

腎特異プロスタグランジン輸送体 OAT-PG ノックアウトマウスの 食塩応答性血圧変動の機序の解明

金井 好克, 永森 收志, 大垣 隆一, 中込 咲綾, Wiriyasermkul Pattama, 西山 俊

大阪大学医学系研究科生体システム薬理学

概要 プロスタグランジン E_2 (PGE_2) は、腎臓において遠位尿細管内流量や塩濃度の変動に伴い遠位尿細管緻密斑から分泌され、輸入細動脈の収縮・拡張を調節するとともに、傍球体装置からのレニン分泌を調節し、腎機能のみならず全身の血圧調節に関わる重要な情報伝達物質として機能している。 PGE_2 は体液中において安定であるため、尿細管一系球体の一過性の反応を可能とするためには、シグナル伝達後に不要となった PGE_2 を即座に排除するメカニズムが不可欠であるが、この PGE_2 クリアランス機構の詳細は、解明されていない。 PGE_2 の代謝酵素である 15-PGDH は、腎皮質では主に近位尿細管上皮細胞内に存在するため、近位尿細管に発現する PGE_2 輸送体が PGE_2 クリアランスを担うはずである。研究代表者らは、近位尿細管に発現する腎特異的 PGE_2 輸送体として、OAT-PG を見だし、そのノックアウト(KO)マウスを作製した。本研究は、OAT-PG KO マウスの表現型を解析し、血圧調節への関与を明らかにすることを目的として実施した。

本研究では、OAT-PG が近位尿細管上皮の側基底膜で 15-PGDH と分子共役して存在することを明らかにした。これは、OAT-PG が PGE_2 クリアランス機構として機能するために非常に有利な性質となる。OAT-PG ホモ KO マウスでは腎皮質から調製した尿細管の PGE_2 の取り込み能が大きく低下しており、腎皮質の PGE_2 取り込みの K_m 値が OAT-PG のそれと一致し、OAT-PG が近位尿細管の主要な PGE_2 輸送体であると結論された。また、OAT-PG KO マウス由来の近位尿細管上皮細胞のトランスウェル上での一次培養では、側基底側の PGE_2 を取り込み頂上膜側に代謝物を分泌する能力が低下しており、OAT-PG が PGE_2 の経上皮代謝を担うことが実証された。OAT-PG KO マウスでは、野生型マウスに比して、フロセミド負荷時に腎皮質及び尿中の PGE_2 量が増加し、腎皮質及び尿中の PGE_2 代謝物量が低下しており、腎皮質局所の PGE_2 クリアランス機構としての OAT-PG の役割が *in vivo* で実証された。腎皮質 PGE_2 レベルの上昇を反映し、OAT-PG KO マウスでは野生型マウスに比して、フロセミド負荷時の血漿レニン活性及びアンギオテンシン II 値ともに上昇していた。

OAT-PG KO マウスの血圧は、Tail Cuff 法及びテレメトリー法によって測定し、高塩食 (8% NaCl) 及び低塩食 (0.03% NaCl) の効果を観察したが、有意な変化は捉えられていない。しかし、OAT-PG KO マウスでは、ACE 阻害薬の作用に拮抗する興味深い表現型が見られており、OAT-PG がレニン-アンギオテンシン-アルドステロン系を介して血圧調節に寄与する可能性について、今後の検討課題である。

1. 研究目的

プロスタグランジン (PG) は生体内に広く存在する生理活性物質であり、全身における様々な生理機能の調節に寄与している。特に腎臓においては、プロスタグランジン E_2 (PGE_2) は、遠位尿細管内流量や塩濃度の変動に伴い遠位尿細管緻密斑(マクラデンサ)から分泌され、輸入細

動脈の収縮・拡張を調節するとともに(尿細管一系球体フィードバック機構)、傍球体装置からのレニン分泌を調節し、腎機能のみならず全身の血圧調節に関わる重要な情報伝達物質として機能している¹⁾。近年の G 蛋白質共役型 PGE_2 受容体の同定や COX-2 が介在する合成経路の発見に伴い、 PGE_2 の腎臓における作用メカニズムは解明さ

れるかと思われたが、現在でも未解明な点が多く残されている。例えば、尿細管-糸球体フィードバック機構は、遠位尿細管への電解質流入量の変化を感知して、一過性に局所の PGE_2 濃度を増加させることで糸球体ろ過量を調節する過程を含むが、これは長期持続的なものではなく、即時的な作用である。しかし、 PGE_2 は体液中において非常に安定であるため、尿細管-糸球体の一過性の反応を可能とするためには、シグナル伝達後に不要となった PGE_2 を即座に排除するメカニズムが不可欠である。このクリアランス機構の異常は、局所の PGE_2 の蓄積をもたらし、糸球体ろ過量やレニン分泌に異常をきたし、ひいては全身血圧調節に変調をきたす可能性がある。この局所での PGE_2 クリアランス機構の詳細は、未だ解明されていない。 PGE_2 クリアランスには、最終的に PGE_2 を代謝分解することが必要だが、 PGE_2 の代謝酵素である 15-PGDH (15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase) は、主に近位尿細管と集合管の細胞質にある。尿細管の microperfusion の研究より、近位尿細管が側底膜から PGE_2 を取り込み、管腔側膜から尿中にその代謝産物を分泌していると報告されている^{2,3)}。この PGE_2 の取り込みを媒介する輸送体と代謝酵素 15-PGDH が、腎皮質局所の PGE_2 クリアランス機構を形成すると想定される。

