

9739 食塩過剰負荷による腎への浸透圧ストレスの病態生理的意義

助成研究者：山内 淳 (大阪大学 医学部)

共同研究者：今井 圓裕 (大阪大学 医学部)

塩分の過剰摂取は腎障害の重要な増悪因子の一つとして広く認められ、その過剰摂取による高血圧が腎障害を進展すると考えられている。しかし、全身血圧および糸球体内の血圧が変化しない程度の減塩食でも、尿蛋白は減少し腎組織像も改善することから、高血圧を介さない機序の重要性が示唆されている。一方近年、腎疾患における間質病変の重要性が再認識され、溶質の過剰負荷により増悪することが報告されている。食塩などの溶質負荷により、糸球体病変における糸球体高血圧に匹敵する何らかの物理的ストレスが、間質病変に関与している可能性があると考えられる。我々は最近、ラット腎において浸透圧感受性遺伝子であるミオイノシトール輸送体 (SMIT) の発現を観察し、SMIT mRNAがヘンレの太い上行脚 (TAL) と緻密斑 (MD) にきわめて強く発現していること、さらにNaCl負荷で著明に誘導されフロセミドにて抑制されることを明らかにした。SMITの発現は尿細管細胞の間質側の浸透圧変化を反映していると考えられることから、TALおよびMDの間質側の浸透圧が生理的条件下でも高いことが推定された。本研究の目的は、ネフロン当たりの溶質の過剰負荷モデルとして部分腎摘ラットを用い、SMIT mRNAの発現を浸透圧マーカーとして利用することにより間質の浸透圧変化を推定し、溶質負荷による浸透圧ストレスと間質障害との関係を検討することである。

5/6腎摘ラットにおいて、SMITの発現はTALおよびMDでは増強し、集合管では低下した。これは、機能ネフロン数の減少によりネフロン当たりの溶質負荷量が増加し、ヘンレ係蹄に至る尿細管流量 (溶質負荷量) が増加することにより、TALおよびMDでのNaCl再吸収量も増加して、間質側の高浸透圧状態をひきおしているのではないかと考えられる。一方、集合管のSMIT発現は腎不全群における尿濃縮機構の障害を反映して低下していると考えられる。次にin vitroの実験系として、間質の線維化および糸球体硬化に関わる主要因子の一つであるtransforming growth factor- β (TGF- β) に着目し、腎線維芽細胞由来のNRK細胞を用いて高浸透圧刺激のTGF- β 活性およびmRNAレベルに対する影響を検討した。NRK細胞を高浸透圧環境 (500mOsm/kg) 下で培養すると、TGF- β 活性は正常浸透圧下の細胞に比し有意に上昇した。コラーゲン産生の指標として ^3H プロリン取り込みについて検討し、高浸透圧刺激による著明な増加を認めた。5/6腎摘ラットでは皮質および髄質外層部でTGF- β 、fibronectinの発現が増加した。さらに浸透圧負荷軽減の目的で、フロセミドを投与すると、SMIT発現は著明に低下し、TGF- β とfibronectinの発現も低下を認めた。以上の結果から、高浸透圧ストレスが間質病変の進展に関与していることが示唆された。この仮説は腎疾患進展機序を全く新しい観点から解明しようとするものであり、非免疫学的な糸球体障害として、糸球体高血圧によるpressure/stretch、血流増加によるshear stressにつぐ第3の物理的ストレスとして、間質の高浸透圧による浸透圧ストレス (hepertonc stress) を提唱せんとするものである。

9739 食塩過剰負荷による腎への浸透圧ストレスの病態生理的意義

助成研究者：山内 淳 (大阪大学 医学部)
共同研究者：今井 圓裕 (大阪大学 医学部)

1. 研究目的

塩分の過剰摂取は腎障害の重要な増悪因子の一つとして広く認められている。その主要なメカニズムとして、長期にわたる食塩の過剰摂取が高血圧をひきおこし、高血圧により腎障害が進展すると考えられている。しかし近年、高血圧を介さない機序の重要性が示唆されている。例えば、部分腎摘による腎不全モデルラットに対して塩分摂取量を変化させると、減塩食により全身血圧および糸球体内の血圧は変化しないにもかかわらず、尿蛋白は減少し腎組織像も改善する(1)。自然発症高血圧ラットの片腎摘モデルでも同様の結果が得られている(2)。これらは塩分の過剰摂取により、高血圧を介さない機序で腎障害を進展させることを示唆する所見であると考えられる。

一方近年、腎疾患における間質病変の重要性が指摘されている。実際、腎疾患患者の腎機能の低下の程度は糸球体障害の程度よりむしろ間質病変とよく相関することが示されている(3)。腎の間質病変の進展に関して、糸球体病変と同様に溶質の過剰負荷により増悪することが報告されている。食塩などの溶質負荷により、糸球体病変における糸球体高血圧に匹敵するような何らかの物理的ストレスが、間質病変においても関与している可能性があると考えられる。

ミオイノシトールは腎で同定された主要なオスモライトの一つで、その特有の輸送体であるNa⁺-依存性ミオイノシトール輸送体 (SMIT) は細胞外浸透圧により遺伝子転写レベルで調節されることが示されている(4)。我々は最近、ラット腎においてSMITの発現を観察し、SMIT mRNAが髄質内層集合管のみならずヘンレの太い上行脚 (TAL) と緻密斑 (MD) にきわめて強く発現していること、さらにNaCl負荷で著明に誘導されフロセミドにて抑制されることを明らかにした(5)。すなわち、NaCl再吸収に依存してこの部位の浸透圧が変化していることを強く示唆する所見であると考えられる。さらに、SMITは主に尿細管細胞基底側の浸透圧依存性に調節されること(6)を、尿細管培養細胞を使った実験から明らかにした。このことから、SMITの発現はTALとMDの基底側すなわち間質側の浸透圧変化を反映していると考えられる。

