べるために、ギャップ結合阻害剤を用いて、細胞間コミュニケーションを特異的阻害による、レニンの産生と分泌の変化を測定した。

(4) 低カルシウムによるギャップ結合ヘミチャネルの開放： 低カルシウム培養条件下、ヘミチャネル開放を検討した。細胞内蛍光色素の取り込み実験、及び細胞外の ATP の濃度などから、ヘミチャネルの開閉を測定した。チャネルの特異性はギャップ結合阻害剤の前処理により確認した。

(5) ギャップ結合ヘミチャネル開放によるレニン産生・分泌の変化： ヘミチャネル開閉とレニン分泌の関係を検討した。ギャップ結合ヘミチャネルの阻害剤を用い、低カルシウムによる傍糸球体細胞のレニン分泌の変化を測定した。レニン量については RIA キットで定量した。

(6) ヘミチャネルの開閉によるレニン分泌情報伝達系の変化： 細胞内外ヘミチャネルを通過できる物質 (PGE<sub>2</sub>, ATP) を定量した。これらの物質が関連する情報伝達経路を、特異的作動薬、阻害剤で前処理し、レニン分泌の影響を調べた。cAMP 濃度は RIA キットで、PKA は VASP タンパクのリン酸化で、CRE はプロモーター活性を定量した。

## 4. 研究成果

(1) 培養レニン分泌細胞において、機能的なギャップ結合が存在することを dye transfer assay を用いて示した。さらに、ギャップ結合蛋白である Cx45, Cx43 及び Cx40 が存在することを特異的な抗体を用いた蛍光抗体法及びウエスタンブロット法を用いて明らかにした。

(2) レニン分泌刺激物質（一酸化窒素、cAMP）は、レニン分泌細胞コネクシン蛋白の発現を促進し、ギャップ結合を亢進させることを明らかにした。逆に小胞体ストレスがレニン産生細胞のコネクシン蛋白を抑制し、ギャップ結合を抑えることを観察した。

(3) ギャップ結合阻害剤である 18alpha-glycyrrhetic acid ( $\alpha$ -GA) を作用させると、レニン分泌細胞のコネクシン 43 蛋白が減少し、ギャップ結合を介した細胞間シグナルの伝達をブロックした。逆に、COX-2

の発現レベルが増加した。これは、PI3 kinase/AKT を介したシグナル伝達系と関連していることを証明した。以上の結果から、ギャップ結合はレニン合成と分泌に関与していることが示唆された。

(4) 傍糸球体レニン産生細胞株 As4.1 において、低カルシウム培養条件下で、ギャップ結合ヘミチャネルが開放していることを蛍光色素 Lucifer Yellow の細胞内取り込み実験および細胞外に放出した ATP 濃度測定によって証明した。

(5) レニン分泌の調節に深く関わる cAMP シグナル情報伝達系が低カルシウム培養によって活性化され、これは、ヘミチャネル阻害及び特異的なギャップ結合蛋白 Cx43、Cx40、Cx45 siRNA 処理によって完全に抑制された。

(6) 低カルシウム刺激による傍糸球体細胞のレニン合成の増加は、ヘミチャネル阻害によって著しく抑えられた。

以上の結果から、ギャップ結合及びギャップ結合ヘミチャネルの開放はレニン産生と分泌の調節に深く関わるということが初めて明らかになった。

#### 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 11 件)

- ① Fang X, Huang T, Zhu Y, Jiang JX, Wang P, Kitamura M and Yao J. Connexin43 hemichannels contribute to cadmium-induced oxidative stress and cell injury. *Antioxid Redox Signal* 15:14:2427-39, 2011. 査読有
- ② Ogata R, Hiramatsu N, Hayakawa K, Nakajima S, Yao J, Kobayashi T, and Kitamura M: Impairment of MCP-1 expression in mesothelial cells exposed to PDF by osmotic stress and acidic stress. *Perit Dial Int* 31: 80-89, 2011. 査読有
- ③ Nakajima S, Hiramatsu N, Hayakawa K, Saito Y, Kato H, Huang T, Yao J, Paton AW, Paton JC, and Kitamura M: Selective abrogation of BiP/GRP78 blunts activation of NF- $\kappa$ B through the ATF6 branch of the UPR: involvement of C/EBP  $\beta$  and mTOR-dependent dephosphorylation of Akt. *Mol Cell Biol* 31: 1710-1718, 2011. 査読有
- ④ Nakajima S, Saito Y, Takahashi S, Hiramatsu N, Kato H, Johno H, Yao J,

Paton AW, Paton JC, and Kitamura M: Anti-inflammatory subtilase cytotoxin up-regulates A20 through the unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun* 397: 176-180, 2010. 査読有

