

平成 21年 5月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590934

研究課題名（和文） 腎内レニン・アンジオテンシン系における
細胞内ホスホリパーゼ A2 の意義研究課題名（英文） Role of cytosolic phospholipase A2 in intrarenal
renin angiotensin system

研究代表者

関 常司（SEKI GEORGE）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30206619

研究成果の概要：本研究の目的は腎近位尿細管輸送に対するアンジオテンシン II（Ang II）の二相性作用の細胞内情報伝達系を明らかにすることである。詳細な検討により低濃度 Ang II による刺激作用は ERK 経路に依存しており、一方高濃度 Ang II による阻害作用は ERK 経路には依存せずグルーブ IV 細胞内ホスホリパーゼ A2/アラキドン酸代謝経路に依存することが示された。さらに腎近位尿細管では細胞内ホスホリパーゼ A2/アラキドン酸代謝経路は ERK 経路に対して抑制的に働くことが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：アンジオテンシン II、ERK、PLA2

1. 研究開始当初の背景

レニン・アンジオテンシン II（Ang II）システムは血圧調整や体内の NaCl 保持において中心的な役割をはたしている。特に Ang II は腎近位尿細管からの Na 再吸収を亢進させ、この作用が Ang II による Na 貯留の大半を担っていると考えられている。ところが実際には腎近位尿細管の Na 輸送に対して Ang II は二相性作用を持っており、低濃度 Ang II は刺激的に働くが、高濃度 Ang II は抑制的に

働くことが知られている。申請者らはこの Ang II の二相性作用が Ang II タイプ 1 受容体（AT1）を介していることを明らかにしてきた（Horita S et al. Hypertension 40:707-712, 2002, Zheng Y et al. J Am Soc Nephrol 14:1116-1122, 2003）。しかし Ang II の二相性作用の細胞内情報伝達系には不明の点が多く残っていた。

具体的にはまず ERK 経路の関与が示唆されているが、過去の報告によれば ERK が高濃度

Ang II の抑制作用を媒介するもの、低濃度 Ang II の亢進作用を媒介するものがあり、一定の見解は得られていなかった。

次に、特に高濃度 Ang II の抑制作用においてフォスホリパーゼ A2 (PLA2) の関与が示唆されているが、種々のタイプの PLA2 の関与を示唆する報告がなされており、やはり統一された見解は得られていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は以上の背景を踏まえ、腎近位尿細管 Na 輸送に対する Ang II の二相性作用の細胞内情報伝達系を明らかにすることである。特に Ang II 作用における ERK の役割を明らかにするとともに、関与する PLA2 の種類を同定し、さらに ERK 経路と PLA2/アラキドン代謝経路の相互作用についても検討を加えることである。

3. 研究の方法

野生型、AT1A および細胞内グルーブ IVA PLA2 (cPLA2 α) 欠損マウスから腎近位尿細管を単離し、倒立型顕微鏡上のチャンバー内でガラスピペットを用いて微小灌流を行った。管腔側を灌流しない状態で尿細管細胞に蛍光色素 (BCECF) を取り込ませ、細胞内 pH 測定装置 (OSP-10) を用いて細胞内 pH を測定した。既報の方法に従い (Yamada et al. *Am J Physiol* 271: F1068-F1076, 1996, Kunimi et al. *Kidney Int.* 57: 534-543, 2000) 溶液の重炭酸濃度減少に対する細胞内 pH 低下速度および細胞内 buffer capacity より基底側膜に発現している Na-HCO₃ 共輸送体 (NBC1) 活性を算出した。

また既報の通りラフィノーズと BCECF を含む管腔側灌流液を用いた Stop-flow microfluorometric 法 (Muller-Berger et al. *Pfluegers Arch* 439: 208-215, 1999, Kunimi et al. *Pfluegers* 440: 908-917, 2000) により、重炭酸再吸収量を測定した。これらの実験では尿細管機能を最適に保つために基底側の灌流は細胞培養液 (DMEM) を用いて行った。

一方、ERK 経路の活性化については腎皮質組織と特異的抗体を用いて既報の方法に従い (Zheng et al. *J Am Soc Nephrol* 16:2288-2295, 2005) Western プロットを行った。

