

助成番号 0635

腎マクラーデンサ細胞による体液量調節機構

河原 克雅¹, 安岡 有紀子¹, 川田 英明²¹北里大学医学部生理学, ²北里大学大学院医療系研究科

概要 ヒトを含む哺乳類の腎臓は、細胞外液量(ECF)・浸透圧・pHならびに電解質組成を保持している唯一の器官である。過剰な食塩摂取の他、上皮型Na⁺チャネル(ENaC)の発現異常(Liddle症候群)やRenin-Angiotensin-Aldosterone系などの調節系の異常は、ECF量の増加を招き、高血圧・動脈硬化・腎硬化・心肥大等の心・腎・血管系の障害を引き起こす。ECF量を適切に保つため、糸球体濾過量(GFR)を精妙に腎内制御する尿細管糸球体フィードバック(TGF)機構の働きは、重要である。哺乳類腎臓には3種類のNOSが発現している:神経型(nNOS)、誘導型(iNOS)、内皮型(eNOS)。nNOSは、神経・心筋においてconstitutiveに発現することが知られているが、MD細胞、IMCD(髄質内層集合管)細胞における発現は誘導的inducibleである。我々は、培養NE-MD細胞を使って、溶液の[Cl⁻]変化に応答し発現するnNOS蛋白とその活性調節機構を明らかにする事を目的とする。本研究は、塩分過剰摂取による心・腎・血管系の障害を未然に防ぐ対策を講じる上で、医学的に非常に重要である。

研究結果 nNOS 蛋白発現・活性調節:pH 依存性

NE-MD細胞株にフロセミド(12 μM)を投与し、誘導されたnNOS蛋白をWestern blottingで測った。L-arginine(Arg)誘導-NO産生量は、NO電極法(WPI製)で測った。nNOS蛋白発現量とNO産生量は、フロセミドにincubationしている時間依存性で、L-Argの濃度依存性であった(Fig. 1)。L-Arg誘導-NO産生量は、7-NI(nNOSの特異的阻害薬)ではほぼ完全に抑制された(Fig. 2)。さらに、L-Arg誘導NO産生量は、pH = 7.1(incubation溶液)で有意に低下した(Fig. 3)。フロセミド誘導nNOS蛋白発現量は、EIPA(NHE阻害薬)存在下で有意に低下した。L-Arg誘導NO産生量も、同様に低下した(未発表)。さらに、低(1/10)Cl⁻溶液で2時間培養したNE-MD細胞のnNOS蛋白発現量・NO産生量は有意に増加した。一方、低(1/10)Na⁺溶液で培養したNE-MD細胞の場合、nNOS蛋白発現量は有意に増加したが、NO産生はほとんど増加しなかった(Fig. 4)。

1. 背景・研究目的

ヒトを含む哺乳類の腎臓は、細胞外液量(ECF)・浸透圧・pHならびに電解質組成を保持している唯一の器官である。過剰な食塩摂取の他、上皮型Na⁺チャネル(ENaC)の発現異常(Liddle症候群)やRenin-Angiotensin-Aldosterone系などの調節系の異常は、ECF量の増加を招き、高血圧・動脈硬化・腎硬化・心肥大等の心・腎・血管系の障害を引き起こす。ECF量を適切に保つため、糸球体濾過量(GFR)を精妙に腎内制御する尿細管糸球体フィードバック(TGF)機構の働きは、重要である^{1,2)}。TGF機構の中心的役割を果たす腎macula densa(MD)細胞において、膜輸送体相互関係や細胞内・外シグナル伝達機構に関して未解明の点が多く残されている。MD細胞は、糸球体濾液(遠位部尿細管-管腔内液)の塩濃度([NaCl])変化を感知し、同一ネフロン内のメサンギウム細胞

