

9240 腎でのナトリウム輸送に及ぼす新しいVasopressin P受容体(Vp)の役割とその病態生理学的意義に関する研究

助成研究者:遠藤 仁(東京大学 医学部)

共同研究者:車 碩鎬(東京大学)

:細山田 真(東京大学)

下垂体後葉から分泌されるペプチドホルモンのvasopressin(AVP)には既に2つの異なる容体の存在が知られている。即ち、V1と呼ばれる受容体は主に血管壁に存在し、この刺激は昇圧作用をもたらす。もう一つのV2受容体は腎内の太いヘンレの係蹄と集合尿細管に存在し、ナトリウムや水の再吸収を促進する結果、抗利尿効果を発現する。本研究者らは上記のV1やV2の受容体拮抗薬によっても抑制されない新しい受容体を腎の近位尿細管(proximal tubule)に見出しこれをVp受容体と名付けた。

SDラットの腎をcollagenaseで処理し、近位尿細管起始部(S1)、髓質部太いヘンレの係蹄上行脚(MTAL)、髓質外層集合尿細管(OMCT)の各分節を単離した。Fura-2AMをloadし、細胞内遊離カルシウム($[Ca^{++}]_i$)を測定した。

実験に使用した三種のネフロン分節で、AVPは濃度依存性に $[Ca^{++}]_i$ を上昇させた。S1では高濃度(>10-10M)でのみ $[Ca^{++}]_i$ の上昇作用が見られたが、MTALとOMCTではAVPの生理学的濃度(>10-13M)においても作用が認められた。MTAL及びOMCTをV1及びV2拮抗薬(10-5M)の両者で同時に前処理すると、AVPによる $[Ca^{++}]_i$ 上昇は完全に抑制された。しかし、S1では上昇した $[Ca^{++}]_i$ の一部(平均12.6%)しか抑制されなかった。これらの結果より、ラットのS1にはV1およびV2とは異なるAVP受容体(Vp)の存在が明らかになった。次にVp受容体とoxytocin受容体の関連性を調べた結果、S1ではoxytocinにより $[Ca^{++}]_i$ は変化を受けなかったが、MTAL及びOMCTでは濃度依存性に $[Ca^{++}]_i$ を上昇させ、この上昇はoxytocin/vasopressin拮抗薬の前処理によって完全に抑制された。又、oxytocinの作用はV1とV2拮抗薬両者により完全に拮抗された。従って、Vp受容体はoxytocin受容体と関連性がないことが明らかになった。Forskolin(20nM)、Bt2cAMP(0.5mM)及び8-bromo cAMP(0.5mM)の前処理によって、S1でのAVPによる $[Ca^{++}]_i$ 上昇は抑制されたが、OMCTでの $[Ca^{++}]_i$ 上昇は増強された。又、PMA(1μM)の前処理はS1及びOMCTでのAVPによる $[Ca^{++}]_i$ 上昇を共に抑制した。この抑制率はS1の方が高値であった。以上により、Vp受容体による $[Ca^{++}]_i$ 上昇とV2受容体による $[Ca^{++}]_i$ 上昇は全く異なることが明らかにされた。GTPγSを用いてVp受容体とG蛋白質との関連を検索した。

GTPγS(5μM)で前処理すると、OMCTでのAVPによる $[Ca^{++}]_i$ 上昇は更に増大したが、S1では無変化であった。従って、Vp受容体はG蛋白質と結合を有しないものと考えられた。Vp受容体の生理学的意義を調べるため細胞内ATPを測定した。S1及びMTALを外来性基質非存在下で25度、10分間AVPと反応させると、S1では細胞内ATPが有意に上昇したが、MTALでは有意に低下した。この結果はVp受容体の刺激はATP依存性の、恐らくイオン輸送を抑制するが、V2受容体刺激は逆に促進させることを意味する。更に、Vp受容体の病態生理学的意義を追求した。三日間絶水させたラット(DHR)のS1におけるAVPによる $[Ca^{++}]_i$ の上昇は正常ラットに比べて有意に低下した。また、易脳卒中発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)のS1でのAVPによる $[Ca^{++}]_i$ 上昇(Vp刺激)もWKYラットに比べて有意に低値を示した。

この結果、Vp受容体の刺激はATPを消費する溶質輸送に抑制的に作用し、溶質利尿の作用を有するものと推察される。又、DHRやSHRSPでの急激なVp変化はこの受容体の病態における役割を強く示唆する。

9240 腎でのナトリウム輸送に及ぼす新しいVasopressin P受容体(Vp)の役割とその病態生理学的意義に関する研究

助成研究者:遠藤 仁(東京大学 医学部)

