

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790222

研究課題名(和文)腎集合管水輸送におけるV1aRシグナル伝達分子の同定

研究課題名(英文)A role of V1a receptor in water/electrolytes metabolism.

研究代表者

安岡 有紀子 (Yasuoka, Yukiko)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：50348504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：バソプレシンV1a受容体(V1aR)は、集合管主細胞のV2R-PKA-AQP2軸を修飾し、AQP2活性を抑制し水再吸収を阻害すると考えられてきた。しかし、V1aRは腎集合管において主細胞ではなく間在細胞(type-A, type-B, non-A, non-B)のみに発現し、V1aR mRNAは、酸負荷時に髄質外層内帯のヘンレループおよび髄質集合管間在細胞type-Aにおいて増加した。V1aR KOマウスへの各種負荷実験から、V1aRは髄質集合管間在細胞における酸分泌亢進、主細胞AQP2の基礎的発現量の維持に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Arginine vasopressin (AVP) functions in the regulation of body fluid homeostasis, vasoconstriction, and ACTH release through vasopressin V1a, V1b (V3), and V2 receptors. We found that V1aR only localized in the intercalated cell (IC) type-A, type-B, non-A and non-B along the collecting duct (CD) in mouse kidney. The level of V1aR mRNA increased at the thick ascending limb (TAL) and IC of the CD in the inner stripe of the outer medulla after acid loading. V1aR may stimulate renal H⁺ excretion and maintain the acid-base balance especially during the metabolic acidosis. Furthermore, we have investigated the amount of AQP2 expression in WT and V1aR KO mice during euhydration and dehydration. The luminal expression of AQP2 significantly increased both in WT and V1aR KO during dehydration, although their levels of expression significantly decreased in V1aR KO mice. V1aR may contribute to water and electrolytes transport by maintaining the basal expression of AQP2 in kidney CD.

研究分野：腎生理

キーワード：V1aR collecting duct acidosis dehydration

1. 研究開始当初の背景

バソプレシン(VP)は、血漿浸透圧の上昇、体液量の減少時に脳下垂体後葉から放出される。血漿 VP 濃度上昇は、腎集合管で細胞内 cAMP を上昇させ、水透過性を亢進させることにより血漿浸透圧を調節する(Michell RH, *Biochem Soc Trans*, 1979)。しかし、単離集合管の管腔側への VP 灌流は、水透過性を抑制し(Ando Y, *J Clin Invest*, 1991)、細胞内 Ca^{2+} を増加させた (Ikeda M, *Kidney Int*, 1994)。一方、Breyer らは、VP は集合管でプロスタグランジン(PG)合成を促進し、主細胞の PG 受容体(EP_3R)を介して Ca^{2+} -PKC 系を活性化(水透過性を抑制)させると報告した(Breyer MD, *Annu Rev Physiol*, 1994)。

VP 受容体は 1992 年にクローニングされ(Molel A, et al. *Nature*)、腎集合管には二つの受容体($V_{1a}R$ 、 V_2R)が発現していた(Terada Y, et al. *J Clin Invest*, 1993)。免疫染色により、 $V_{1a}R$ 、 V_2R は集合管主細胞に発現し、 $V_{1a}R$ は管腔膜、 V_2R は基底膜に局在しているのが明らかにされた(Gonzalez CB, et al. *Kidney Int*, 1997)。腎集合管における水輸送調節は主細胞において行われ、基底膜の V_2R -cAMP-PKA シグナルが水透過性を亢進し、管腔側の $V_{1a}R$ -PG 合成- Ca^{2+} -PKC シグナルが拮抗していると考えられている。