を含む傍糸球体装置(JGA)にシグナルを送り、GFR量調節を行う^{1,2)}。その調節の第1ステップは、MD細胞の管腔側に位置するNa-K-2Cl共輸送体(NKCC2)によるNaCl流入量の増減の感知と考えられる。例えば、NaCl流入量の減少を感知すると、JGAに化学シグナル(アデノシン、ATPなど)が放出されると共に、神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS:neuronal nitric oxide synthase)³⁾やシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2:cyclooxygenase-2)⁴⁾の発現量の増加が起こる。しかし、NKCC2を介したこれら分子群の活性化に関わるシグナル伝達経路についての分子機構解明は、一行に進んでいない。その大きな理由の一つとして、遺伝子工学的に純粋に単離されたMD細胞株(NE-MD)が存在しなかったからである⁵⁾。2005年以前にMD細胞株として報告されたものは、特定のlectinで標識された腎細胞をセルソーターで回収して得られた

MMDD1細胞があった⁶⁾。しかし、ネフロンその他セグメント細胞の混入および増殖を示唆する所見があり⁷⁾、この細胞を用いて生理学的、生化学的、分子生物学的解析を行うことには疑問が残る

哺乳類腎臓には3種類のNOSが発現している:神経型(nNOS)、誘導型(iNOS)、内皮型(eNOS)。nNOSは、神経・心筋においてconstitutiveに発現することが知られているが、MD細胞^{3,5)}、IMCD(髄質内層集合管)細胞における発現は誘導的inducibleである。我々は、培養NE-MD細胞を使って、溶液の[Cl⁻]変化に応答し発現するnNOS蛋白とその活性調節機構を明らかにする事を目的とする。本研究は、塩分過剰摂取による心・腎・血管系の障害を未然に防ぐ対策を講じる上で、医学的に非常に重要である。

2. 研究計画・方法

(1)NE-MD 細胞における nNOS 蛋白の発現機構:

NE-MD細胞の培養液にフロセミド(12 μM)を投与し、0, 2, 5時間後のnNOS蛋白発現量および活性をWestern blottingとNO産生量で解析する。フロセミド刺激に代えて、細胞外液のNa⁺濃度を1/10に(1/10 Na⁺群)、Cl⁻濃度を1/10に(1/10 Cl⁻群)した時の、発現誘導解析を行い、フロセミド刺激と比較する。さらに、細胞外液のpH酸性化や0 Ca²⁺濃度が、nNOS蛋白の発現や活性にどう影響するかを調べる。

(2)NO 感受性電極による NO 産生機構の解析:

フロセミドや低NaCl溶液でnNOS蛋白を誘導させたNE-MD細胞に、基質(L-arginine)を投与し、産生されたNO量をNO電極装置(WPI製, USA)で測定する。nNOS活性に細胞内Ca²⁺, pHが影響するメカニズムを明らかにする。

(3)細胞内 pH, Ca²⁺の測定:

NO産生時の細胞内pH, Ca²⁺の役割を調べるために、蛍光分光計(Argus HiSca, 浜松ホトニクス)や共焦点レーザー顕微鏡(LSM510, Zeiss)によって細胞内pH, Ca²⁺の時間的・空間的变化を測定する。

3. 研究結果

nNOS 蛋白発現・活性調節:pH 依存性

NE-MD細胞株にフロセミド(12 μM)を投与し、誘導されたnNOS蛋白をWestern blottingで測った。L-arginine(Arg)誘導-NO産生量は、NO電極法(WPI製)で測った。

nNOS蛋白発現量とNO産生量は、フロセミドにincubationしている時間依存性で、L-Argの濃度依存性であった(Fig. 1)。L- Arg誘導-NO産生量は、7-NI(nNOSの特異的阻害薬)でほぼ完全に抑制された(Fig. 2)。さらに、L- Arg誘導NO産生量は、pH = 7.1(incubation溶液)で有意に低下した(Fig. 3)。フロセミド誘導nNOS蛋白発現量は、EIPA(NHE阻害薬)存在下で有意に低下した。L-Arg誘導NO産生量も、同様に低下した(未発表)。さらに、低(1/10)Cl⁻溶液で2時間培養したNE-MD細胞のnNOS蛋白発現量・NO産生量は有意に増加した。一方、低(1/10)Na⁺溶液で培養したNE-MD細胞の場合、nNOS蛋白発現量は有意に増加したが、NO産生はほとんど増加しなかった(Fig. 4)。

