

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790949

研究課題名(和文)腎産生GABAの分泌調節が、高血圧の成因維持に果たす役割の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of blood pressure regulation by renal GABAergic system

研究代表者

谷田部 淳一 (Yatabe, Junichi)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10566681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)： $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)は、抑制性の神経伝達物質として知られる。GABAは血圧低下を目的に食品に添加されたりしているが、その作用機序は不明である。

今回の研究では、ラットの腎臓を摘出し様々なGABA関連分子の発現解析を行った。WKYの腎皮質には、GABA(A)、GABA(B)、GABA(C)受容体がそれぞれ腎特異的な形式で発現していた。また、GABA合成酵素GAD67のヘテロノックアウトマウスを用いた検討も行った。

腎GABA系への刺激がナトリウム利尿や血圧低下をもたらすメカニズムが明らかになれば、腎GABA系を司る分子が、高血圧症の病態診断や降圧治療の新たなターゲットとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Gamma-aminobutyric acid (GABA) is an important neurotransmitter, but recent reports have revealed the expression of GABAergic components in peripheral, non-neural tissues. GABA administration induces natriuresis and lowers blood pressure, suggesting renal GABA targets. However, systematic evaluation of renal GABAergic components has not been reported. In this study, rat kidney was used to see expressions of GABA-related molecules. GABA<sub>A</sub> receptor subunits,  $\alpha$ 1,  $\beta$ 3 and  $\pi$ , both types of GABA<sub>B</sub> receptors, R1 and R2, and GABA<sub>C</sub> receptor  $\rho$ 1 and  $\rho$ 2 subunit expressions were detected. GABA producing enzymes, its transporters and degrading enzyme were also expressed. In vivo study, GAD67 hetero knockout mice paradoxically showed a reduced blood pressure compared to wild-type mice.

In summary, unique set of GABA related molecules and functions were found in rat kidney cortex. A possible existence of local renal GABAergic system is suggested.

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：GABA 高血圧 腎臓 食塩 尿細管

### 1. 研究開始当初の背景

-アミノ酪酸( $\gamma$ -aminobutyric acid; GABA)は GABA 受容体を介して作用する中枢の抑制性神経伝達物質であり、GABA 受容体のアゴニストは睡眠導入剤や麻酔薬として広く用いられている。最近では GABA や GABA 受容体は中枢神経だけではなく、末梢神経や非神経組織での発現が認められるが、その機能は未だ明らかになっていない。一方で、腎臓は水やナトリウムの再吸収を介し血圧調節など重要な役割を果たしている。ラットの腎臓では、結合尿細管や集合管に GABA の存在が示され、腎臓での非神経的作用・機能があると考えられる(J Histochem Cytochem. 1992; 40: 675-680)。また、ヒトやラットに GABA を経口投与すると Na 利尿が引き起こされ、血圧が低下(Biosci Biotechnol Biochem. 2007 Jan; 71 :165-173)したり、GABA(A)、GABA(B)受容体のアゴニストが水利尿やナトリウム利尿を引き起こす(J Pharmacol Exp Ther. 1996; 279: 602-607)こと、さらに GABA(B)受容体刺激が虚血再灌流による腎機能障害を軽減すること(JPET 338:767-774, 2011)がすでに報告されている。以上から、腎臓での GABA 刺激が血圧調節や腎保護作用に大きく関連している可能性があると考えられるが、そのメカニズムの詳細は不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、in vitro 実験にて高血圧の病態と GABA 分泌調節の関連を解明する。さらに in vivo 実験として、GABA 合成酵素である GAD67 のヘテロノックアウトマウスを用い、GABA 合成の低下が高血圧に関連した表現型に与える影響を解析する。

### 3. 研究の方法

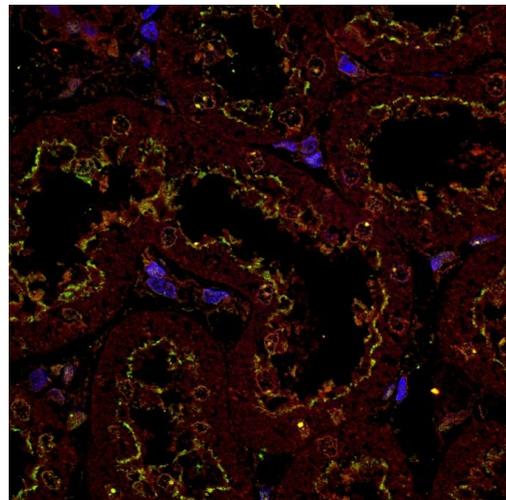
研究 9 週齢の正常血圧ラット(Wistar-Kyoto rat; WKY)の腎臓を摘出し、mRNA、蛋白、組織切片を調整した。GABA(A)受容体のサブユニット 16 種(1-6, 1-3, 1-3, , , ), GABA(B)受容体のサブタイプ 2 種(R1, R2)、GABA(C)受容体のサブユニット 3 種(1-3)、GABA 合成酵素(glutamate decarboxylase; GAD)のサブタイプ 2 種(GAD65, GAD67)、GABA トランスポーター(GABA transporter; GAT)のサブタイプ 3 種(GAT1-3)、GABA 分解酵素(4-aminobutyrate aminotransferase; ABAT)の発現を RT-PCR 法によって検出した。また、mRNA の発現を確認できた分子は、それぞれに特異的な抗体を用いてウェスタンブロット法、免疫組織染色法を行った。