4. 研究成果

(1) ERK 経路の役割

まず ERK 経路の意義を明らかにするために MEK 阻害剤 (PD98059) を用いた検討を行った。図 1 に示すように MEK 阻害剤は基底側に添加した低濃度 Ang II による NBC1 亢進作用を完全に抑制するものの、高濃度 Ang II による

抑制作用にはまったく影響を与えなかった。

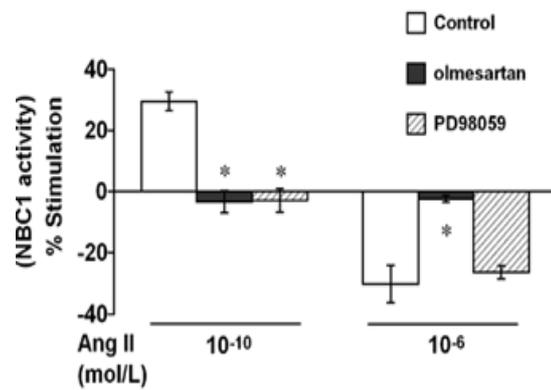


図 1. Ang II の NBC1 に対する 2 相性作用に対する MEK 阻害剤 (PD98059) および AT1 受容体阻害剤 (olmesartan) の効果

一方、図 2 に示すように ERK のリン酸化は低濃度 Ang II によってのみ亢進し、この作用は AT1 受容体阻害剤 (olmesartan) によって抑制されたが、AT2 受容体阻害剤 (PD12319) によっては影響を受けなかった。

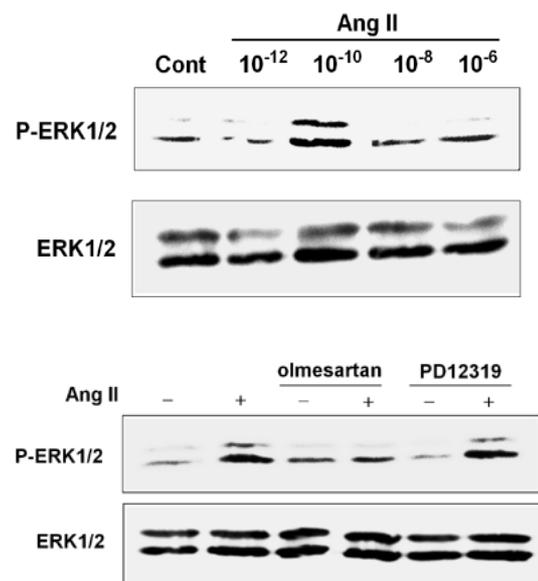


図 2. 腎皮質における Western blot 法による ERK リン酸化の解析

これらの結果から ERK 経路は低濃度 Ang II による亢進作用にのみ関与し、高濃度 Ang II の抑制作用は ERK 経路に依存しないことが示された。

(2) 細胞内 PLA2 の意義

次に細胞内 PLA2 (cPLA2) の意義を明らかにするために特異的阻害剤 (pyrrophenone) を用いて検討を行った。図 3 に示すように pyrrophenone の存在下では Ang II の抑制作用が消失し、全ての濃度の Ang II は亢進作用を持つようになった。

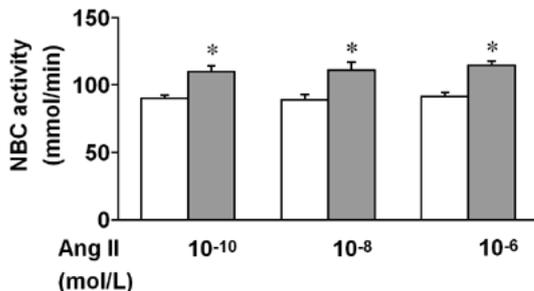


図 3 . cPLA2 の特異的阻害剤 (pyrrophenone) 存在下での Ang II 作用

この結果より高濃度 Ang II の抑制作用は cPLA2 活性に依存することが示された。

(3) Ang II シグナルに關与する PLA2 の同定

次に Ang II シグナルに關与する PLA2 の種類を同定するために cPLA2 α 欠損マウスから単離した尿細管を用いて検討した。図 4 に示すようにこのマウスでは Ang II による抑制作用は認めず、全ての濃度の Ang II は亢進作用を呈した。

