

平成 23 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590983

研究課題名（和文）単離接合尿細管細胞でのカリクレイン分泌低下機序解明と多型保有者での食塩感受性検討

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms for the decrease in kallikrein secretion in isolated renal connecting tubular cells and examination of salt sensitivity on polymorphisms

研究代表者

藤田 朋恵 (FUJITA TOMOE)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：20296510

研究成果の概要（和文）：(1) ラット腎接合尿細管を初代培養しカルシウムイメージングモデルを作成した。バソプレシンは細胞内カルシウムを増加し、その反応は V1a 受容体によるものであった。(2) SV40 ラージ T 抗原遺伝子導入ラットの腎初期集合管を単離し、限界希釈によりカリクレイン分泌細胞の樹立を試みた。得られた細胞は介在細胞が大部分で、カリクレインを産生する主細胞はわずかであった。(3) 日本人健康成人 77 名においてカリクレインプロモータ多型者 6 名を検出した。同多型者では非多型者に比べ尿中カリクレイン活性は低く、飲水負荷後のナトリウム排泄量は高かった。

研究成果の概要（英文）：(1) We have established a calcium imaging model on primary cultured rat renal connecting tubules. Vasopressin increases intracellular calcium via a V1a receptor. (2) We have tried to obtain monoclonal cells of the kallikrein secreting cell by maximum diluting cultured cells derived from the renal initial collecting tubules isolated from SV40 large T antigen transgenic rats. Most of the cultured cells were intercalated cells and kallikrein secreting cells were few. (3) Six subjects among the 77 healthy Japanese volunteers have the polymorphism in the renal kallikrein promoter. Urine kallikrein activity was lower and sodium excretion was higher after water loading in the subjects with the promoter polymorphism than the subjects without the polymorphism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究専門分野：薬理学、臨床薬理学

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：マイクロダイセクション、腎接合尿細管、腎カリクレイン、カルシウムイメージング、SV40 ラージ T 抗原遺伝子導入ラット、遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

(1) 尿中カリクレイン分泌低下は食塩感受性高血圧発症の一要因と考えられている。カリクレイン分泌の細胞内機序についてはカリクレインを分泌している細胞が腎遠位尿細管の一部に限局することからその単離が困難であり十分な検討がなされていない。

(2) 尿中カリクレイン低下を示すカリクレイン遺伝子多型保有者での尿中ナトリウム排泄量は非多型保有者に比べて低下していないという報告があるが、大規模な高血圧患者のケースコントロール研究ではカリクレイン遺伝子多型が高血圧のリスクと関係することが報告されており、カリクレインのヒト高血圧症発症に対する役割は不明である。

2. 研究の目的

(1) ラット腎接合尿細管単離による初代培養細胞を用いたカルシウムイメージングモデルの作成とカリクレイン分泌刺激薬によるカルシウム濃度測定

(2) SV40 ラージT 抗原遺伝子導入ラット腎接合尿細管単離による継代細胞を用いたカリクレイン産生単一細胞の樹立と同細胞を用いたカリクレイン分泌細胞内機序の検討

(3) ヒトカリクレイン遺伝子多型検索と尿中カリクレイン分泌低下を伴う多型保有者でのナトリウム排泄能の検討

3. 研究の方法

(1) カルシウムイメージングモデルの作成

① 初代培養細胞作成：4 週齢雄性ラット (Sprague Dawley rat, Wistar Kyoto rat) を用いて、ハンクス液、0.05% Collagenase type I 入りハンクス液の順に灌流し腎摘出。0.5~1 mm 切片にし0.1% Collagenase type I 入りハンクス液で 30~60 分インキュベーション。洗浄後、実体顕微鏡下 60~80 倍で接合尿細管を形態的特徴により単離し、Collagen type I コートガラス上で初代培養する。

② イメージング: 培養 2-3 日目の細胞を使用。Ringer 液 (pH 7.5) に蛍光カルシウム指示薬 fura2-AM (2 μM) を加え細胞を 30 分、37°C インキュベート。蛍光指示薬洗浄後、下記組成液を加え、蛍光顕微鏡下 2 波長励起 340nm/380nm 比から放出波長 510nm で細胞内カルシウム濃度変化の経時的画像を得る (高速カルシウム濃度測定システム)。