共同研究者:車 碩鎬(東京大学)

:細山田 真(東京大学)

1. 研究目的

1.1 下垂体後葉から分泌されるペプチドホルモンのvasopressin(AVP)には既に2つの異なる受容体の存在が知られている。即ち、 V_1 と呼ばれる受容体は主に血管に存在し、この刺激は昇圧作用をもたらす。もう一つの V_2 受容体は腎内の太いヘンレの係蹄と集合尿細管に存在し、ナトリウムや水の再吸収を促進する結果、抗利尿効果を発現する。本研究者らは上記の V_1 や V_2 の受容体拮抗薬によっても抑制されない新しい受容体を腎の近位尿細管(proximale tubule)に見出しこれをVp受容体と名付けた。

1.2 従って本研究ではこのVp受容体の構造と機能を明かにし、従来知られていなかったAVPのVpを介した腎内ナトリウム輸送に及ぼす作用を解析し、その病態生理学的意義の解明を目的とする。

2. 研究方法

2.1 ネフロンの単離

Sprague Dawley ラットの腎を0.1% collagenase溶液で灌流した後、皮質から髓質内層に向かった厚さ約1mmのスライスを作成した。このスライスを0.1% collagenaseを含むHanks溶液中で37℃30分間好氣的に反応させた。氷冷Hanks液でスライスを洗浄後、実体顕微鏡下に単一ネフロンを構成する3分節、即ち近位尿細管起始部(S_i)、髓質部太いヘンレの係蹄上行脚(MTAL)、髓質外層集合尿細管(OMCT)を単離して以下の実験に供した¹⁾。

又、病態生理学的研究に対しては幼弱(4週令)及び成熟(14~16週令)のWistar Kyoto Rats(WKY)並びにStroke Prone Spontaneously Hypertensive Rats(SHRSP)を同様の方法で処理してネフロンを単離した。

2.2 細胞内遊離カルシウム濃度([Ca⁺⁺]_i)の測定

単離した各ネフロン分節を10%牛胎児血清(FCS)、2mM puruvate、10mM CH₃COONaを含むHanks溶液でFura-2/AMを25℃、20分間取り込ませた。その後、尿細管をFCS非含有Hanks溶液で三回洗い、実験に使用した。単一ネフロン分節内[Ca⁺⁺]_iは二波長蛍光顕微鏡で測定した²⁾。

2.3 細胞内ATP含有量の測定

単離したS₁とMTALを外來基質非存在下に、AVP(-)とAVP(+)の条件下で25°C10分間反応させた。その後、10% Trichloroacetic acid でATPを抽出し、luciferin/luciferaseを用いた発光法で定量化した³⁾。

3. 研究結果

3.1 健常ラット腎細胞内遊離カルシウム濃度に及ぼすAVPの作用

実験に使用した全て(S₁、MTAL、及びOMCT)のネフロン分節で、AVPは濃度依存性に[Ca⁺⁺]_iを上昇させた。Fig.1の上段左側に代表的な記録を示すが、S₁では高濃度(10⁻⁷M)のAVPにより[Ca⁺⁺]_iの上昇作用が見られた。この上昇はFig.1上段右側のようにV₁とV₂の拮抗薬前処理で殆ど影響を受けなかった。Fig.1下段左側にはOMCTでのAVPの作用を示した。同下段右側に示すようにこの上昇はV₁、V₂拮抗薬の2分間前処理で完全に消失した。そこでFig.2にAVPの用量作用曲線を示すが、MTALとOMCTではAVPの生理的濃度(>10⁻¹³M)においても作用が認められた。MTALでもV₁及びV₂拮抗薬(10⁻⁵M)の両者で同時に前処理すると、AVPによる[Ca⁺⁺]_i上昇は完全に抑制された。しかし、S₁では上昇した[Ca⁺⁺]_iの一部(平均12.6%)しか抑制されなかった。これらの結果より、ラットのS₁にはV₁およびV₂とは異なるAVP受容体(V_p)の存在が明らかになった。一方、oxytocinは腎細胞に対してイノシトールリン酸の生成を促進し、利尿作用を示すことが知られている。本研究で新しく発見されたV_p受容体とoxytocin受容体の関連性を調べた。S₁ではoxytocinにより[Ca⁺⁺]_iは変化を受けなかったが、MTAL及びOMCTでは濃度依存性に[Ca⁺⁺]_iを上昇させ、この上昇はoxytocin/vasopressin拮抗薬の前処理によって完全に抑制された。又oxytocinの作用はV₁とV₂拮抗薬両者により完全に拮抗された。従って、V_p受容体はoxytocin受容体と関連性がないことが明らかになった。以上の様々のagonists、antagonistsを組み合わせた実験結果より、各ネフロン分節におけるAVP受容体サブタイプの相対的分布を定量化し、Fig.3の横軸の下に横長カラムと%の数字で示した。即ち、S₁にはV_p受容体が、MTAL及びOMCTにはV₂受容体が85-90%存在することを初めて明かにした。他方、forskolin(20nM)、dibutyryl-cyclic AMP (Bt₂cAMP, 0.5mM)、及び8-bromo cAMP(0.5mM)の前処理によって、S₁でのAVPによる[Ca⁺⁺]_i上昇は抑制されたが、OMCTでの[Ca⁺⁺]_i上昇は増強された。Phorbol myristate acetate (PMA, 1μM)の前処置はS₁及びOMCTでのAVPによる[Ca⁺⁺]_i上昇を共に抑制した。この抑制率はS₁の方が高値であった。GTPγSを用いてV_p受容体とG蛋白質との関連を検索した。GTPγS(5μM)で前処置すると、OMCTでのAVPによる[Ca⁺⁺]_i上昇は更に増大したが、S₁では無変化であった。従って、V_p受容体はG蛋白質と結合を有しないものと考えられた。以上により、V_p受容体による[Ca⁺⁺]_i上昇とV₂受容体による[Ca⁺⁺]_i上昇は全く異なることが明らかにされた。