我々は、 $V_{1a}R$ の集合管内局在を調べるために、従来の ISH 法よりも高感度な TSA-ISH 法を用いた。その結果、 $V_{1a}R$ は主細胞には発現がなく、間在細胞(IC)の酸分泌を担う IC-typeA (IC-A)とアルカリ分泌を担う IC-typeB (IC-B) に発現していることを確認した。集合管間在細胞の $V_{1a}R$ mRNA は、マウスに酸負荷(代謝性アシドーシス)すると発現量が増加した。 $V_{1a}R$ は IC-A における酸分泌に関与していると考えられた。

集合管主細胞に発現していると考えられていた $V_{1a}R$ が間在細胞に発現していたことにより、 $V_{1a}R$ が水透過性調節に関与するには、間在細胞から主細胞にシグナルが伝達されなければならない。マウス間在細胞には PG 合成酵素である cyclooxygenase (COX-1)が発現し(Campean V, et al. *Am J Physiol*, 2003)、「 $V_{1a}R$ -PG- Ca^{2+} -PKC 系」の一部は間在細胞で行われている可能性が示唆された(間在細胞 $V_{1a}R$ -PG 合成・放出-主細胞 Ca^{2+} -PKC 系)。

2. 研究の目的

$V_{1a}R$ は集合管において、「 $V_{1a}R$ は間在細胞にのみに発現し、第一義的には酸塩基調節をコントロールする」、次に「 $V_{1a}R$ は、間在細胞から主細胞へのシグナルまたは他の因子を介して二次的に水電解質代謝に関与している」ことが推測された。 $V_{1a}R$ KO マウスを用いることにより、 $V_{1a}R$ による水電解質代謝を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 絶水、水負荷実験: WT、KO マウスを

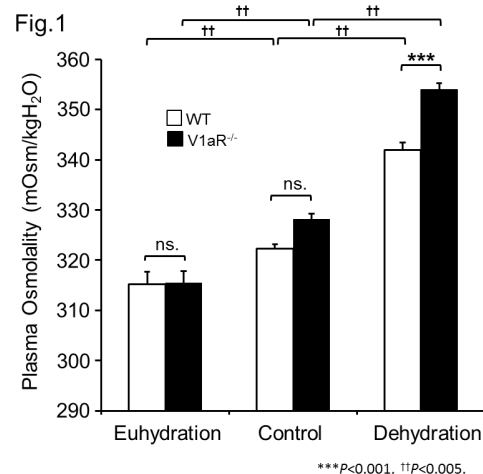
代謝ケージに入れ、24 時間絶水、または 5% glucose 溶液を 24 時間飲水させた後、尿を採取した。その後、マウスはイソフルラン麻酔下で採血し、免疫組織化学的解析用、western blotting 用に腎臓を採取した。尿、血液は pH、電解質濃度等を測定した。

