

令和元年6月12日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09658

研究課題名(和文) -アミノ酪酸(GABA)による水利尿と腎保護の新しいメカニズムの解明

研究課題名(英文) Exploring the new role of GABA on water diuresis and renal protection

研究代表者

谷田部 淳一 (Yatabe, Junichi)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：10566681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ドパミンは腎のドパミンD1受容体に作用して利尿作用を発揮することが知られている。D1受容体はGRK4によりリン酸化を受けることで脱感作され、ナトリウム利尿が減少する。一方、中枢においてGRK4がGABA-B受容体のR2サブタイプを脱感作するという報告がなされた。腎臓においてもGABAによる利尿作用の低下にGRK4が関与している可能性を示した。GABA-BR2受容体は集合管の主細胞に発現していた。また、高血圧モデルラットでは、lysineの血中・尿中濃度が低いことが分かった。リジンはピペコリン酸に代謝されることによってGABA系シグナルを修飾している。高血圧とGABAの関わりを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GABAによる利尿作用の詳細が明らかとなれば、尿酸上昇などの副作用が少ない新しい降圧利尿薬の開発を促す可能性もある。本研究では、GABA受容体に作用するリジンとその代謝物ピペコリン酸に着目することとなったが、GABA受容体の脱感作を司るGRK4の遺伝子多型とAQP2の相互作用が明らかになれば、高血圧症の個別化医療を実現するために重要な知見を与えることになる。

研究成果の概要(英文)：Dopamine acts on renal tubular dopamine D1 receptor (D1R) to induce natriuresis. When D1R is phosphorylated by GRK4, the receptor is desensitized, and urinary sodium excretion is decreased. Meanwhile, it was reported that GRK4 in the central nervous system also desensitizes GABA-B receptor R2 subtype, suggesting the possibility that GRK4 is additionally involved in the natriuretic actions of GABA. We analyzed renal expression of GABA receptors and found that GABA-R2 is expressed mainly in principal cells of collecting ducts. Also, we found that blood and urine concentrations of lysine were reduced in hypertensive model rats. Lysine is metabolized to pipercolic acid, which modulates GABA signaling. Our findings revealed possible mechanism of relations between hypertension and GABA.

研究分野：高血圧・内分泌内科学

キーワード：高血圧 GABA リジン アクアポリン ドーパミン GRK4

1. 研究開始当初の背景

-アミノ酪酸(GABA)は中枢の抑制性神経伝達物質で、GABAA 受容体アゴニストは催眠薬や麻酔薬として広く用いられる。しかし GABA は中枢だけでなく、末梢神経や末梢の非神経組織にも存在するが、その機能は不明である。ラットの腎臓では、GABA 自体が接合尿細管や集合管に含まれることから、神経伝達物質とは異なる腎特異的な機能が想定される(J Histochem Cytochem. 1992; 40: 675-680)。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す。GABA をヒトやラットに経口投与すると、Na 利尿が引き起こされ、血圧が低下する(Biosci Biotechnol Biochem. 2007 Jan; 71 :165-173)。また、GABAA 受容体や GABAB 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)。さらに GABAB 受容体刺激が虚血再灌流による腎機能障害を軽減する(JPET 338:767-774, 2011)。以上の報告から、腎臓で GABA が血圧調節や腎保護作用に大きく関与している可能性がある。しかし、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

-アミノ酪酸(GABA)は中枢で作用する抑制性神経伝達物質だが、末梢の非神経組織にも存在する。これまで我々は、ラット腎に GABA の合成酵素、受容体、トランスポーター、分解酵素など、一連の GABA 関連分子が発現することを初めて明らかにした。さらにその発現様式は腎臓と脳では異なることが分かった。これらのことから、GABA は腎特異的な機能を有すると考える。そこで本研究では、腎臓における GABA の役割を更に解明する。特に、近位尿細管における GABAA 受容体を介した腎保護作用と、集合管における GABAB 受容体を介したアキュアポリン 2(AQP2)の機能調節に着目する。本研究の成果から腎局所での GABA による腎保護効果や利尿調節機構を明らかにし、腎 GABA 系をターゲットにした直接的腎保護戦略の理論構築や、副作用の少ない新たな利用薬の開発と高血圧症の個別化治療に貢献する。

