

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390264

研究課題名（和文）腎特異的新規 PG 輸送体の腎皮質局所 PG クリアランスにおける役割と病態関連性の解析

研究課題名（英文）Roles of a novel kidney-specific prostaglandin (PG) transporter in local PG clearance in renal cortex and its pathological relevance

研究代表者

金井 好克 (KANAI YOSHIKATSU)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60204533

研究成果の概要（和文）：腎皮質においてプロスタグランジン  $E_2$  ( $PGE_2$ ) は、遠位尿細管緻密斑から分泌され、傍球体装置からのレニン分泌と尿細管-糸球体フィードバック機構を調節するオータコイドとして機能している。しかし、放出された  $PGE_2$  を除去し、シグナルを OFF にする分子機構は明らかにされていなかった。本研究は、新規腎特異的 PG トランスポーター OAT-PG ノックアウトマウスを用い、OAT-PG が皮質局所の PG クリアランスを担うことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In renal cortex, prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) is released from the macula densa of distal tubules and functions as an autacoid responsible for the regulation of tubuloglomerular feedback and renin release from the juxtaglomerular apparatus. However, the molecular mechanisms through which released  $PGE_2$  is removed and  $PGE_2$  signal is turned off have not been understood. By using knockout mice in which the gene for the novel prostaglandin-specific transporter OAT-PG is disrupted, this study has addressed the questions. The results in this study indicate that OAT-PG is the transporter responsible for the local prostaglandin clearance in renal cortex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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：トランスポーター、プロスタグランジン、近位尿細管、傍糸球体装置、レニン

## 1. 研究開始当初の背景

腎皮質においては、プロスタグランジン

 $E_2$  ( $PGE_2$ ) は、尿細管内流量や塩濃度の変動に伴い遠位尿細管緻密斑（マクラデンサ）から

分泌され、輸入細動脈の収縮・拡張を調節する（尿細管-糸球体フィードバック機構）とともに傍球体装置からのレニン分泌を調節し、腎機能及び血圧の調節、塩類恒常性の維持に重要な役割を果たしている。PGE<sub>2</sub>は体液中では非常に安定であるため、これらの調節を即時的に行うためには、シグナル伝達後に不要となった PGE<sub>2</sub> を即座に除去するメカニズム（シグナルを OFF にするメカニズム）が不可欠となる。この PGE<sub>2</sub> 除去機構の異常は、腎皮質局所の PGE<sub>2</sub> の蓄積をもたらし、糸球体過剰やレニン分泌の異常、ひいては塩類恒常性や全身血圧調節に変調をきたす可能性がある。この腎皮質の PGE<sub>2</sub> 除去機構の詳細は解明されていないが、PGE<sub>2</sub> の代謝酵素 15-PGDH (15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase) を持つ近位尿細管が側底膜から PGE<sub>2</sub> を取り込み管腔側膜から尿中にその代謝産物を分泌していると報告されており (Am J Physiol. 237:F268-F273, 1979)、この PGE<sub>2</sub> の取り込みを媒介する輸送体と代謝酵素 15-PGDH が、腎皮質の PGE<sub>2</sub> 除去機構を形成すると想定される。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、腎尿細管上皮の輸送体の分子探索の過程で、SLC22 ファミリーに属する新たな腎特異的有機アニオントランスポーターを見だし、これがプロスタグランジンを選択的に輸送することから prostaglandin-specific organic anion transporter (OAT-PG) と命名した。本研究は、OAT-PG の機能特性、発現の局在、生体内での機能的役割を解析することで、OAT-PG が、腎皮質局所プロスタグランジン除去機構の分子実体であることを実証することを目的として行った。

## 3. 研究の方法

(1) OAT-PG の機能特性の解析。OAT-PG の安定発現細胞を用い、<sup>14</sup>C-PGE<sub>2</sub> の取り込みを指標に、OAT-PG のキネティクス、基質特異性、既存の薬物に対する感受性、及び駆動のメカニズムを解析した。