溶質の負荷が増加すると、ネフロン当たりの濾過量が増加し、ヘンレ係蹄に至る尿細管流量 (溶質負荷量) が増加することにより、TAL、MDでのNaCl再吸収量も増加して間質側の浸透圧が上昇するという推測が成り立つ。このような高浸透圧刺激もしくは大きな浸透圧変化は、局所の細胞に対して物理的なストレスを与えるものと考えられる。本研究の目的は、ネフロン当たりの溶質の過剰負荷モデルとして部分腎摘ラットを用い、SMIT mRNAの発現を浸透圧マーカーとして利用することにより間質の浸透圧変化を推定し、浸透圧ストレスと間質障害との関係を検討することである。

2. 研究方法

A. SMIT発現観察による尿細管間質側の浸透圧変化の推定

ラットに5/6腎摘出術を行い、経時的に血圧、尿蛋白量、腎機能をチェックした。また、浸透圧負荷軽減の目的で腎摘2週間後よりフロセミド(20 mg/kg 体重/日)を投与してその効果を検討した。腎摘4週後にパラフォルムアルデヒドにて灌流固定後屠殺し、腎組織変化を観察した。また、局所の浸透圧変化の指標としてSMITの発現をin situ hybridization法により検討した。

B. 高浸透圧刺激と間質障害との関係について

間質線維化に強く関与することが指摘されているtransforming growth factor (TGF)- β に着目し、in vitroおよびin vivoの実験をおこなった。

1) In vitroの実験系

ラット腎由来の線維芽細胞であるNRK細胞を用い、メデイウムの浸透圧を種々の溶質(NaCl、グルコース、ラフィノース、マニトール、尿素)を加えることにより500 mosm/kgに上昇させたときのTGF- β 活性を、mink lung細胞の成長阻害作用のbioassayにより測定した(7)。また、高浸透圧刺激後のNRK細胞からRNAを経時的に抽出し、Northern blot法にてTGF- β mRNA量の変化を検討した。さらに、コラーゲン合成の指標として $[^3\text{H}]$ プロリンの取り込みを正常浸透圧および高浸透圧環境下で測定した。

2) In vivoの検討

上記Aのごとく作成した各群の部分腎摘ラットにおいて、TGF- β および細胞外基質の代表としてフィブロネクチンの発現を免疫組織化学およびin situ hybridization法により観察し、尿蛋白、腎機能、腎組織およびSMIT発現との関連について検討した。

3. 研究結果

1) 5/6腎摘ラットにおけるSMIT発現変化(8)

血清クレアチニン、尿蛋白は腎不全群で有意に上昇し、フロセミド投与により有意に低下した(表1)。血圧は腎不全群で有意に上昇し、フロセミド投与によりコントロール群と同程度まで低下した。

Table 1. Renal function and systolic blood pressure two and four weeks after renal ablation

Group	Parameter	CONT	NX	NX-FU
2 week	S _{Cr} mg/dl	0.41 ± 0.02	1.04 ± 0.07 ^a	1.06 ± 0.06 ^a
	C _{Cr} ml/min	2.00 ± 0.09	0.64 ± 0.05 ^a	0.70 ± 0.06 ^a
	Urine protein mg/day	14.0 ± 0.7	23.9 ± 6.0 ^a	23.0 ± 2.2 ^a
4 week	S _{Cr} mg/dl	0.36 ± 0.02	1.04 ± 0.11 ^a	0.80 ± 0.11 ^a
	SUN mg/dl	21.6 ± 0.8	67.0 ± 5.2 ^a	61.0 ± 7.8 ^a
	C _{Cr} ml/min	2.76 ± 0.29	0.67 ± 0.10 ^a	0.78 ± 0.08 ^a
	Urine volume ml/day	8.1 ± 0.7	29.0 ± 2.1 ^a	28.5 ± 1.8 ^a
	Osmolarity mOsm/liter	2501 ± 275	1097 ± 174 ^a	1138 ± 68 ^a
	Urine protein mg/day	15.5 ± 0.9	50.1 ± 14.7 ^a	26.6 ± 3.3 ^{a,c}
	Systolic BP mm Hg	120 ± 2.4	128 ± 2.7 ^a	118 ± 2.5 ^{a,b}

Values are mean ± SEM for five or ten rats. At sacrifice (4 weeks), blood samples were taken from half of the (5) rats of each group. Other parameters were measured in all rats.

Abbreviations are: CONT, sham-operated control rats; NX, 5/6 nephrectomized rats; NX-FU, 5/6 nephrectomized rats with furosemide administration; S_{Cr}, serum creatinine; C_{Cr}, creatinine clearance; SUN, serum urea nitrogen; systolic BP, systolic blood pressure.

^a P < 0.01 vs. CONT, ^b P < 0.05 and ^c P < 0.01 vs. NX

局所の浸透圧マーカーとして、SMITの発現をin situ hybridizationで観察すると、腎不全群では髓質外層と皮質部で発現の増加が認められたが、髓質内層では逆にシグナルが低下した(図1)。SMITの発現増加はTALおよびMDに認められた(図2)。これらのシグナルはフロセミド投与により抑制された(図1)。5/6腎摘により同部位のSMIT発現が増強する原因として、機能ネフロン数の減少によりネフロン当たりの溶質負荷量が増加し、ヘンレ係蹄に至る尿細管流量(溶質負荷量)が増加する(9)ことにより、TALおよびMDでのNaCl再吸収量も増加して、間質側の高浸透圧状態をひきおしているのではないかと考えられる。一方、IMCDのSMIT発現は腎不全群における尿濃縮機構の障害を反映して低下していると考えられる。

Figure 1. Film autoradiograms demonstrating the pattern of hybridization of SMIT antisense cRNA probe (³⁵S-labeled) to rat kidney cryosections. Most intense hybridization signals were present in the outer medulla. There were also significant signals in the inner medulla and papilla of the kidney although these signals were less intense than those in the outer medulla. A punctate pattern of the signal was apparent in the cortex of kidney. Abbreviations are: CONT, sham-operated control rats; NX, 5/6 nephrectomized rats without drug treatment; FU, 5/6 nephrectomized rats with furosemide administration.