(2) カリクレイン産生単一細胞の樹立

SV40 ラージT 抗原遺伝子導入ラットから上記①の方法で接合尿細管および初期集合管を採取し、継代培養細胞を得た。得られた細胞塊を 96 穴に 1 個ずつに播かれるように限界希釈し、単一細胞から増殖したと思われる細胞塊を得た。介在細胞、主細胞 (初期集合

管)、接合尿細管細胞 (接合尿細管)、線維芽細胞のマーカ遺伝子の発現量を測定し、細胞の種類と混合比率を推定した。

(3) カリクレイン多型検索と尿中カリクレイン排泄量、ナトリウム排泄率測定

① 対象：日本人 20~45 歳までの健康な男女で文書同意の得られた者

② 多型解析：末梢白血球 DNA を用いたカリクレイン遺伝子のダイレクトシーケンス

③ 尿、血清採取：随時尿 (1 回目)、飲水 500ml 後随時尿 (2 回目) 中のカリクレイン活性、ナトリウム濃度、クレアチニン濃度と血清ナトリウム、クレアチニン濃度の測定

4. 研究成果

(1) カルシウムイメージングモデルの作成

① 接合尿細管の初代培養 (SD rat)

図 1 に腎皮質から酵素処理、実体顕微鏡下で単離した接合尿細管像、初代培養細胞像およびカリクレインをマーカーとした接合尿細管細胞の分布を示す。

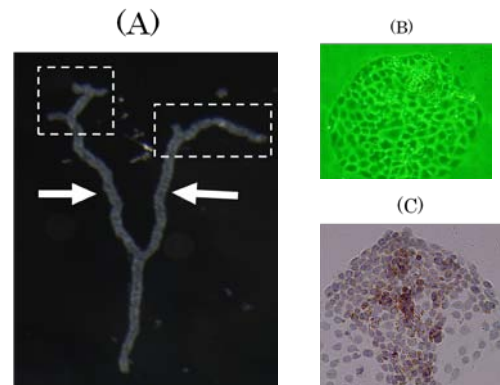


図 1. (A) 実体顕微鏡下单離接合尿細管および初期集合管像。接合尿細管はアーケードを形成し (点線内) 初期集合管へ移行する (矢印)。初期集合管は集合管へ合流する (直線)。(B) 相差顕微鏡下单離接合尿細管の初代培養細胞。培養 4 8 時間後に小島を形成した。(C) 細胞小島中カリクレイン陽性細胞分布。ラット抗カリクレイン抗体で染色した。細胞質内に分泌顆粒として染色される細胞を確認した。

遠位尿細管の上流部に位置する遠位曲尿細管から接合尿細管部を確実に単離できたかを確認するために、図 2 に遠位曲尿細管と接合尿細管として単離した初代培養細胞中の各尿細管のマーカ遺伝子発現量を比較したものを示す。(A), (B) は接合尿細管、(C) は遠位曲尿細管のマーカ遺伝子である。

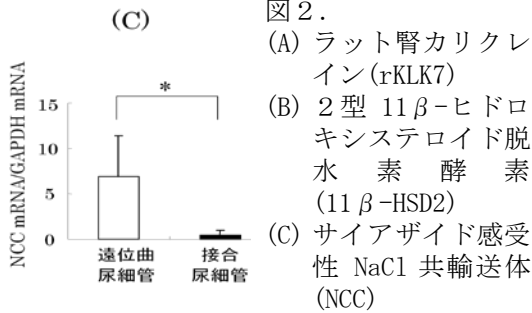
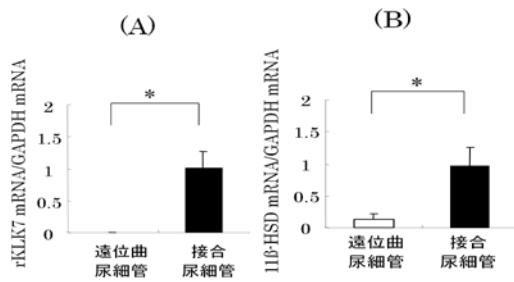


図 2.

