

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591244

研究課題名(和文)バゾプレッシン 1a受容体によるアルドステロン受容体核内輸送機構の解明

研究課題名(英文)The mechanisms of regulation of nucleocytoplasmic transport of mineralocorticoid receptor by vasopressin V1a receptor.

研究代表者

野々口 博史 (Nonoguchi, Hiroshi)

北里大学・北里大学メディカルセンター・副院長

研究者番号：30218341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：腎集合尿管間細胞由来のcell line(IN-1C cell)を用いて、アルドステロンの核内受容体であるミネラルコルチコイド受容体(MR)が細胞質から核内への輸送を免疫組織学的に証明し、その輸送には、アルドステロンによるRegulator of chromosome condensation-1 (RCC-1)の活性化とバゾプレッシンV1a受容体の存在が必須であることを明らかにした。一方、バゾプレッシンはRan Gap1の活性化を抑えることで、MRの核外への輸送を抑制していることも明らかにした。また、アルドステロンとバゾプレッシンによるPKC活性化は、異なる経路であることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We showed that aldosterone stimulated nucleocytoplasmic transport of mineralocorticoid receptor (MR) in rat intercalated cells using immunohistochemistry and Western blot. Aldosterone was found to stimulate RCC-1 activity, whereas vasopressin decreases the activation of Ran Gap1. The presence of vasopressin V1a receptor was required for the stimulation of nucleocytoplasmic transport of MR.

Aldosterone and vasopressin stimulate PKC pathway. However, aldosterone stimulates atypical or novel PKC pathways whereas vasopressin stimulate conventional PKC pathway. Although EGF receptor has been thought to be a membrane-bound receptor of aldosterone, further investigations are required to draw the conclusion.

研究分野：腎生理

キーワード：アルドステロン バゾプレッシン ミネラルコルチコイド受容体 バゾプレッシンV1a受容体 核内受容体 間細胞 small G protein 酸塩基平衡

1. 研究開始当初の背景

アルドステロンの受容体であるミネラルコルチコイド受容体(MR)は、核内受容体であり、細胞質から核内へ輸送されることが必要である。腎臓の集合尿細管の間在細胞では、MR とともに、バゾプレッシン V1a 受容体(V1aR)が発現しているが、バゾプレッシン V2 受容体(V2R)は発現していない。V1aR-KO マウスでは、アルドステロンによる尿酸性化作用が低下しており、V1aR がアルドステロンによるMR核内輸送に関与していると考えられた。

2. 研究の目的

アルドステロンによるMR核内輸送の制御機構を探り、V1aR がそれにどのように関与しているのかを検討することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

V1aR-ko マウスと我々が独自に開発したラット集合尿細管間在細胞 CELL LINE (in-ic CELL)を用いて、免疫組織学、細胞質と核分画に分けた Western Blot 法を用いて、検討を行った。また、in situ hybridization 法を用いて、エリスロポエチン遺伝子発現についても検討した。

4. 研究成果

腎集合尿細管間在細胞である IN-IC cell アルドステロンを投与すると、30 分後にはMRの核内への輸送が見られた。siRNAにより、V1aR 遺伝子をノックダウンすると、その作用は完全に消失した。アルドステロン投与 30 分後には、MR 発現は増加しておらず、non-genomic なさようであった。バゾプレッシンでも、同様に、MRの核内への輸送が見られた。その際のMR輸送蛋白やRan cycle の変化を見ると、アルドステロンによるRCC-1の核内での発現増加と、バゾプレッシンによるRan Gap1の発現低下が認められた。この二つの変化は、核内のGTP型Ranの増加からMRの核内への輸送を刺激すると考えられた。腎での酸排泄部位である腎集合尿細管間在細胞における酸排泄を行うアルドステロンの作用には、バゾプレッシンV1a受容体の存在が必須であることが判明した。結果からはこれまでのその機序については、不明であるが、V1aRが細胞骨格形成に関与し、それが破たんするためにMRの核内輸送が障害される可能性が考えられる。

また、高感度 in situ hybridization 法を用いて、正常状態においては、腎皮質部の尿細管、中でも集合尿細管間在細胞で特に産生されることを明らかにした。マウスを 1%

の低酸素 4 時間にすると、腎間質でのエリスロポエチン産生が著明に増加した。尿細管でも増加を認めたが、2 倍程度であった。低酸素刺激では、Hypoxia inducible factor 2 α (HIF2 α) 発現が増加することが知られているが、その代謝に重要な HIF prolyl hydroxylase 2 (PHD2) がエリスロポエチン産生が認められる皮質部尿細管に広く発現し、低酸素で遺伝子発現が増加することも明らかにした。このエリスロポエチン産生に重要と考えられている HIF2 α 産生は、コントロールマウスに外因性アルドステロンであるフロリネフを投与すると増加したが、バゾプレッシン V1aR-KO マウスでは増加が認められず、アルドステロンは造血ホルモンでもあり、その作用には、V1aR が関与していることも明らかにした。MRの核内輸送との関連に関しては、検討中である。