研究代表者らは、これまでに尿細管上皮の輸送体の分子探索に携わり、アミノ酸、尿酸を含む有機アニオンの輸送体を同定してきたが、その過程でマウス腎より SLC22 ファミリーに属する新たな有機アニオン輸送体を見だし、これが PG を選択的に輸送することから prostaglandin-specific organic anion transporter (OAT-PG) と命名した⁴⁾。OAT-PG は、近位尿細管の間質に面した側底膜に存在し、合成酵素 COX-2 ではなく、代謝酵素 15-PGDH と共存した。しかも、大変興味深いことに、免疫組織学的検討の結果、両者が近位尿細管側底膜で共局在していることが明らかになった⁴⁾。細胞質蛋白質である 15-PGDH が、膜蛋白質である OAT-PG によって繋ぎ止められ、OAT-PG により細胞内に取り込まれた PGE_2 は即座に 15-PGDH によって捕らえられることになり、非常に効率の良い PGE_2 クリアランス機構が形成されていることが示唆される (Figure 1)。15-PGDH は、OAT-PG と分子複合体を形成して存在し、効率の良い「輸送と代謝の共役」を実現していると想定される。

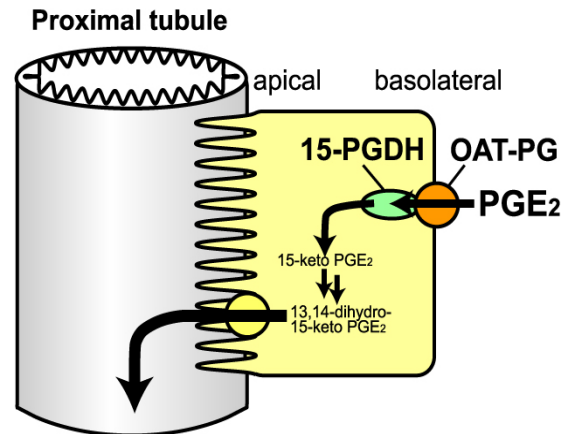


Figure 1. Functional and physical coupling of OAT-PG and 15-PGDH

研究代表者らは、 PGE_2 除去における OAT-PG の役割と生理的病態的意義を明らかにすることを目的として、OAT-PG ノックアウトマウスを作製した。本研究は、OAT-PG ノックアウトマウスの表現型を解析し、血圧調節への関与を明らかにすることを目的として実施した。

2. 研究方法

2.1 OAT-PG と 15-PGDH の分子共役の実証

細胞分画および共免疫沈降により、OAT-PG と 15-PGDH の分子共役について検討した。解析手法の概略は、研究成果の項に記す。

2.2 OAT-PG のノックアウトマウス及びそれを用いた解析

OAT-PG のノックアウトマウスは、常法にしたがい、ターゲティングベクターを用いた遺伝子ターゲティングにより OAT-PG 遺伝子の第 3、第 4 エクソンを破壊した ES 細胞を得、それを用いてキメラマウスを作製し、キメラマウスを交配することでヘテロノックアウト個体を得たものである。ホモノックアウト個体は、ヘテロノックアウト個体を交配することで得られた。

OAT-PG のノックアウトマウスを用いて行った各解析の解析手法の概略は、研究成果の項に記す。

2.3 マウス血圧測定

マウス血圧測定は、Tail Cuff によるマウスの非観血的血圧測定 (ソフトロン社製)、およびマウスの頸動脈にカニュー

レーションシテレメリー法(AD Instruments 社製)により随時血圧を測定し、血圧変動をモニタリングした。血圧測定は、神戸薬科大学江本憲昭教授、中山和彦博士との共同研究により実施した。

3. 研究結果

3.1 OAT-PG と 15-PGDH の共役

OAT-PG は、抗 OAT-PG 抗体を用いたマウス腎の免疫組織化学において、近位尿細管側底膜に局在して存在し、またプロスタグランジン代謝酵素である 15-PGDH との蛍光免疫組織化学による共染色において、OAT-PG と 15-PGDH が近位尿細管側底膜で共存していたことから、両者が共役して機能することが示唆された。そこで、両者の分子共役についてさらに検討した。

3.1.1 細胞分画による検討

両者の側底膜での共局在を細胞分画により確認した。2X HA タグ付 OAT-PG と 3X FLAG タグ付 15-PGDH を HEK293 細胞へ一過性発現し、可溶性画分と膜画分に分離した。検出は、抗 HA 抗体及び抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロットによって行った。その結果、**Figure 2a** に示すように、2X HA タグ付 OAT-PG は、膜画分にのみ検出されたが、3X FLAG タグ付 15-PGDH は、可溶性画分のみでなく、膜画分にも検出された。これは、可溶性酵素である 15-PGDH が、細胞質のみならず、膜にも何らかの形で存在することを示唆している。