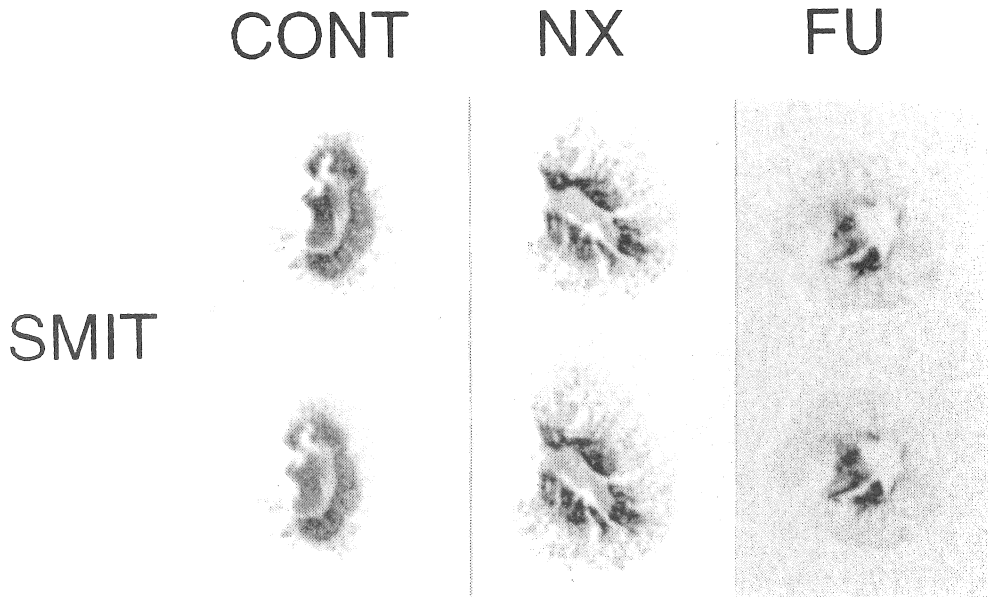
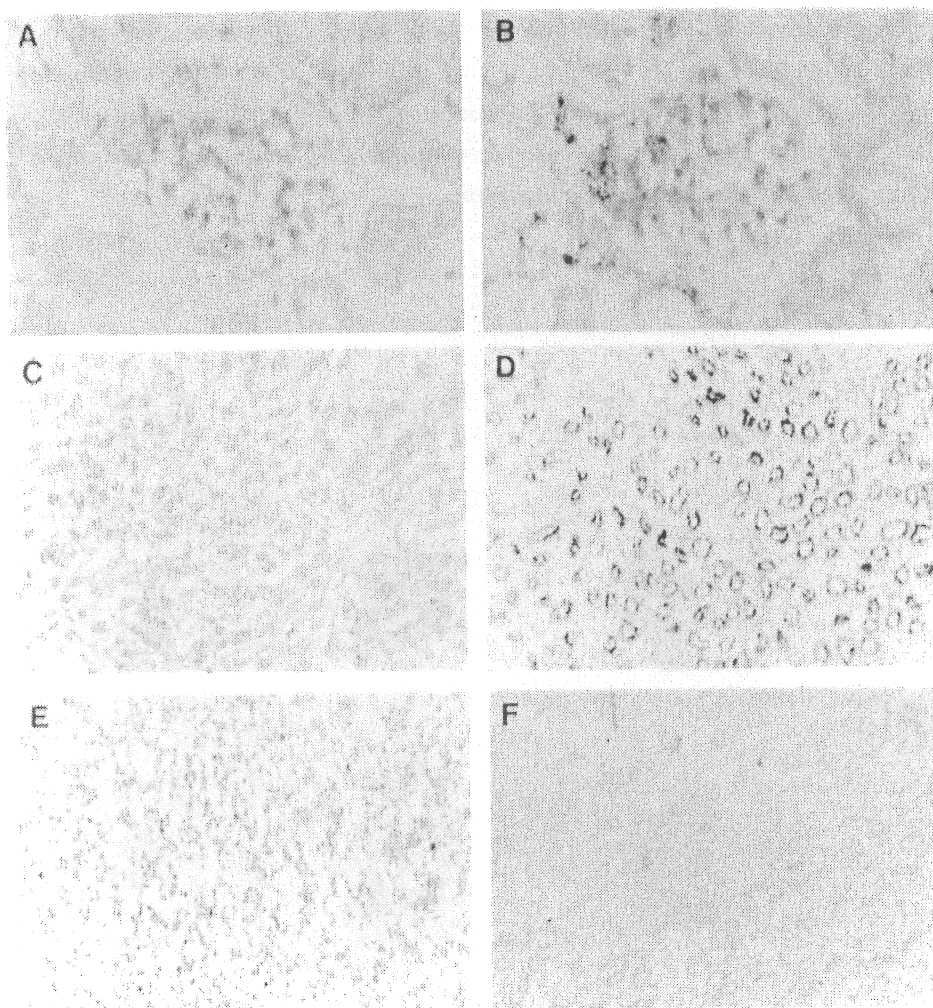


Figure 2. Bright field photomicrographs demonstrating the pattern of in situ hybridization of ³⁵S-labeled rat SMIT antisense cRNA probe to a cryosection of rat kidneys of control (A, C, E) and nephrectomized (B, D, F) rats. A and B: Cortex of kidney including glomerulus and macula densa cells. Intense signals were observed in the juxtaglomerular region and cortical thick ascending limbs of Henle's loop but not in the glomerulus (X400). C and D: Outer medulla of kidney. Intense hybridization signals were seen in the medullary thick ascending limbs of Henle's loop and were apparently increased in the remnant kidney (X100). E and F: Inner medulla of kidney. Significant but less intense signals were seen in the inner medullary collecting ducts. SMIT signals in this area was markedly decreased in nephrectomized rats (X100).