(2) OAT-PG の発現の局在の検討と 15-PGDH との共局在の実証。免疫組織化学、蛍光免疫組織化学、細胞画分、共免疫沈降により、発現解析と共局在の検討を行った。

(3) 生体内での機能的役割の解析。OAT-PG のノックアウト (KO) マウスを用い、腎の組織学的観察、腎皮質から調整した単離尿管懸濁液を用いた [<sup>3</sup>H] 標識 PGE<sub>2</sub> 取り込みへの OAT-PG の寄与の検討、PGE<sub>2</sub> レベル、代謝物量及び尿中代謝物量の検討、血圧の寄与の検討、フロセミド負荷、ACE 阻害剤の影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) OAT-PG の機能特性。

OAT-PG をマウス腎近位尿細管由来 S2 細胞に安定発現させ、OAT-PG の機能特性を検討した。その結果、OAT-PG は、交換輸送体であること、細胞容積測定結果から濃縮性の輸送を行うこと、PGE<sub>2</sub> に加え PGE<sub>1</sub>、PGF<sub>1</sub>α、PGF<sub>2</sub>α、PGD<sub>2</sub>、PGB<sub>2</sub>、PGH<sub>2</sub> 等を輸送すること、15-keto PGE<sub>2</sub> や 13, 14-dihydro-PGE<sub>2</sub>、13, 14-dihydro-15-keto PGE<sub>2</sub> 等の PGE<sub>2</sub> 代謝物は輸送しないこと、C1 のカルボキシル基が必須であること、及び ω-鎖の疎水性が重要であることが明らかになった。OAT-PG が PGE<sub>2</sub> 代謝物は輸送しないことは、腎皮質で OAT-PG によって取り込まれた PGE<sub>2</sub> が細胞内に結合する 15-PGDH により迅速に代謝され代謝物となると、OAT-PG を介した逆流がおこらず、OAT-PG/15-PGDH 複合体が代謝物を尿中に一方向性に輸送するために都合の良い性質である。

### (2) OAT-PG の発現の局在。

ノーザンブロットでは、OAT-PG は、腎特異的な発現を示したため、OAT-PG の抗体を作製し、マウス腎において免疫組織化学を行ったところ、OAT-PG は近位尿細管側底膜に局在して存在していた。そこで、蛍光免疫組織化学を用いて、プロスタグランジン代謝酵素である 15-PGDH との共染色を行い、OAT-PG と 15-PGDH が近位尿細管側底膜で共存することを実証した。この両者の側底膜での共局在は、細胞画分によりさらに確認された。さらに、HEK293 細胞への 2X HA タグ付 OAT-PG と 3X FLAG タグ付 15-PGDH の共発現による相互の抗タグ抗体による共免疫沈降、およびマウス腎膜画分からの抗 15-PGDH による OAT-PG の共免疫沈降によって、OAT-PG と 15-PGDH の直接結合を実証した。

### (3) OAT-PG の生体内での機能的役割。

OAT-PG KO マウスを用い、OAT-PG の生体内での機能的役割を解析した。

OAT-PG のノックアウトは、PCR、ウエスタンブロット及び免疫組織化学で確認した。OAT-PG は、生後 3 週頃から発現が検出され、4 週齢で成体レベルに達するもので、ホモノックアウト個体は、出産・発育に問題がなく、通常食餌で飼育された個体は、通常観察においては明らかな異常は呈しない。腎には形態的異常やヘマトキシリンエオジン染色における組織学的異常は、見いだされなかった。

OAT-PG KO マウス腎皮質から調整した単離尿管懸濁液を用いて、[<sup>3</sup>H] 標識 PGE<sub>2</sub> の取り込みを測定したところ、ヘテロ、ホモ KO マウスでは、野生型に比べて取り込み機能の低下が見られた。対照として測定した [<sup>14</sup>C] パラミノ馬尿酸の取り込みには群間の差はなかった。さらに速度論的解析により野生型マウスの腎皮質単離尿管懸濁液の PGE<sub>2</sub> の