培養細胞への強制発現により OAT-PG と 15-PGDH の膜画分での共存が示されたので、実際の腎臓を用いて、

同様に細胞分画による検討を行った。マウス腎皮質より可溶性画分と膜画分を調整し、抗 OAT-PG 抗体及び抗 15-PGDH 抗体によるウェスタンブロットによって検出した。その結果、**Figure 2b** に示すように、OAT-PG は、膜画分のみ検出されたが、15-PGDH は、可溶性画分、膜画分ともに検出された。これにより、実際の腎臓においても、膜画分で OAT-PG と 15-PGDH が共存することが示され、15-PGDH が、細胞質のみならず、膜にも形で存在することが確認された。

3.1.2 共免疫沈降による検討

2X HA タグ付 OAT-PG と 3X FLAG タグ付 15-PGDH を HEK293 細胞に共発現させ、相互の抗タグ抗体による免疫沈降を行った。検出は、抗 HA 抗体及び抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロットによって行った。その結果、**Figure 3a** に示すように、OAT-PG と 15-PGDH は、相互に共免疫沈降されることが示された。これは、両者が何らかの形で物理的に結合していることを示唆している。

培養細胞への強制発現により OAT-PG と 15-PGDH が相互に共免疫沈降されることが示されたので、実際の腎臓を用いて、同様に共免疫沈降による検討を行った。マウス腎皮質より膜試料を調整し、抗 OAT-PG 抗体による免疫沈降を行った。その結果、**Figure 3b** に示すように、抗 OAT-PG 抗体により、OAT-PG が共免疫沈降した。これにより、実際の腎臓においても、OAT-PG と 15-PGDH が物理的に結合していることが確認された。

以上により、OAT-PG と 15-PGDH の直接結合が実証された。

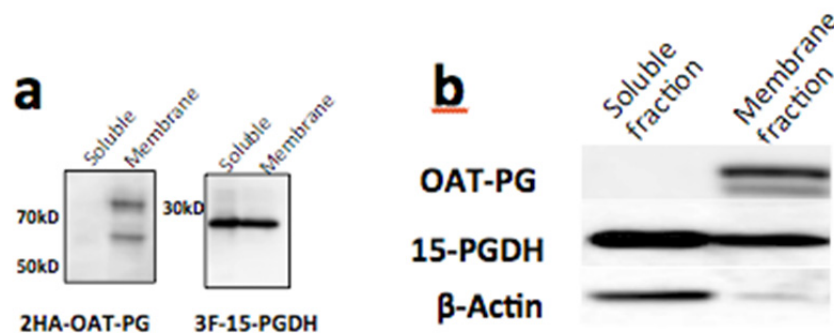


Figure 2. Co-localization of OAT-PG and 15-PGDH in cell fractionation. **a**, 2X HA-tagged OAT-PG and 3X FLAG-tagged 15-PGDH were expressed in HEK293 cells. **b**, membrane fraction and soluble fraction were prepared from mouse kidney cortex.

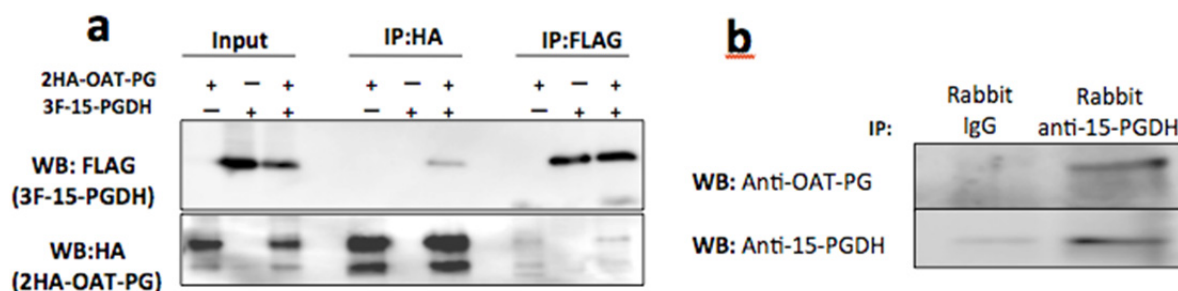


Figure 3. Co-localization of OAT-PG and 15-PGDH in coimmunoprecipitation. **a**, 2X HA-tagged OAT-PG and 3X FLAG-tagged 15-PGDH were expressed in HEK293 cells. **b**, immunoprecipitation using anti-15-PGDH was performed on proteins prepared from mouse kidney cortex.