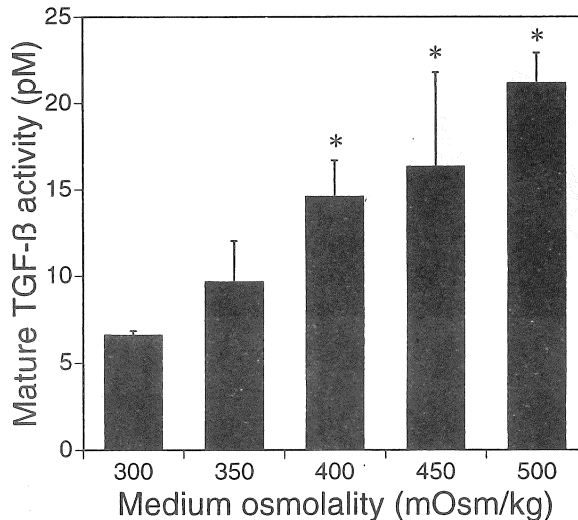
2) 高浸透圧刺激と間質障害との関係について

(a) in vitro study

このような腎局所の細胞に対する高浸透圧ストレスの増強が、間質の線維化や糸球体硬化といった腎病変に関与しているとする、高浸透圧刺激により成長因子やサイトカインが誘導され、細胞外基質の産生を促進する可能性があると考えられる。そこで、間質の線維化および糸球体硬化に関わる主要因子の一つである transforming growth factor- β (TGF- β) に着目し、腎線維芽細胞由来のNRK細胞を用いて高浸透圧刺激のTGF- β 活性およびmRNAレベルに対する影響を検討した(10)。高浸透圧刺激後24時間後まで mature TGF- β 活性は有意に増加し、図3に示すように300 mosm/kgから500 mosm/kgまで浸透圧依存性に上昇した。しかし、総TGF- β 活性およびTGF- β mRNAレベルには影響を与えなかった。すなわち、NRK細胞では非活性型のTGF- β が高浸透圧刺激により活性化されると考えられた。

Figure 3. Osmolality-dependency in hypertonicity-induced TGF- β activity.

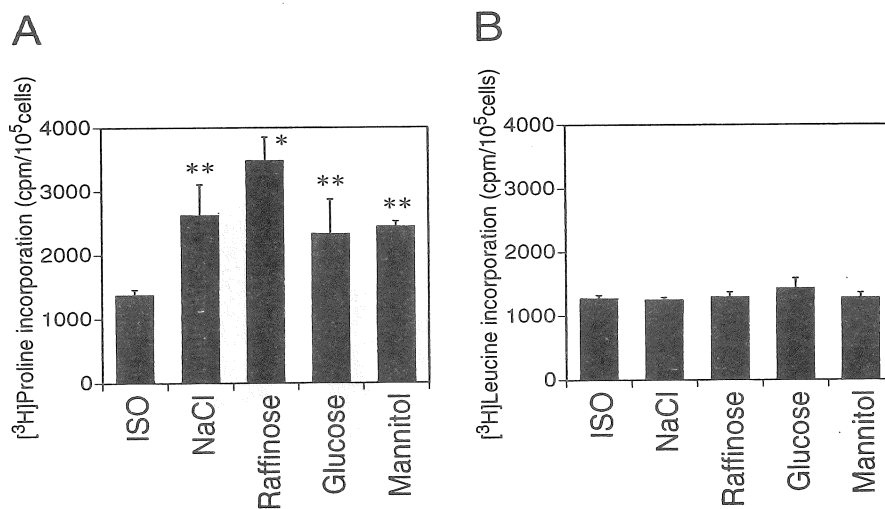
NRK cells were cultured for 12 hours after switching to a different osmolality. The medium osmolality ranged from 300 to 500 mOsm/kg, which were made by the addition of 0 to 200 mOsm/kg of NaCl. TGF- β activity in culture medium of NRK cells was measured by bioassay using mink lung epithelial cells. Each bar is the mean of 4 independent experiments; error lines are SD. *P<0.01 vs. 300 mOsm/kg.



さらに、コラーゲン合成の指標として細胞内への [^3H]プロリンの取り込みを測定し、高浸透圧刺激による影響を検討した。蛋白合成の指標として [^3H]ロイシンの取り込みを測定した。種々の溶質の添加によりメデイウムの浸透圧を500 mOsm/kgに上昇させた場合、 [^3H]プロリンの取り込みは有意に増加したが、 [^3H]ロイシンの取り込みには影響を与えなかった。すなわち、高浸透圧刺激によりコラーゲン産生が特異的に増加することが示唆された。

Figure 4. Effects of hypertonicity on [^3H] proline and [^3H] leucine incorporation.