3.2 健常ラット腎細胞内ATP含量に及ぼすAVPの作用

V_p受容体の生理学的意義を調べるため細胞内ATPを測定した。S₁及びMTALを外来性基質非存在下で25°C、10分間AVPと反応させると、WKYのS₁では細胞内ATPが有意に上昇したが、MTALでは有意に低下した(Fig. 4B上段)。この結果はS₁でのV_p受容体の刺激はATP依存性の、恐らくイオン輸送を抑制するが、MTALに存在するV₂受容体刺激は逆にイオン輸送を促進させるものと思われる。

3.3 易脳卒中発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)での腎細胞内カルシウム濃度に及ぼすATPの作用

V_p受容体の病態生理学的意義を追求した。SHRSPのS₁でのAVPによる[Ca⁺⁺]_i上昇(V_p刺激)はFig. 5Bに代表的な反応を示すように、WKYに比べて有意に低値を示した。Fig. 5Bの実験を繰り返し行なった結果をFig. 6Bにまとめた。OMCTではWKYとSHRSPにおいて差はなかったが、S₁ではSHRSPで有意の低下を認めた。

3.4 SHRSPの腎細胞内ATP含有量に及ぼすAVPの効果

Fig. 4B下段に結果を示すが、SHRSPのS₁ではAVPの存在により非存在群に比して細胞内ATP含量の平均値は低下し、WKYでの有意な上昇とは異なっていた。これに対してSHRSPのMTALではWKYと同様のATP含量の有意な低下が認められた。

3.5 SHRSPにおけるV_pの変化と血圧との関連性

SHRSPに認められたV_p応答性の低下が高血圧に続発するものか否かを確認する目的で幼弱期(4週令)の高血圧発症前のWKYとSHRSPのS₁とMTALにおけるAVPのATP含量と[Ca⁺⁺]_iに及ぼす作用を検索した。Fig. 4AにはATP含量の変化を示す。4A上段のWKYのS₁におけるAVPによるATPの有意な増大に比し、下段のSHRSPでは有意差を認めなかった。このS₁での程度は4Bの成熟型ではより明らかな違いとなった。[Ca⁺⁺]_iに及ぼすAVPの効果(Fig. 6A)はATPよりも明瞭で高血圧発症以前の4週令でも既にS₁で明らかな応答性の低下を認めた。

4. 考察

4.1 AVPの受容体にはV₁とV₂の2つが良く知られており、この両者の化学構造は、1992年に相次いでそのcDNAクローニングの結果明らかにされた。即ち、V₁は主に血管系にV₂は腎の集合尿細管に分布することが各mRNAの発現からも改めて示された。本研究では新たに第三のAVP受容体とも言うべきV_pの存在を上述のV₁とV₂の体内存在部位とは異なる近位尿細管に見出した。V_pのAVPとの親和性はFig. 2に認められるようにV₂のそれに比べて低く、10⁻⁸M AVPで[Ca⁺⁺]_iの上昇が有意に認められた。この低親和性に反し、反応の強度は同じFig. 2のOMCTやMTALに比べて極めて高く、V_pの性質としてはlow affinity high capacity型の受容体である事が判明した。薬理的検討によればV_pのAVP応答はV₁やV₂の拮抗薬によって殆ど影響されないことより新しいタイプと判断した。紙面の都合で結果は図示しないもののoxytocin受容体とも異なるものであった。