Table 1. Biochemical parameters at basal condition

	WT	<i>Oat-pg</i> ^{-/-}
<i>Plasma</i>		
Na ⁺ (mEq/L)	146.5 ± 1.5	144 ± 1.1
K ⁺ (mEq/L)	6.95 ± 0.82	6.97 ± 0.27
Cl ⁻ (mEq/L)	113.3 ± 1.63	112 ± 1.5
Creatinine (mg/dL)	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.05
GFR (μL/min)	326.9 ± 36.4	388.5 ± 32.7
PRA (ng/mL/hr)	10.8 ± 1.2	8.2 ± 1.6
Angiotensin II (pg/mL)	483 ± 79	460 ± 129

3. 2 OAT-PG ノックアウトマウスの表現型

3. 2. 1 腎組織形態および血漿電解質への影響

OAT-PG 遺伝子のノックアウトは、PCR、ウェスタンブロット及び免疫組織化学で確認した。*OAT-PG* は、生後3週頃から発現が検出され、急速に発現が上昇して4週齢で成体レベルに達するもので、ホモノックアウト個体は、出産・発育に問題がなく、通常食餌で飼育された個体は、通常観察においては明らかな異常は呈しない。腎にはマクロ形態的異常やヘマトキシリンエオジン染色における組織学的異常は、見いだされなかった。

また、*OAT-PG* ノックアウトマウスと野生型マウスで血漿電解質を比較したところ、通常食飼育下、非刺激時において、Na⁺、K⁺、Cl⁻、クレアチニン値に変化はなかった (**Table 1**)。

3. 2. 2 腎近位尿細管の PGE₂ 取り込みへの *OAT-PG* の寄与

OAT-PG は、腎近位尿細管の側底膜に局限して存在するが、その腎近位尿細管の PGE₂ 取り込みへの寄与を明らかにするために、*OAT-PG* ノックアウトマウスと野生型マウ

スの腎近位尿細管の PGE₂ 取り込み能を比較した。

OAT-PG KO マウス腎皮質から調整した単離尿細管懸濁液を用いて、³H標識 PGE₂ の取り込みを測定したところ、ヘテロ、ホモノックアウトマウスでは、野生型に比べて取り込み機能の低下が見られた (**Figure 4a**)。対照として測定した [¹⁴C]パラアミノ馬尿酸の取り込みには群間の差はなかった (**Figure 4b**)。 [³H]PGE₂ 取り込みの時間経過を比較した結果を **Figure 4c** に示すが、野生型、ヘテロ、ホモノックアウトマウスの順で取り込み値が低下していた。野生型マウスの腎皮質単離尿細管懸濁液の PGE₂ の取り込みの速度論的解析の結果を **Figure 4d** に示すが、飽和型の取り込みであり、Km 値が 91.6 ± 48.0 nM と算出された。これは、マウス *OAT-PG* の [³H]PGE₂ 取り込みの Km 値 118.3 ± 3.0 nM と近い値⁴⁾ となり、*OAT-PG* が腎皮質において PGE₂ の取り込みを担う主要なトランスポーターであることが実証された。

