

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590283

研究課題名(和文) ENaC制御因子を分子標的としたフラボノイドによる食塩感受性高血圧抑制機構の解明

研究課題名(英文) Inhibitory mechanism of quercetin on ENaC in salt-sensitive hypertension

研究代表者

新里 直美(Niisato, Naomi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00237645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、我々はケルセチンによる長期的な影響について明らかにした一方で、我々はケルセチンがアルドステロンにより亢進したENaCを介するNa⁺再吸収を短時間(1時間程度)で著しく抑制することも見出した。本研究では、ケルセチンの短期的な作用メカニズムを解明する目的で研究を推進したところ、ケルセチンはENaCの活性化に關与するプロテアーゼ活性に抑制的に制御し、Na⁺/K⁺ ATPaseの活性を直接阻害することによりナトリウム再吸収を抑制することを示唆する結果であり、ケルセチンによる新たな抑制メカニズムを見出した。

研究成果の概要(英文)：In our previous studies, we have revealed that chronic treatment with quercetin decreased epithelial Na⁺ channel (ENaC)-mediated Na⁺ reabsorption by suppressing ENaC gene expression. In this study, we investigated the acute effect of quercetin on ENaC-mediated Na⁺ reabsorption and found that application of quercetin rapidly reduced ENaC-mediated Na⁺ reabsorption by inhibiting the protease-dependent ENaC activity and Na⁺, K⁺ ATPase activity in renal epithelial A6 cells.

研究分野：細胞生理学、細胞生物学

キーワード：フラボノイド ENaC Na⁺再吸収 ケルセチン

1. 研究開始当初の背景

国内で4000万人以上にも上ると推定される高血圧患者の約4割が食塩感受性高血圧で、脳心血管障害と慢性腎臓病の発症・進展に深く関与すると考えられている。食塩感受性高血圧症は主に腎臓のNa⁺排泄機能異常と密接に関係しており、最近の藤田らの研究では、塩分過多により血中アルドステロン(ALD)濃度が低下するにも関わらず、Rac1というsmall G proteinの活性化を介して鉍質コルチコイド受容体(MR)が活性化され、抑制されるはずのALDシグナルが亢進してNa⁺再吸収が促進し、食塩感受性高血圧が発症する(J Clin Invest 121: 3233, 2011)という報告がなされている。また、Wangらは、プロスタシンというENaCを活性化するセリンプロテアーゼ活性亢進と高血圧発症との関連性を強く示唆する報告をしている(Am J Physiol 284: R1031, 2003)。一方、我々は食塩感受性高血圧発症モデル動物であるDahl salt-sensitive rat (DSラット)を用いて上皮型Na⁺チャンネル(ENaC)を介する腎Na⁺再吸収制御に注目して研究を行い、以下のことを明らかにした。

- (1) DSラットでは、高食塩負荷で血中ALD濃度は低下するにも関わらずENaCの発現が増大し、副腎摘出DSラットにALDを投与して血中ALD濃度を上昇させると、ENaC遺伝子発現が抑制されるというALDによるENaC発現の異常制御が食塩感受性高血圧発症要因の1つであることを見出した(Biochem Biophys Res Commun (BBRC) 341: 376, 2006, Cell Biol Int. 31: 1288, 2007)。
- (2) DSラットで高食塩負荷により発症する高血圧症は、フラボノイドであるケルセチンを同時摂取させるとENaCの遺伝子発現を阻害して血圧上昇が有意に抑制されることを見出した(BBRC. 315: 892, 2004)。
- (3) 皮質集合管主細胞で、ケルセチンの長時間処理はENaCの遺伝子発現を抑制して(BBRC 336: 401, 2005, Am J Physiol 287: F932, 2004.) Na⁺再吸収を顕著に減少させることを見出した。
- (4) 皮質集合管主細胞で、ケルセチンはENaC遺伝子発現に影響しない短時

間でもNa⁺再吸収を顕著に減少させた。(新里:未発表)

このように、ケルセチンによる長期的・短期的処理は、皮質集合管主細胞においてENaCを介するNa⁺再吸収を顕著に抑制するが、短期的な抑制作用のメカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、フラボノイドであるケルセチンのENaCを介するNa⁺再吸収に対する短期的抑制作用の分子標的を明らかにし、抑制メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

(1) 細胞.