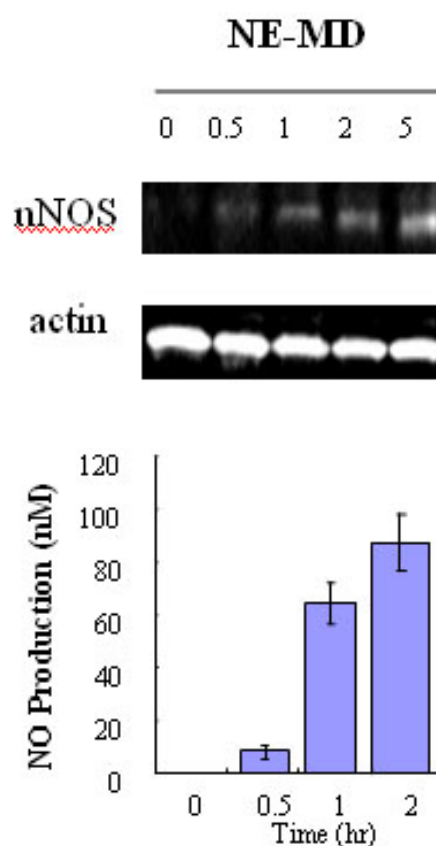


Figure 1. nNOS Expression and Nitric Oxide Production. Expression of nNOS protein increased time-dependently in NE-MD cells. Numbers indicate time (hours) after application of 12 μM furosemide to the bathing solution (upper panel). Time-dependent increase of NO production was obtained from NE-MD cells incubated with the same experimental conditions. (lower panel).

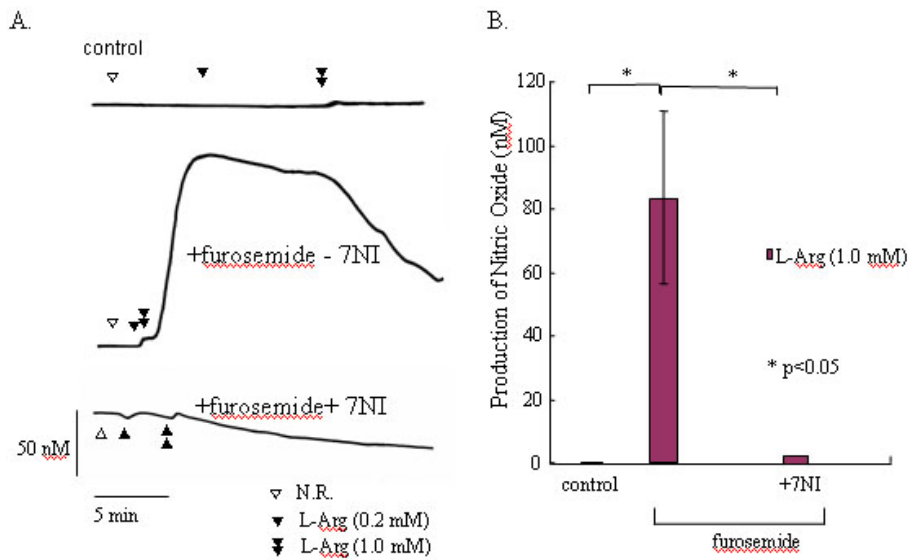


Figure 2. Effect of 7-nitroindazole (7-NI) on NO Production. A. Time-course of NO production with or without incubation of furosemide. Note that L-Arg-induced NO was completely inhibited in the presence of 7-NI. B. A summary of Fig. 2A.