3. 2. 3 「経上皮代謝」における *OAT-PG* の寄与

OAT-PG は、PGE₂ の代謝酵素である 15-PGDH と分子共役することはすでに示したが、それによって効率の良い

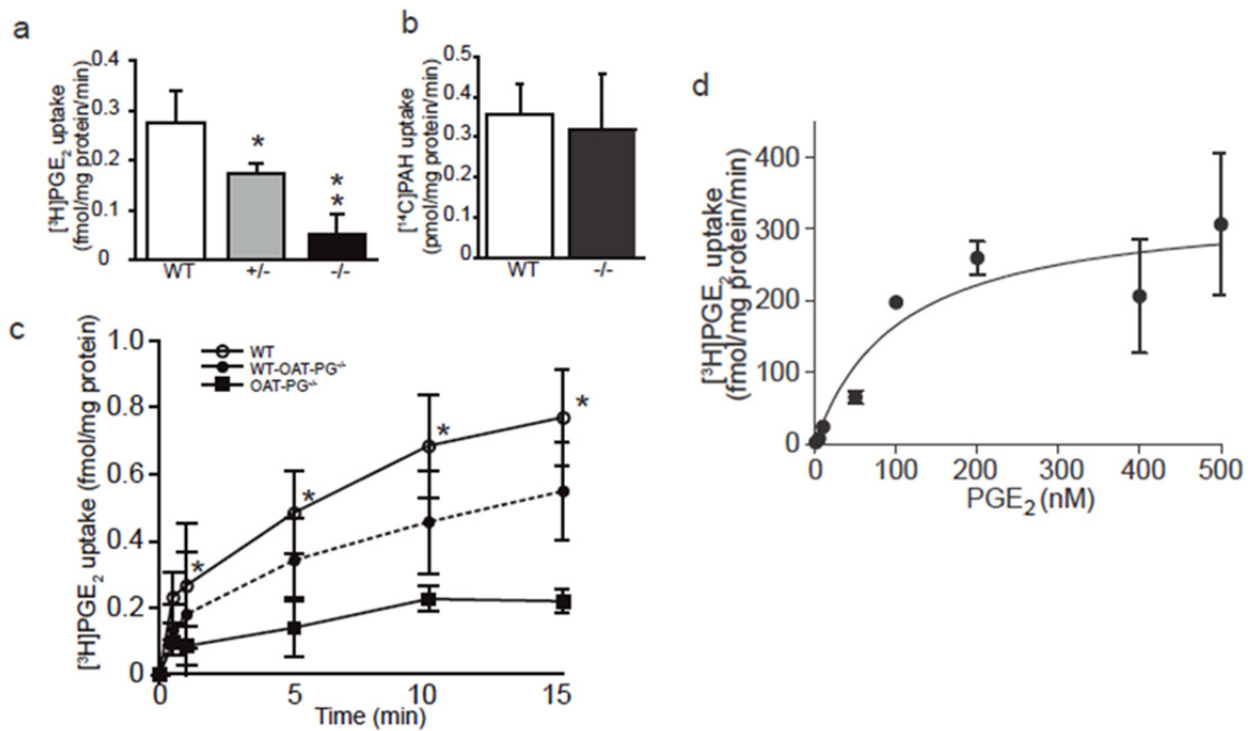


Figure 4. PGE₂ transport by renal cortex tubular suspensions prepared from wild type and OAT-PG^{-/-} mice. **a**, [³H]PGE₂ uptake by tubular suspensions from wild type, OAT-PG^{+/-} and OAT-PG^{-/-} mice. **b**, [¹⁴C]PAH uptake by tubular suspensions from wild type and OAT-PG^{-/-} mice. **c**, Time-dependent uptake of [³H]PGE₂ by tubular suspensions. **d**, concentration dependence of [³H]PGE₂ uptake by tubular suspension from wild type mice.

細胞外 PGE₂ のクリアランスと代謝が実現すると考えられる。これによって、近位尿細管細胞は、側基底側の PGE₂ を取り込んで代謝して、頂上膜側(管腔側)へ放出することになる。この「経上皮代謝」を実験的に示し、それへの OAT-PG の寄与を明らかにするために、トランスウェルを用いた近位尿細管細胞の初代培養を行った。常法に従い、トランスウェル上で近位尿細管細胞の初代培養を行い、側基底側に PGE₂ を添加し、頂上膜の緩衝液中に現れる PGE₂ 代謝物を測定した。

Figure 5a に示すように、野生側マウス近位尿細管細胞の初代培養では、トランスウェルの上皮側基底側チャンバーに PGE₂ を添加した際には、頂上膜側チャンバーに PGE₂ の代謝物が時間依存的に増加したが、ホモノックアウトマウスでは、PGE₂ 代謝物の分泌が有意に低値を示した。また、頂上膜側チャンバーに PGE₂ を添加した際には、側基底側チャンバーに PGE₂ 代謝物は出現しなかった (**Figure 5b**)。これにより、近位尿細管細胞は、PGE₂ の一方方向性の「経上皮代謝」を担うことが実証された。

3. 2. 4 腎皮質および尿中の PGE₂ および代謝物量への OAT-PG の寄与

負荷をかけない状態では、OAT-PG ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、腎皮質 PGE₂ レベル、代謝物量、および尿中 PGE₂ 量、尿中代謝物量には、変化はなかった (**Figures 6, 7**)。これに対して、フロセミド負荷を行ったところ、野生型で腎皮質の PGE₂ の上昇、代謝物量の上昇、および尿中 PGE₂ 量の上昇、尿中代謝物量の上昇が観察されたが、OAT-PG ノックアウトマウスでは、野生型に比して腎皮質で PGE₂ がさらに蓄積し、PGE₂ 代謝物は対照レベルまで減少した (**Figures 6, 7**)。また、尿中 PGE₂ 量は野生型に比してさらに上昇し、PGE₂ 代謝物は対照レベルまで減少した (**Figures 6, 7**)。この結果は、OAT-PG が、腎皮質局所の PGE₂ クリアランスを担うトランスポーターであること、そして OAT-PG は近位尿細管の側基底側から PGE₂ を取り込み、PGE₂ は尿細管上皮細胞内で代謝されて代謝物が管腔側から尿中に排泄されることを指示するものである。

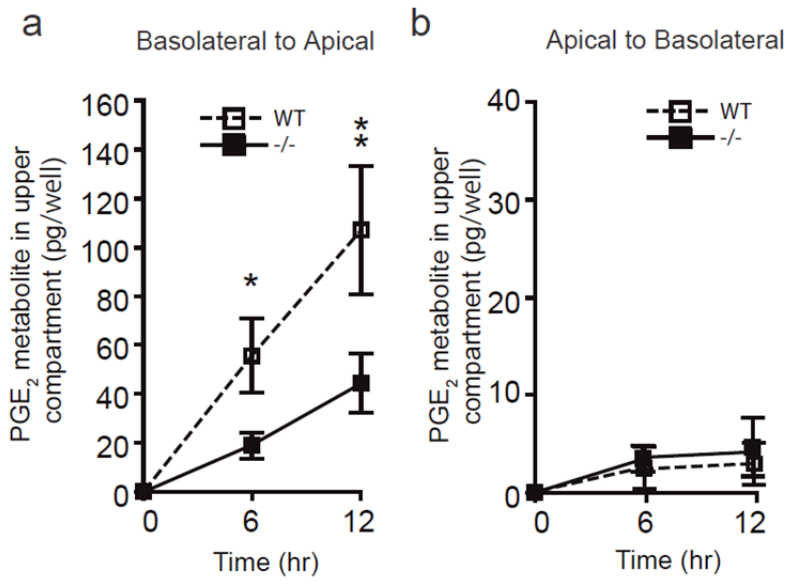


Figure 5. “Trans-epithelial metabolism” of PGE₂ by trans-well monolayer culture of mouse proximal tubule cells. **a**, PGE₂ was added to lower chamber (basolateral side), whereas PGE₂ metabolites was measured in the media of upper chamber (apical side). **b**, PGE₂ was added to upper chamber (apical side), whereas PGE₂ metabolites was measured in the media of lower chamber (basolateral side).

