

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月16日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：H23～H24
 課題番号：23790932
 研究課題名（和文） ヒト尿細管に特異的なアンジオテンシン II による Na 輸送活性化機序と生理的意義
 研究課題名（英文） The details and physiologic significance of human renal proximal tubule specific stimulation of Na transport by Angiotensin II
 研究代表者 堀田 晶子
 (HORITA SHOKO)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：20534895

研究成果の概要（和文）：

AngII はマウスの近位尿細管輸送に対し低濃度で刺激、高濃度で抑制を示すが、ヒトでは濃度依存的かつ一相性に亢進させる。この機序を解明するため、ヒト、野生型及び cGKII 欠損マウス腎にて NBCe1 活性測定等を行った。

ヒトでは高濃度 AngII の作用は NO 阻害により消失し、NO ドナーは ERK を介し NBCe1 を亢進させた。野生型マウスでは高濃度 AngII の作用は NO 阻害により刺激に転じ、NO ドナーは NBCe1 を抑制した。

ヒトでは NO 経路から ERK 活性化により AngII が一相性刺激作用を持ち、AngII による血圧調節がより重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

AngII has biphasic effect (stimulation in low concentration and inhibition in high concentration) on mouse proximal tubule (PT) but in human AngII monophasically stimulates PT transport. To clarify this, NBCe1 activity in PT was measured in human, wild-type and cGKII^{-/-} mice kidney. In human inhibition of NO blocked AngII effect, meanwhile NO donor stimulated NBCe1 activity via ERK. In wild-type mice the inhibition by high concentration of AngII changed to stimulation by inhibition of NO, while NO donor suppressed NBCe1. It was suggested that in human PT AngII has monophasic stimulatory effect via NO and consequent ERK activation, and regulation of blood pressure by AngII is more important.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,390,000	990,000	4,290,000

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：高血圧学

1. 研究開始当初の背景

アンジオテンシン II (AngII) は血管および腎への作用を介して血圧を調節しているが、近年 Coffman らは AngII 持続注入による高血圧発症モデルにおいては腎 AT1 受容体を介する Na 再吸収亢進が中心的な役割を果たすこと

を報告した (Proc Natl Acad Sci USA 103: 17985, 2006)。

興味深いことに AngII は腎内の主要な標的セグメントである近位尿細管 Na 輸送を二相性に調節することが知られている。すなわちウサギ・ラット・マウスの近位尿細管において AngII は低濃度 (10^{-10} M 程度) で刺激作用を持

つが、 10^{-8} M程度で刺激作用は消失し、さらに高濃度 (10^{-6} M程度) では逆に抑制作用を示す (Pflugers Arch 367:295, 1977, J Clin Invest 73:507, 1984)。この二相性作用を司る受容体については長年議論が分かれていたが、申請者らはAT1A欠損マウスなどを用いた検討により、AngIIの基底側 (Hypertension 40:707, 2002) および管腔側 (J Am Soc Nephrol 14: 1116-1122, 2003) からの二相性作用がともにAT1 受容体を介していることを証明した。さらに申請者らは低濃度AngIIの刺激作用にはERK経路が主に関与し、高濃度AngIIの抑制作用にはcPLA2/P450/5, 6-EET経路が関与することも明らかにした (J Am Soc Nephrol 19: 252, 2008, Hypertension Res 31: 2155, 2008)。

2. 研究の目的

ところが、最近になって高濃度 AngII の抑制作用には一酸化窒素 (NO) /グアニリルシクラーゼ (GC) /cGMP 経路の関与も報告された (Hypertension 52: 1099, 2008)。

ここで AngII には体循環とは独立して調節される局所産生系が存在し、特に腎内 Ang II 濃度は血中よりはるかに高く維持されている。しかし本来、腎からの Na 再吸収を亢進させるはずの AngII が何故、高濃度で Na 輸送を抑制するのか、その生理的意義は不明である。また従来 AngII の尿細管輸送調節作用については主に動物由来の尿細管もしくは培養細胞を用いた解析がなされており、AngII が本当にヒトの intact な尿細管でも二相性作用を持つのかどうかは不明であった。そこで本研究の目的を、ヒト尿細管における AngII の特異的作用の機序の解明とした。

3. 研究の方法

AngII のヒト近位尿細管重炭酸再吸収に対する作用の検討 : AngII のヒト近位尿細管重炭酸再吸収に対する作用を明らかにするために、単離したヒト近位尿細管を微小灌流し申請者らが開発・応用してきた蛍光色素を用いた microfluorescence stop-flow 法

