

機関番号：14401  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590973  
 研究課題名（和文） プロスタグランジン E<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> 受容体経路活性化による食塩感受性治療の可能性  
 研究課題名（英文） Therapeutic approach towards salt-sensitive hypertension via activation of prostaglandin E<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> receptors  
 研究代表者  
 守山 敏樹 (MORIYAMA TOSHIKI)  
 大阪大学・保健センター・教授  
 研究者番号：30283815

研究成果の概要（和文）：我々は、シクロオキシゲナーゼ 1 (COX-1) 遺伝子欠失マウスが、正常マウスと比較して、高食塩食下で血圧上昇と多尿を示すことを明らかとした。本機序の一端として、プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)-EP<sub>4</sub> 受容体 経路の役割に着目した。EP<sub>4</sub> は cAMP 産生を介して水再吸収を促進することが報告されており、実際、選択的 EP<sub>4</sub> 作動薬は水再吸収を亢進するが、一方、Na 再吸収は亢進しなかった。Na 再吸収の亢進を抑制する情報伝達経路として、選択的 EP<sub>4</sub> 作動薬が、培養腎皮質集合管 (M-1) 細で MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1) の発現とそれに伴う p38 蛋白リン酸化の抑制を誘導すること、さらに、選択的 p38 阻害薬が、Akt, Sgk1 蛋白リン酸化を抑制することで、Na 再吸収を抑制する可能性を明らかとした。本研究より、EP<sub>4</sub> 受容体活性化の水再吸収の促進と Na 再吸収の抑制機序の一端が示された。

研究成果の概要（英文）：Cyclooxygenase-1 (COX-1) deficient mice are salt sensitive and polyuric under high salt diet. We have focused on the prostaglandin E<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> receptor signaling pathway as a cause of these phenotypes. EP<sub>4</sub> has been shown to enhance water absorption via cAMP production and, as anticipated, the administration of EP<sub>4</sub> agonist: ONO-AE1-329 (EP4AG, 6x10<sup>-10</sup>mol/gram body weight every one hour) in rats increased water absorption. On the other hand, sodium absorption was not enhanced by EP4AG. EP4AG (10<sup>-6</sup>M) in cultured mice collecting duct (M-1) cells reduced the abundance of the phosphorylated Akt, Sgk1 and p38 proteins and increased the expression of MAP kinase phosphatase 1 (MKP1) mRNA. P38 inhibitor (BIRB796: 10<sup>-5</sup>M) reduced the protein abundance of phosphorylated Akt and Sgk-1, which could be a counteracting mechanism to cAMP-mediated sodium absorption. In conclusion, EP4AG can be an effective agent as a mediator for the renal tubular water and electrolyte transports.

## 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
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：プロスタグランジン E<sub>2</sub>、EP<sub>4</sub> 受容体、食塩感受性、MKP1、p38、Akt、Sgk1

## 1. 研究開始当初の背景

非ステロイド系消炎鎮痛薬 (NSAIDs) は、解熱鎮痛薬として日常臨床で頻用される薬

剤である。NSAIDs の副作用では消化管粘膜障害が有名であるが、ある種の患者群においては血圧上昇の原因となることも報告されて

いる。また、シクロオキシゲナーゼ-2の選択的阻害薬や NSAIDs で心血管合併症の発症頻度が上昇することが報告され、シクロオキシゲナーゼとその産物（アラキドン酸代謝物）の循環器疾患発症への関与機序の解明は重要である。シクロオキシゲナーゼはアラキドン酸をプロスタグランジン H2 (PGH2) に変換することで、PGH2 の代謝生成物である、5種類の PG (PGE2・I2・D2・F2 $\alpha$ ・トロンボキサン A2) の産生に関与する。5種類の PG のなかには、血管収縮反応や拡張反応、塩分排泄または貯留に関与するものが混在しており、COX の役割を予測することは困難である。