4.2 新しいタイプのV_p受容体の生理的意義を解明する目的で細胞内ATPの代謝回転に及ぼす作用を検討した。既に各種利尿薬の作用部位とその結果の定量的解析に用いている方法を導入した。即ち、基質非存在下にネフロンセグメントを加温すると電解質輸送が活性化されて、細胞内ATPの消費が即、細胞内ATP残存量の低下をもたらす⁴⁾。これをS₁とMTALに適用するとAVPにより前者ではATPの見かけ上の増加(実際はATP消費の抑制と思われる)、後者ではATP量の低下(電解質輸用の活性化の結果による)が認められた。このFig. 4の成績はV_p刺激がATPを消費する系即ちイオン輸送の抑制(利尿効果の発現)をもたらすものと考えられる。このAVPの利尿作用については比較的高濃度のAVPを腎動脈に注入すると近位尿細管での再吸収が低下したというin vivo実験の報告⁹⁾を裏付けるものと思われる。

4.3 腎と高血圧の関連性は多岐にわたって追求されており高血圧発症における腎の役割は看過できない。従って高血圧モデルであるSHRSPを用いてV_p受容体の応答性を検索した。Fig. 5とFig. 6で示されるようにSHRSPの高血圧発症期(成熟ラット)のみならず高血圧発症前期(幼弱ラット)においてもV_pの機能が減弱していた。即ち利尿効果に一役かっているV_pの作用が低下することは体内にイオン(特にナトリウム)の蓄積が生ずることを示唆する。興味深いことにはSHRSPは遺伝的にこのV_pの発現が低下しているものと考えられ、病態の発症にV_pの発現量が関与することを強く暗示している。

5. 今後の課題

腎における電解質輸送の研究は腎生理学、腎薬理学の急速な発展に伴って全貌は明らかにされつつあるが、未だ不明の点も多い。V_pの腎での役割を更に解明するためにはV_p受容体の実態を示す必要があるので、今後はV_pの発現をコードする遺伝子クローニングを追求する所存である。

6. 文献

- 1) Tamura, K. and Endou, H.
Contribution of the purine nucleotide cycle to intranephron ammoniogenesis in rats. *Am. J. Physiol.*, 255:F1122-F1127 (1988)
- 2) Jung, K.Y. and Endou, H.
Biphasic increasing effect of angiotensin-II on intracellular free calcium in isolated rat early proximal tubule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165(3):1221-1228 (1989)

- 3) Uchida, S. and Endou, H.
Substrate specificity to maintain cellular ATP along the mouse nephron.
Am. J. Physiol. 255:F977-F983 (1988)
- 4) Jung, K.Y. and Endou, H.
Furosemide acts on short loop of descending thin limb, but not on long loop.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 253(3);1184-1188 (1990)
- 5) Kurtzman, N.A., P.W. Rogers, S. Boonjarern, and J.A.L. Arruda.
Effect of infusion of pharmacologic amounts of vasopressin on renal electrolyte excretion. Am. J. Physiol. 228(3):890-894 (1975)