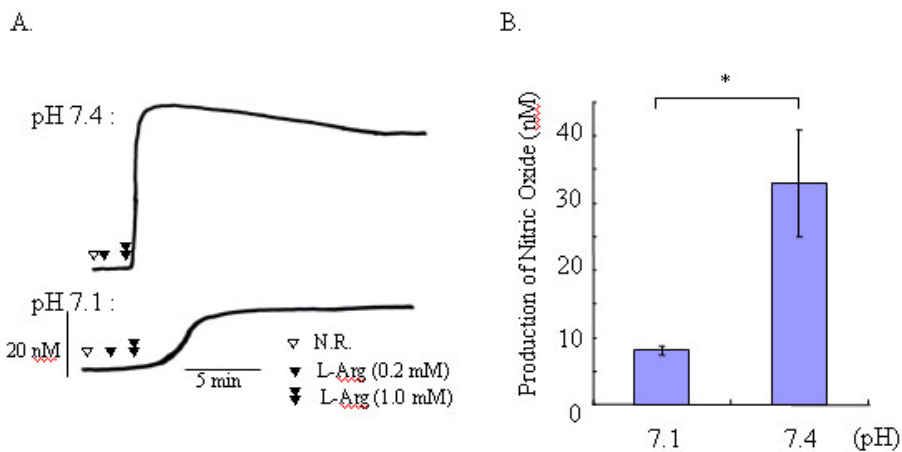


Figure 3. Effect of Acidification on NO Production. A. Time course of NO production in control (pH 7.4) and in acidification (pH 7.1). B. A summary of Fig. 3A.

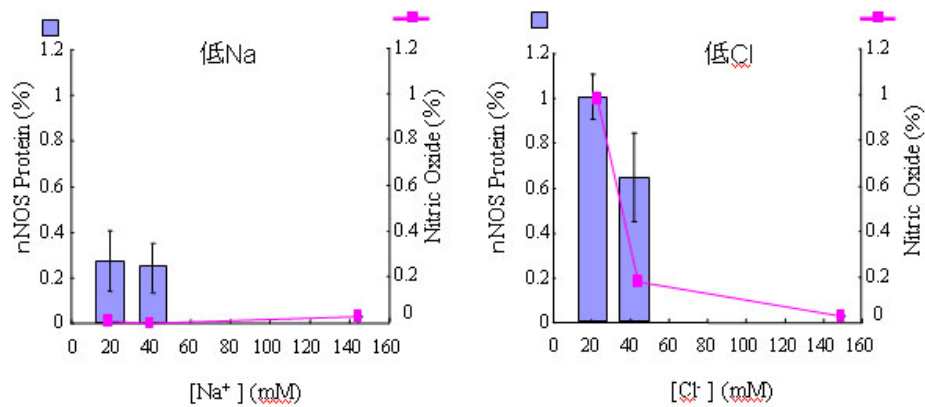


Figure 4. Effects of Low [NaCl] on nNOS Protein and NO Productions. Although nNOS protein and NO productions increased in Low Cl solution (right panel), NO production has been completely inhibited in Low Na solution (left panel).

4. 考 察

NE-MD細胞株におけるnNOS蛋白発現・活性は、細胞内へのNaCl流入量低下で誘導され、酸性pH感受性であった。管腔内液の低 [NaCl]は、MD細胞においてnNOS蛋白発現を誘導するが、細胞内pH_iも同時に低下し、NO産生量(増加量)は抑制させる。この実験結果は、個体レベルでの代謝性アシドーシスは、nNOS蛋白発現を抑制すると共に、NO産生抑制も起こす事を示唆する。従来報告されている、細胞外液 [NaCl]増加によるNO産生量増加は²⁾、細胞内pHのアルカリ化(酸性状態から標準状態へ)によるnNOS蛋白の活性化によると考えられる。

5. 今後の展望

NE-MD細胞⁵⁾は、膜輸送体、酵素、イオン輸送調節機構などにおいて、既報のマクラデンサ(MD)細胞特性を有し^{1,2)}、MD細胞研究に必要な細胞株であることが明らかになった。NE-MD細胞の機能研究は、Na⁺輸送、体液量調節における遠位部尿細管のシグナル伝達系の解明に貢献すると考えられる。一方、MD細胞に発現するnNOS蛋白分子(65 kD)の大きさは、脳や心筋タイプ(140-160 kD)にくらべ半分以下であった。しかし、nNOS蛋白機能活性は、フルサイズのnNOS蛋白同様、Ca²⁺、pH依存性であった。PCR法と質量分析器を組み合わせるMD細胞nNOS蛋白分子の全長構造を解明し(欠失ドメインを明らかにし)、新規蛋白として同定するとともに、MD細胞nNOS蛋白の特殊性を明らかにしたい。

文 献

1. Schnermann J, Levine DZ. Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide. *Annu Rev Physiol.* 2003; 65: 501-29
2. Komlosi P, Fintha A, Bell PD. Current mechanisms of macula densa cell signalling. *Acta Physiol Scand.* 2004 Aug; 181(4): 463-9.
3. Kovacs G, Komlosi P, Fuson A, Peti-Peterdi J, Rosivall L, Bell PD. Neuronal nitric oxide synthase: its role and regulation in macula densa cells. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Oct; 14(10): 2475-83.
4. Krämer BK, Kammerl MC, Kömhoff M. Renal cyclooxygenase-2 (COX-2): Physiological, pathophysiological, and clinical implications. *Kidney Blood Press Res.* 2004; 27(1): 43-62