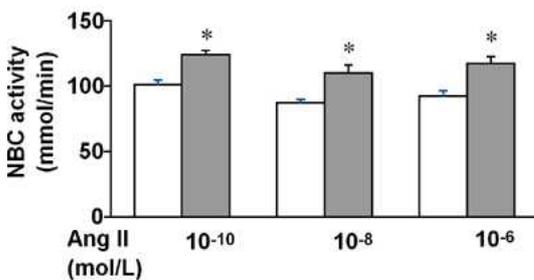


図 4 . cPLA2 α 欠損マウスにおける Ang II 作用

この結果から、細胞内 cPLA2 の中でも cPLA2 α が高濃度 Ang II の抑制作用を媒介することが示された。

一方、図 5 に示すようにアラキドン酸およびその代謝物 (5,6-EET) による抑制作用は野生型と cPLA2 α 欠損マウスにおいてほぼ同等

であった。

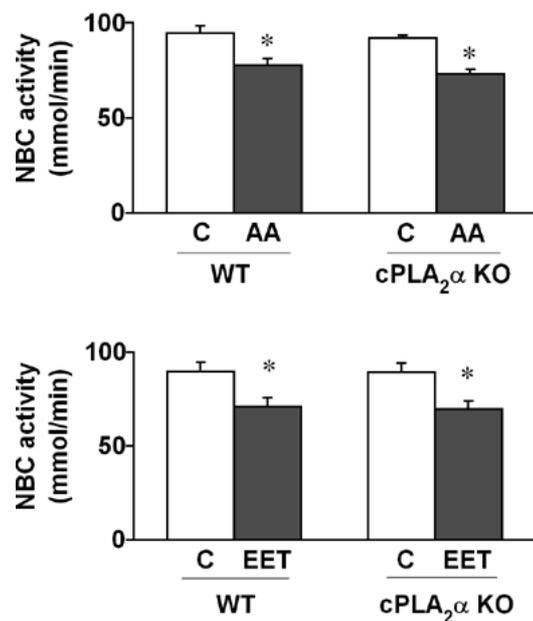


図 5 . 野生型 (WT) および cPLA2 α 欠損マウスにおけるアラキドン酸 (AA) および 5,6-EET の作用

これらの結果は cPLA2 α 欠損マウスの近位尿細管においてもアラキドン酸代謝経路およびその代謝産物に対する反応性などが正常に保たれていることを示している。

以上をまとめると、高濃度 Ang II による抑制作用は cPLA2 α を介したものであることが確認された。

(4) 管腔側 Ang II 作用のシグナル伝達

以上の一連の実験は基底側の Ang II シグナルを調べたものであったが、管腔側にはまた別のシグナルが存在することを示唆する報告が過去になされていた。そこで管腔側 Ang II 作用における cPLA2 α の関与を明らかにするために、cPLA2 α 欠損マウスから単離した近位尿細管を用いて管腔側 Ang II の重炭酸再吸収量 (JHCO₃) に対する作用を検討した。その結果図 6 に示すように、cPLA2 α 欠損マウスでは野生型マウスで見られた二相性作用が消失し、全ての濃度の Ang II が刺激作用を示した。このことは管腔側 Ang II 作用においてもやはり cPLA2 α が高濃度 Ang II の抑制作用を担っていることを示している。