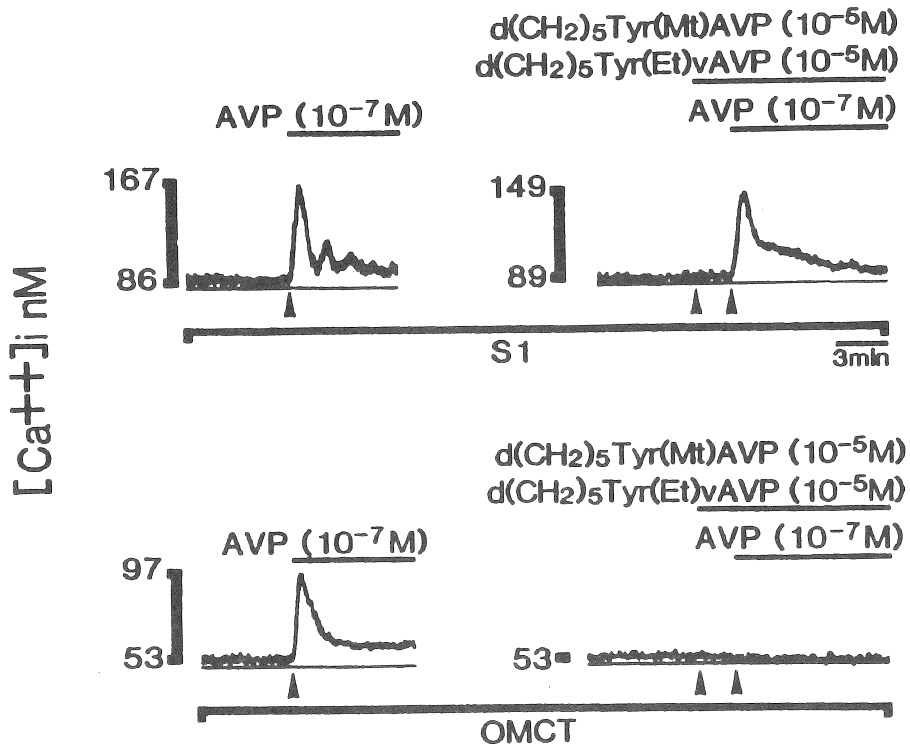


Fig.-1 Effect of V_{1a} and V_2 antagonists on AVP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in isolated rat S_1 and OMCT. The arrow heads indicate time of AVP or antagonist administration.

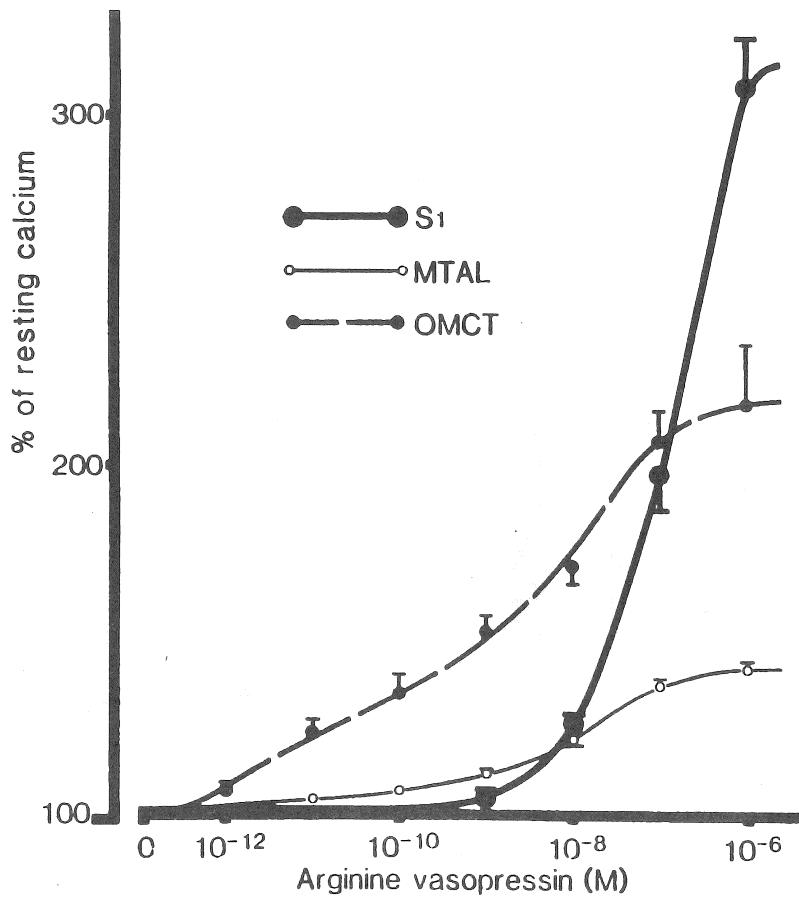


Fig.-2 Dose-response relationship between AVP concentrations and $[Ca^{++}]_i$ increase in isolated rat S₁, MTAL and OMCT.