申請者らは、シクロオキシゲナーゼ-1 遺伝子欠失(COX-1 $^{-/-}$ )マウスは、正常食塩食下で、正常マウスと比べて、トロンボキサン A2 と PGE2 の産生が低下し、睡眠中の降圧が交感神経活動性の亢進のため妨げられている (non-dipper 型) ことを報告した (川田・今井ら, Hypertension 45:1131-8, 2005)。臨床的に、non-dipper 型の血圧変動は、心血管病のリスク増加および食塩感受性と関連することが示されている。食塩感受性は心血管疾患、インスリン抵抗性、糸球体硬化の危険因子であり、その発症機序および治療法の解明は重要である。しかしながら、高食塩負荷 COX-1 $^{-/-}$ マウスでの交感神経活動性亢進や ENaC 活性亢進の分子生化学的な機序についての知見は限られている。COX-1 $^{-/-}$ マウスとは反対に PGE2 の産生が亢進した病態である hyperprostaglandin E syndrome/ antenatal Bartter syndrome (HPS/aBS) では、NSAIDs の一つであるインドメサシンで改善する尿細管からの塩分喪失性多尿症を認めることから (Pediatrics 108:E5, 2001)、尿細管の水・ナトリウム利尿制御への PGE2 の関与は明らかである。PGE2 には、4種類の受容体サブタイプ(EP1~4)が存在し、EP2 と EP4 は adenylylate cyclase (AC) を活性化し、反対に EP3 は AC を抑制する。PGE2 のよる水・ナトリウム利尿の分子生化学的な機序については、Aquaporin2 (AQP2) の管腔側への移行の制御が報告されているが、それ以外の電解質制御機構は明らかでない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は COX-1 代謝産物の高食塩食下での生理機能を解明することを目的とする。以下の3つの項目を明らかとすることにある。

- (1) COX-1 代謝産物の高食塩食下での動態と表現系への関与について COX-1 ノックアウトマウスを用いて解明す

る。

- (2) COX-1 代謝産物で特に重要性が明らかとなったプロスタグランジン E2 の受容体である EP4 受容体が水・Na 排泄に果たす役割を動物個体レベルで明らかとする。
- (3) 腎集合管における EP4 受容体細胞内シグナルと水・Na 排泄制御機構の関連を明らかとする。

## 3. 研究の方法

### (1) 食塩抵抗性と多尿抑制への COX-1 の関与

COX-1 ノックアウトおよびワイルドマウスの実験には Black6/129 バックグラウンドのオスを用いた。持続的血压測定にはテレメトリ法を用い、カテーテル部分は内頸動脈に挿入した。高食塩食 (Na 含有量 6.0g/100g) 開始前から血圧を持続的にモニターすることで、食塩感受性の有無を検討した。

尿のサンプリングは、メタボリックケージを用いた 24 時間蓄尿で行い、尿中プロスタグランジン代謝産物 (TxB<sub>2</sub>, 6-ketoPGF<sub>1 $\alpha$</sub> , PGE<sub>2</sub>, 11- $\beta$  PGF<sub>2 $\alpha$</sub> )・尿中カテコールアミン代謝産物 (メタネフリン・ノルメタネフリン)、および尿中アルドステロンは EIA キットを用いて検討した。

### (2) 食塩抵抗性と多尿抑制への PGE2-EP4 受容体の関与

Wister ラットのオスを用い、選択的 EP4 作動薬 (ONO-AE1-329:EP4AG) を腹腔内投与 (6x10<sup>-10</sup>mol/gram : 1 時間毎に計 2 回) し、薬剤投与開始から 2 時間目まで、持続的に採尿を行った後、採血をよび腎臓のサンプリングを行った。尿量および尿浸透圧、Fractional excretion of Na を計算し、薬剤が水・Na 排泄に与える影響について検討した。

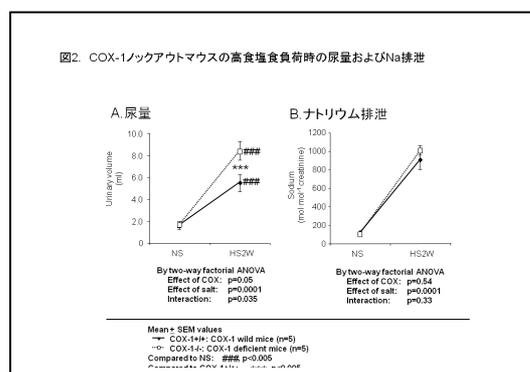
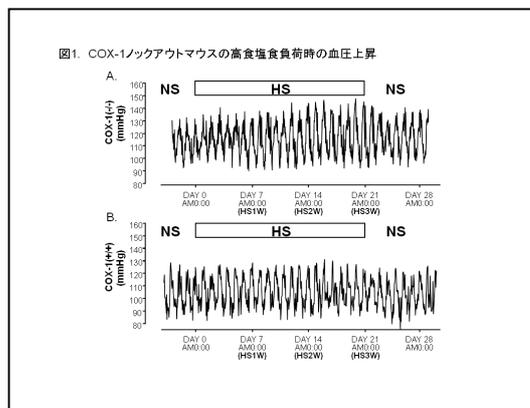
選択的 EP4 作動薬の集合管細胞への効果は、培養マウス皮質集合管細胞 (M-1) に、選択的 EP4 作動薬 (EP4AG) 1 $\mu$ M または選択的 p38 阻害薬 (BIRB796:10 $\mu$ M, Axon Medchem, Groningen, Netherlands) を負荷して検討した。mRNA 発現は、18S 発現をコントロールとした real-time PCR 法を用いて半定量した。用いたプライマー配列を以下に示す (MKP-1 forward, 5'-acatcagctcctggttcaacg -3', MKP1 reverse, 5'-tgaggttaagcaaggcagatgg -3'; alphaENaC forward, 5'-ccaagtggacaggaaggactg -3', alphaENaC reverse, 5'-aagcgggtaccactctctcag -3'; and 18S forward, 5'-cgctaccacatccaaggaa -3', 18S reverse, 5'-agctggaattaccgcggc -3'.)。蛋白発現

