

### 9841 腎における食塩代謝および微小循環調節に関与する血管作動性因子の臨床的意義に関する分子医学的検討

助成研究者：田中 一成 (京都大学大学院 医学研究科)  
 共同研究者：向山 政志 (京都大学大学院 医学研究科)  
 小谷 仁人 (京都大学大学院 医学研究科)  
 中尾 一和 (京都大学大学院 医学研究科)

プロスタノイドは、プロスタグランディンおよびトロンボキサンからなるアラキドン酸の代謝産物であり、5種類のプロスタノイドが8種類の特異的受容体と結合することにより、主にautocrine/paracrine調節因子として、腎では糸球体血流調節や水電解質代謝など、重要な生理作用に関与する。近年、全てのプロスタノイド受容体の一次構造が解明され、さらにこれらを欠損したマウスがそれぞれ作製された。本研究では、プロスタノイドの主要な標的臓器である腎臓での食塩代謝および循環調節における作用を、動物モデルを用いて解析し、それらの意義の解明および臨床応用に向けて検討することを目的とした。

ラット腎において、PGE受容体サブタイプのうちEP3は尿細管に、EP4は糸球体に主に発現を認めたが、EP1は従来報告されていた集合管以外に、糸球体にも明らかな発現を認めた。培養メサンギウム細胞では、PGE2はEP1を介して増殖促進的に、EP4刺激で抑制的に働くことが明らかとなった。とくに、遺伝性高血圧ラット由来や高グルコース濃度で培養したメサンギウム細胞は増殖作用が亢進しており、この機序にPGE2/EP1系の相対的な機能亢進、およびPGE2/EP4系の機能低下が関与することが示された。

またEP1は集合管における主要なPGE受容体サブタイプであり、細胞内Caの上昇を介しPGE2のNa・水利尿作用に関与すると考えられてきたが、EP1欠損マウスでは基礎の水・Na再吸収には異常を認めないが、高食塩食負荷の際の水利尿の低下が観察された。一方、PGI<sub>2</sub>/IP系については、基礎の腎機能やレニン分泌調節にあまり関与しないが、高食塩食負荷において、野生型 (IP<sup>+/+</sup>) では変化がなかったが、欠損マウス (IP<sup>-/-</sup>) では軽度ながら有意の血圧の上昇が観察された。また、48時間絶水負荷による血漿レニン活性は野生型とも顕著に上昇したが、欠損マウスでその度合いが大きい傾向にあり、食塩負荷時や著しい脱水時などでは、腎血流、血圧調節やレニン分泌に影響を与える可能性が示唆された。

以上より、高血圧や糖尿病状態において、腎でのPGE受容体サブタイプのバランスの異常が病態形成に関与する可能性が示唆された。また、欠損マウスの解析から、プロスタノイド受容体EP1およびIPは、食塩負荷時や著しい脱水時などの条件において、腎での食塩代謝や循環調節に関与する可能性が示された。



## 9 8 4 1 腎における食塩代謝および微小循環調節に関与する血管作動性因子の臨床的意義に関する分子医学的検討

助成研究者：田中 一成 (京都大学大学院 医学研究科)  
 共同研究者：向山 政志 (京都大学大学院 医学研究科)  
 小谷 仁人 (京都大学大学院 医学研究科)  
 中尾 一和 (京都大学大学院 医学研究科)

### 1. 研究目的

腎炎、糖尿病性腎症および高血圧性腎硬化症は末期腎不全に至る主要な原因であり、近年のわが国における透析患者数の急速な増加とあわせ、その克服は医学研究上重要課題である。これらの疾患の発症および進展において、種々の血管作動性因子による調節の重要性が示唆されてきたが、特に、これらの腎における電解質代謝および微小循環の調節とその異常は、疾患の理解と治療法の開発のために極めて重要と考えられる。

プロスタノイドは、プロスタグランディン (PG) およびトロンボキサン (TX) からなるアラキドン酸の代謝産物であり、アラキドン酸がシクロオキシゲナーゼ (COX) の作用により PGG<sub>2</sub> を経て PGH<sub>2</sub> へ代謝されることから始まる。これからさらに特異的な合成酵素により 5 種類のプロスタノイドが生成する。これらは生体内できわめて不安定なため、それらの産生部位やその近傍で autocrine/paracrine 調節因子として作用すると考えられるが、腎では糸球体血流調節、水電解質代謝調節など、種々の重要な生理作用を有する(1,2)。これらの作用は、その標的臓器の細胞膜上にある 8 種類の特異的受容体と結合することにより発揮される (Table 1)。近年、成宮らを中心に、全てのプロスタノイド受容体の一次構造が解明された(1)。さらに、これらを欠損したマウスがそれぞれ作製され、個々の生理的意義について解析がすすめられている(3-5)。