- (A) ラット腎カリクレイン (rKLK7)
 (B) 2型 11β-ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (11β-HSD2)
 (C) サイアザイド感受性 NaCl 共輸送体 (NCC)

平均±標準誤差、*P<0.05
 N=3、5 (各遠位曲尿細管、接合尿細管)

②カルシウムイメージング測定(WKY rat)
 カリクレイン分泌増加作用のある高カリウム液とバソプレッシン(AVP)を細胞添加後、細胞内カルシウム濃度を測定した(図3-5)。

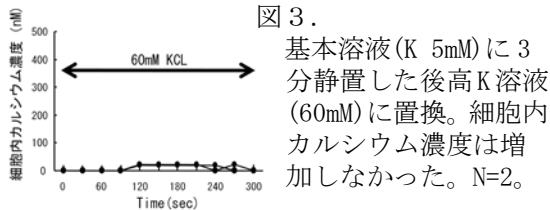


図 3.

基本溶液(K 5mM)に3分静置した後高K溶液(60mM)に置換。細胞内カルシウム濃度は増加しなかった。N=2。

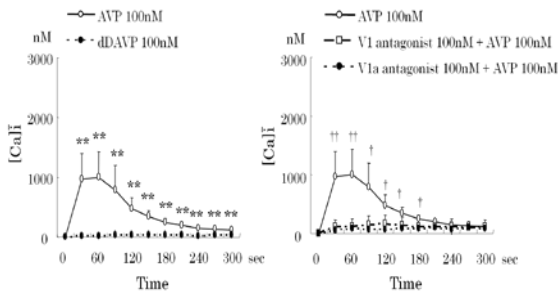


図 4. AVP により細胞内カルシウム濃度は増加したがV₂受容体 agonist では増加しなかった。増加反応はV₁受容体、V_{1a}受容体拮抗薬で抑制された。

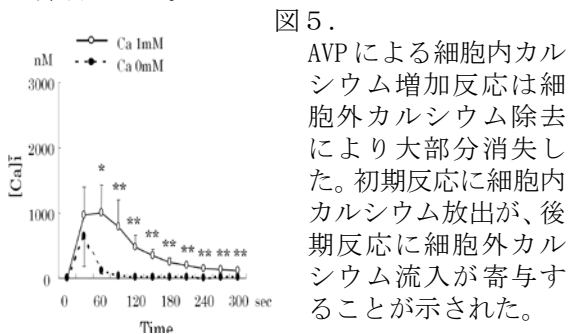


図 5.

AVP による細胞内カルシウム増加反応は細胞外カルシウム除去により大部分消失した。初期反応に細胞内カルシウム放出が、後期反応に細胞外カルシウム流入が寄与することが示された。

国内外における位置づけ、インパクト:ラットにおいて接合尿細管という限局した部位を単離し細胞内カルシウムイメージングを確立したことは国内外の研究報告としてほとんどない。接合尿細管の細胞内カルシウム動態を調べるのに有用なモデルになる。

今後の展望:ラット高血圧モデル動物に応用し、接合尿細管の高血圧発症に対する役割をカルシウム動態の面から明らかにする。

(2) カリクレイン産生単一細胞の樹立

図6にSV40導入ラットから単離した初期集合管を複数回継代培養し、得られた細胞中マーカー遺伝子発現量を内部標準遺伝子GAPDHに対する相対値として示す。

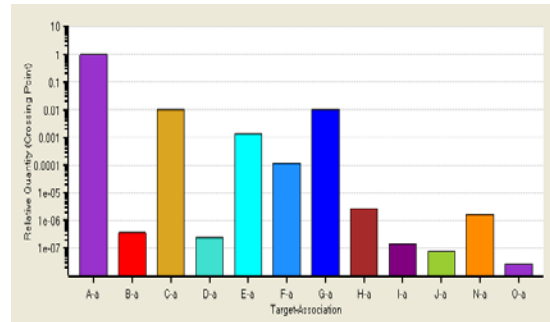


図 6.