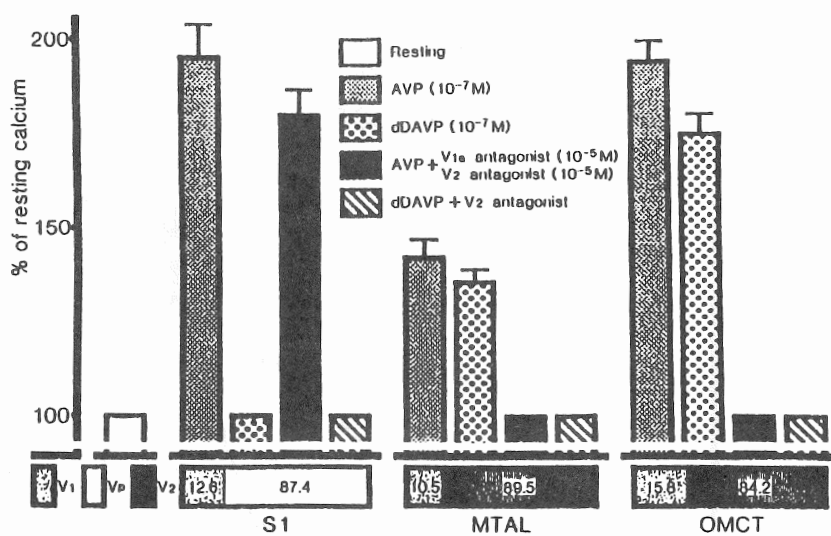


Fig.-3 Effect of V₁ and/or V₂ antagonists on AVP- or dDAVP-induced [Ca⁺⁺]_i transient and relative distribution of AVP receptor subtypes in isolated rat S₁, MTAL and OMCT.

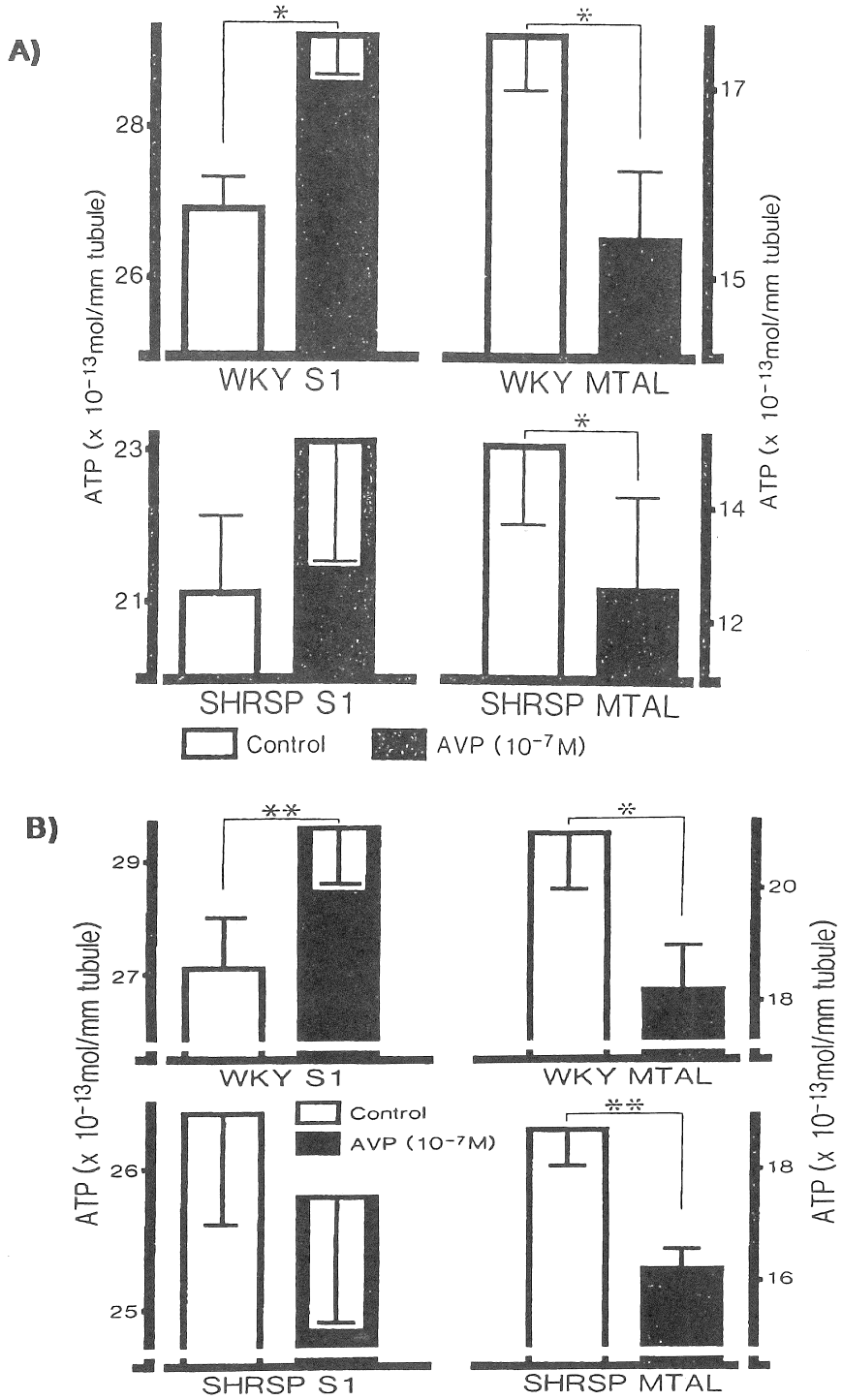


Fig.-4 AVP-induced cellular ATP change in WKY and SHRSP S₁ and MTAL
A): young (4-week old) rats **B):** adult (14-16-week old) rats