われわれはこれまで、ラットのプロスタサイクリン受容体および PGE 受容体 EP<sub>1</sub>、EP<sub>4</sub> サブタイプ、さらにヒトのプロスタサイクリン受容体および PGE 受容体 EP<sub>3</sub>、EP<sub>4</sub> サブタイプの cDNA の構造決定を行い、それぞれの受容体の細胞内情報伝達系も解明した(6-10)。本研究では、これらの成果をもとに、プロスタノイドの主要な標的臓器である腎臓での食塩代謝や循環調節におけるプロスタノイドの作用を分子生物学的に解析し、それらの意義の解明と、受容体拮抗薬の開発などの臨床応用に向けて検討することを目的とした。

### 2. 研究方法

#### 2.1 ラット腎における PGE 受容体サブタイプの発現と意義

16週齢の Wistar-Kyoto ラット (WKY) および高血圧自然発症ラット (SHRSP) より differential sieving 法にて糸球体を単離し、またこれから培養メサンギウム細胞を確立した。これらにおける EP サブタイプの発現を、in situ hybridization 法および Northern

blot法を用いて検討した。また、培養メサンギウム細胞におけるEPサブタイプの機能について、PGE2および各種EP受容体アゴニスト、アンタゴニストの存在下、48時間の<sup>3</sup>H-thymidine取込みを用いたDNA合成能、およびfura-2を用いた細胞内Ca濃度を測定した(11)。さらに、メサンギウム細胞を正常(5.6mM)または高グルコース濃度下(25mM)に培養して、その増殖に及ぼすEPサブタイプの意義についても検討した(11)。

## 2.2 EP1欠損マウスの機能解析

12週齢の野生型(*EP1*<sup>+/+</sup>)およびEP1欠損マウス(*EP1*<sup>-/-</sup>)(5)について、血中尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Cr)およびNa濃度、尿量、尿浸透圧、尿中NaおよびCr排泄を測定した。さらに、これらを定常食(0.5%NaCl食)または高食塩食(2%、8%)下で2週間飼育し、水・Na調節に与える影響について検討した。

## 2.3 プロスタサイクリン受容体(IP)欠損マウスの機能解析

15-21週齢の野生型(*IP1*<sup>+/+</sup>)およびIP欠損マウス(*IP*<sup>-/-</sup>)(3)について、tail-cuff法を用いた血圧、血中BUN、Cr、および尿量、尿Na、Cr排泄を測定した。また、2%高食塩食を2週間負荷し、血圧に与える影響を調べた。さらに、48時間絶水負荷を行い、血漿レニン活性(12)に及ぼす効果を検討した。

## 3. 研究結果

### 3.1 ラット腎におけるPGE受容体サブタイプの発現と高血圧ラットにおける意義

ラット腎における各プロスタノイド受容体の発現を、in situ hybridization、Northern blot法にて検討したところ、EP3は尿細管に、EP4は糸球体に主に発現を認めたが、EP1は従来報告されていた集合管以外に、WKY、SHRSPともに糸球体にも明らかな発現を認めた。そこで、単離糸球体より調製した培養メサンギウム細胞を用いて、PGE受容体サブタイプの発現と、その機能的意義について検討を行った。それぞれのアゴニストを用いて細胞増殖への作用をみたところ、sulprostone(EP1アゴニスト)、M&B28767(EP3/EP1アゴニスト)にて増殖亢進を認めたが、butaprost(EP2アゴニスト)は作用を示さず、11-deoxy-PGE1(EP4アゴニスト)はむしろ抑制作用を示した(Fig. 1A)。これからEP1を介した増殖促進作用が考えられたため、2種類の選択的EP1アンタゴニスト(SC-51322、ONO-AE-628)を用いて解析し、PGE2の細胞増殖作用はEP1を介することが明らかとなった(Fig. 1B)。またその細胞内機序として、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用が示された(Fig. 2)。

高血圧ラット(SHRSP)由来培養メサンギウム細胞は、対照のWKY由来細胞と比較し、PGE2に対する増殖反応が有意に亢進しており(Fig. 3)、これはEP1アンタゴニストに