取り込みの親和性が OAT-PG のそれと同等であることが示され、OAT-PG が腎皮質において PGE<sub>2</sub> の取り込みを担う主要なトランスポーターであることが実証された。

トランスウェルを用いた近位尿細管細胞の初代培養により、PGE<sub>2</sub> の経上皮代謝を検討した。野生側マウス近位尿細管細胞の初代培養では、上皮の側基底側に PGE<sub>2</sub> を添加した際には、頂上膜側に PGE<sub>2</sub> の代謝物が時間依存的に増加したが、ホモ KO マウスでは、PGE<sub>2</sub> 代謝物の分泌が有意に低下していた。これにより、近位尿細管側基底側の OAT-PG と細胞内の 15-PGDH の連携により PGE<sub>2</sub> が代謝され、しかも PGE<sub>2</sub> は側基底側から OAT-PG によって尿細管上皮細胞内に取り込まれてその代謝物が頂上膜側から排出されることが示された。これは、*in vivo* における PGE<sub>2</sub> の経上皮代謝を *in vitro* で再現したものである。

負荷をかけない状態では、腎皮質 PGE<sub>2</sub> レベル、代謝物量、及び尿中代謝物量には、変化はなかったが、フロセミド負荷により腎皮質局所の PGE<sub>2</sub> を上昇させた状態において、野生型に比して OAT-PG KO マウス腎皮質で PGE<sub>2</sub> が蓄積し、PGE<sub>2</sub> 代謝物が減少した。これに対応して尿中 PGE<sub>2</sub> 代謝物も減少した。さらに、フロセミド負荷後の血中のレニン活性及びアンギオテンシン II 値が、OAT-PG KO マウスで上昇した。以上の結果から、OAT-PG は、特に腎皮質で PGE<sub>2</sub> が上昇する状態において、腎皮質における PGE<sub>2</sub> 局所クリアランスを担い、レニン-アンギオテンシン-アルドステロン系の制御に関わることが示唆された。

OAT-PG KO マウスは、ACE 阻害剤の降圧作用に抵抗性を示すという興味深い結果が得られた。これは、今後の新たな研究において解析されるべき新たな研究課題である。

#### 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 17 件)

- 1) Tanaka H., Takafuji K., Taguchi A., Wiriyasermkul P., Ohgaki R., Nagamori S., Suh P-G., Kanai Y. Linkage of N-cadherin to Multiple Cytoskeletal Elements Revealed by a Proteomic Approach in Hippocampal Neurons. *Neurochem Int.* *in press.* 2012 査読有
- 2) Wiriyasermkul, P. Nagamori S., Tominaga H, Oriuchi N, Kaira K, Nakao H, Kitashoji T, Ohgaki R. Tanaka H, Endou H, Endo K, Sakurai H and Kanai Y.

Transport of 3-fluoro-L- $\alpha$ -methyl tyrosine by tumor-pregulated amino acid transporter LAT1: a cause of the tumor uptake in PET. *J Nucl Med* in press 2012 査読有

3) Chronic maternal infusion of full-length adiponectin in pregnant mice down-regulates placental amino acid transporter activity and expression and decreases fetal growth. Rosario FJ, Schumacher MA, Jiang J, Kanai Y., Powell TL, Jansson T. *J Physiol.* 590, 1495-1509, 2012 査読有

4) Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. Furuya M, Horiguchi J, Nakajima H, Kanai Y., Oyama T. *Cancer Sci.* 103(2): 382-389. 2012 査読有

5) Sex hormones induce a gender-related difference in renal expression of a novel prostaglandin transporter, OAT-PG, influencing basal PGE<sub>2</sub> concentration. Hatano R, Onoe K, Obara M, Matsubara M, Kanai Y., Muto S, Asano S. *Am J Physiol Renal Physiol.* 302(3) . 2012 査読有