Xenopus laevis 由来で皮質集合管主細胞のモデル細胞であるA6細胞を上皮細胞として極性を保持するようにpermeable support上で単層に培養して実験に供与した。

(2) 経上皮Na⁺再吸収の電気生理学的測定. 単層に培養したA6細胞は、Ussing chamberにセットし、緩衝液(95 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5 mM glucose, 25 mM NaHCO₃の溶液を5% CO₂でバブリングしてpH7.4になるように調整)で満たして経上皮Na⁺再吸収をベンザミル(ENaC阻害剤)感受性短絡電流として測定した。また、ベンザミル(ENaC阻害剤)感受性コンダタンスはENaCチャンネル活性の指標とした。

(3) 表面ビオチン化によるENaC表面発現量の測定.

単層に培養したA6細胞は、一晚アルドステロン処理をした後、アルドステロン存在下にケルセチンおよびコントロール(溶媒のDMSOのみ)により短時間処理をした。細胞を4に冷却して管腔側膜を表面ビオチン化してcrude cell lysateを調整した。その後、アビジンビーズによりビオチン化タンパク質をpull-downし、SDS-PAGEにより分離後、抗ENaC抗体によりImmunoblottingして、ENaC表面発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) ケルセチンの短時間処理によるENaC

を介する Na⁺再吸収への影響 .

A6 細胞は permeable support 上で単層に培養した後、20 - 24 時間、1 μ M aldosterone で処理すると、20 - 30 μ A/cm² の非常に大きな短絡電流が観察され、これらの殆どは、ベンザミル感受性短絡電流であることが確認されている . この A6 細胞に 100 μ M quercetin を両側に加えると 30 - 60 分で殆どのベンザミル感受性短絡電流が消失した . そこで、そのメカニズムを解明するために、ケルセチンの ENaC 活性 (ベンザミル感受性コンダクタンス測定) と Na⁺, K⁺-ポンプの活性 (管腔側にイオノフォアを添加後のウアバイン感受性電流測定) への影響について検討すると、ENaC 活性も Na⁺, K⁺-ポンプの活性も低下していることが明らかになった . 従って、ケルセチンは管腔側の ENaC を介する Na⁺流入過程と血管側の Na⁺, K⁺-ポンプを介する流出過程の両方を抑制して Na⁺再吸収を減少させたと考えられる .

(2)ケルセチンの ENaC を介する Na⁺流入過程への影響

ケルセチンの ENaC を介する Na⁺流入過程への影響について詳細に検討するために、まず、ENaC 膜発現への影響について検討した . その結果、ケルセチンは ENaC の膜発現量を減少させることが明らかとなったが、Na⁺再吸収量の減少と比較すると、ENaC の膜発現量の減少だけでは説明がつかないと考えられた .

(3)ケルセチンの ENaC 活性への影響

ENaC は管腔側膜上で、プロテアーゼにより切断されて活性化されることが知られている . そこで、次に ENaC の活性化に対する影響について調べたところ、ケルセチン処理により cleaved ENaC が減少する傾向が認められ、ケルセチンは ENaC を活性化するプロテアーゼの活性化を抑制して、Na⁺再吸収を抑制している可能性が示唆された .

以上の結果より、ケルセチンは ENaC を活性化するプロテアーゼの活性、ENaC の膜発現量、Na⁺, K⁺-ポンプの活性を抑制することで、短期的に ENaC を介する Na⁺再吸収量を抑制することを明らかにした .