て抑制されることから、PGE<sub>2</sub>/EP<sub>1</sub>系の相対的な機能亢進が増殖亢進作用に関与する可能性が考えられた。

### 3.2 糖尿病状態でのラットメサンギウム細胞におけるPGE受容体サブタイプの意義

高グルコース濃度下で培養したメサンギウム細胞の増殖性は亢進し、これは糖尿病におけるメサンギウムの増生とそれに引き続く硬化を反映すると考えられる。高グルコース下で約3倍に亢進したDNA合成能はEP<sub>1</sub>アンタゴニストの添加でほぼ完全に抑制され（Fig. 4）、内因性のPGE<sub>2</sub>/EP<sub>1</sub>系の機能亢進がその病態形成に関与する可能性が示された。

### 3.3 EP<sub>1</sub>欠損マウスの機能解析

EP<sub>1</sub>は本来集合管に主に発現し、水・Na再吸収を阻害してPGE<sub>2</sub>の利尿作用における役割が想定されてきた。EP<sub>1</sub>欠損マウス（EP<sub>1</sub><sup>-/-</sup>）は、腎臓に明らかな形態学的異常を認めず、また基礎時の血中BUN、Cr、Naおよび尿量、尿中Na排泄、尿浸透圧に変化を認めなかった（Table 2）。この欠損マウスに高食塩食負荷を行うと、野生型（EP<sub>1</sub><sup>+/+</sup>）に比べ尿量の増加が有意に抑制され、水利尿不全傾向を認めたが（Fig. 5）、尿中Na排泄には有意な差異を認めなかった（Fig. 6）。

### 3.4 IP欠損マウスの機能解析

IP欠損マウスでは血栓形成傾向および痛覚の低下が報告されたが(3)、腎ではIPは血管系に主に存在し、糸球体血流維持およびレニン分泌調節に関わることが想定されてきた。IP欠損マウス（IP<sup>-/-</sup>）は腎臓に明らかな形態学的異常を認めず、また基礎時の血圧はやや低い傾向にあり、また血中BUN、Cr、尿量、尿中Na排泄に変化を認めなかった（Table 3）。これらのマウスに高食塩食負荷を行うと、野生型（IP<sup>+/+</sup>）では変化がなかったが、欠損マウス（IP<sup>-/-</sup>）では前値に比べ軽度ながら有意の血圧の上昇が観察された（Fig. 7）。また、48時間絶水負荷による血漿レニン活性は、野生型とも顕著に上昇したが、欠損マウスにおいてその度合いが大きい傾向にあった（Fig. 8）。

## 4. 考 察

プロスタノイドは腎における主要な電解質代謝・循環調節系のひとつであり、PGE<sub>2</sub>、プロスタサイクリンは糸球体血流維持とレニン分泌調節に、またPGE<sub>2</sub>は尿細管での水・Na再吸収の抑制に重要であると考えられてきた。しかしその詳細については、いまだ不明な点が多い。

これまでの生理学的研究から、PGE<sub>2</sub>は集合管において、細胞内Caの上昇を介してNa再吸収を阻害し、Na・水利尿作用を発揮すると考えられている(13)。EP<sub>1</sub>は集合管にお

る主要なPGE受容体サブタイプであり、細胞内Caの上昇により情報伝達を行う (Fig. 2)。これからPGE2のNa・水利尿作用にEP1サブタイプが少なくとも一部関与すると考えられてきたが、今回の結果からEP1欠損マウスでは食塩負荷による水利尿の低下が観察された (Fig. 5)、この仮説と矛盾しない。今後EP3など他のサブタイプ欠損マウスを含めた解析により、さらに明らかになることが期待される。

今回の研究により、EP1はラットにおいて集合管以外に糸球体およびメサンギウム細胞に存在し、細胞増殖促進的に作用することが明らかとなった。とくに、高血圧ラット由来や高グルコース下での培養メサンギウム細胞の増殖亢進作用に、このPGE2/EP1系の相対的な機能亢進が存在することが示された。我々はまた、この機序にPGE2/EP4系の機能低下が密接に関与することを見出している(11)。このようなEPサブタイプのバランスの異常が、これらの細胞機能調節の異常を来している可能性が示唆されるが、これが*in vivo*のモデルでも認められるかについて、さらに検討を進めている。