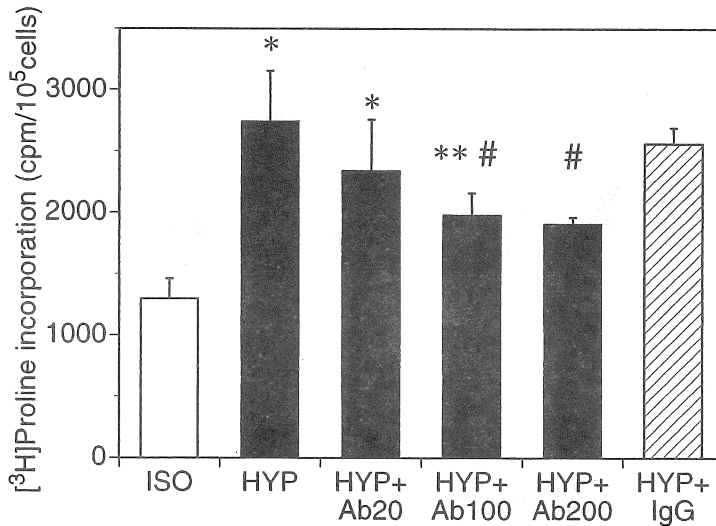
[^3H] proline (A) and [^3H] leucine (B) incorporation were measured after 24 hours of incubation in isotonic or hypertonic medium. Hypertonic medium(500 mOsm/kg) was made by the addition of various solutes (NaCl, raffinose, glucose and mannitol). The cells were pulsed for the final 5 hours with L-[2,3,4,5- ^3H] proline (1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$) or L-[4,5- ^3H] leucine (1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$). Abbreviation is: ISO, isotonic medium. Each bar is the mean of 4 independent experiments; error lines are SD. * $P < 0.01$ vs. control and ** $P < 0.05$ vs. control.



高浸透圧刺激による ^3H プロリンの取り込み増加が、 $\text{TGF-}\beta$ 活性の増加を介するものかどうかを検討するために、メディウムに抗 $\text{TGF-}\beta$ 抗体を添加してその影響を観察した(図5)。高浸透圧刺激による ^3H プロリン増加は、抗 $\text{TGF-}\beta$ 抗体により有意に抑制されたが、コントロールとして添加した免疫グロブリン(IgG)では変化が見られなかった。これらのことから、高浸透圧刺激により少なくとも一部は $\text{TGF-}\beta$ を介してコラーゲン産生が増加し、 ^3H プロリンの取り込みが増加するものと考えられる。

Figure 5. Effects of anti- $\text{TGF-}\beta$ antibody on ^3H proline incorporation

^3H Proline incorporation was measured 24 hours after switching to hypertonic medium. When indicated, anti- $\text{TGF-}\beta$ neutralizing antibody or normal rabbit IgG was added to the hypertonic medium.(500 mOsm/kg, made by the addition of NaCl). Abbreviations are: ISO, isotonic medium; HYP, hypertonic medium; HYP+Ab, HYP+Ab100, HYP+Ab200, hypertonic medium with 20, 100 or 200 $\mu\text{g/ml}$ of anti- $\text{TGF-}\beta$ antibody; HYP+IgG, hypertonic medium with 200 $\mu\text{g/ml}$ rabbit IgG. Each bar is the mean of 4 independent experiments; error lines are SD. * $P < 0.01$ vs. ISO, ** $P < 0.05$ vs. ISO and # $P < 0.05$ vs. HYP.



(b) in vivo study

5/6腎摘による腎不全モデルラットで示された局所の浸透圧ストレスが、TGF- β やコラーゲン産生に關与するかどうかを検討するために、TGF- β およびフィブロネクチンの発現変化をNorthern blotおよびin situ hybridization法にて検討した。図6にNorthern blotの結果を示す。腎不全群ではTGF- β およびフィブロネクチンmRNAが著明に増加し、フロセミド投与により抑制された。

Figure 6. Northern blot analysis of SMIT, TGF- β and fibronectin mRNA using RNA from the whole remnant kidney. Samples of 20 μ g of total RNA were separated by electrophoresis on 1% agarose formaldehyde gel and was transferred to nylon membrane. The ethidium bromide-stained gel (Et-Br) demonstrates equal loading. Abbreviations are: CONT, sham-operated control rats; NX, 5/6 nephrectomized rats without drug treatment; NX-FU, 5/6 nephrectomized rats with furosemide administration.

