

論文の内容の要旨

氏名 白井 雅弓

論文題目 Effects of angiotensin II specific to human renal proximal tubule transport
(アンジオテンシン II のヒト近位尿細管特異的作用の解析)

【背景】高血圧症は心血管疾患の重要な要因である。血圧調節には多くの臓器が関与しており、中でも腎臓の Na 排泄機構が大きな決定因子であることが近年示唆されている。腎臓の近位尿細管では、糸球体濾過された塩分の約 60% を再吸収している。この過程は管腔側の Na/H 交換輸送体 (NHE3) と基底側のナトリウム・重炭酸共同輸送体 (NBCe1) をはじめとしたナトリウム輸送体に依存する。アンジオテンシン II (Ang II) はこれらの Na 輸送体の調節を介して、血圧調節に大きな影響を与えることが示されている。

Ang II の受容体にはアンジオテンシン II タイプ 1 受容体 (AT₁受容体) ・アンジオテンシン II タイプ 2 受容体 (AT₂受容体) が存在し、腎臓では主に AT₁受容体を介して、血圧調節が行われている。ウサギ・ラット・マウスの近位尿細管 Na 輸送体に対し、Ang II は低濃度で刺激、高濃度で抑制の二相性の調節を行うことが報告されている。特に、Ang II の刺激作用は、PKC 経路又は、細胞内 cAMP 濃度の低下を介しており、抑制作用はホスホリダーゼ A2 (PLA2) /アラキドン酸経路または一酸化窒素 (NO) 経路が関与していることがいくつかの論文で報告されている。

NO 経路では、合成された NO が sGS (可溶性 Ganyly Cyclase) を活性化し、cGMP 濃度が上昇することが明らかになっている。古典的 NO 経路において cGMP の下流に存在する cGMP 依存性プロテインキナーゼ (cGKs) には cGKI、cGKII の二種類があり、近位尿細管では cGKII が認められている。cGKII のさらに下流には GSK をはじめとしたプロテインキナーゼの存在が報告されている。

前述のように尿細管に発現するイオン輸送体の調節機構については従来の研究は動物由来の尿細管については検討されているものの、ヒト腎尿細管に対する知見は殆どない。高血圧症の成因としての重要性を鑑みて、ヒト近位尿細管 NBCe1 の Ang II による調節機構について、マウス・ラットの NBCe1 調節機構と比較・検討した。

【方法】C57BL/6 マウス (Wild type、cGKII ノックアウトマウス)、Wistar ラット及び、腎がん摘出術で得られたヒト正常腎組織から単離した近位尿細管を、ノルエピネフリンを含む DMEM で灌流した。この灌流液中の重炭酸濃度の変化 (25-12.5mM) に対する細胞内 pH 変化速度を蛍光色素 (BCECF) を用いて測定し、別の実験で得られた細胞内 Buffer capacity と合わせ NBCe1 活性を算出した。細胞内シグナル伝達系については ERK・GSK3β・のリン酸化を Western blotting 法で評価した。また cGKII の細胞内の発現様式

については共焦点レーザー顕微鏡による免疫蛍光染色法にて評価した。

【結果】従来の報告通り、マウス・ラットの NBCe1 に対し、Ang II は低濃度 (10^{-10} M) で刺激、高濃度 (10^{-6} M) で抑制の二相性の調節作用を有することを確認した。これに対して、ヒト近位尿細管では、Ang II は NBCe1 に対して濃度依存的な亢進作用を示すことが判明した。これらの促進作用は AT_1 受容体阻害剤 valsartan や MEK 阻害剤 PD98059 によりほぼ完全に抑制された。

マウスで高濃度 AngII の抑制作用を媒介するアラキドン酸および 5,6-EET (5,6-epoxyeicosatrienoic acid) はヒト NBCe1 活性に対して抑制作用を示さなかった。

さらに、他の種で抑制作用を呈すると報告されている NO/sGS/cGMP 経路について、NO 合成阻害剤：L-NAME、NO ドナー：Sodium Nitroprusside Dihydrate (SNP)、sGS (可溶性 Ganyly Cyclase) 阻害剤 ODQ 及び膜透過性 cyclic GMP、8Br-cGMP (cGMP) を用いて実験した。マウスでは L-NAME 存在下で Ang II を投与すると、全ての濃度の Ang II 投与で NBCe1 活性の亢進作用を認めた。これとは対照的にヒトでは L-NAME は Ang II の亢進作用を消失させた。また SNP はマウス・ラットの近位尿細管 NBCe1 に対し抑制的に、ヒト近位尿細管 NBCe1 に対しては亢進的に作用した。sGC 阻害剤である ODQ 存在下ではマウス近位尿細管 NBCe1 に対する高濃度 Ang II の抑制作用は亢進作用に転じた。これに対してヒトでは ODQ 存在下では Ang II の刺激作用が消失をした。さらに 8Br-cGMP はマウス NBCe1 活性を抑制したが、ヒト NBCe1 活性を逆に亢進させた。