また、PGI2/IP系については、基礎の腎機能やレニン分泌調節にあまり関与しない可能性が考えられた。しかし同時に、食塩負荷時や著しい脱水時などでは、腎血流や血圧調節、またレニン分泌に影響を与える可能性が示唆されたが、その詳細については不明であり、今後のさらなる検討が必要である。

## 5. 今後の課題

分子生物学的研究によって、従来のCOX阻害薬を用いた研究では解明できなかった個々のプロスタノイド受容体を介する複雑な生理機能が明らかにされてきた。今後さらに、ヒト腎疾患におけるプロスタノイド受容体の発現を検討することにより病態への関与がより明らかにされるとともに、受容体欠損マウスモデルを用いて、COX阻害薬 (NSAID) による腎障害の原因となる受容体の解明、生体への各種アゴニスト、アンタゴニスト投与による効果の検討から治療への応用など、生理的・病態生理的意義の解明に向け、研究が発展することが期待される。

## 6. 参考文献

- 1) Ushikubi F, Hirata M, Narumiya S. Molecular biology of prostanoid receptors: An overview. *J Lipid Mediators Cell Signalling* 12:343-359, 1995.
- 2) Breyer M, Jacobson H, Breyer R. Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. *J Am Soc Nephrol* 7:8-17, 1996.
- 3) Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, et al. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 388:678-682, 1997.
- 4) Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, et al. Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin

- F receptor. *Science* **277**:681-683, 1997.
- 5) Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* **395**:281-284, 1998.
  - 6) Sasaki Y, Usui T, Tanaka I, et al. Cloning and expression of a cDNA for rat prostacyclin receptor. *Biochim Biophys Acta* **1224**:601-605, 1994.
  - 7) Sando T, Usui T, Tanaka I, et al. Molecular cloning and expression of rat prostaglandin E receptor EP<sub>2</sub> subtype. *Biochem Biophys Res Commun* **200**:1329-1333, 1994.
  - 8) Nakagawa O, Tanaka I, Usui T, et al. Molecular cloning of human prostacyclin receptor cDNA and its gene expression in cardiovascular system. *Circulation* **90**:1643-1647, 1994.
  - 9) Kotani M, Tanaka I, Ogawa Y, et al. Molecular Cloning and expression of multiple isoforms of human prostaglandin E receptor EP3 subtype generated by alternative mRNA splicing: Multiple second messenger systems and tissue-specific distributions. *Mol Pharmacol* **48**:869-879, 1995.
  - 10) Mori K, Tanaka I, Kotani M, et al. Gene expression of the human prostaglandin E receptor EP4 subtype: Differential regulation in monocytoid and lymphoid lineage cells by phorbol ester. *J Mol Med* **74**:333-336, 1996.
  - 11) Ishibashi R, Tanaka I, Kotani M, et al. Roles of prostaglandin E receptors in mesangial cells under high glucose conditions. *Kidney Int* **56**: in press, 1999.
  - 12) Naruse M, Naruse K, Inagami T. Immunoreactive renin in mouse adrenal gland: localization in the inner cortical region. *Hypertension* **6**:275-280, 1983.
  - 13) Guan YF, Zhang YH, Breyer RM, et al. Prostaglandin E2 inhibits renal collecting duct Na<sup>+</sup> absorption by activating the EP1 receptor. *J Clin Invest* **102**:194-201, 1998.

Table 1. Prostanoid receptors

| Ligand           | Receptor        | Intracellular Response | Tissue Response   |
|------------------|-----------------|------------------------|---|
| PGD <sub>2</sub> | DP              | cAMP ↑                 | Smooth muscle relaxation<br>Inhibition of platelet aggregation                              |
| PGE <sub>2</sub> | EP <sub>1</sub> | Ca <sup>2+</sup>       | Smooth muscle contraction   |
|                  | EP <sub>2</sub> | cAMP ↑                 | Smooth muscle relaxation<br>Intestinal secretion  |
|                  | EP <sub>3</sub> | PI response<br>cAMP ↓↑ | Smooth muscle contraction<br>Neurotransmitter release inhibition<br>Inhibition of lipolysis |
|                  | EP <sub>4</sub> | cAMP ↑                 | Smooth muscle relaxation  |
| PGF <sub>2</sub> | FP              | PI response            | Myometrial contraction, Luteolysis  |
| PGI <sub>2</sub> | IP              | cAMP ↑                 | Smooth muscle relaxation<br>Inhibition of platelet aggregation                              |
| TXA <sub>2</sub> | TP              | PI response            | Smooth muscle contraction<br>Platelet aggregation   |