研究 GABA 産生酵素(GAD67)減少マウス(GAD67-GFP ヘテロノックインマウス)と野生型コントロールマウス(C57BL/6N)の表現型を比較した。約 16 週齢のオスマウスを実験に使用した。血圧はテールカフ法で測定した。

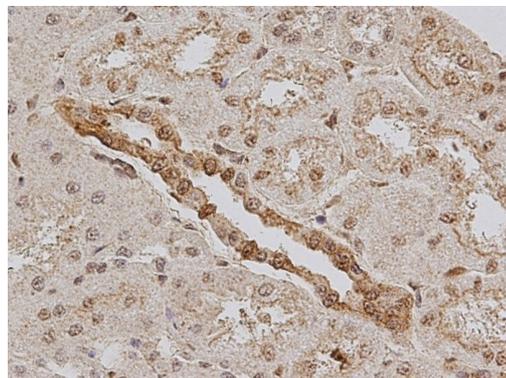
また、下大静脈血および膀胱穿刺で採取した尿にて GABA 濃度や電解質濃度を測定した。

### 4. 研究成果

研究 WKY の腎皮質において、GABA(A)受容体は 16 種類のサブユニットのうち 1、3、  
、  
サブユニットの mRNA が発現していた。GABA(B)受容体は R1、R2 サブタイプの両者、GABA(C)受容体は 3 種類のサブユニットのうち 1-2 サブユニットの mRNA が検出された。一方、GABA(A)受容体 2-6、1-2、1-3、  
、GABA(C)受容体 3 サブユニットの mRNA は検出されなかった。また、GABA 合成酵素では GAD65、GAD67 の両者、GABA トランスポーターでは 3 種のサブタイプのうち GAT2、GABA 分解酵素 ABAT の mRNA が存在した。また、これらの分子はそれぞれに特異的な抗体を用いて蛋白レベルの発現も確認した。GABA(A)受容体の蛍光免疫組織染色の結果から、GABA(A)受容体 1、3、サブユニットが腎尿細管に共発現している可能性が示唆された。(図 1)。また、GABA(B)受容体 R2 サブタイプは、主に集合管に発現が見られた(図 2)。



(図 1) GABA<sub>A</sub> 受容体 3 サブユニット(緑)と 1 サブユニット(赤)の共発現(黄)

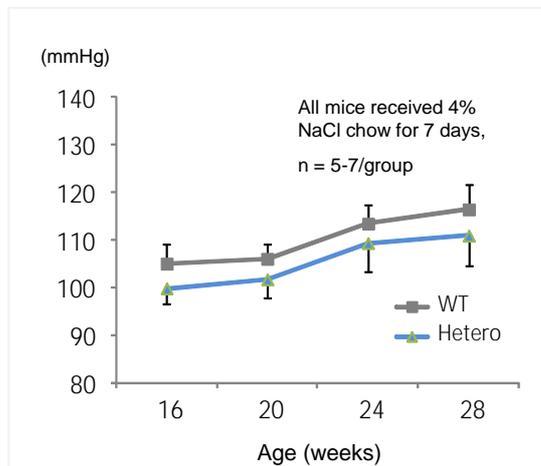


(図 2) GABA<sub>B</sub> 受容体 R2 サブタイプの発現

以上より、ラット腎臓において中枢とは異なる特徴的な GABA 関連分子の発現プロフィールを初めて明らかにした。特に、腎尿細管では GABA(A) 受容体の サブユニットが サブユニットで置換され、サブユニットで五量体を形成している可能性が示唆された。

研究 野生型マウス、ヘテロマウスの間で、血圧や心拍数にはイソフルラン麻酔下、覚醒時とも有意な差を認めなかった。血中および尿中のナトリウム、クレアチニン値にも有意な差を認めなかった。血漿 GABA 濃度は、野生型とヘテロマウスで同等 (野生型  $100 \pm 13$  vs. ヘテロ  $102 \pm 10$  pmol/ml,  $n = 10-12$ ) であったが、尿中 GABA 濃度はヘテロマウスで野生型の約 1.38 倍と有意に高値であった (野生型  $41030 \pm 2841$  vs. ヘテロ  $56418 \pm 4942$  pmol/ml,  $n = 10-11$ ,  $P < 0.05$ )。