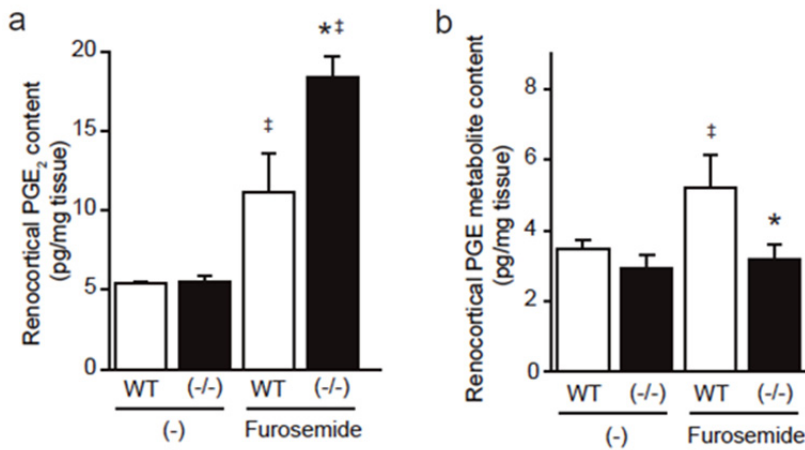


Figure 6. Measurement of PGE₂ (**a**) and its metabolite (**b**) in renal cortex. Furosemide (40 mg/kg body weight) was administered (IP) and compared with non-treated control.

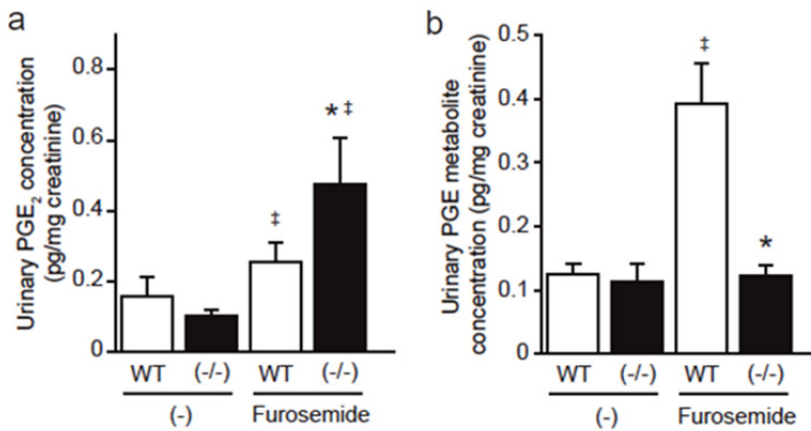


Figure 7. Measurement of PGE₂ (**a**) and its metabolite (**b**) in urine. Furosemide (40 mg/kg body weight) was administered (IP) and compared with non-treated control.

3. 2. 5 レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系への OAT-PG の寄与

腎皮質において、PGE₂ はレニン分泌を制御する。非刺激時には、OAT-PG ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、血漿レニン活性及びアンジオテンシン II 値に変化はなかった (Table 2)。

そこで、フロセミド負荷時に測定したところ、OAT-PG ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して、血漿レニン活性及びアンジオテンシン II 値ともに上昇した。

3. 2. 6 OAT-PG の血圧調節への寄与

通常環境飼育下では、OAT-PG ノックアウトマウスと野生型マウスの間に、Tail Cuff 法で測定した血圧に差異がなかったため、高塩食 (8% NaCl)、低塩食 (0.03% NaCl) で飼育し、通常食 (0.3% NaCl) と比較した。

食塩負荷前に 100~110 mmHg 程度に維持されていた

収縮期血圧が、低塩分食から高塩分食に切り替えた群では、高塩食によりノックアウトマウスでは 85~95 mmHg まで低下した。しかし、大数サンプル処理による数値平均をとることで、有意差消失した (Figure 8)。

Tail Cuff 法測定時のストレス等が血圧変化の検出を妨げている可能性を考慮し、テレメリー法によって、通常食、低塩食、高塩食飼育時の血圧測定を実施したが、ノックアウトマウスと野生型マウスの間に、有意な差異は検出されなかった。

4. 考 察

本研究では、研究代表者らが腎特発的に発現するプロスタグランジントランスポートターとして見いだした OAT-PG が、プロスタグランジン代謝酵素である 15-PGDH と分子共役することが示された。これにより、OAT-PG/15-PGDH 複

Table 2. Plasma renin activity (PRA) and angiotensin II concentration after furosemide administration

	WT	<i>Oat-pg</i> ^{-/-}
PRA (ng/mL/hr)	24.3 ± 4.2 [‡]	36.6 ± 6.8 ^{*‡}
Angiotensin II (pg/mL)	850 ± 275 [‡]	1700 ± 152 ^{*‡}

*p<0.05 vs. WT mice with same treatment, [‡]p<0.05 vs. same genotype at basal condition.