Table 2. Basal characteristics of EP1 knockout mice

|                                     | EP <sub>1</sub> <sup>+/+</sup> | EP <sub>1</sub> <sup>-/-</sup> |
|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| BUN (mg/dl)                         | 35.3±4.7                       | 32.3±1.1                       |
| Cr (mg/dl)                          | 0.085±0.020                    | 0.063±0.008                    |
| Na (mEq/l)                          | 143.5±0.3                      | 144.8±1.7                      |
| Urine Vol. (ml/day)                 | 1.05±0.28                      | 1.42±0.22                      |
| Urine Na/Cr (mEq/mg)                | 0.32±0.03                      | 0.33±0.02                      |
| Urine Osm (mOsm/kgH <sub>2</sub> O) | 1639±495                       | 1345±157                       |

(n = 4)

Table 3. Basal characteristics of IP knockout mice

|                      | IP <sup>+/+</sup> | IP <sup>-/-</sup> |
|----------------------|-------------------|-------------------|
| SBP (mmHg)           | 111±1             | 106±2             |
| DBP (mmHg)           | 88±1              | 85±2              |
| PR (/min)            | 660±18            | 633±19            |
| Body Wt (g)          | 31.7±1.0          | 34.0±0.8          |
| BUN (mg/dl)          | 29±3              | 28±2              |
| Cr (mg/dl)           | 0.075±0.006       | 0.067±0.008       |
| Urine Vol. (ml/day)  | 1.93±0.25         | 1.90±0.19         |
| Urine Na/Cr (mEq/mg) | 0.32±0.03         | 0.31±0.03         |

(n = 10)



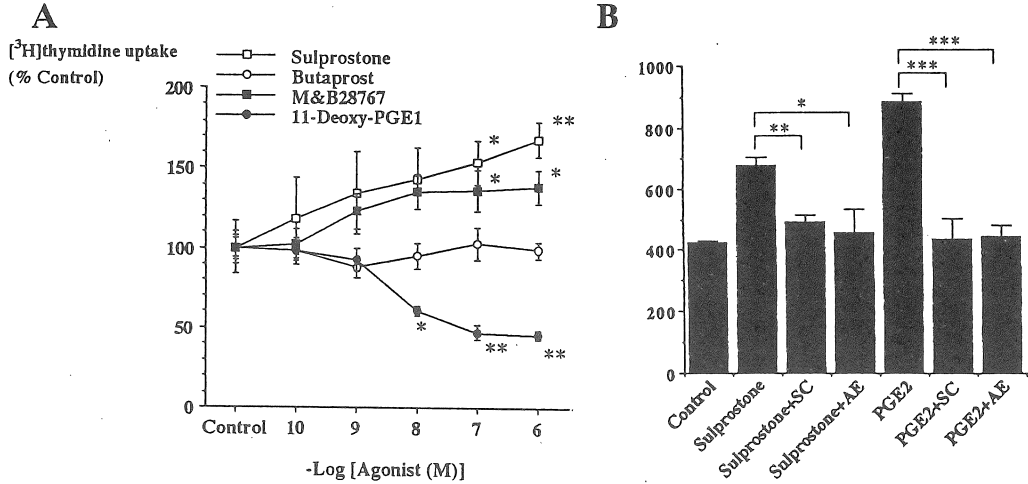


Fig. 1. (A) <sup>3</sup>H-thymidine uptake in the presence of various agonists of PGE receptors. (B) Inhibition by EP<sub>1</sub> antagonists (SC: 10<sup>-7</sup> M, AE: 10<sup>-6</sup> M) of DNA synthesis stimulated with an EP<sub>1</sub> agonist (sulprostone 10<sup>-6</sup> M) or PGE<sub>2</sub> (10<sup>-8</sup> M). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, n = 4.