は以下の抗体を用いてウェスタンブロッティング法で検討した (anti-p38 antibody 1:1000 (Cell Signaling Technology), anti-phospho p38 antibody 1:1000 (Cell Signaling Technology), anti-Akt antibody 1:1000 (Cell Signaling Technology), anti-phospho Akt antibody 1:1000 (Cell Signaling Technology), anti-phospho Sgk-1 antibody 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA), anti-beta actin antibody 1:10000 (Sigma-Aldrich))。

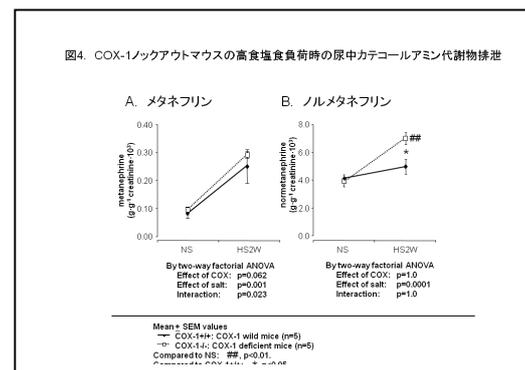
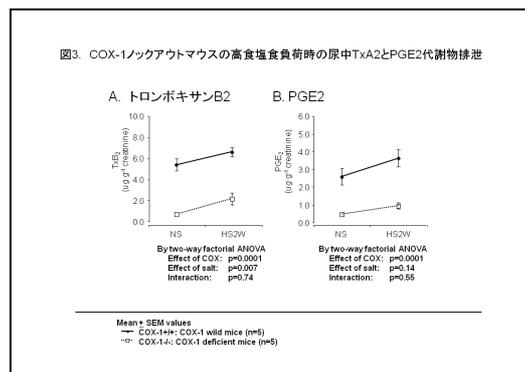
#### 4. 研究成果

##### (1) 食塩抵抗性と多尿抑制への COX-1 の関与

COX-1 ノックアウトマウスは、ワイルドマウスに比較して、高食塩食により軽度 (収縮期血圧で+10mmHg) の血圧上昇と多尿を呈した (図1, 2)。



COX-1 ノックアウトマウスでは、尿中 PGE2 と TxA2 代謝産物の排泄が正常食および高食塩食下で共に 70%近く低下していた (図 3)。一方、COX-1 ノックアウトマウスでの尿中 PGI2 と PGF2 代謝産物の排泄は保たれていた。COX-1 ノックアウトマウスは高食塩食下で、交感神経活動性の指標である尿中ノルメタネフリン排泄の亢進を認めた (図 4)。

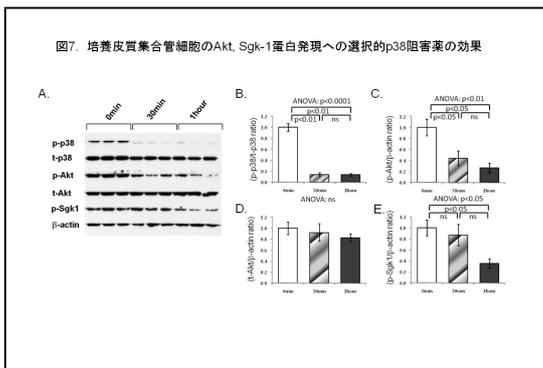
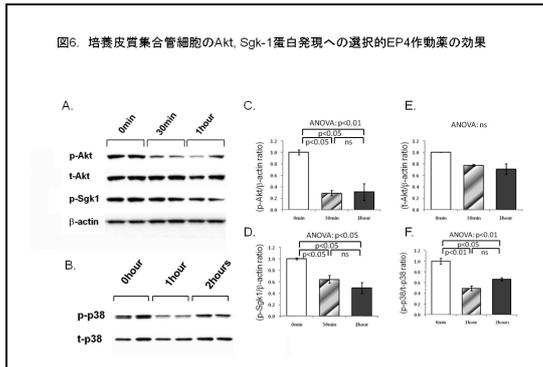
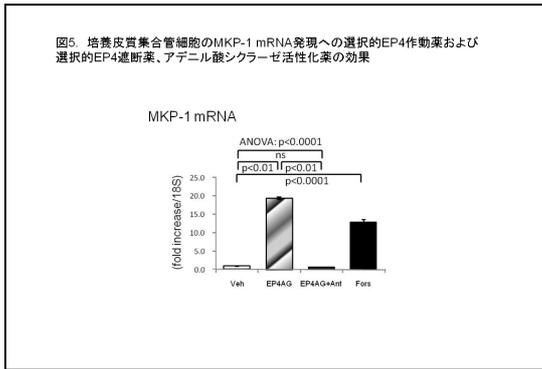