6) L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in malignant pleural mesothelioma. Kaira K, Oriuchi N, Takahashi T, Nakagawa K, Ohde Y, Okumura T, Murakami H, Shukuya T, Kenmotsu H, Naito T, Kanai Y., Endo M, Kondo H, Nakajima T, Yamamoto N. *Anticancer Res.* Dec;31(12):4075-82. 2011 査読有

7) Pathogenic GLUT9 mutations causing renal hypouricemia type 2 (RHUC2). Kawamura Y, Matsuo H, Chiba T, Nagamori S, Nakayama A, Inoue H,

Utsumi Y, Oda T, Nishiyama J, Kanai Y, Shinomiya N. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2011, 30(12):1105-1111. 査読有

8) Identification of ABCG2 dysfunction as a major factor contributing to gout. Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Nakayama A, Takada Y, Okada C, Sakurai Y, Hosoya T, Kanai Y, Suzuki H, Shinomiya N. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2011, 30(12):1105-11. 査読有

9) ABCG2 is a high-capacity urate transporter and its genetic impairment increases serum uric acid levels in humans. Nakayama A, Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Ikebuchi Y, Ito K, Hosoya T, Kanai Y, Suzuki H, Shinomiya N. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2011, 30(12):1091-7. 査読有

10) Relationship between LAT1 expression and response to platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer patients with postoperative recurrence. Kaira K, Takahashi T, Murakami H, Shukuya T, Kenmotsu H, Naito T, Oriuchi N, Kanai Y, Endo M, Kondo H, Nakajima T, Yamamoto N. Anticancer Res. 2011, 31(11):3775-82. 査読有

11) A seven-transmembrane receptor that mediates avoidance response to dihydrocaffeic acid, a water-soluble repellent in *Caenorhabditis elegans*. Aoki R, Yagami T, Sasakura H, Ogura K, Kajihara Y, Ibi M, Miyamae T, Nakamura F, Asakura T, Kanai Y, Misu Y, Iino Y, Ezcurra M, Schafer WR, Mori I, Goshima Y. J Neurosci. 2011, 31(46):16603-10. 査読有

12) LAT1 expression is closely associated with hypoxic markers and mTOR in resected non-small cell lung cancer. Kaira K, Oriuchi N, Takahashi T, Nakagawa K, Ohde Y, Okumura T, Murakami H, Shukuya T, Kenmotsu H, Naito T, Kanai Y, Endo M, Kondo H, Nakajima T, Yamamoto N. Am J Transl Res. 2011;3(5): 468-78. 査読有

13) Transportsomes and channelsomes: are they functional units for physiological responses? Mori Y, Kiyonaka S, Kanai Y. Channels (Austin). 2011, 5(5):387-90. 査読有

14) Role of amino acid transporter LAT2 in the activation of mTORC1 pathway and the pathogenesis of crescentic glomerulonephritis. Kurayama R, Ito N, Nishibori Y, Fukuhara D, Akimoto Y, Higashihara E, Ishigaki Y, Sai Y, Miyamoto K, Endou H, Kanai Y, Yan K. Lab Invest. 2011, 91(7): 992-1006. 査読有

15) 金井好克 : 生体膜トランスポーター研究の現状と展望、膜 36: 128-138 (2011). 査読有

16) 金井好克 : 開発中の次世代の治療薬 : SGLT阻害薬、Mebio 28: 111-117 (2011). 査読無

17) 金井好克 : 神経伝達物質トランスポーターの新展開、脳 21 14:302-304 (2011) 査読無

[学会発表] (計 18 件)

1) 金井好克 : Proteomics and metabolomics approaches to membrane transporters: Comprehensive analysis of epithelial transport function., 2012 International Symposium on Pharmacogenomics: "One Step Toward Personalized Medicine", 2012 年 1 月 30 日, Seoul, Korea