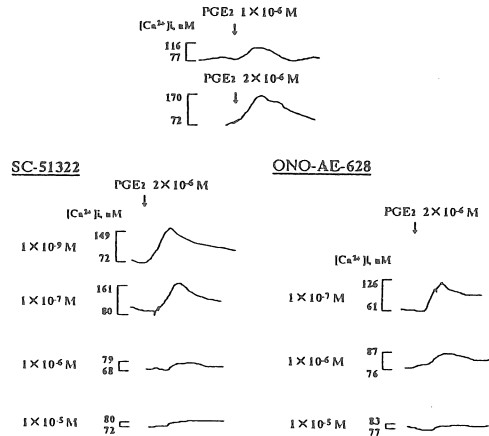


Fig. 2. Inhibitory effects of EP<sub>1</sub> antagonists (SC-51322 and ONO-AE-628) on PGE<sub>2</sub>-induced increase in intracellular calcium in rat mesangial cells.

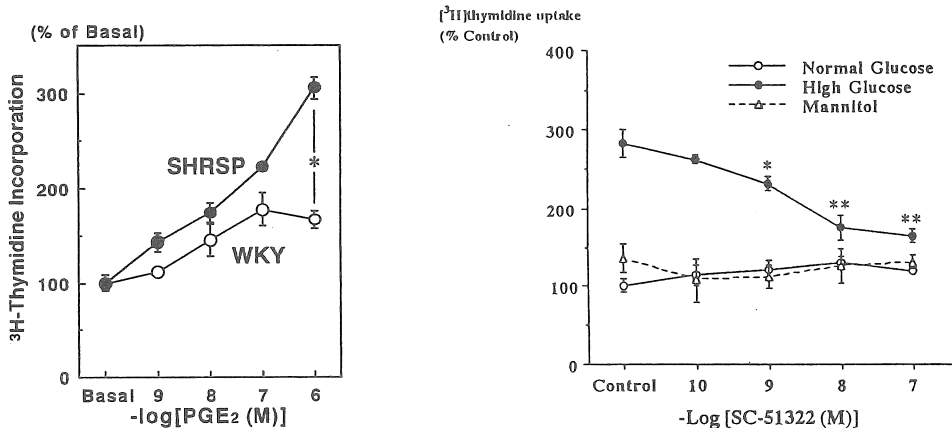


Fig. 3. PGE<sub>2</sub>-induced proliferation of mesangial cells from WKY and SHRSP. \*p < 0.05, n = 4.

Fig. 4. Effect of an EP<sub>1</sub> antagonist on high glucose-induced cell proliferation in rat mesangial cells. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. control, n = 8.

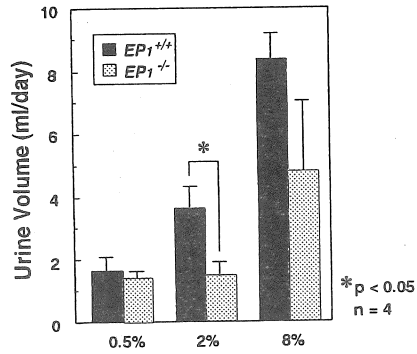


Fig. 5. Urine volume of  $EP1^{+/+}$  and  $EP1^{-/-}$  mice on different sodium diets.

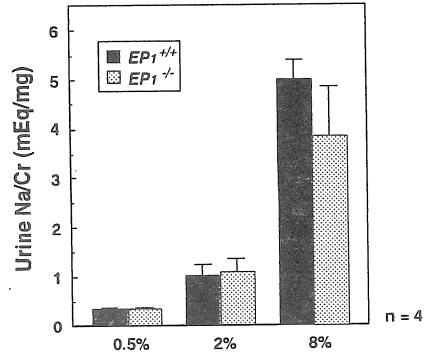


Fig. 6. Urinary sodium excretion of  $EP1^{+/+}$  and  $EP1^{-/-}$  mice on different sodium diets.

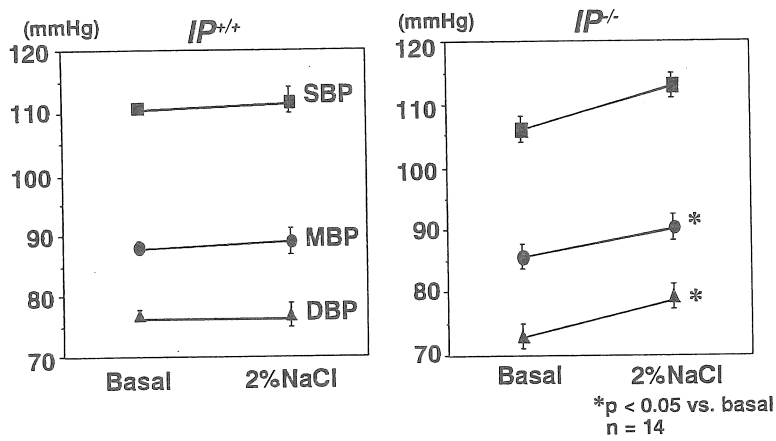


Fig. 7. Effects of high-salt diet on blood pressures in IP knockout mice.