5. Yasuoka Y, Kawada H, Suzuki Y, Sato M, Endou H, Obinata M, Kawahara K. Establishment of a mouse macula densa cell line with an nNOS promoter driving EGFP expression. *Jpn J Physiol.* 2005 Dec; 55(6): 365-72.
6. Yang T, Park JM, Arend L, Huang Y, Topaloglu R, Pasumarthy A, Praetorius H, Spring K, Briggs JP, Schnermann J. Low chloride stimulation of prostaglandin E2 release and cyclooxygenase-2 expression in a mouse macula densa cell line. *J Biol Chem.* 2000 Dec 1; 275(48): 37922-9.
7. He H, Podymow T, Zimpelmann J, Burns KD. NO inhibits Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport via a cytochrome P-450-dependent pathway in renal epithelial cells (MMDD1). *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Jun; 284(6): F1235-44

Publication

1. Akiba L, Hidekazu F, Yasuoka Y, Kawahara K. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in cultured mouse macula densa cells. *Kitasato Med J* 37: 16-21, 2007

Presentations

1. Kawada H, Yasuoka Y, Fukuda H, Akiba L, Kawahara K. Metabolic acidosis may modulate the tubuloglomerular feedback system by decreasing the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) activity of the macula densa. *J Am Soc Nephrol* 17 (Suppl): 474A, 2006
2. Yasuoka Y, Kawada H, Kawahara K. Expression of mineralocorticoid receptor (MR), glucocorticoid receptor (GR), and Na⁺-K⁺ ATPase subunits in mouse macula densa cell line (NE-MD). *J Physiol Sci* 57(Suppl): S131, 2007
3. Kawada H, Yasuoka Y, Fukuda H, Akiba L, Kawahara K. Expression and activity of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in mouse macula densa cells: Effect of metabolic acidosis. *J Physiol Sci* 57(Suppl): S130, 2007
4. Akiba L, Fukuda H, Yasuoka Y, Kawahara K. Regulatory mechanisms of cyclooxygenase-2 gene expression in cultured mouse macula densa cells. *J Physiol Sci* 57(Suppl): S218, 2007

No. 0635

Regulation of Body Fluid Volume by Kidney Macula Densa: Effect of Metabolic Acidosis on the Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS)

Katsumasa Kawahara, Yukiko Yasuoka, Hideaki Kawada

Department of Physiology, Kitasato University School of Medicine

Summary

Nitric oxide (NO) generated by neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in the macula densa blunts the tubuloglomerular feedback system. Experiments were performed in an established macula densa cell line with an nNOS-promoter-driven-EGFP (NE-MD) (Jpn J Physiol, 2005) to investigate whether metabolic acidosis may regulate the nNOS protein expression and/or activity. The previous study in our laboratory has demonstrated that the nNOS protein expression in NE-MD cells is time-dependently increased in the presence of 12 μ M furosemide, an inhibitor of the Na^+ - K^+ -2 Cl^- cotransporter. In the present study, NE-MD cells were incubated with furosemide for 2-5 hours with or without acidification. The nNOS protein expression was analysed by Western blotting. L-arginine (Arg)-induced NO generation was measured by using an NO-sensitive electrode (WPI, USA). Intracellular pH (pH_i) of NE-MD cells was monitored by the BCECF assay (unpublished). We found that L-Arg-induced NO generation and the nNOS protein expression was significantly lower at pH 7.1, compared with pH 7.4 (control). Further, L-Arg-induced NO generation was significantly higher when NE-MD cells were incubated with low (1/10) Cl^- solution, but not with low (1/10) Na^+ solution. These results indicate that the furosemide-induced nNOS protein expression and NO generation are significantly decreased in an acidic condition. In conclusion, low [NaCl] or acidic urine may modulate the tubuloglomerular feedback mechanism by decreasing NO generation in the macula densa probably due to low pH_i .