(Pflugers Arch 439:208, 1999, J Am Soc Nephrol 14:1116-1122, 2003, J Am Soc Nephrol 19: 252, 2008) を用いて重炭酸再吸収量に対する AngII 濃度依存性作用を明らかにする。この際に AT1 阻害剤や NOS/NO/cGMP 経路の阻害剤に加えて NO ドナー、細胞膜透過性 cGMP などの効果も合わせて検証し、AngII 作用のシグナル伝達系を明らかにする。また管腔側に添加した AngII の濃度依存性作用を明らかにするとともに、細胞膜グアニリルシクラーゼを介する ANP 作用も合わせて検討する。

AngII のマウス近位尿細管重炭酸再吸収に対する作用の検討 : AngII のマウス近位尿細管重炭酸再吸収に対する作用と NOS/NO/cGMP 経路の関与を明らかにするために、まず野生型マウスから得られた単離尿細管を微小灌流し、microfluorescence stop-flow 法により AngII の濃度依存性を明らかにする。この際に AT1 阻害剤や NOS/NO/cGMP 経路の阻害剤に加えて NO ドナー、細胞膜透過性 cGMP などの効果も合わせて検証し、AngII 作用のシグナル伝達系を明らかにする。さらに同様の実験を cGKII 欠損マウスを用いて検討し、NOS/NO/cGMP 経路と AT1 受容体、cPLA2/P450/5, 6-EET 経路の関係を明らかにする。

AngII 尿細管作用における NOS/NO/cGMP/cGK の意義 : AngII の尿細管作用における NOS/NO/cGMP/cGK の意義を明らかにするために、まず AngII による NO 発現量および細胞内 Ca 濃度増加反応について、ヒトおよびマウス・ウサギから得た単離尿細管を申請者らの既報の方法 (Hypertension 40:707, 2002, J Am Soc Nephrol 14:1116-1122, 2003) に従い微小灌流し、蛍光色素 (DAF2, Fura2 など) を用いて定量化し濃度反応性を比較する。cGMP 関与については同様に微小灌流した単離尿細管を用いて、細胞膜透過性アナログおよび非透過性アナログの作用を比較し、細胞膜受容体の関与についても検討する。また特異的阻害に加えて cGKII 欠損マウス (J Clin Invest 98:662, 1996) から得た尿細管を用いた検討も行い、NOS/NO/cGMP 経路における AngII シグナリングの詳細も明らかにする。

cGK の関与については、GSK3 β (J Clin Invest 118:2506, 2008) などを基質とするキナーゼアッセイを行い検証する。具体的には腎癌摘出術で得られた正常腎皮質およびマウス・ラットの腎皮質をホモゲナイズし、得られた蛋白抽出液を ATP, cGMP を含む反応液中で一定時間反応させた後、GSK3 β 抗体およびリン酸化 GSK3 β 抗体を用いた Western blot を行い、cGK キナーゼ活性を定量化し、比較する。同時に ERK, リン酸化 ERK 抗体を用いた解析も行い、cGMP/cGK と MEK/ERK 経路のクロストークについても種差の有無を明らかにする。この際にキナーゼアッセイの特異性を検証するために cGK 特異的阻害剤の抑制効果を確認し、また外因性 cGKII 添加による反応増強効果も確認する。

4. 研究成果

まず、AngIIは他の種と全く異なるヒト特異的な濃度依存性刺激作用を有することを確認した。すなわちヒト近位尿細管の主要なNa

輸送体であるNa-HCO₃共輸送体(NBCe1)活性はAngII 10⁻¹⁰ Mにより 138%、10⁻⁸ M で 160%、10⁻⁶ M で 203%まで著明に亢進した (figure1)。