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 8 件)

Sun H, Niisato N, Inui T, Marunaka Y. Insulin is involved in transcriptional regulation of NKCC and the CFTR Cl(-) channel through PI3K activation and ERK inactivation in renal epithelial cells. J Physiol Sci. 64: pp433-443, 2014. (査読あり)

DOI: 10.1007/s12576-014-0338-3

Sun H, Niisato N, Nishio K, Hamilton KL, Marunaka Y. Distinct action of flavonoids, myricetin and quercetin, on epithelial Cl(-) secretion: useful tools as regulators of Cl(-) secretion. Biomed Res Int. 2014: p902735, 2014. (査読あり)

DOI: 10.1155/2014/902735

Hayata H, Miyazaki H, Niisato N, Yokoyama N, Marunaka Y. Lowered extracellular pH is involved in the pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance. Biochem Biophys Res Commun. 445: 170-174, 2014. (査読あり)

Kitagawa M, Niisato N, Shiozaki A, Ohta-Fujimoto M, Hosogi S, Miyazaki H, Ichikawa D, Otsuji E, Marunaka Y. A regulatory role of K(+)-Cl(-) cotransporter in the cell cycle progression of breast cancer MDA-MB-231 cells. Arch Biochem Biophys. 539: pp92-98, 2014. (査読あり)

Aoi W, Hosogi S, Niisato N, Yokoyama N, Hayata H, Miyazaki H, Kusuzaki K, Fukuda T, Fukui M, Nakamura N, Marunaka Y. Improvement of insulin resistance, blood pressure and interstitial pH in early developmental stage of insulin resistance in OLETF rats by intake of propolis extracts. Biochem Biophys Res Commun. 423:650-653, 2013. (査読あり)

Hosogi S, Miyazaki H, Nakajima K, Ashihara E, Niisato N, Kusuzaki K, Marunaka Y. An inhibitor of Na(+)/H(+) exchanger (NHE), ethyl-isopropyl

amiloride (EIPA), diminishes proliferation of MKN28 human gastric cancer cells by decreasing the cytosolic Cl(-) concentration via DIDS-sensitive pathways. Cell Physiol Biochem. 30: 1241-1253, 2013. (査読あり)

Nakajima K, Niisato N, Marunaka Y. Enhancement of tubulin polymerization by Cl(-)-induced blockade of intrinsic GTPase. Biochem Biophys Res Commun. 425: 225-229, 2013. (査読あり)

Nagao H, Nakajima K, Niisato N, Hirota R, Bando H, Sakaguchi H, Hisa Y, Marunaka Y. K(+)-Cl(-) cotransporter 1 (KCC1) negatively regulates NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. Cell Physiol Biochem. 30: 538-551, 2013. (査読あり)

[学会発表](計18件)

Niisato N, Marunaka Y. Regulation of epithelial Na⁺ channel (ENaC) trafficking by aldosterone. International Symposium on Renal Physiology Chinese Society of Physiology. (招聘講演). 2014年10月25日~27日. Shanghai, China.

Niisato N, Marunaka Y. A role of p38 on proteasome-dependent degradation of ENaC in aldosterone-stimulated renal epithelial A6 cells. The 2nd International Symposium on epithelial Barrier and Transport. 2014年11月1日~2日 立命館大学(滋賀県草津市).

Sun H, Niisato N, Marunaka Y. Involvement of insulin in transcriptional regulation of NKCC and CFTR Cl-channel through PI3K activation and ERK inactivation in renal epithelial A6 cells. The 2nd International Symposium on epithelial Barrier and Transport. 2014年11月1日~2日 立命館大学(滋賀県草津市).

Marunaka Y, Niisato N, Yokoyama N, Sasamoto K. Molecular mechanisms of regulation of ENaC expression and intracellular trafficking in renal

epithelium. Symposium on "Metabolic regulation of renal physiology and pathology" FAOPS Joint Symposium-Japan/China. The 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2014年3月16日~18日 鹿児島大学(鹿児島).

Niisato N, Marunaka Y. An essential role of p38 on ENaC trafficking in aldosterone-stimulated Na⁺ reabsorption in renal epithelial A6 cells. 2014年3月16日~18日 鹿児島大学(鹿児島).

Niisato N, Marunaka Y. Molecular mechanisms of Epithelial Na⁺ channel (ENaC) regulation. Symposium on "Epithelial Ion Transport". The 134th Annual Meeting of The Pharmaceutical Society of Japan. 2014年3月27日~30日 熊本大学(熊本).