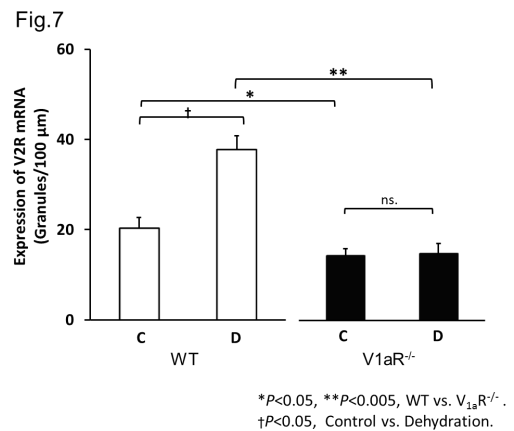
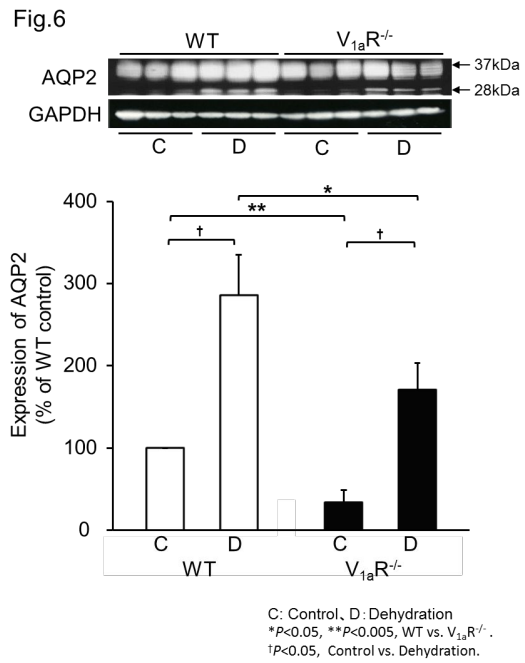
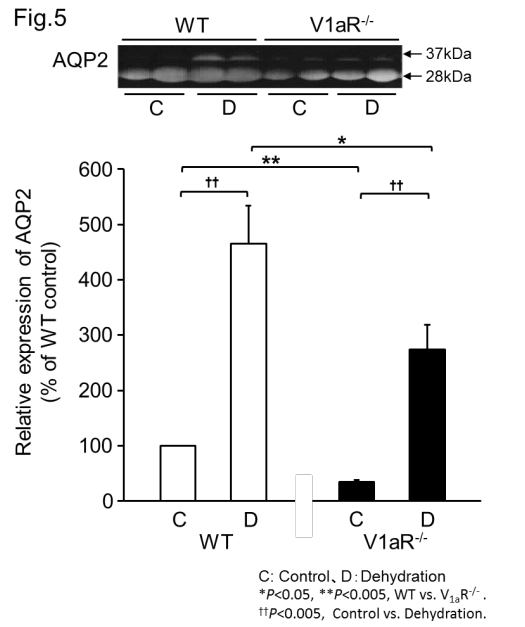
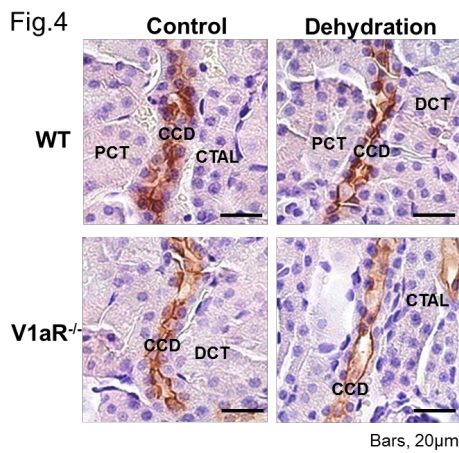
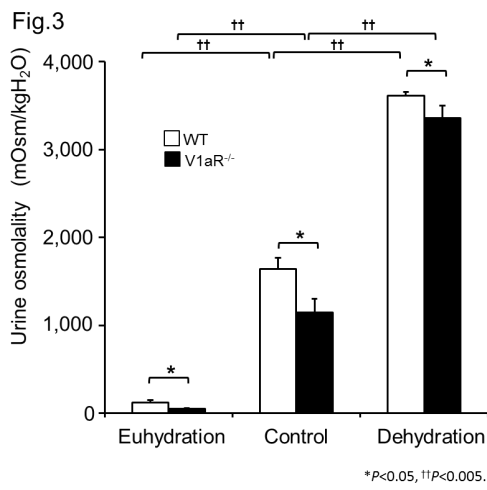
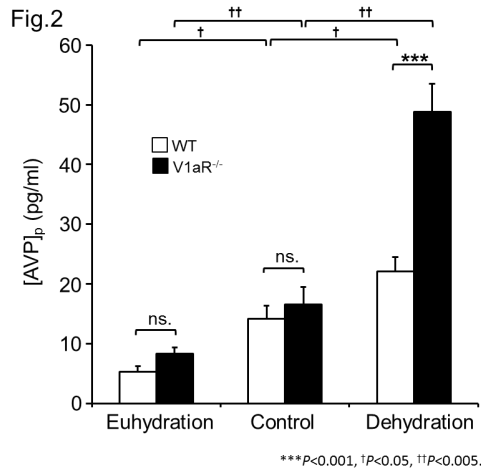
(2) 酸負荷実験: WT、 $V_{1a}R$ KO マウスに酸負荷として、2.5% NH_4Cl 添加食を 6 日間与えた。5 日目の朝に代謝ケージに 1 匹ずつ入れ、6 日目の朝に 24 時間尿を採取した。マウスはイソフルラン麻酔下で採血し、免疫組織化学的解析用、western blotting 用に腎臓を採取した。尿、血液は pH、電解質濃度等を測定した。