GABA 産生酵素(GAD67)減少マウスでは、野生型マウスに比べ、血圧に有意な差を認めなかった。



(図 3) GAD67 ヘテロマウスの収縮期血圧と野生型の収縮期血圧の比較

このマウスモデルにおいて、生下時には脳の GABA 含有量が野生型の 60-70%に減少しているが、7 週齢では有意な差が無くなると報告されており、これには GAD65 による代償などが考えられている。本研究では、このマウスモデルで尿中 GABA 濃度が、むしろ有意に高いことが明らかとなった。尿中の GABA は、腎由来の可能性が高いが、この機序および意義は不明である。

これらの結果から、今後、腎臓における GABA 系の構成や情報伝達機構を詳細に検討することで、腎局所での GABA による血圧調節機構を明らかにできる可能性があると考えられる。

##### 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 0 件)

[学会発表](計 15 件)

Yatabe M, Yatabe J, Takano K, Kimura J, Watanabe T. GABA Concentrations and Blood Pressure-related Phenotypes of GAD67-GFP Hetero Knock-in Mice, The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology (APCN2014)

Takano K, Yatabe J, Yatabe MS, Sanada H, Jose PA, Watanabe T, Kimura J. Co-Assembly of GABA(A) Receptor  $\alpha 1$  and  $\alpha 3$  Subunits and Its Expression in Rat and Human Kidney, Kidney Week 2013

高野梢、谷田部淳二、谷田部緑、渡辺毅、木村純子 ラット腎皮質における GABA(A) サブユニットの特徴的な共発現の解析、第 36 回日本高血圧学会総会

谷田部緑、谷田部淳二、高野梢、渡辺毅、柳川右千夫、福田敦夫、木村純子 GABA 産生酵素(GAD67)減少モデルマウスの血圧関連表現型、第 36 回日本高血圧学会総会

高野梢、谷田部淳二、谷田部緑、渡辺毅、木村純子 腎臓に発現する GABA(A) 受容体の主要サブユニットは  $\alpha 1$  である、日本薬理学会北部会

Yatabe J, Yatabe SM, Takano K, Sanada H, Watanabe T and Kimura J. Identification of functional GABAergic system in rat kidney, World Congress of Nephrology 2013

高野梢、谷田部淳二、谷田部緑、安倍麻美、鈴木友、渡辺毅、木村純子 ラット腎皮質に発現する GABA 関連分子のプロファイル、第 56 回日本腎臓学会学術総会

谷田部淳二、谷田部緑、高野梢、安倍麻美、鈴木友、眞田寛啓、渡辺毅、木村純子 ラット腎皮質における GABA の産生、放出とその局所作用を司る分子群の同定、第 86 回日本内分泌学会学術総会

谷田部淳二、谷田部緑、高野梢、安倍麻美、鈴木友、眞田寛啓、渡辺毅、木村純子 ラット腎皮質に発現する GABA 関連分子の同定、第 86 回日本薬理学会年会

谷田部淳二、高野梢、谷田部緑、安倍麻美、鈴木友、眞田寛啓、渡辺毅、木村純子 高血圧モデルラット腎皮質の GABA 関連分子発現は、食塩負荷により変化する、第 86 回日本薬理学会年会

Takano K, Yatabe J, Yatabe MS, Sanada H, Watanabe T, Kimura J. Characteristic Expressions of GABA Receptors and GABA Producing/Transporting Molecules in Rat Kidney, Kidney Week 2012

Yatabe J, Yatabe MS, Takano K, Watanabe T, Felder RA, Jose PA, Sanada H, Kimura

J. Renal GABA Production, Release and Locally-Functional GABA Signaling in Rodents, Kidney Week 2012

谷田部淳一、谷田部緑、高野梢、井上浩一、森島寿貴、福田敦夫、柳川右千夫、真田寛啓、渡辺毅、木村純子腎性 - アミノ酪酸(GABA)産生と高血圧モデルラットにおける末梢性 GABAergic system の働き、第 55 回日本腎臓学会学術総会

谷田部淳一、谷田部緑、高野梢、井上浩一、森島寿貴、福田敦夫、柳川右千夫、真田寛啓、渡辺毅、木村純子末梢性 - アミノ酪酸の産生と腎 GABAergic system の制御機構に関する検討、第 85 回日本内分泌学会学術総会

Takano K, Yatabe J, Yatabe SM, Sanada H, Watanabe T, Kimura J. Systematic evaluation of GABA receptor subtype and subunit mRNA in renal cortex of hypertensive model rats, The 85th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society

〔図書〕(計 0 件)

〔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

<http://www.fmu.ac.jp/kenkyu/Profiles/16/0001568/profile.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷田部 淳一 (YATABE, Junichi)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10566681