Western blotting 法で Ang II の刺激作用に対する ERK 経路の関与を検討したところ、マウスでは低濃度のみで ERK のリン酸化の増強を認めたが、ヒトでは全濃度の Ang II で ERK のリン酸化の増強を認めた。これは、前述の生理実験で評価された Ang II の NBCe1 に対する作用の結果と矛盾しない結果であった。

NOS/NO/sGC/cGMP 経路の下流であるとされる cGKII の蛍光染色を行った。cGKII は、マウスおよびラットでは核膜・細胞質の両方に発現しているが、ヒトでは核膜周囲のみ発現していた。cGKII のさらに下位である GSK3 β について、Western blotting による検討を行ったところ、SNP、cGMP 投与下でマウス・ラットでは GSK3 β のリン酸化の亢進が認められ cGKII の活性化が確認された。しかしヒトでは GSK3 β のリン酸化を認められなかった。また、マウス・ラットでは Ang II の全濃度で GSK3 β のリン酸化の増強が認められるのに対しヒトでは Ang II による GSK3 β のリン酸化は認められなかった。

Western blotting および cGKII の蛍光染色の結果より、cGKII の作用の有無が Ang II がマウス・ラット NBCe1 に対し 2 相性作用を呈し、ヒト NBCe1 に対しては濃度依存的刺激作用を有する原因となっている可能性を考え、cGKII ノックアウトマウスによる実験を行った。結果、cGKII マウスに NBCe1 に対し AngII は濃度非依存的な刺激作用を有するが、SNP 暴露に対し、cGKI I ノックアウトマウス NBCe1 の活性は変化しないことが明らかとなった。

【結論】今回の実験で、Ang II はマウス・ラットの NBCe1 を二相性に調節するのに対

し、ヒト NBCe1 を濃度依存的に亢進させることが初めて示された。Valsartan 存在下で、ヒトの NBCe1 に対する Ang II の作用がほぼ消失していたことから、マウスと同様にヒトでも、AngII は AT1 受容体を介して、NBCe1 を調節していることが示された。また、ヒトでの Ang II による NBCe1 刺激作用は MEK 阻害剤で消失していたことから、やはり、マウスと同様にヒトでも Ang II の NBCe1 刺激作用に ERK 経路が関与していることが示唆された。

ヒトでは、マウスと異なり、cPLA2/アラキドン酸/5,6-EET 経路が抑制経路として機能していないことが、Ang II の抑制作用が欠如している一因であるとも考えられた。しかし、NOS/NO/sGC/cGMP 経路がマウス・ラット NBCe1 では抑制的に働いているのに対し、ヒト NBCe1 では刺激的に働いていることが、Ang II に対する反応の違いの主因であると考えられた。Western blotting 及び蛍光免疫染色の結果から、これには、cGKII の関与が示唆され、実際、cGKII ノックアウトマウスでは、高濃度 Ang II による抑制作用は刺激作用に転じていた。しかし、cGKII ノックアウトマウス NBCe1 に対する Ang II の刺激作用は濃度非依存性の刺激作用で、同マウスに SNP を投与しても、抑制作用の消失を認めるのみで、ヒトに対するような刺激作用は認められていなかった。

以上のことから、ヒトにおいて、他の種とことなり、NOS/NO/sGC/cGMP 経路が cGKII を活性化せず、ERK 経路を増強させることが、ヒトで Ang II の一相性・濃度依存的刺激作用が認められることの原因であることが明らかになった。cGKII マウスとヒトとの SNP の作用の相違から、こうした作用差には、cGKII 以外のプロテインキナーゼも関わっていることが示唆された。いずれにしろ他の種と異なりヒトでは Ang II が近位尿細管 Na 輸送を濃度依存性に亢進することが明らかになり、ヒト高血圧発症機構において Ang II が特異的かつ、極めて重要な役割を持つことが示唆された。