3. 研究の方法

GABA のみならず他のアミノ酸についても体内動態を検討した結果、リジンが高血圧の病態と関与することが分かった。食塩負荷をすると尿中に排泄されるアミノ酸が増加し、血中濃度が下がるアミノ酸が多かったが、リジンは WKY において唯一食塩負荷後に血中濃度が上昇することが示された。また、高血圧モデル SHR では、lysine の血中濃度も WKY にくらべ低いことが分かった。リジンはピペコリン酸に代謝されることによって GABA 系シグナルを修飾することが知られている。そこで、リジンの体内動態を明らかにすることから、腎における GABA 情報伝達経路の役割を探ることとした。

< 動物実験 >

8 週齢の高血圧自然発症ラット (SHR) とその対照である Wistar-Kyoto ラット (WKY) に対し、0.28% (通常食塩食) または 4% の食塩を添加した餌 (高食塩食) を 8 週間与えた。負荷前、負荷後 3 日、5 日、7 日時点において、代謝ケージを用い 24 時間塩酸蓄尿を施行した。また、糞便の採取を実施した。糞便は、PBS または蒸留水中で破碎し、遠心上清を 0.25 μm のフィルターにてろ過した。血漿サンプルは、負荷前、負荷後 7 日目のラットをそれぞれペントバルビタール (50 mcg/kg) の腹腔内注射により麻酔を行い、腹腔動脈から EDTA-2Na を添加した試験管に採血した。その際、急速脱血を行うことにより苦痛なく義死せしめた。2 つ目の実験として、8 週齢の SHR と WKY に対し、水道水または水道水に溶解した 10 g/L 濃度の L-リジンの投与を 4 週間実施した。血圧測定、尿量測定を定期的に行い、食塩付加試験と同様にサンプル調整を実施した。血漿アミノ酸濃度、糞便中アミノ酸濃度は LC/MS/MS 法にて測定した。すべての実験計画は、東京女子医科大学動物実験倫理委員会の審査により承認済みである (承認番号 15-156)。