笹本浩平、新里直美、丸中良典. 上皮組織における電気的中性クロライドイオン輸送体活性の電気生理学的機能測定の可能性 数理モデル活用による測定法の新展開. 第9回京滋呼吸器リサーチフォーラム. 2014年4月5日(京都).

丸中良典、笹本浩平、新里直美. 上皮組織クロライドイオン分泌に寄与する電気的中性クロライドイオン輸送体活性の電気生理学的測定の新展開 数値的シミュレーション活用による新測定法の確立. 第13回肺サーファクタント分子病態研究会. 2014年6月21日(札幌).

樽野陽幸、Zhoo ming Ma、新里直美、宮崎裕明、加塩麻紀子、孫紅昕、Foskett J Kevin、丸中良典. CAHLM イオンチャネルの構造・機能の解析. 膜シンポジウム. 2014年11月26日~27日(神戸).

新里直美、西尾 恭介、丸中良典. アルドステロンによる p38 を介する Na⁺ 再吸収亢進における細胞内クロライドイオンの役割解明. 第57回日本腎臓学会学術総会. 2014年7月4日~6日パシフィコ横浜(横浜市).

丸中良典、笹本浩平、新里直美、西尾恭介. 腎上皮細胞クロライドイオン輸送体

活性の電気生理学的手法による検証．第 57 回日本腎臓学会学術総会．2014 年 7 月 4 日～6 日パシフィコ横浜（横浜市）．

Sun H, Niisato N, Marunaka Y. Transcriptional regulation of NKCC and CFTR Cl⁻ channel through PI3K activation and ERK inactivation by insulin in renal epithelial A6 cells. 第 107 回近畿生理学談話会．2014 年 10 月 25 日（神戸）．

Marunaka Y, Niisato N, Miyazaki H, Nakajima K, Hosogi S, Taruno A, Yokoyama N. Action of quercetin on cell function via regulation of chloride ion transport. The 13th International Conference on Functional and Medical Foods with Bioactive Compounds: Science and Practice/ The 1st International Symposium of Academic Society for Functional Foods and Bioactive Compounds. 2013 年 5 月 11 日～12 日 京都府立医科大学（京都）．

新里直美、丸中良典．p38MAPK を介する ENaC 膜発現制御機構の解明．膜シンポジウム 2013．2013 年 11 月 7 日～8 日 京都府立医科大学（京都）．

新里直美、丸中良典、西尾恭介．アルドステロンによる腎ナトリウム再吸収制御における MAPK の役割．第 56 回日本腎臓学会学術総会．2013 年 5 月 10 日～12 日 東京国際フォーラム（東京）．

Marunaka Y, Niisato N. Osmotic Regulation of Epithelial Na⁺ Channel. International Symposium on Epithelial Barrier and Transport 2012. 2012 年 9 月 15 日～16 日 立命館大学（滋賀）．

Niisato N, Marunaka Y. p38 controls proteasome-dependent degradation of ENaC in aldosterone-treated renal epithelial A6 cells. International Symposium on Epithelial Barrier and Transport 2012. 2012 年 9 月 15 日～16 日．立命館大学（滋賀）．

新里直美、西尾恭介、丸中良典．アルド

ステロン刺激時の MAPK phosphatase 及び p38 を介する Na⁺再吸収制御メカニズムの解明．第 55 回日本腎臓学会学術総会．2012 年 6 月 1 日～3 日．パシフィコ横浜（横浜市）．

〔その他〕

ホームページ等

<http://kpum-molecular-cell-physiology.info/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

新里 直美 (NIISATO Naomi)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・
准教授

研究者番号：00237645

(2)研究分担者

丸中 良典 (MARUNAKA Yoshinori)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・
教授

研究者番号：00127036

宮崎 裕明 (MIYAZAKI Hiroaki)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・
講師

研究者番号：30360027

中島 謙一 (NAKAJIMA Kenichi)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・
助教

研究者番号：40398392

細木 誠之 (HOSOGI Shigekuni)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・
客員講師

研究者番号：30433254

横山 紀子 (YOKOYAMA Noriko)

京都府立医科大学・医学部・
博士研究員

研究者番号：40112958

(3)連携研究者

なし