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 15 件)

- 1) 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)(In press)
- 2) 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)2014;453(3):356-61. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.089.
- 3) 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)2014; 449(2):222-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.014.
- 4) Izumi Y, Kawahara K, Nonoguchi H. Combined angiotensin inhibition in diabetic nephropathy. *N Engl J Med.* (査読有)2014;370(8):777-8. doi: 10.1056/NEJMc1315504#SA2.
 - 5) Klootwijk ED, Reichold M, Helip-Wooley A, Tolaymat A, Broeker C, Robinette SL, Reinders J, Peindl D, Renner K, Eberhart K, Assmann N, Oefner PJ, Dettmer K, Sterner C, Schroeder J, Zorger N, Witzgall R, Reinhold SW, Stanescu HC, Bockenbauer D, Jaureguiberry G, Courtneidge H, Hall AM, Wijeyesekera AD, Holmes E, Nicholson JK, O'Brien K, Bernardini I, Krasnewich DM, Arcos-Burgos M, Izumi Y, Nonoguchi H, Jia Y, Reddy JK, Ilyas M, Unwin RJ, Gahl WA, Warth R, Kleta R. Mistargeting of peroxisomal EHHADH and inherited renal Fanconi's syndrome. *N Engl J Med.* (査読有) 2014; 370(2):129-38. doi: 10.1056/NEJMoa1307581.
 - 6) 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)2013;8(12):e83146. doi: 10.1371/journal.pone.0083146.
 - 7) 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 OMCD(is) are the target of the vasopressin V1a receptor axis for urinary acidification. *Clin Exp Nephrol.* (査読有)2013;17(6):783-92. doi: 10.1007/s10157-013-0783-y.
 - 8) Izumi Y, Ogawa M, Itoh H, Shimada H, Nonoguchi H. Association of chronic kidney disease with adverse outcomes. *Lancet.* (査読有)2013;381(9866):531. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60271-8
 - 9) Koshimizu TA, Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H, Tanoue A. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol Rev.* (査読有) 2012;92(4):1813-64. doi: 10.1152/physrev.00035.2011.
 - 10) 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 V1a receptor. *Clin Exp Nephrol.* (査読有)2013; 17(2):183-90. doi: 10.1007/s10157-012-0686-3
 - 11) Hori K, Nagai T, Izumi Y, Kimura M, Hasuike Y, Nakayama Y, Nanami M, Tokuyama M, Otaki Y, Kuragano T, Kohda Y, Obinata M, Kawahara K, Tanoue A, Tomita K, Nakanishi T, Nonoguchi H. Vasopressin V1a receptor is required for nucleocytoplasmic transport of mineralocorticoid receptor. *Am J Physiol Renal Physiol.* (査読有)2012;303(7):F1080-8. doi: 10.1152/ajprenal.00052.2012.
 - 12) Moriguchi R, Otaki Y, Hazeki S, Shimada T, Matsumoto A, Kakita N, Kaibe S, Kuragano T, Nonoguchi H, Masayoshi N, Hasuike Y, Nakanishi T. High levels of tumor necrosis factor- α downregulate antimicrobial iron transport protein, Nramp1, in chronic hemodialysis patients: a key factor for infection risk. *Am J Nephrol.* (査読有) 2012; 35(4):372-8. doi: 10.1159/000337742.
 - 13) Yahiro M, Kuragano T, Kida A, Kitamura R, Furuta M, Hasuike Y, Otaki Y, Nonoguchi H, Nakanishi T. The impact of ferritin fluctuations on stable hemoglobin levels in hemodialysis patients. *Clin Exp Nephrol.* (査読有)2012;16(3):448-55. doi: 10.1007/s10157-011-0584-0.
 - 14) Kuragano T, Kida A, Furuta M, Yahiro M, Kitamura R, Otaki Y, Nonoguchi H, Matsumoto A, Nakanishi T. Effects of acetate-free citrate-containing dialysate on metabolic acidosis, anemia, and malnutrition in hemodialysis patients. *Artif Organs.* (査読有)2012;36(3):282-90. doi: 10.1111/j.1525-1594.2011.01349.x.
 - 15) Hasuike Y, Hama Y, Nonoguchi H, Hori K, Tokuyama M, Toyoda K, Hazeki S, Nanami M, Otaki Y,

Kuragano T, Nakanishi T. Persistent homocysteine metabolism abnormality accelerates cardiovascular disease in hemodialyzed patients--the Nishinomiya Study. *J Ren Nutr.* (査読有) 2012; 22(1):12-8.e1. doi: 10.1053/j.jrn.2011.04.005.