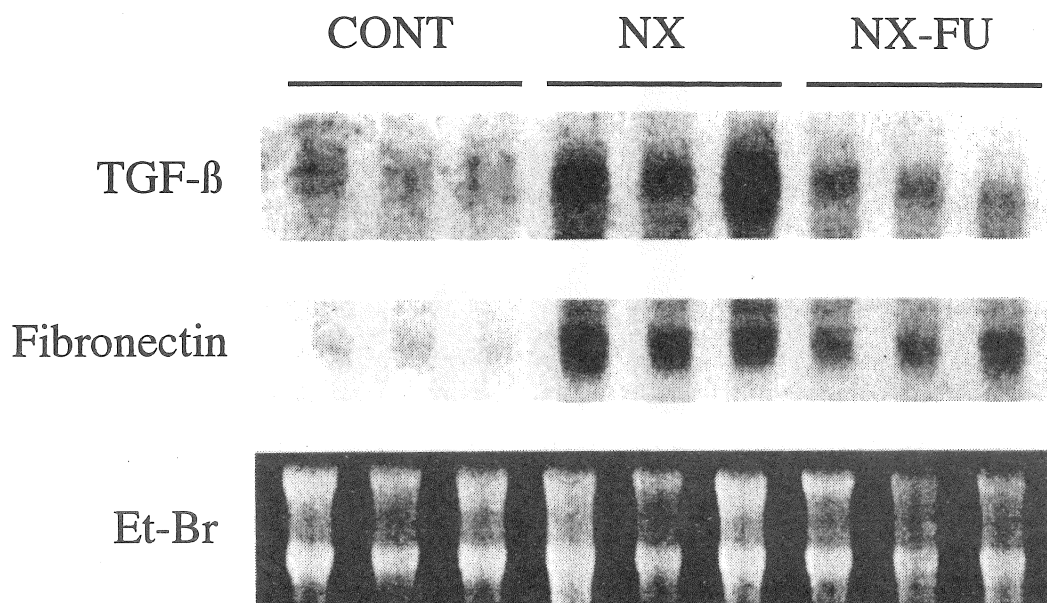
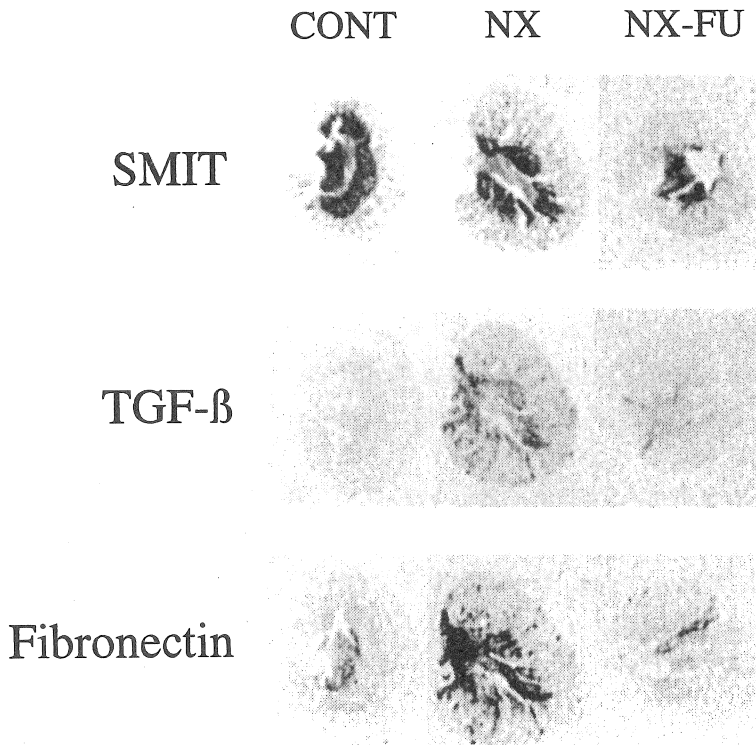


図7に各群のin situ hybridizationの結果を示す。腎不全群においてTGF- β の発現は、腎皮質および髄質外層において著明に増加したが、フロセミド投与により抑制された。これは同時に観察したSMITのin situ hybridizationの結果と類似の傾向を示した。さらに、細胞外基質であるフィブロネクチンの発現は、TGF- β と同様腎不全群において著明に増加し、フロセミド投与により抑制された。強拡大像の観察により、糸球体では特に血管極と思われる部位に強い発現がみられ、髄質外層では間質および尿細管に発現が見られた。これらは、フロセミド投与により著明に抑制された。このようにTGF- β 、フィブロネクチンの発現増強を認めた部位はSMITと類似しており、これがフロセミド投与により著明に抑制されたことから、TGF- β の発現に高浸透圧刺激の関与が示唆された。

Figure 7. Film autoradiograms demonstrating the pattern of hybridization of SMIT, TGF- β and fibronectin antisense cRNA probes (35 S-labeled) to rat kidney cryosections. Abbreviations are: CONT, sham-operated control rats; NX, 5/6 nephrectomized rats without drug treatment; NX-FU, 5/6 nephrectomized rats with furosemide administration.