- ⑤ Tamai M, Shimada T, Hiramatsu N, Hayakawa K, Okamura M, Tagawa Y, Takahashi S, Nakajima S, Yao J, and Kitamura M: Selective deletion of adipocytes, but not preadipocytes, by TNF- $\alpha$  via C/EBP- and PPAR $\gamma$ -mediated suppression of NF- $\kappa$ B. *Lab Invest* 90: 1385-1395, 2010. 査読有
- ⑥ Huang T, Zhu Y, Fang X, Chi Y, Kitamura M, and Yao J: Gap junctions sensitize cancer cells to proteasome inhibitor MG132-induced apoptosis. *Cancer Sci* 101: 713-721, 2010. 査読有
- ⑦ Yao J, Huang T, Fang X, Chi Y, Zhu Y, Wan Y, Matsue H, and Kitamura M: Disruption of gap junction attenuates aminoglycoside-elicited renal tubular cell injury. *Br J Pharmacol* 160: 2055-2068, 2010. 査読有
- ⑧ Huang T, Wan Y, Zhu Y, Fang X, Hiramatsu N, Hayakawa K, Paton A, Paton J, Kitamura M, and Yao J: Downregulation of gap junction expression and function by endoplasmic reticulum stress. *J Cell Biochem*, 107: 973-983, 2009. 査読有
- ⑨ Yao J, Oite T and Kitamura M: Gap junctional intercellular communication in the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol - Renal* 296: F939-946, 2009. 査読有
- ⑩ Oite T and Yao J: Disturbances of glomerular hemodynamics: a risk factor determining progression of glomerular diseases? *J Nephro* 22 (2):196-202, 2009. 査読有
- ⑪ 姚建、北村正敬、追手巖: 糸球体メサンギウム細胞の細胞特性、日本腎臓学会誌 50:554-560, 2008. 査読無

[学会発表] (計 9 件)

- ① Yao J, Sun W, Huang T, Nakajima S, and Kitamura M: Connexin43 hemichannels exaggerate cadmium-induced oxidative stress and cell injury in renal tubular epithelial cells. 43rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Denver, November 16-21, 2010
- ② Huang T, Nakajima S, Kitamura M, Yao J: Connexin hemichannels mediate low calcium-elicited activation of cAMP

signaling pathway and elevation of renin production in juxtaglomerular cells. 43rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Denver, November 16-21, 2010.

- ③ Huang T, Chi Y, Fan X, Zhu Y, Kitamura M, and Yao J: Participation of gap junction hemichannel in low calcium-elicited renin synthesis and secretion. 第 53 回日本腎臓学会総会、2010 年 6 月 16-18 日、神戸
- ④ 姚 建: 腎臓におけるギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションの役割、第 24 回新潟腎シンポジウム、2009 年 7 月 25 日、新潟
- ⑤ Huang T, Zhu Y, Wan Y, Hiramatsu N, Paton AW, Paton JC, Kitamura M, and Yao J: Endoplasmic reticulum stress regulates gap junction expression and function in glomerular mesangial cells. 第 52 回日本腎臓学会総会、2009 年 6 月 3-5 日、横浜
- ⑥ Fang X, Huang T, Zhu Y, Kitamura M, and Yao J: Gap junction renders renal tubular cells vulnerable to cadmium-induced injury. 第 52 回日本腎臓学会総会、2009 年 6 月 3-5 日、横浜
- ⑦ Huang T, Kitamura M, and Yao J: Participation of gap junction in proteasome inhibition-induced cell damage. 第 31 回日本分子生物学会年会 / 第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 10-12 日、神戸
- ⑧ Yao J: Gap junction in renal microcirculation. 中国中西医结合微小循環学術大会 2008、(特別報告)北京大学、2008 年 6 月 6 日、北京
- ⑨ Yao J, Huang T, Hiramatsu N, Kitamura M: Gap junction renders renal tubular cell vulnerable to aminoglycosides-induced cytotoxicity. 第 51 回日本腎臓学会学術総会、2008 年 5 月 30 日-6 月 1 日、福岡

[図書] (計 1 件)

- ① Yao J: Pathophysiological roles of gap junction in kidney, Chapter in Cell adhesion Molecules in the kidney edited by Ichiei Narita, published by Koko-do Co., Ltd. 2009, pp41-48.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

姚 建 (YAO JIAN)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・  
准教授

研究者番号：50303128

### (2) 研究分担者

北村 正敬 (KITAMURA MASANORI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・  
教授

研究者番号：90333062

### (3) 連携研究者

なし