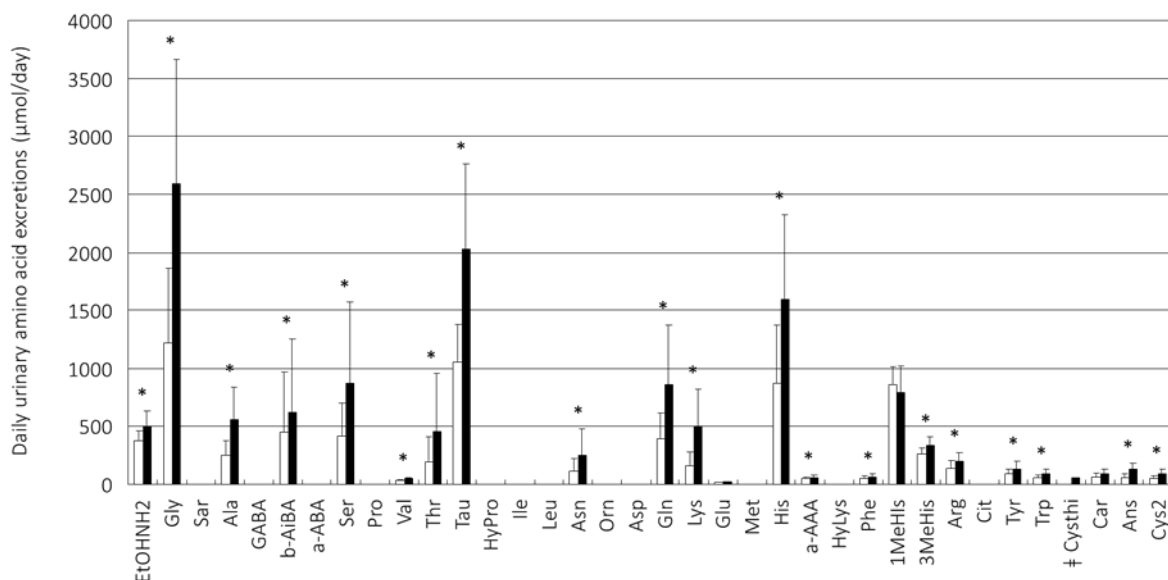
< 健常者尿サンプルにおける 1 日食塩摂取量と血漿アミノ酸濃度の関連解析 >

本研究の趣旨に書面をもって同意した健常成人 23 名を対象とした。日常的に摂取している食事 (日常食) をコントロールとし、低食塩食 (3 g/day) 7 日間、高食塩食 (20 g/day) 7 日間の試験食摂取を実施した。試験食は管理栄養士がメニュー作成を行い、被験者自らが調理した。それぞれの試験食摂取終了日前日より 24 時間蓄尿を実施した。終了日には、血圧・脈拍・体重測定、随時尿の採取と採血 (血漿・血清各 5 ml) を施行した。本試験の実施は、福島県立医科大学倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号: 1555)。血漿アミノ酸濃度は、動物実験の場合と同様に LC/MS/MS 法にて測定を行った。

4. 研究成果

健康成人に対する食塩負荷は、尿中アミノ酸排泄を増加させた。一方で、血漿中 leucine, asparagine, lysine, methionine, histidine, phenylalanine, 1-methylhistidine, tryptophan 濃度は有意に低下した (図 1)。

図 1) 健康成人に対する食塩負荷が尿中アミノ酸排泄に与える影響



WKY ラットにおいては、ヒトと同じように、食塩付加によって多くの尿中アミノ酸排泄は有意に増加した。同様に、多くの血漿中アミノ酸濃度は有意に低下した。しかし興味深いことに、尿中 lysine 排泄は食塩付加により約 3 倍に増加したにもかかわらず、血漿中 lysine 濃度は有意に約 2 割上昇した (図 2)。また、血漿中 lysine 濃度は、食塩付加前において SHR よりも WKY で有意に高いことが示された (図 3)。ラットにおいては尿中 lysine 排泄量が増加しているにもかかわらず血漿 lysine 濃度が上昇していることから、その機序が腎での再吸収増加によるものとは考えがたかった。また、食塩付加後の血漿アミノ酸プロフィールからは分枝鎖アミノ酸の上昇が一律には認められず、lysine 単独での上昇であることから、最大のアミノ酸プールである筋肉の分解による動員であるとも考えがたかった。すなわち、ヒトまたは WKY ラットと SHR との違いは腸管における lysine 吸収の違いである可能性を考え、糞便中の lysine 濃度測定を実施した。