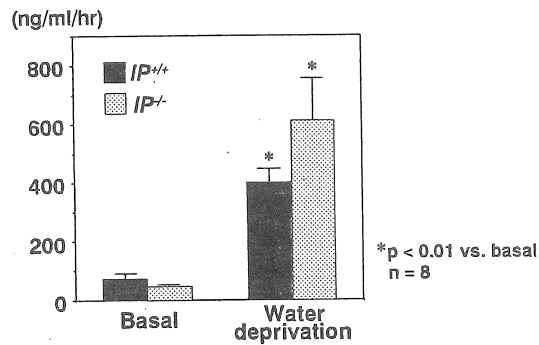


Fig. 8. Effects of 48h water deprivation on plasma renin activity in IP knockout mice.

9 8 4 1

**Molecular Studies on Clinical Significance of Renal Vasoactive Substances in  
the Regulation of Salt Metabolism and Renal Microcirculation  
— Roles of the Prostanoid System —**

Issei Tanaka, Masashi Mukoyama, Masato Kotani, and Kazuwa Nakao  
Department of Medicine and Clinical Science  
Kyoto University Graduate School of Medicine

Summary

Prostanoids are arachidonic acid metabolites, and there are 5 main prostanoids acting on 8 distinct receptors. Of them, prostaglandin (PG)  $E_2$  and prostacyclin ( $PGI_2$ ) are major vasoactive prostanoids in the kidney, and are thought to be involved as autocrine/paracrine regulators in the control of renal blood flow, glomerular filtration, sodium and water reabsorption, and possibly of renin release. Recent advances have revealed the primary structure of all the prostanoid receptors, and mice deficient in each of the receptors have been established. In this study, to elucidate the physiological and pathophysiological significance of prostanoids in salt metabolism and renal microcirculation, we investigated the roles of  $PGE_{1-4}$  and PGI receptors (IP) in the kidney *in vitro* and *in vivo* using animal models.

In rat kidney, PGE receptor  $EP_3$  subtype is expressed in the tubules and  $EP_4$  in the glomeruli, while  $EP_1$  is present in the glomeruli as well as in the collecting ducts. Cultured rat mesangial cells expressed  $EP_1$  and  $EP_4$ .  $PGE_2$  stimulated mesangial cell growth via  $EP_1$ , but inhibited via  $EP_4$ . Mesangial cells prepared from stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) were more proliferative than those from control Wistar-Kyoto rats (WKY), and  $EP_1$ -mediated cell proliferation was more enhanced in the cells from SHRSP than from WKY. High glucose stimulated growth of WKY mesangial cells, and the blockade of  $EP_1$  by antagonists completely abolished this enhancement, suggesting that augmentation of autocrine  $PGE_2/EP_1$  system could contribute to the proliferative nature of mesangial cells under high glucose states. We also found that attenuated  $PGE_2/EP_4$  signaling has a critical role in this  $EP_1$  augmentation.

Renal function, urinary Na excretion, and renal histology were normal in  $EP_1$ -knockout ( $EP_1^{-/-}$ ) mice and IP-knockout ( $IP^{-/-}$ ) mice. When mice were fed with 2% NaCl diet for 2 weeks, wild-type (WT) mice exhibited increase in urine volume and urinary Na excretion without significant blood pressure changes. Interestingly, urine volume increase was significantly attenuated in  $EP_1^{-/-}$  mice. In  $IP^{-/-}$  mice, 2% NaCl loading for 2 weeks resulted in significant blood pressure increase. Water deprivation for 48 h resulted in marked increase in plasma renin activity, and the increment tended to be higher in  $IP^{-/-}$  mice than in WT.

These results indicate that renal prostanoid receptors are expressed with region specificity, and suggest that an imbalance between PGE receptor subtypes might be involved in disease states such as hypertension and diabetes. Furthermore, although not essential for maintaining renal function under physiological condition, the  $PGE_2/EP_1$  system may be involved in the regulation of water diuresis under high salt loading, and the  $PGI_2/IP$  system may be implicated in the regulation of blood pressure and renin release in excessively salt-loaded or dehydrated states.