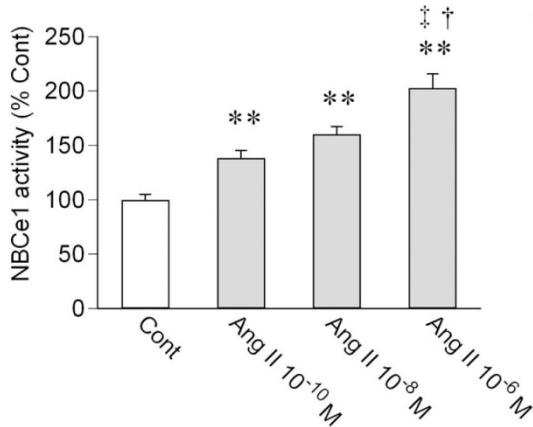


Figure 1

次に、ヒトPTに特有のAngII作用機序を明らかにするために、腎癌摘出術から得られた正常ヒト腎皮質におけるWestern blotによるキナーゼアッセイ及びBCECFを用いた単離灌流PTの細胞内pH測定実験を行った。ヒトでは10⁻⁶M Ang II のNBCe1 亢進作用 (+103%)はNOS阻害剤(L-NAME) (figure2A)、可溶性グアニリルシクラーゼ (sGC) 阻害剤 (ODQ) (figure2C)により完全に阻害され、NOドナー(SNP) (figure2B) および 8Br-cGMP (figure2D)はNBCe1 活性を亢進させた (+40~80%)。MEK阻害剤PD98059 の存在下では、AngIIの濃度依存性刺激作用は消失していた。

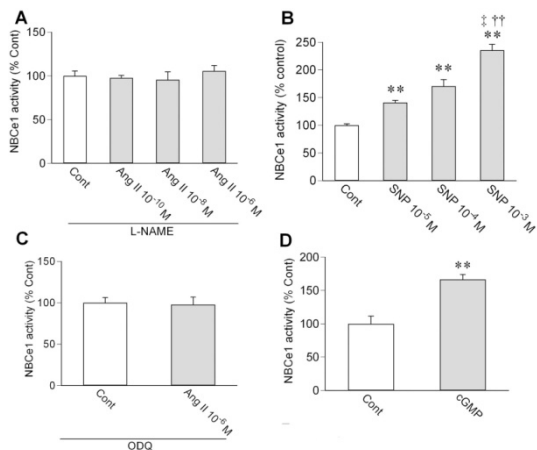


Figure 2

一方で、cGKII 阻害剤 KT5823 の存在下では、AngII の濃度依存性刺激作用はほぼすべて残存していた。キナーゼアッセイでは、リン酸

化 ERK は AngII の濃度依存性に発現亢進が見られた。すなわち、これらの刺激作用は cGKII ではなく ERK 経路に依存していた。

一方、野生型マウスでは 10⁻⁶ M AngIIが抑制作用 (-41%) を示す (figure3A) がL-NAME (figure3B), ODQ (figure3D)の存在下では亢進作用 (+20~40%) へと転じた。またNOドナー (SNP) (figure3C)および 8Br-cGMPはヒトではNBCe1 活性を亢進させたが、マウスではNBCe1 活性を逆に抑制した(-20~40%)。さらに SNP および 8Br-cGMPはヒト腎皮質ではcGKII活性化を伴わずにERKを活性化させたが、キナーゼアッセイにてマウス腎皮質では逆にcGKIIを活性化したがERKを活性化しなかった。

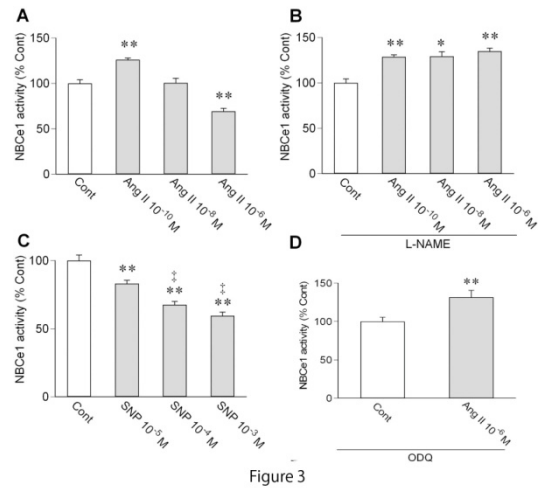


Figure 3

cGKII 欠損マウスでは全ての濃度の AngII は刺激作用(+30%)を有しており、SNP および 8Br-cGMP はNBCe1 活性に影響を与えなかった。

また、cGKII 阻害薬 KT5823 の存在下では、ヒトでは上述のように AngII の刺激作用は残存したが、マウスでは AngII の抑制作用が消失し、cGKII 欠損マウスに類似した刺激作用に転じた。

以上より、マウスでは高濃度 AngII の抑制作用はNO/sGC/cGMP/cGKII 経路に依存することが示された。ヒトではNO/sGC/cGMPからcGKIIを介さずにMEK/ERKを活性化する特異的経路が存在するため Ang II が一相性刺激作用を持つと考えられた。