以上の結果より、COX-1 は高食塩食下で PGE2 と TxA2 産生を介して、食塩抵抗性と多尿抑制に関与すると結論された。

##### (2) 食塩抵抗性と多尿抑制への PGE2-EP4 受容体の関与

PGE2 が過剰に生成される病態である hyper PGE2 syndrome は、塩喪失と多尿を特徴とするが、この特徴は PGE2 が食塩抵抗性と多尿抑制に関与するととの COX-1 ノックアウトマウスで得られた知見とは合致しない。しかしながら、PGE2 には 4 種類の受容体 (EP1-4) が存在し、特に EP2/4 と EP3 は全く反対の作用を示すことが知られている。そこで、cAMP の産生を増加する選択的 EP4 受容体作動薬をラットに投与すると、尿中 Na 排泄を維持したまま、尿濃縮を生じた。

選択的 EP4 受容体作動薬が水再吸収を亢進する一方、Na 再吸収は亢進しない機序として、選択的 EP<sub>4</sub> 作動薬が、培養腎皮質集合管 (M-1) 細で MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1) の発現 (図 5) とそれに伴う p38 蛋白リン酸化の抑制 (図 6) を誘導すること、さらに、選択的 p38 阻害薬が、Akt, Sgk1 蛋白リン酸化を抑制すること (図 7) で、Na 再吸収を抑制している可能性を明らかとした。本研究より、EP<sub>4</sub> 受容体活性化の水再吸収の促進と Na 再吸収の抑制機序の一端が示された。



electrolytes transport. American society of nephrology 2010: 2010年11月18日: Denver, USA

- 川田典孝, 守山敏樹 他 PGE2-EP4 シグナルは、p38, Akt と Sgk1 蛋白リン酸化抑制により、Na 再吸収や K 排泄を抑制する 日本腎臓学会: 2010年6月16日 神戸
- Kawada N, Moriyama T 他 The role of EP4 receptors in the regulation of renal tubular electrolytes transport. NEXUS 2010: 2010年4月16日: Kyoto, Japan
- Kawada N, Moriyama T 他 The Activation of PGE2 receptor type4 in renal collecting ducts inhibits the ENaC expression by the activation of PKA and the induction of MKP-1 via non-PKA pathway. American society of nephrology 2009: 2009年10月29日: San Diego, USA
- 川田典孝, 守山敏樹 他 PGE2-EP4 シグナルの Akt, Sgk-1 リン酸化低下機序に関する検討 日本腎臓学会: 2009年6月3日 横浜
- Kawada N, Moriyama T 他 The Activation of PGE2-EP4 pathway inhibits the ENaC expression in renal collecting ducts by the activation of PKA-ERK signaling and inhibition of PI3K-Akt signaling. American society of nephrology 2008: 2008年11月8日: Philadelphia, USA
- 川田典孝, 守山敏樹 他 PGE2-EP4 受容体シグナルは、Sgk-1 の活性化低下と ERK の活性化を介して ENaC を制御する 日本腎臓学会: 2008年5月30日 福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

守山 敏樹 (MORIYAMA TOSHIKI)  
大阪大学・保健センター・教授  
研究者番号: 30283815

### (2) 研究分担者

川田 典孝 (KAWADA NORITAKA)  
大阪大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 80437326

## 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1件)

- N-Kawada, T-Moriyama 他 Towards developing new strategies to reduce the adverse side effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Clinical and experimental nephrology 査読あり 2011 in press.

[学会発表] (計7件)

- Kawada N, Moriyama T 他 The role of EP4 receptors/MKP-1/p38MAPK signaling in the regulation of renal tubular