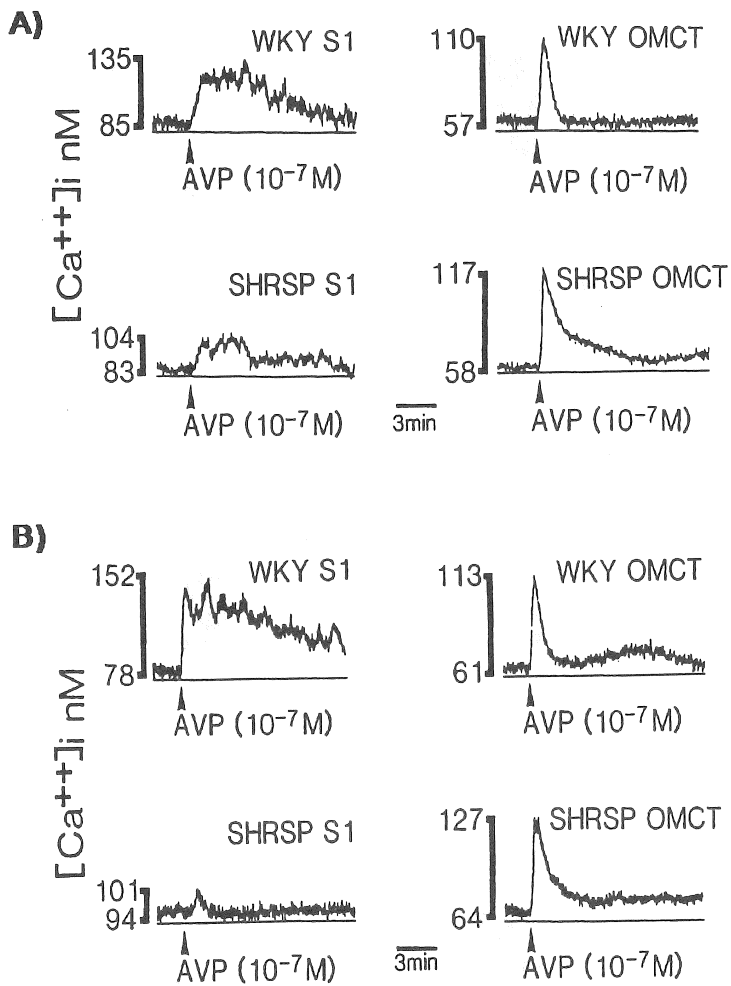


Fig. -5 The representative [Ca²⁺]_i signals induced by AVP in S1 and OMCT.