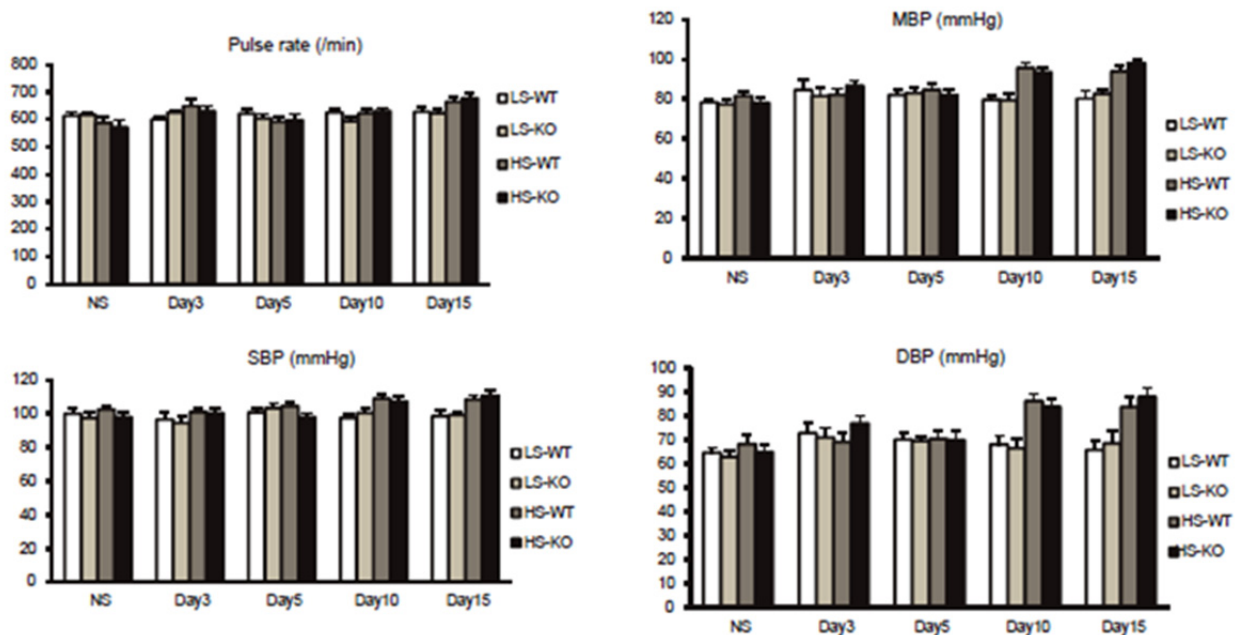


Figure 8. Blood pressure of wild type (WT) and OAT-PG knockout (KO) mice fed with low-salt (LS) or high-salt (HS) diet. Pulse rate, systolic blood pressure (SBP), mean blood pressure (MBP) and diastolic blood pressure (DBP) are shown.

合体が存在する近位尿細管基底膜から取り込まれた PGE₂ が効率良く代謝されると想定される。近位尿細管細胞の初代培養をトランスウェル上で行って「経上皮代謝」を *in vitro* で再現した実験では、近位尿細管細胞は PGE₂ の一方向性の「経上皮代謝」を担うことが実証され、この過程を OAT-PG が担うことが示された (Figure 5)。これは、PGE₂ は側基底側から OAT-PG によって尿細管上皮細胞内に取り込まれて、側基底側の OAT-PG と細胞内の 15-PGDH の連携により PGE₂ が代謝され、しかもその代謝物が頂上膜側から排出されることによる。すでに OAT-PG の詳細な基質認識の解析は行ったが、その際に、OAT-PG は 15-keto PGE₂ や 13,14-dihydro-PGE₂、13,14-dihydro-15-keto PGE₂ 等の PGE₂ 代謝物は輸送しないことを明らかにした⁴⁾。OAT-PG が PGE₂ 代謝物は輸送しないことは、腎皮質で OAT-PG によって取り込まれた PGE₂ が細胞内に結合する 15-PGDH により迅速に代謝され代謝物となると、OAT-PG を介した逆流がおこらず、OAT-PG/15-PGDH 複合体が代謝物を尿中に一方向性に輸送するために都合の良い性質である。

すでに述べたように、PGE₂ は腎皮質でレニン分泌と尿細管-糸球体フィードバックを媒介する重要なメディエーターである。本研究は、細胞外で安定な物質である PGE₂ を除去し、シグナルを消去する機構としての OAT-PG の機能的意義を OAT-PG ノックアウトマウスを用いて実証した。非刺激では、OAT-PG ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、腎皮質 PGE₂ レベル、代謝物量、および尿中 PGE₂ 量、尿中代謝物量には変化はなく、血漿レニン活性及びアンギオテンシン II 値に変化はないことから、平常状態では、腎皮質の PGE₂ は、OAT-PG に依存しなくとも拡散等によって十分に除去されていると想定される。本研究では、フロセミド負荷によって、OAT-PG ノックアウトマウスは野生型マウスと比べて、腎皮質と尿中 PGE₂ 量が上昇し、腎皮質と尿中の代謝物量が低下することを示したが、このようなマクラデンサでの PGE₂ の産生が上昇する状況下では、腎皮質局所での PGE₂ クリアランスにとって OAT-PG が必須の因子となる。以上の結果から、OAT-PG は、特に腎皮質で PGE₂ が上昇する状態において、腎皮質における PGE₂ 局所クリアランスを担い、レニン-アンギオテンシン-アルドステロン系の制御に関わることが示唆された。