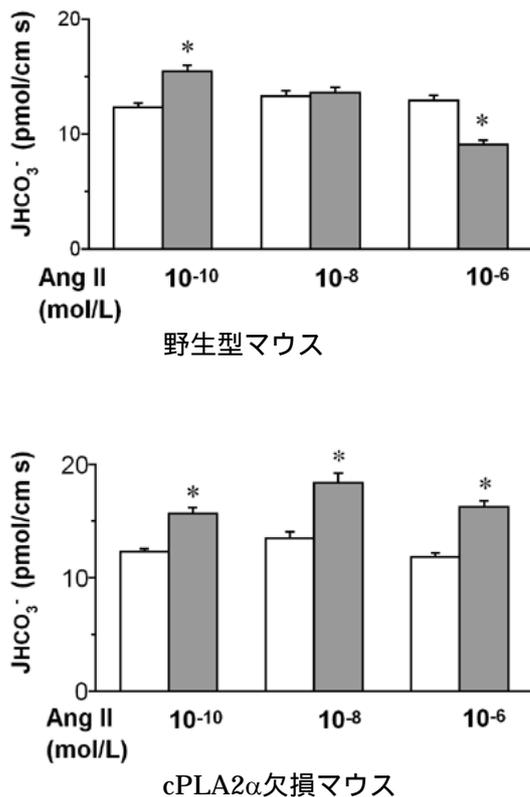


図6．野生型および cPLA2 α 欠損マウスにおける管腔側 Ang II 作用

(5) 近位尿細管 Ang II 作用における ERK および cPLA2 α の相互作用

ここまでの結果をまとめると Ang II の AT1 受容体を介する近位尿細管二相性作用のうち、刺激作用については ERK 経路に依存するが、抑制作用については ERK 経路に依存せず cPLA2 α /アラキドン酸代謝物に依存することが示された。すなわち近位尿細管 Ang II 作用が亢進または抑制作用を示すかどうかは、ERK と cPLA2 α 活性の度合いによって決定されることが、初めて明確に示された。

一方、ERK 経路と cPLA2 α /アラキドン酸代謝物経路の相互作用を調べるために、アラキドン酸およびその代謝産物である 5,6-EET 存在下での Ang II 作用を検討したところ、低濃度 Ang II による輸送亢進作用と ERK 活性化はともにほぼ完全に抑制された。またアラキドン酸およびその代謝産物である 5,6-EET 存在下では高濃度 Ang II による輸送抑制作用は完全に消失した。さらにまたアラキドン酸およびその代謝産物である 5,6-EET は細胞内 Ca 濃度を変化させなかった。

これらの結果をまとめると図7に示すような ERK 経路と cPLA2 α /アラキドン酸代謝経路の相互作用が明らかになった。

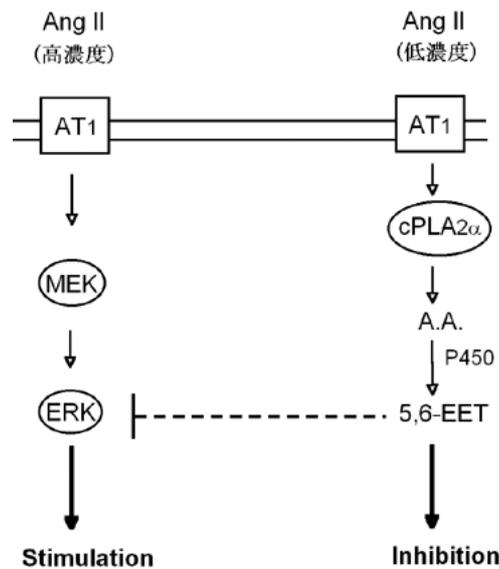


図7．近位尿細管 Ang II 作用のシグナル伝達系

ここで種々の組織において cPLA2/アラキドン酸代謝物は ERK 経路に対して促進的に働き、またさらに ERK 経路は cPLA2を活性化させるため、cPLA2と ERK 経路は positive feedback ループを形成すると考えられている。これに対して近位尿細管では cPLA2 α /アラキドン酸代謝物が ERK 経路に対して抑制的に働き、cPLA2と ERK 経路は negative feedback ループを形成している。

何故、腎近位尿細管でのみこのような特徴的なシグナル伝達系が機能しているのか詳細は未だ不明である。しかし腎近位尿細管腔内に血中よりはるかに高い濃度の Ang II が存在することを考えると、この negative feedback ループは高濃度 Ang II による組織障害を避けるために機能していることが示唆された。

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10件)