A:GAPDH, B:COL4a, C:CAR2, D:KLK, E:11bHSD, F:SCNN1b, G:Atp6V1b1, H:NCC, I:NCX, J:AQP2, N:Atpla1, O:Atp1b1
 Bは線維芽細胞、C, Gは介在細胞、D, E, F, J, N, Oは主細胞、Hは遠位曲尿細管細胞のマーカー。

介在、主細胞の代表的な細胞膜蛋白の遺伝子発現(GのH+ATPaseとNのNa+/K+ATPase)の相対値から主細胞は介在細胞の1万分の1程度しか存在していないことが示された。本来、介在細胞の割合はラットで、接合尿細管42%、初期集合管43%と報告されていること(Kimら、J Am Soc Nephrol 1999)。今回分布割合が著しく変化した原因として継代を繰り返した過程で、介在細胞の増殖力が主細胞のそれを上回ったことが考えられた。

国内外における位置づけ、インパクト:ラット皮質集合管の初代培養にSV40を導入して得た細胞やSV40導入マウス由来集合管主細胞を用いた研究報告はあるが、接合尿細管細胞の樹立はなされていない。カリクレイン分泌に関する細胞内機序についてはこれまでその限定的な局在から検討されていない。

今後の展望:細胞表面マーカーとなる蛍光標識レクチンを用いてフローサイトメトリーによる細胞のソーティングを行った後、限界希釈により主細胞、接合尿細管細胞の単一化を目指す。

(3) カリクレイン多型検索と尿中カリクレイン排泄量、ナトリウム排泄率測定

図7として、ヒトカリクレイン遺伝子(hKLK1)のシエーマと今回解析を行った多型部位を示す。

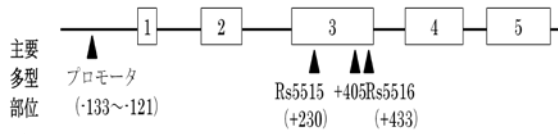


図7.

表1. プロモータ領域多型アレル頻度

型	77人 (今回)	18人 (アジア人の既報)
A	0.708	0.611
B	0.201	0.111
H	0.078	0.250

表2. エクソン3領域多型アレル頻度

SNP	アミノ酸	60人 (今回)	45人 (中国人の既報)
rs5515	R→H	0.000	不明
-	D→D	0.200	不明
rs5516	Q→E		0.200

尿中カリクレイン活性低値を示す多型であるプロモータH型とエクソン3 rs5515の内後者のSNPは検出されなかったため、H型と非H型保有者とで尿中カリクレイン活性、ナトリウム排泄率などを比較した。測定は同意を得た者として、H型保有者6名中5名、非H型保有者71名中55名で行った。

図8(A)、(B)に各々1回目、2回目(飲水後)の尿中カリクレイン活性値を尿中クレアチニン補正值として示す。

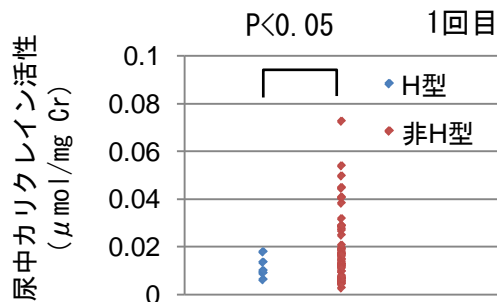


図8.(A)

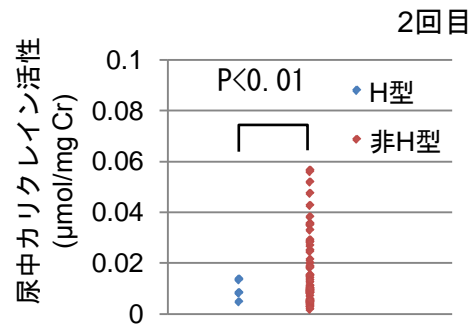


図8.(B)