5. 今後の課題

OAT-PG と血圧について、塩分負荷、塩分制限による詳細な検討を行ったが、個々のマウスでは、塩分負荷により、OAT-PG ノックアウトで血圧低下が生じる個体があるものの、大数群で数値平均をとると有意差消失し、血圧への影響を捉える適切な条件がまだ掴めていないと考えている。さらなる長期的な低食塩・高食塩負荷による血圧への影響解析は今後の課題としたい。本研究の過程で一つ大きな血圧変化として観察されたのは、ACE 阻害薬リシノプリル投与の降圧作用に対して、OAT-PG ノックアウトマウスは、抵抗性を示すという興味深い結果が得られたことである(データ未提示)。アンジオテンシン II がシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) に抑制的に働いているため、ACE 阻害薬投与はマクラデンサでの COX-2 発現を活性化し、PGE₂ 合成を増加させる。OAT-PG ノックアウトマウスでは、腎皮質局所の PGE₂ がさらに増加するはずであり、これがレニン-アンギオテンシン-アルドステロン系を賦活し、ACE 阻害薬の効果に拮抗するためなのか、今後の新たな研究において解析されるべき新たな研究課題である。

文献等

- 1) Hao CM, Breyer MD: Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol.* 70: 357-377, 2008
- 2) Nakanishi T, Shiigai T, Endou H: Localization and properties of NAD-dependent 15 hydroxyprostaglandin dehydrogenase activity in spontaneously hypertensive rat kidney. *Clin Exp Hypertens.* 8: 91-112, 1986
- 3) Yao B, Xu J, Harris RC, Zhang MZ: Renal localization and regulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F433-F439, 2008.
- 4) Shiraya K, Hirata T, Hatano R, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Jutabha P, Matsubara M, Muto S, Tanaka H, Asano S, Anzai N, Endou H, Yamada A, Sakurai H, Kanai Y: A novel transporter of SLC22 family specifically transports prostaglandins and co-localizes with 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in renal proximal tubules. *J Biol Chem* 285: 22141-22151, 2010.

Phenotype of Knockout of Kidney-Specific Prostaglandin Transporter OAT-PG and Salt-Responsive Blood Pressure Changes

Yoshikatsu Kanai, Shushi Nagamori, Ryuichi Ohgaki, Saya Nakagomi,
Pattama Wiriyasermkul, Takashi Nishiyama

Division of Bio-system Pharmacology, Department of Pharmacology,
Osaka University Graduate School of Medicine

Summary

In renal cortex, prostaglandin E₂ (PGE₂) is released from macula densa of distal convoluted tubules and regulates constriction and dilation of afferent and efferent arterioles as well as renin release from juxtaglomerular apparatus. After transmitting signals, PGE₂ needs to be removed to terminate the signals, which is essential to ensure the rapid regulation by means of PGE₂ signaling. The PGE₂ transporter in proximal tubules is supposed to be responsible for the PGE₂ clearance in renal cortex because PGE₂ metabolizing enzyme 15-PGDH is present in the proximal tubule cells. We identified a kidney-specific prostaglandin transporter OAT-PG (prostaglandin-specific organic anion transporter) which is expressed in the proximal tubules and transports PGE₂. In this study, we analyzed the phenotypes of OAT-PG knockout mice.

In this study, by means of cell fractionation and coimmunoprecipitation assays, we revealed that OAT-PG is physically coupled with 15-PGDH. This is beneficial to ensure efficient clearance of PGE₂ by coupling transport and metabolism. OAT-PG homo knockout (KO) mice exhibited reduced PGE₂ uptake by tubular suspension prepared from the renal cortex. We, thus, concluded that OAT-PG is the major PGE₂ transporter of renal proximal tubules. Furthermore, OAT-PG KO mice showed the reduced trans-epithelial metabolism of PGE₂. When PGE₂ was applied to the basolateral side of trans-well culture of the proximal tubule epithelial cells, less PGE₂ metabolites excreted from the apical side in the OAT-PG KO mice, indicating the importance of OAT-PG in the trans-epithelial metabolism of PGE₂. In the renal cortex of OAT-PG KO mice, PGE₂ accumulated more on furosemide treatment compared with wild type mice. PGE₂ metabolites were less in the renal cortex and urine of OAT-PG KO mice, consistent with the roles of OAT-PG in the PGE₂ clearance. The plasma rennin activity and angiotensin II levels were elevated in OAT-PG KO mice compared with wild type mice.

Blood pressure of OAT-PG KO mice was measured by Tail Cuff method and telemetry. However, significant changes in blood pressure responding to high-salt or low-salt diets have not been concluded at the moment. In contrast, we have obtained interesting results indicating the resistance of OAT-PG KO mice to ACE inhibitors, which should be examined in future studies.