A): young WKY and SHRSP **B):** adult WKY and SHRSP

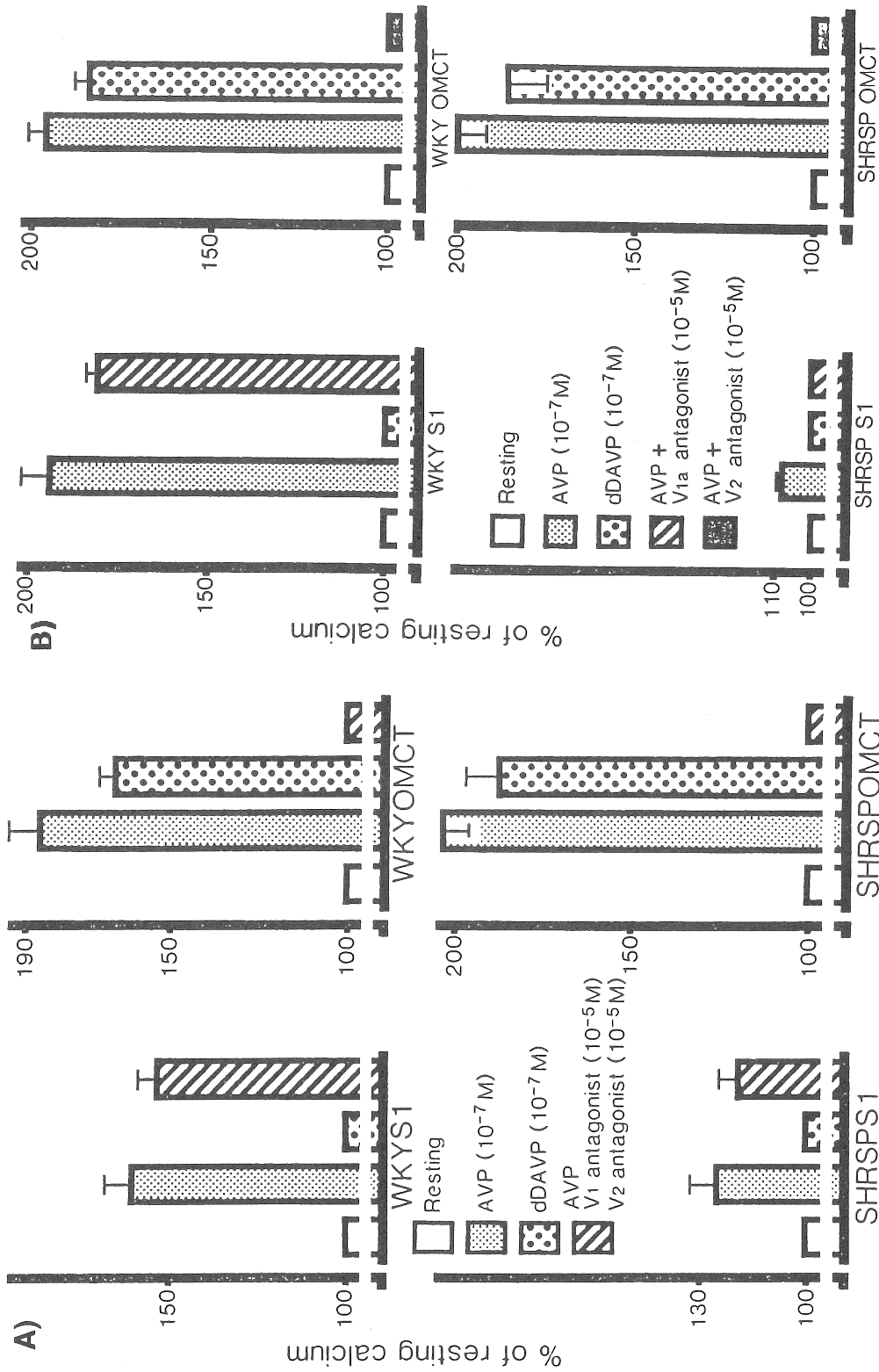


Fig. 6 Effect of AVP and its analogues on $[Ca^{2+}]_i$ in S1 and OMCT of WKY and SHRSP. **A)** young rats. **B)** adult rats.

Role of a novel vasopressin receptor, Vp in intrarenal sodium transport and its pathophysiological significance

Hitoshi Endou, Seok Ho Cha and Makoto Hosoyamada
Department of Pharmacology, Faculty of Medicine
University of Tokyo

Summary

Recently, we found a novel arginine vasopressin (AVP) receptor (Vp) in normotensive rat early proximal tubules (S₁) which was insensitive to the well-known V₁ and V₂ antagonists. To investigate a possible involvement of Vp receptor in hypertension, intracellular free calcium ([Ca⁺⁺]_i) and cellular ATP content were measured in S₁, medullary thick ascending limbs of Henle's loop (MTAL), and outer medullary collecting tubules (OMCT) isolated from young (4 week-old) and adult (14-16 week-old) Wistar-Kyoto (WKY) and age-matched stroke-prone spontaneously hypertensive (SHRSP) rat kidneys. AVP (10⁻⁷M) transiently increased [Ca⁺⁺]_i, followed by sustained phase for 14-18 min in these nephron segments, except in S₁ from SHRSP. AVP (10⁻⁷M)-induced [Ca⁺⁺]_i transient in S₁ from SHRSP was significantly lower than that in S₁ from age-matched WKY, and the attenuation in adult rats was remarkably higher than that in young rats. [Ca⁺⁺]_i transients by AVP in MTAL and OMCT from SHRSP were similar to those in MTAL and OMCT from age-matched WKY. DDAVP (10⁻⁷M), a specific V₂ agonist, in MTAL and OMCT of both species transiently mobilized [Ca⁺⁺]_i, but not that in S₁ of both species. On the other hand, cellular ATP content in MTAL of WKY and SHRSP was significantly decreased by incubation with 10⁻⁷M AVP under no substrate, but ATP in S₁ of WKY was conversely increased. Interestingly, cellular ATP content in S₁ of adult SHRSP significantly decreased with the addition of 10⁻⁷M AVP. These results suggest that Vp receptor stimulation in normotensive rat S₁ inhibits ATP-consuming ion transport. Its property in hypertensive rat S₁ is gradually attenuated by aging. Accordingly, Vp receptor could be considered an important regulator involved in manifesting volume-expanded hypertension.