〔学会発表〕(計 15 件)

- 1) Izumi Y, Yasuoka Y, Nagai T, Nakayama Y, Inoue H, Nakanishi T, Mukoyama M, Kawahara K, Nonoguchi H. Erythropoietin production by the nephron. 47th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2014/11/15. Philadelphia, USA.
- 2) 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. 47th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2014/11/14. Philadelphia, USA.
- 3) Izumi Y, Nakayama Y, Inoue H, Onoue T, Nonoguchi H, Kakizoe Y, Kuwabara T, Mukoyama M. Computational analysis of the effect of aldosterone and low pH on gene expression and cell function. 47th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2014/11/15. Philadelphia, USA.
- 4) 泉裕一郎、安岡有紀子、永井孝憲、中山裕史、井上秀樹、中西健、向山政史、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回日本腎臓学会総会。2014年7月6日、パシフィコ横浜、神奈川、横浜。
- 5) 安岡有紀子、佐藤雄一、野々口博史、河原克雅。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回日本腎臓学会総会。2014年7月5日、パシフィコ横浜、神奈川、横浜。
- 6) Izumi Y, Yasuoka Y, Nagai T, Nakayama Y, Nanami M, Nakanishi T, Tasnoue A, Kawahara K, Nonoguchi H. Mechanisms of Erythropoietin production by Aldosterone in intercalated cells. 46th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2013/11/8, Atlanta, USA.
- 7) Yasuoka Y, Sato Y, Nonoguchi H, Kawahara K. Calcium salts affect acid-base balance by stimulating differently types A and B of intercalated cells in mouse kidney collecting ducts. 46th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2013/11/8. Atlanta USA.
- 8) 永井孝憲、堀加穂理、泉裕一郎、中山裕史、倉賀野隆裕、富田公夫、河原克雅、田上昭人、野々口博史、中西健。低酸素血症およびアルドステロンによる集合管の間在細胞におけるエリスロポエチンの産生機構。第56回日本腎臓学会総会、2013年5月10日、東京国際フォーラム、東京
- 9) 安岡有紀子、佐藤雄一、野々口博史、河原克雅。マウス集合尿細管間在細胞(type B)におけるカルシウム感受性受容体(CaSR)の役割。第56回日本腎臓学会総会、2013年5月10日、東京国際フォーラム、東京
- 10) Nagai T, Hori K, Izumi Y, Kimura M, Nakayama Y, Hasuike Y, Nanami M, Otaki Y, Kuragano T, Tomita K, Kawahara K, Tanoue A, Nakanishi T, Nonoguchi H. Hypoxia and aldosterone stimulate erythropoietin production in intercalated cells of the collecting ducts. 45th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2012/11/1., San Diego, USA.
- 11) Yasuoka Y, Sato Y, Nonoguchi H, Kawahara K. Upregulation of mice carbonic anhydrase XII in the alpha-intercalated cellof outer medullary collecting duct during acidosis. 45th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2012/11/1, San Diego, USA.
- 12) 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V1受容体の役割。第55回日本腎臓学会総会、2012年6月1日、パシフィコ横浜、神奈川、横浜
- 13) 永井孝憲、田中彩子、蓮池由紀子、野々口博史、中西健。4型腎尿細管性ア

シドーシス。堀加穂理。第55回日本腎臓学会総会、2012年6月1日、パシフィコ横浜、神奈川、横浜

- 14) 永井孝憲、堀加穂理、蓮池由紀子、小瀧慶長、倉賀野隆裕、野々口博史、中西健。バゾプレッシンV1aレセプターによるミネラルコルチコイドレセプター細胞質核内輸送制御機構。第55回日本腎臓学会総会、2012年6月2日、パシフィコ横浜、神奈川、横浜
- 15) 蓮池由紀子、福本裕美、海邊正治、徳山正徳、西影裕文、木田有利、小瀧慶長、倉賀野隆裕、野々口博史、中西健。持続型の赤血球造血刺激因子製剤による治療は低反応性貧血と鉄制御の異常を改善する。第55回日本腎臓学会総会、2012年6月2日、パシフィコ横浜、神奈川、横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

野々口 博史 (HIROSHI NONOGUCHI)
北里大学・北里大学メディカルセンター・
副院長
研究者番号：30218341

(2)研究分担者

中西 健 (TAKESHI NAKANISHI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：70217769

(3)連携研究者

河原 克雅 (KATSUMASA KAWAHARA)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：70134525

中山 裕史 (YUSHI NAKAYAMA)
熊本大学・医学部・准教授
研究者番号：003635312

安岡 有紀子 (YUKIKO YASUOKA)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：50348504

泉 裕一郎 (YUICHIRO IZUMI)
熊本大学・医学部・研究員
研究者番号：20736243