1. Seki G, Yamada H, Li Y, Horita S, Ishizaka N, Koike K and Fujita T: Roles of MEK/ERK pathway in vascular and renal tubular actions of angiotensin II. *Vascular Disease Prevention* 6, 154-159, 2009 (査読有り)

2. Li Y, Yamada H, Kita Y, Suzuki M, Endo Y, Horita S, Yamazaki O, Shimizu T, Seki G, Fujita T: Arachidonic acid metabolites inhibit the stimulatory effect of

angiotensin II in renal proximal tubules. Hypertension Res 31: 2155-2164, 2008 (査読有り)

3. Seki G, Yamada H, Horita S, Suzuki M, Sekine T, Igarashi T and Fujita T: Activation and Inactivation Mechanisms of Na-HCO₃ Cotransporter NBC1. J Epithelial Biology and Pharmacology 1: 35-39, 2008 (査読有り)

4. Seki G, Yamada H, Li Y, Horita S, Suzuki M, and Fujita T: The Roles of Abnormal Renal Sodium Handling in Hypertension Associated with Metabolic Syndrome. Current Hypertension Reviews 4: 197-202, 2008 (査読有り)

5. Li Y, Yamada H, Kita Y, Kunimi M, Horita S, Suzuki M, Endo Y, Shimizu T, Seki G, Fujita T: Roles of ERK and cPLA2 in the angiotensin II-mediated biphasic regulation of Na⁺-HCO₃⁻ transport. J Am Soc Nephrol 19: 252-259, 2008

6. Suzuki M, Vaisbich M, Yamada H, Horita S, Li Y, Sekine T, Moriyama N, Igarashi T, Endo Y, Cardoso T, de Sá L, Koch H, Seki G, Fujita T: Functional analysis of a novel missense NBC1 mutation and of other mutations causing proximal renal tubular acidosis. Pflugers Arch 455:583-593, 2008 (査読有り)

7. Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Shimomura H, Koike K, Seki G, Nagai R, Yamakado M. Association of Cigarette Smoking with Chronic Kidney Disease in Japanese men. Hypertension Res 31: 485-492, 2008 (査読有り)

8. Terada N, Ohno N, Saitoh S, Seki G, Komada M, Suzuki T, Yamakawa H, Soleimani M, Ohno S: Interaction of membrane skeletal protein, protein 4.1B and p55 and sodium-bicarbonate cotransporter1 in mouse renal S1-S2 proximal tubules. J Histochem Cytochem 55:1199-1206, 2007 (査読有り)

9. Ishizaka N, Ishizaka Y, Koike K, Seki G, Nagai R, Yamakado M. Association between Obesity and Chronic Kidney Disease in Japanese: Differences in Gender and Hypertensive Status? Hypertension Res 30:1059-1064, 2007 (査読有り)

10. Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Koike K, Seki G, Nagai R, Yamakado M. Association between Chronic Kidney Disease and Carotid Intima-Media Thickening in Individuals with Hypertension and Impaired Glucose Metabolism. Hypertension Res 30:1035-1041, 2007 (査読有り)

〔学会発表〕(計 3件)

1. 遠藤 陽子、山田 秀臣、李 月紅、鈴木 正志、山崎 修、門脇 孝、関 常司、藤田 敏郎: PPAR α /EGFR/ERK 経路を介したチアゾリンの近位尿細管作用。第 51 回日本腎臓学会総会 2008 年 6 月 1 日 福岡

2. Seki G, H Yamada: Physiology and pathophysiology of Na HCO₃ cotransporter NBC1. 第 85 回日本生理学会大会 2008 年 3 月 25 日東京

3. 関 常司、堀田 晶子、鈴木 正志、山田 秀臣: 酸・塩基平衡関連分子の臨床。第 37 回日本腎臓学会東部会 2007 年 10 月 6 日埼玉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 常司 (SEKI GEORGE)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 30206619

(2) 研究分担者

山田 秀臣 (YAMADA HIDEOMI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 60396752
野入 英世 (NOIRI EISEI)
東京大学・医学部附属病院・準教授
研究者番号: 00301820

(3) 連携研究者

該当者なし