2) 金井好克: アミノ酸の細胞取込み機構とエイジング、第28回臨床フリーラジカル会議、2012年1月20日、亀岡

3) 金井好克: アミノ酸誘導体によるトランスポーターを標的とした癌の PET 診断と癌抑制薬、新アミノ酸分析研究会第一回学術講演会、2011年12月9日、東京

4) 金井好克: 輸送体と疾患、第51回茨城腎研究会講演会、2011年11月29日、つくば

5) 金井好克: アミノ酸化合物による腫瘍特異性の高い PET 診断とトランスポーター抑制の抗腫瘍効果、ランチョンセミナー「アミノ酸が未来を造る」、第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2011年11月24日、岡山

6) 金井好克: 癌のアミノ酸トランスポーターと代謝制御、シンポジウム「がんの代謝制御」、第84回日本生化学会大会、2011年9月24日、京都

7) 金井好克: Usefulness of metabolomics in the analysis of *in vivo* function of transporters, International Forum on the Development of Traditional Chinese Medicine, 2011年9月21日、Tianjin, China

8) 金井好克: Metabolomics and proteomics in transporter research in relevance to DMPK study, 2011 ISSX/CSSX Workshop- Optimization of ADMET/DMPK Research Capacity, 2011年9月18日、Tianjin, China

9) 金井好克: アミノ酸トランスポーターと疾患: 特別講演 シスチン尿症と悪性腫瘍を中心に、日本尿路結石症学会第21回学術集会、2011年8月26日、千葉

10) 金井好克: 網羅的プロテオミクスが明らかにする栄養摂取、病態、加齢等による栄養動態変動の機序、第1回生活習慣病予防のための機能性食品開発に関する研究会、2011

年7月25日、大阪

11) 金井好克: “Transportsome”, the multi-molecular assemblies for transport-transport and transport-metabolism couplings. Symposium Bio-inspired Materials and Functionalities, 2011年6月22日、Groningen, The Netherlands

12) 金井好克: アミノ酸の細胞への取り込み機構と加齢、シンポジウム「筋萎縮と同化・異化作用」、第11回日本抗加齢学会総会、2011年5月27日、京都

13) 金井好克: 悪性腫瘍のトランスポーター: その診断・治療の分子標的としての意義、シンポジウム「トランスポーターからみた医薬品安全性評価」、第18回HAB研究機構学術年会、2011年5月20日、東京

14) 金井好克: 薬理学からみた脳卒中、ランチョンセミナー、第52回日本神経学会学術大会、2011年5月18日、名古屋

15) 金井好克: 特別講演 生体膜トランスポーター研究の現状と展望、日本膜学会第33年会、2011年5月12日、東京

16) 金井好克: Tumor imaging and development of potential anti-tumor therapeutics targeting an amino acid transporter., 4th Asia Pacific Regional ISSX Meeting, 2011年4月23日、Tainan, Taiwan

17) 金井好克: Transport-metabolism coupling mediated by transportsomes in epithelial cells., Frontiers in Epithelial Transport 2011, 2011年4月15日、Seoul, Korea

18) 金井好克: トランスポーターと体内物質動態、シンポジウム「チャネル・トランスポーターによる生体機能制御とその破綻」、第28回日本医学会総会、2011年4月9日、東京

〔図書〕（計3件）

1) 金井好克：栄養素トランスポーター：その研究の進展と今後の課題、pp.153-161

書籍名：栄養・食品機能とトランスポーター  
竹谷豊・薩秀夫・伊藤美紀子・武田英二編 建  
帛社：2011, 総ページ数：291

2) 金井好克：アミノ酸輸送体とその異常、  
pp.258-262 書籍名：小児腎臓病学 飯島一  
誠・薩秀夫・関根孝司・金子一成編 診断と  
治療社 2011 総ページ数：459

3) 金井好克：ハルトナップ（ハートナップ）  
症候群、pp.527-527 症候群ハンドブック  
井村裕夫・福井次矢・辻省次編 中山書店 2011  
総ページ数：757

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金井 好克 (KANAI YOSHIKATSU)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：60204533

### (2) 研究分担者

永森 收志 (NAGAMORI SHUSHI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：90467572

大垣 隆一 (OHGAKI RHUICHI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20467525