図 2

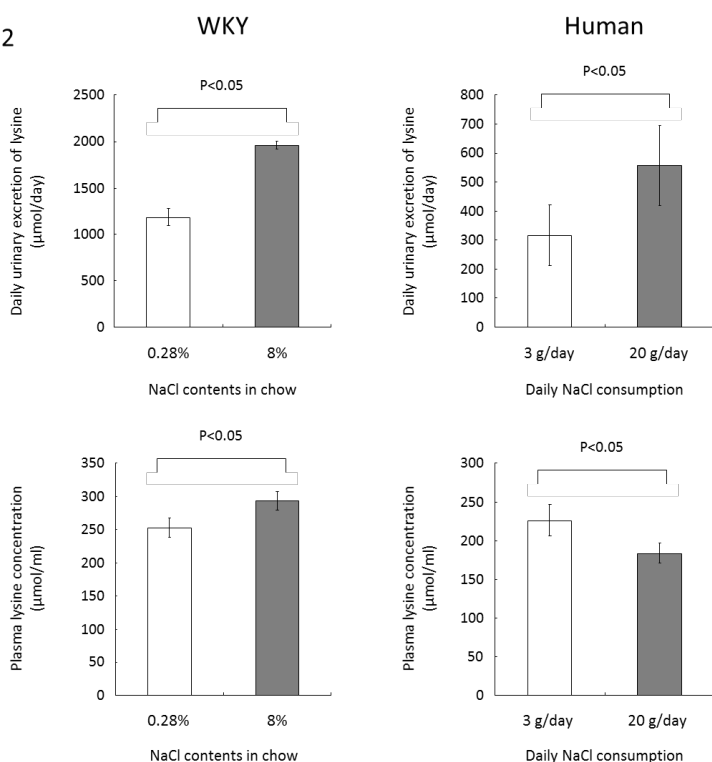


図 3)

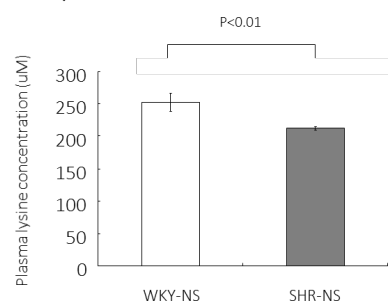


図 2) 尿中 lysine 排泄と血漿中 lysine 濃度、図 1A-D より抜粋して再掲

図 3) 血漿中 lysine 濃度のラット種による違い、*P<0.01, One-way ANOVA, N = 7-8

WKY ラットにおいて、PBS により菌体破壊を抑えた抽出法でも、水を用いた菌体破壊を促進する抽出法でも同じように、WKY の糞便中 lysine 濃度は、SHR のそれよりも高い傾向が認められた。

次に、腸管内または糞便中 lysine 濃度の低下を補う方法として、経口 lysine 付加を実施した。SHR ではやはり lysine 投与前で WKY よりも糞便中リジン濃度の低下が見られたが、lysine 付加によって有意な糞便中リジン濃度の上昇が見られ、そのレベルは lysine 付加前の WKY のそれに匹敵した。Lysine 付加によって有意な血圧の変化は見られなかったが、1 日尿量は lysine 付加をした SHR で有意な上昇が見られた。

本研究では、血圧が正常な WKY や健常ヒトと比較して、高血圧を示す SHR において有意な血漿 lysine 濃度の低下が見られたことをはじめて示した。げっ歯類は一般に食塩抵抗性であるが、リジン代謝の違いがその一因である可能性を考える。リジンは、5-hydroxytryptamine (5-HT; serotonin) 受容体に作用するとの報告があり 6、5-HT1A、5-HT2A 受容体を介してはアゴニストとして、5-HT4 などの受容体を介しては部分的アンタゴニストとして血圧低下作用を示す可能性がある。一方、リジンの代表的代謝物の中にはピペコリン酸が含まれる。GABA は GABAA 受容体と GABAB 受容体に作用して降圧効果を示すと考えられているが、ピペコリン酸は GABA 受容体のアゴニストとして働くとの報告がある。ラットで食塩負荷時に増加したリジンは上記に示すようなセロトニン受容体を介する機序のほか、代謝を受けてピペコリン酸として GABA 受容体を介するメカニズムで抗高血圧、食塩抵抗作用を發揮している可能性がある。ラットにおいて食塩負荷後に血漿リジン濃度の上昇とともに血漿ピペコリン酸が増加しているかどうかを今後検討する必要があり、血漿中ピペコリン酸の測定系構築に取り組んでいる。

本研究ではまた、WKY において、食塩付加によって血中に lysine が動員される機序は腸管内におけるアミノ酸代謝の違いである可能性を示した。L-lysine はヒトにおいて体内で合成できない必須アミノ酸であるが、腸内細菌叢を形成する一部の微生物は lysine を産生し、その産生効率はナトリウム濃度に影響される。どの微生物が生体の腸管内で lysine 産生をつかさどっているかは今後検討が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1) 谷田部緑、谷田部淳一、木田可奈子、上野聡子、中山聡、森本聡、市原淳弘：高血圧自然発症ラットにおける相対的低リジン血症への糞便中リジン濃度の関与：第 60 回日本腎臓学会学術集会 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。