4. 考察

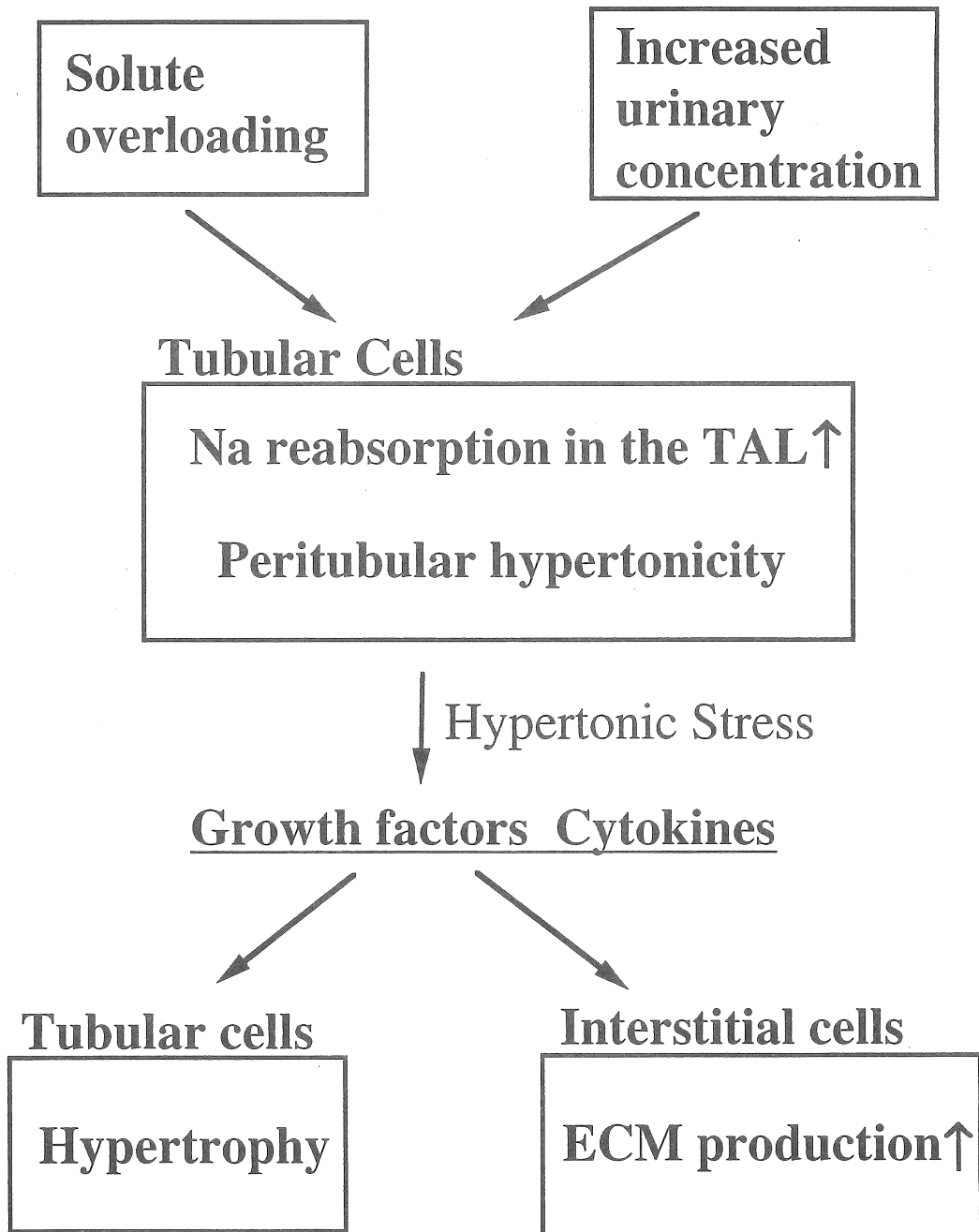
今回の結果、5/6腎摘ラットにおいてヘンレ上行脚および緻密斑にSMITの強い発現を認めたことから、同部位の間質側の浸透圧が高く、浸透圧ストレスにさらされていることが示唆された。また、5/6腎摘によりTGF- β 発現が増強しフロセミドにより抑制された。フロセミドは全身血圧を低下させるが、糸球体内高血圧は改善しないことから(11)、糸球体内高血圧以外の機序が関与すると考えられた。さらに、TGF- β の発現増強を認めた部位はSMITの発現部位と類似しており、高浸透圧ストレスによりTGF- β 発現が増強する可能性が示唆された。培養細胞系では高浸透圧刺激によりTGF- β mRNAの変化は見られず、TGF- β 活性の亢進が認められた。腎摘により生体内で見られたTGF- β mRNAの発現亢進については、高浸透圧刺激により活性化されたTGF- β がautocrine、paracrineに働き、mRNAレベルを亢進する可能性も考えられる。また、細胞種により反応が異なる可能性があり、尿細管細胞でも検討する必要があると思われる。

細胞に対する高浸透圧刺激の影響については培養細胞系でかなり検討されている。細胞増殖には抑制的に働くという報告がある(12)が、軽度の浸透圧増加の場合は逆に増殖を亢進させるという報告(13)もあり、二相性の影響をもつ可能性がある。一般に細胞機能に対して抑制的に働くとする報告が多いが、ミオイノシトールをはじめとするオスモライト蓄積に関する遺伝子や熱ショック蛋白、Egr-1、c-fosなどのいわゆる immediate early response geneの発現を亢進させることが知られている(14)。またある種のホルモンやサイトカインの作用に影響を与えることも報告されており(15)(16)(17)(18)、浸透圧刺激は広い意味での物理的ストレスの一つであるといえる。

BankirとKrizは、蛋白負荷と尿の濃縮が双方とも腎にとって負担になり、腎肥大、特にTALにおけるNaCl再吸収増加を介して同部の尿細管細胞の肥大をきたすことを示した(19)。両者とも腎疾患の増悪因子であり、改善策として蛋白摂取制限や水分摂取が考えられる。実際、水分摂取量を増加すると尿蛋白が減少し、腎組織病変が改善することが示されている(20)。このメカニズムは浸透圧ストレスの概念を導入すると説明しやすい。溶質の過剰負荷や尿の濃縮はいずれもTALにおけるNaの再吸収を増加し、間質側の浸透圧を上昇させる。尿細管細胞に対する高浸透圧ストレスにより成長因子、サイトカインが誘導され、尿細管細胞の肥大をおこすとともに、間質細胞での細胞外マトリックスの産生亢進を引き起こす(図8)。

この仮説は腎疾患進展機序を全く新しい観点から解明しようとするものであり、非免疫学的な糸球体障害として、glomerular hypertensionによるpressure / stretch、hyperperfusionによるshear stressにつぐ第3の物理的ストレスとして、間質のhyperosmolarity (もしくはchange in osmolarity)による高浸透圧ストレス(hypertonic stress)を提唱せんとするものである。

Figure 8. Hypertonicity hypothesis in the progression of renal disease



5. 今後の課題

我々の結果から、腎間質障害の進行に溶質の過剰負荷による高浸透圧ストレスの関与が示唆された。さらに、食塩との関係をあきらかにするため、塩分摂取量を変化させたとき（高塩食、低塩食）のSMITおよびTGF- β の発現変化を観察する必要がある。また、浸透圧負荷軽減の目的で、水利尿の効果を検討する。

今回の実験は比較的短期であったため、フロセミドによる腎組織の改善が明瞭でなかったが、さらに観察記間を延長することにより間質の線維化、糸球体硬化病変の改善が期待される。