4. 研究成果

(1) WT、KO マウスを 24 時間絶水、または 5% glucose 溶液を飲水させ、血液・尿成分を比較し、AQP2、 V_2R の発現量を解析した。標準飼育時、絶水時、5% glucose 飲水時の血漿 pH、 pCO_2 、 pO_2 、 HCO_3^- 濃度の値は WT と KO に差はなかったが、絶水時の $Na^+ \cdot K^+ \cdot Cl^-$ 濃度、血漿浸透圧、血漿[AVP]の値は、KO は WT より高く有意な差があった(絶水時、血漿浸透圧(mOsm/kg H_2O): WT 342、KO 354 ($P < 0.001$) (Fig.1)、血漿[AVP] (pg/ml): WT 22.1、KO 48.8 ($P < 0.001$)) (Fig.2)。尿浸透圧(mOsm/kg H_2O)の値は、標準飼育時、絶水時、5% glucose 飲水時において KO は WT より低く有意な差があった(Fig.3)。集合管の AQP2 は、絶水で WT、KO 共に管腔膜側へ移行したが(免疫染色(Fig.4)および尿中 AQP2 の定量(Fig.5))、KO の AQP2 発現量は WT より少なかった(Fig.6)。また、 V_2R mRNA の発現量は、絶水で WT は増加したが、KO は増加しなかった(Fig.7)。

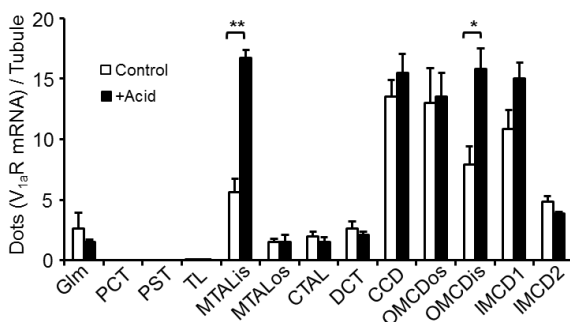
$V_{1a}R$ KO マウスは、水電解質調節分子 AQP2、 V_2R の発現量が少なく、尿濃縮能が低下していることが明らかになった。





(2) アシドーシス誘発時における WT の $V_{1a}R$ mRNA の発現量は、MTAL と OMCD(IC-A)においてのみ、有意に増加した ($P < 0.05$) (Fig.8)。血漿[AVP](pg/ml)は、WT、KO 共に増加せず有意差はなかった (WT: 304.4 ± 58.5 (0 d), 293.6 ± 52.9 (6 d)、KO: 443.6 ± 46.5 (0 d), 479.6 ± 41 (6 d))。尿中 AVP 排泄量 (pg/d) も同様の傾向を示した (WT: 417.2 ± 51.9 (0 d), 531.6 ± 84.2 (6 d)、KO: 645.3 ± 117.7 (0 d), 970.1 ± 252.8 (6 d))。アシドーシス誘導時、WT の AQP2、 $V_{2}R$ 発現量は増加したが、AQP2 は細胞質内に限局した。KO マウスでは、AQP2、 $V_{2}R$ の発現量が著しく低下し、AQP2 は管腔膜に局在した。AVP- $V_{1a}R$ (IC)を介したシグナルは、 $V_{2}R$ (PC)の発現/活性化と AQP2 の管腔膜から細胞質への移行に影響し、代謝性アシドーシス時の尿濃縮能低下をもたらすと考えられた。

Fig.8



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Yasuoka Y, Sato Y, Healy JM, Nonoguchi H, Kawahara K. pH-sensitive expression of calcium-sensing receptor (CaSR) in type-B intercalated cells of the cortical collecting ducts (CCD) in mouse kidney. *Clin Exp Nephrol*, 査読有, 2014

DOI: 10.1007/s10157-014-1063-1.