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5件):すべて査読あり

Suzuki M, Seki G, Yamada H, Horita S, Fujita T. Functional Roles of Electrogenic Sodium Bicarbonate Cotransporter NBCe1 in Ocular Tissues. *Open Ophthalmol J.* 2012;6:36-41.
DOI: 10.2174/1874364101206010036

Yamazaki O, Yamada H, Suzuki M, Horita S, Shirai A, Nakamura M, Satoh N, Fujita T, Seki G. Identification of dominant negative effect of L522P mutation in the electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCe1. *Pflugers Arch.* 2013; Apr 05 (epub ahead)
DOI: 10.1007/s00424-013-1277-1

Horita S, Seki G, Yamada H, Suzuki M, Koike K, Fujita T. Insulin resistance, obesity, hypertension, and renal sodium transport. *International Journal of Hypertension* 2011;391762:1-8
DOI: 10.4061/2011/391762

Endo Y, Suzuki M, Yamada H, Horita S, Kunimi M, Yamazaki O, Shirai A, Nakamura M, Iso-O N, Li Y, Hara M, Tsukamoto K, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Seki G, et al. Thiazolidinediones enhance sodium-coupled bicarbonate absorption from renal proximal tubules via PPAR γ -dependent nongenomic signaling. *Cell Metabolism* 2011;13(5):550-61
DOI: 10.1016/j.cmet.2011.02.015

Lo YF, Yang SS, Seki G, Yamada H, Horita S, Yamazaki O, Fujita T, Usui T, Tsai JD, Yu IS, Lin SW, Lin SH. Severe metabolic acidosis causes early lethality in NBC1 W516X knock-in mice as a model of human isolated proximal renal tubular acidosis. *Kidney International* 2011;79(7):730-41
DOI: 10.1038/ki.2010.523

〔学会発表〕(計8件)

白井雅弓, 堀田晶子 他
アンジオテンシン(Ang) II のヒト近位尿細管特異的作用機序
第55回日本腎臓学会学術総会
2012年06月01日~2012年06月03日
パシフィコ横浜

中村元信, 堀田晶子 他

インスリン抵抗性におけるインスリンの近位尿細管輸送亢進作用機序
第55回日本腎臓学会学術総会
2012年06月01日~2012年06月03日
パシフィコ横浜

Motonobu Nakamura, Shoko Horita, et al. Stimulatory Effect of Insulin on Renal Proximal Na Transport Is Preserved in Insulin Resistance
ASN Kidney Week 2012
2012年11月01日~2012年11月04日
San Diego, U.S.A.

Ayumi Shirai, Shoko Horita, et al. NO/sGC/cGMP/ERK Pathway Mediates a Unique Dose-Dependent Stimulation of Human Proximal Transport by Angiotensin II
ASN Kidney Week 2012
2012年11月01日~2012年11月04日
San Diego, U.S.A.

白井雅弓, 堀田晶子, 他
アンジオテンシン II のヒト近位尿細管作用における NO/sGC/cGMP 経路の意義
第54回日本腎臓学会学術総会
2011/06/15
パシフィコ横浜

中村元信, 堀田晶子, 他
インスリンの近位尿細管輸送亢進作用はインスリン抵抗性でも保たれる
第54回日本腎臓学会学術総会
2011/06/16
パシフィコ横浜

Yamazaki O, Yamada H, Suzuki M, Horita S, Nakamura M, Seki G, Fujita T. The cytosolic mutant L522P of NBCe1 has a dominant negative effect.
ASN Kidney Week 2011
2011/11/10
Philadelphia, USA.

Nakamura M, Yamazaki O, Yamada H, Suzuki M, Horita S, Seki G, Fujita T. Stimulatory effect of insulin on renal proximal Na transport is preserved in obesity-induced insulin resistant rats.
ASN Kidney Week 2011
2011/11/12
Philadelphia, USA.

〔図書〕(計2件)

Shoko Horita, Motonobu Nakamura, Masashi Suzuki, Hideomi Yamada and George Seki

Obesity Epidemic - Role of Altered Renal Sodium Transport in Insulin Resistance and Hypertension pp.18
iConcept Press. 2013
ISBN: 978-1477554-96-8.

George Seki, Shoko Horita, et al.
Mutations in Human Genetic Disease - Pathophysiological roles of mutations in the electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCe1 pp.15
InTech. 2012
ISBN 980-953-307-125-6.

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者：

堀田 晶子 (HORITA SHOKO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20534895

(2)研究分担者：なし