表3. 尿中ナトリウム排泄率 FeNa (%)

	H型	非H型	ttest
1回目	0.49±0.09	0.52±0.46	0.699
2回目	1.10±0.17	0.85±0.50	0.027

表4. 尿中ナトリウム排泄量 (mEq/mg Cr)

	H型	非H型	ttest
1回目	0.11±0.01	0.11±0.07	0.912
2回目	0.24±0.03	0.18±0.08	0.007

1回目排尿におけるナトリウム排泄率および排泄量はH型、非H型とも違いがなかった。しかし、飲水後において両評価項目はH型において非H型に比べ高いことが示された。

国内外における位置づけ、インパクト:日本人においてカリクレイン遺伝子多型および尿中カリクレイン活性低値を示す多型報告はない。尿中カリクレイン低下を示すプロモータ領域多型を約8%に認めた。さらに、同多型者で尿中ナトリウム排泄量が飲水負荷後に非多型者に比べ高いことが示された。

今後の展望:これまでカリクレイン活性低下によりナトリウム排泄が減弱すると考えられてきた。今回の結果は予想に反しカリクレイン活性低下者で飲水負荷後にナトリウム排泄能が高いことが示された。カリクレイン欠損マウスで遠位尿細管ナトリウムチャネル活性低下が報告されていることから、結果は多型者でのナトリウム再吸収能低下を反映するかもしれない。カリクレインの腎ナトリウム調節における役割をH型、非H型多型者での比較試験によって明らかにする。

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9件)

- ① Yamazaki A, Kumagai Y, Yamane N, Tozuka Z, Sugiyama Y, Fujita T, Yokota S, Maeda M. Microdose study of a P-glycoprotein substrate, fexofenadine, using a non-radioisotope-labelled drug and LC/MS/MS. *J Clin Pharm Ther* 35 : 169-175, 2010、査読あり
- ② Fujita T, Kumagai Y, Nakahara I, Ohtani Y, Majima M. Estimating the Contribution of Genes to Variation in Renal Drug Clearance by Active Secretion Using Multiple Data From Clinical Phase I Studies. *J Clin Pharmacol*, 50/1 : 109-114, 2010、査読あり
- ③ Kamata Y, Fujita T, Kato T, Hayashi I, Kurosaka M, Katori M, Fujita Y, Majima M. An ATP-sensitive potassium channel blocker suppresses sodium-induced hypertension through increased secretion of urinary kallikrein. *Hypertens Res* 32(3) : 220-226, 2009、査読あり
- ④ Kumagai Y, Fujita T, Ozaki M, Yokota S, Maeda M, Shida M, Otani Y, Yamaya H, Tsuruta H. Safety, tolerability and pharmacokinetics of TAS-108, a novel anti-oestrogen, in healthy post-menopausal Japanese women: a phase I single oral dose study. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 104/5:352-359, 2009、査読あり
- ⑤ 杉山篤, 福田涼子, 毛利光志, 藤田朋恵, 熊谷雄治. Levofloxacin 注射剤 500mg 単回投与の健康被験者における QT 間隔に対する影響. *日本化学療法学会雑誌* 57/2, 106-114, 2009、査読あり
- ⑥ Tomoe Fujita, Shuichi Yasuda, Yuji Kamata, Kazumi Fujita, Yoshio Ohtani, Yuji Kumagai, Masataka Majima. Contribution of down regulation of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A to increased absorption of cyclosporine A in a rat nephrosis model. *J Pharmacol Exp Ther*, 327(2), 592-599, 2008、査読あり
- ⑦ 藤田朋恵, 石原和彦, 藤田和己, 池田康彦, 大谷義夫, 熊谷雄治, 馬嶋正隆. 有

機アニオン性尿毒症毒素インドキシル硫酸腎排泄への腎尿細管分泌の大きな寄与-L-トリプトファン経口負荷投与後健康成人での検討-臨床薬理の進歩 No. 29 : 106-112, 2008、査読なし