Itoh K, Izumi Y, Inoue T, Inoue H, Nakayama Y, Uematsu T, Fukuyama T, Yamazaki T, Yasuoka Y, Makino T, Nagaba Y, Tomita K, Kobayashi N, Kawahara K, Mukoyama M, Nonoguchi H. Expression of three isoforms of Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) in the kidney and regulation by dehydration. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 453, 356-61, 2014

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.09.089.

Nagai T, Yasuoka Y, Izumi Y, Horikawa K, Kimura M, Nakayama Y, Uematsu T, Fukuyama T, Yamazaki T, Kohda Y, Hasuike Y, Nanami M, Kuragano T, Kobayashi N, Obinata M, Tomita K,

Tanoue A, Nakanishi T, Kawahara K, Nonoguchi H. Reevaluation of erythropoietin production by the nephron. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 449, 222-228, 2014

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.05.014.

Yasuoka Y, Kobayashi M, Sato Y, Zhou M, Abe H, Okamoto H, Nonoguchi H, Tanoue A, Kawahara K. The intercalated cells of the mouse kidney OMCDs are the target of the vasopressin V_{1a} receptor axis for urinary acidification. *Clin Exp Nephrol*, 査読有, 17, 783-792, 2013

DOI: 10.1007/s10157-013-0783-y.

Yasuoka Y, Kobayashi M, Sato Y, Nonoguchi H, Tanoue A, Okamoto H, Kawahara K. Decreased expression of aquaporin 2 in the collecting duct of mice lacking the vasopressin V_{1a} receptor. *Clin Exp Nephrol*, 査読有, 17, 183-190, 2013

DOI: 10.1007/s10157-012-0686-3

Nonoguchi H, Izumi Y, Nakayama Y, Matsuzaki T, Yasuoka Y, Inoue T, Inoue H, Mouri T, Kawahara K, Saito H, Tomita K. Effects of atrial natriuretic peptide on bicarbonate transport in long- and short-looped medullary thick ascending limbs of rats. *PLOS one*, 査読有, 8:e83146, 2013

DOI: 10.1371/journal.pone.0083146.

Kaji I, Yasuoka Y, Karaki S, Kuwahara A. Activation of TRPA1 by luminal stimuli induces EP4-mediated anion secretion in human and rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 査読有, 302, G690-G701, 2012

DOI: 10.1152/ajpgi.00289.2011.

〔学会発表〕(計17件)

Kawahara K, Yasuoka Y, Nonoguchi H. Water and electrolytes transport across kidney collecting ducts through vasopressin receptors. 第92回日本生理学会大会、2015年3月21日、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

Yasuoka Y, Sato Y, Nonoguchi H, Kawahara K. Role of calcium sensing receptor (CaSR) in type-B intercalated cell of mouse kidney collecting duct during acid/base and Ca salts-loadings. 第92回日本生理学会大会、2015年3月21日、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

Izumi Y, Yasuoka Y, Nagai T, Nakayama Y, Inoue H, Nakanishi T, Mukoyama M, Kawahara M, Nonoguchi H. Erythropoietin Production by the Nephron. アメリカ腎臓学会、2014年11月15日、フィラデルフィア(U.S.A.)