さらに、ヒトの腎生検標本を用い、SMITの発現をmRNAレベル、蛋白レベルで観察することにより、腎疾患患者における浸透圧ストレスの関与を推定する予定である。

6. 文献

1. Lax DS, Benstein JA, Tolbert E, Dworkin L. Effects of salt restriction on growth and glomerular injury in rats with remnant kidneys. *Kidney Int* 1992;41:1527-1534.
2. Benstein JA, Feiner HD, Parker M, Dworkin L. Superiority of salt restriction over diuretics in reducing renal hypertrophy and injury in uninephrectomized SHR. *Am J Physiol* 1990;258:F1675-F1681.
3. Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis* 1992;20:1-17.
4. Yamauchi A, Uchida S, Preston AS, Kwon HM, Handler JS. Hypertonicity stimulates transcription of gene for Na⁺-myo-inositol cotransporter in MDCK cells. *Am J Physiol* 1993;264:F20-F23.
5. Yamauchi A, Miyai A, Shimada S, et al. Localization and rapid regulation of Na⁺/myo-inositol cotransporter in rat kidney. *J Clin Invest* 1995;96:1195-1201.
6. Yamauchi A, Sugiura T, Itoh T, et al. Na⁺/myo-inositol transport is regulated by basolateral tonicity in Madin-Darby canine kidney cells. *J Clin Invest* 1996;97:263-267.
7. Kaname S, Uchida S, Ogata E, Kurokawa K. Autocrine secretion of transforming growth factor-beta in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* 1992;42:1319-1327.
8. Yamauchi A, Sugiura T, Kitamura H, et al. Effects of partial nephrectomy on the expression of osmolyte transporters. *Kidney Int* 1997;51:1847-1854.
9. Meyer TW, Scholey JW, Brenner BM. Nephron adaptation to renal injury. In: Brenner BM, ed. *The Kidney*. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1995:2011-2048.
10. Sugiura T, Yamauchi A, Kitamura H, et al. Effects of hypertonic stress on transforming growth factor-β activity in NRK cells. *Kidney Int* in press.
11. Lane PH, Schmitz PG. Chronic furosemide treatment produced glomerular hypertension in the rat. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:681.
12. Stubblefield E, Mueller GC. Effects of sodium chloride concentration on growth, biochemical composition, and metabolism of Hela cells. *Cancer Res* 1960;20:1646-1655.
13. Toback FG. Induction of growth in kidney epithelial cells in culture by Na⁺. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:6654-6656.
14. Burg MB, Garcia-Perez A. How tonicity regulates gene expression. *J Am Soc Nephrol* 1992;3:121-127.
15. Levin EG, Santell L, Saljooque F. Hyperosmotic stress stimulates tissue plasminogen activator expression by a PKC-independent pathway. *Am J Physiol* 1993;265:C387-C396.
16. Kohan DE, Padilla E. Osmolar regulation of endothelin-1 production by rat inner medullary collecting duct. *J Clin Invest* 1993;91:1235-1240.
17. Lutz W, Kumar R. Hypertonic sucrose treatment enhances second messenger accumulation in vasopressin-sensitive cells. *Am J Physiol* 1993;264:F228-F233.
18. Imura O, Kusano E, Ishida F, Oono S, Ando Y, Asano Y. Hyperosmolality rapidly reduces atrial-natriuretic-peptide-dependent cyclic guanosine monophosphate production in cultured

rat inner medullary collecting duct cells. *Pflugers Arch* 1995;430:81-87.

19. Bankir LB, Kriz W. Adaptation of the kidney to protein intake and to urine concentrating activity: Similar consequences in health and CRF. *Kidney Int* 1995;47:7-24.

20. Bouby N, Bachmann S, Bichet D, Bankir L. Effects of water intake on the progression of chronic renal failure in 5/6 nephrectomized rats. *Am J Physiol* 1990;258:F973-F979.

Pathophysiological role of hypertonic stress by salt loading in the kidney

Atsushi Yamauchi & Enyu Imai

First Department of Medicine
Osaka University School of Medicine

Summary

Na⁺/*myo*-inositol cotransporter (SMIT) was a major osmolyte transporter that is regulated by extracellular osmolarity. We examined the expression of SMIT in partial nephrectomized rats in order to assess the change in local osmolarity following reduction of renal mass. Four weeks after 5/6 nephrectomy, the rats were compared to sham-operated control animals. In situ hybridization revealed that signals for the transporter mRNA were markedly reduced in the inner medulla of the remnant kidney. In contrast, these signals in the outer medulla as well as cortex increased following nephrectomy. Microscopic examination revealed that the signals in the thick ascending limbs of Henle (TAL) as well as macula densa cells were significantly increased. The signals in this segment were reduced by furosemide administration. The increased expression in NX rats appears to reflect the increased NaCl transport and high local osmolarity in this segment.

Hypertonicity is known to modulate the expression of some genes and the action of several cytokines. We next evaluated whether hypertonicity would increase the expression and/or activity of transforming growth factor- β (TGF- β) in NRK cells. The bioassay for TGF- β showed that mature TGF- β activity was significantly increased when the cells were cultured in a hypertonic medium (500 mOsm/kg). In contrast, total TGF- β activity and TGF- β mRNA abundance did not change significantly, suggesting that hypertonicity activated TGF- β without affecting the synthesis of TGF- β . To determine whether collagen synthesis was increased by hypertonicity, we examined [³H] proline incorporation into NRK cells cultured in hypertonic medium. Proline incorporation increased in an osmolality-dependent manner. Furthermore, anti-TGF- β antibody prevented the increase in proline incorporation induced by hypertonicity. These results suggest that hypertonicity promotes the processing of latent TGF- β to the biologically active form, resulting in the stimulation of collagen synthesis in NRK cells.

To examine possible role of local hypertonicity in renal fibrosis, we investigated the expression of TGF- β and fibronectin in the remnant kidney. In situ hybridization revealed that signals for TGF- β mRNA were markedly increased in the outer medulla and cortex following nephrectomy. Microscopic examination revealed that the signals in the outer medulla were localized to the interstitial cells as well as the TAL cells. The expression of fibronectin showed a similar pattern. These results suggested a possible involvement of hypertonic stress in the progression of renal diseases.