- ⑧ Katori M, Majima M. Are all individuals equally sensitive in the blood pressure to high salt intake? (Review article). *Acta Physiol Hung.* 95(3):247-65, 2008、査読なし
- ⑨ Katori M, Majima M. A role of the renal kallikrein-kinin system in the kidney. *Acta Physiol Hung.* 95(1):127-8; author reply 129-30, 2008、査読なし

[学会発表] (計10件)

- ① 前田実花, 野村今日子, 脇坂真美, 江旻, 王国琴, 小林真美, 高橋賢成, 藤田朋恵, 池田康彦, 黒山政一, 熊谷雄治. 日本人及び中国人(漢民族)を対象とした1施設による薬物動態比較試験の実施体制の検討-企画・立案から実施までの課題-, 第31回日本臨床薬理学会, 2010/12/3, 京都国際会議場
- ② 脇坂真美, 江旻, 池田康彦, 藤田朋恵, 高橋賢成, 中村智美, 斉藤由美子, 前田実花, 王国琴, 佐藤美穂子, 蓮沼智子, 熊谷雄治. 日本人及び中国人(漢民族)でのアセトアミノフェン薬物動態の比較, 第31回日本臨床薬理学会, 2010/12/3, 京都国際会議場
- ③ 藤田朋恵, 石原和彦, 安田修一, 熊谷雄治, 馬嶋正隆. 尿細管分泌の面からみた有機アニオン性尿毒症惹起物質インドキシル硫酸とアンジオテンシン変換酵素阻害薬との生体内での相互作用. 第31回日本臨床薬理学会, 2010/12/2, 京都国際会議場
- ④ 中村智美, 石崎沙織, 高橋賢成, 前田実花, 黒山政一, 田ヶ谷浩邦, 池田康彦, 藤田朋恵, 熊谷雄治. 臨床薬理試験参加希望者の検査データの年次調査1-血算-, 第31回日本臨床薬理学会, 2010/12/1, 京都国際会議場
- ⑤ Yuji Kumagai, Tomoe Fujita, Atsuhiko Kawaguchi ら. Phase I Study of the Safety, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Teneligliptin, a New DPP-IV Inhibitor, in Healthy Volunteers. *American Diabetes Association's 70th Scientific Sessions 2010/6/28, Orlando, FL(米国)*
- ⑥ 川口敦弘, 林義治, 近藤和興, 藤田朋恵, 熊谷雄治. 新規 DPP-IV 阻害薬

teneligliptin の健康成人における薬物動態及び薬理学的効果. 第 53 回日本糖尿病学会、2010/5/27、岡山コンベンションセンター

- ⑦ Yuji Kumagai, Shigeto Kanada, Tomoe Fujita, Masayuki Yamaguchi, Sayaka Shimada, Kaneo Sekiguchi . The relationship among PK/PD profiles of Aliskiren administered orally after meal in Japanese patients with essential hypertension、第 30 回日本臨床薬理学会年会、2009/12/04、パシフィコ横浜会議センター
- ⑧ Yuji Kamata, Tomoe Fujita, Shuichi Yasuda, Yoshikuni Fujita, Masataka Majima. Elevation of intracellular calcium in response to vasopressin and bradykinin in primary cultured rat isolated renal connecting tubule segments. 第 82 回日本薬理学会年会、2009/3/18、パシフィコ横浜
- ⑨ 前田実花、横田慎一、野村今日子、藤田朋恵、池田康彦、高橋賢成、小川幸雄、黒山政一、佐藤敏彦、熊谷雄治. 臨床研究／臨床試験コーディネーター(CRC)教育・研修プログラムに関する検討(1)－CRC教育・研修ラダーシートの検討と構築－ 第 29 回日本臨床薬理学会年会、2008/12/06、東京
- ⑩ 江旻、熊谷雄治、藤田朋恵、馬嶋正隆. 医薬品承認用量の国際比較 第 I 報－日本と中国の比較－ 第 29 回日本臨床薬理学会、2008/12/04、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 朋恵 (FUJITA TOMOE)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：20296510

(2) 研究分担者

馬嶋 正隆 (MAJIMA MASATAKA)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：70181641