Yasuoka Y, Sato Y, Nonoguchi H, Kawahara K. Hypercalcemia in Mice with

High CaP Diet Co-Operatively Stimulated Renal Alpha and Beta Intercalated Cells (IC-A and -B) via Basolateral Ca-Sensing Receptor in IC-B. アメリカ腎臓学会、2014年11月14日、フィラデルフィア (U.S.A.)

河原克雅、安岡有紀子、佐藤雄一、野々口博史. 腎尿細管 Ca 感受性受容体 (CaSR) の役割. 第44回日本腎臓学会東部学術大会、2014年10月24日、ベルサール新宿グランド (東京都新宿区)

福田英一、石井大輔、岩村正、安岡有紀子、野々口博史、河原克雅. 5/6腎摘マウスの血液・尿データと腎機能評価. 第44回日本腎臓学会東部学術大会、2014年10月24日、ベルサール新宿グランド (東京都新宿区)

泉裕一郎、永井孝憲、安岡有紀子、中西健、河原克雅、野々口博史. 腎尿細管におけるエリスロポエチン産生とアルドステロンによる制御機構. 第57回日本腎臓学会学術総会、2014年7月6日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

安岡有紀子、佐藤雄一、野々口博史、河原克雅. Ca塩摂取時の腎結石予防と酸塩基調節: 腎集合管 Ca 感受性受容体 (CaSR) の役割. 第57回日本腎臓学会学術総会、2014年7月5日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Yasuoka Y, Kawahara K. Regulation of water and electrolytes transport in kidney tubule cells: Vasopressin V_{1a} receptor and calcium sensing receptor. 第91回日本生理学会大会、2014年3月15日、鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)

Izumi Y, Yasuoka Y, Nagai T, Hori K, Nakayama Y, Nanami M, Nakanishi T, Tanoue A, Tomita K, Kawahara K, Nonoguchi H. Mechanisms of erythropoietin production by aldosterone in the intercalated cells. アメリカ腎臓学会、2013年11月7日、アトランタ (U.S.A.)

Yasuoka Y, Sato Y, Nonoguchi H, Kawahara K. Calcium salts affect acid-base by stimulating differently type A and B intercalated cells in mouse kidney collecting duct. アメリカ腎臓学会、2013年11月7日、アトランタ (U.S.A.)

安岡有紀子、佐藤雄一、野々口博史、河原克雅. マウス腎集合管間在細胞 (type B) におけるカルシウム感受性受容体 (CaSR) の役割. 第56回日本腎臓学会学術総会、2013年5月10日、東京国際フォーラム (東京都千代田区)

安岡有紀子、佐藤雄一、河原克雅. A role of Ca-sensing receptor (CaSR) expressed in type B intercalated cells along the mouse kidney collecting duct. 第90回日本生理学会大会、2013年3月

29日、タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

河原克雅、安岡有紀子. Metabolic acidosis caused by insufficient vasopressin V_{1a} receptor in kidney collecting duct. 第90回日本生理学会大会、2013年3月29日、タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

安岡有紀子、佐藤雄一、河原克雅. Upregulation of mice carbonic anhydrase XII in the α -intercalated cell of outer medullary collecting duct during acidosis. アメリカ腎臓学会、2012年11月2日、サンディエゴ (U.S.A.)

安岡有紀子、佐藤雄一、河原克雅. 腎近位尿細管 K チャネル (TASK2) の酸塩基調節における役割. 第42回日本腎臓学会東部学術大会、2012年10月14日、朱鷺メッセ (新潟県新潟市)

安岡有紀子、佐藤雄一、野々口博史、田上昭人、河原克雅. 尿濃縮におけるバゾプレッシン V_{1a} 受容体の役割. 第55回日本腎臓学会学術総会、2012年6月1日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔図書〕(計1件)

河原克雅、安岡有紀子、腎と透析 特集: 水代謝の基礎と機能障害 水の調節機構、2012、p. 21-26

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安岡有紀子 (YASUOKA, Yukiko)

北里大学・医学部・助教

研究者番号: 50348504