

# 腎尿細管におけるナトリウム感知と糸球体濾過量のフィードバック調節機構の 分子メカニズムの解明

波多野 亮, 三木 隆司

千葉大学大学院医学研究院代謝生理学

## 概要

腎臓は糸球体濾過を受けて生成された原尿から  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ などの電解質を再吸収し、全身の体液量調節や血圧調節を担っている。血液から濾過された糖やアミノ酸などは近位尿細管でほぼ全て再吸収され全身へと再供給される。一方で、 $\text{Na}^+$ のような電解質は近位尿細管において糖やアミノ酸の再吸収と同時に近位尿細管で 60%程度再吸収されるが、残りはヘンレ上行脚以降のセグメントで水の再吸収や血圧調節などを目的とした再吸収調節を受ける。

ヘンレ上行脚の糸球体隣接部位にはマクラデンサ細胞という特殊な細胞が存在し、アデノシンやプロスタグランジン (PG) といった情報伝達物質を分泌することで輸入細動脈の収縮を促し糸球体濾過量を制御する”尿細管-糸球体フィードバック (TGF: tubulo-glomerular feedback)”という機構が存在する。マクラデンサ細胞は  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  共輸送体 2 (NKCC2) を管腔側に発現しており、この NKCC2 の阻害剤であるフロセミドは  $\text{PGE}_2$  の産生を促して TGF を活性化させることが知られており、 $\text{Na}^+$  や  $\text{Cl}^-$  の再吸収がその鍵となる。マクラデンサ細胞で産生された  $\text{PGE}_2$  は輸入細動脈に発現する受容体に結合して輸入細動脈を収縮させることで糸球体濾過量を抑制する。一方、PG は有機アニオン化合物であり細胞膜の透過にはトランスポーターが必要であると考えられているが、このマクラデンサ細胞における  $\text{PGE}_2$  の分泌機構については明らかになっていない。申請者らは本研究において新たにマクラデンサ細胞から  $\text{PGE}_2$  を分泌するトランスポーターとして ABC トランスポーターである MRP4 を見出した。腎臓において MRP4 は主に近位尿細管に発現しているが、マクラデンサ細胞の血管側に局在していることが明らかになった。MRP4 欠損マウスでは低塩分刺激やフロセミド刺激による COX-2 発現誘導や  $\text{PGE}_2$  産生が低下していることが判明した。尿中の  $\text{Na}^+$  排泄量などに野生型マウスとの間で違いは見られなかったが、糸球体濾過量の調節に異常が見られた。一方で、MRP4 は細胞内から細胞外へと  $\text{PGE}_2$  を輸送するだけでなく、環状ヌクレオチドである cAMP の輸送にも関わっており、細胞内の cAMP 濃度上昇が原因となって COX-2 発現の低下や糸球体濾過量調節異常が引き起こされた可能性が考えられる。今後、MRP4 のマクラデンサ細胞における  $\text{PGE}_2$  輸送や細胞内 cAMP 濃度調節機能について解析を進めることによって、TGF 機能の新たな調節機構解明に繋がる事が期待される。

## 1. 緒言

ネフロンは部位ごとに異なる機能を有するが、遠位尿細管・集合管では主に  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ などの電解質再吸収と体液量調節のための水の再吸収を担っている。これらの溶質・水再吸収機能は糸球体濾過機能と大きく関連しており、特に遠位尿細管での  $\text{Na}^+$ 再吸収量の変化は糸球体濾過量の調節に重要な役割を担っていることが知られている。

ヘンレ上行脚の糸球体隣接部位にはマクラデンサ細胞という特殊な細胞が存在し、アデノシンやプロスタグランジン (PG) といった情報伝達物質を分泌することで輸入細動脈の収縮や拡張を促す”尿細管-糸球体フィードバック (TGF: tubulo-glomerular feedback)”という機構が存在する<sup>(1,2)</sup>。更に遠位部の尿細管である結合尿細管にもこのようなフィードバック機構、結合尿細管-糸球体フィードバック

(CTGF: connecting tubule-glomerular feedback)の存在が報告されており、TGFによる糸球体濾過機能の変化をリセットする役割を担うものと考えられている。このように高次の生理学的調節機構の存在が知られているが、アデノシンや ATP, PGs の様なシグナル伝達物質がどのような分子機構を通じて分泌されているかについては明らかになっていない。

PG は、局所ホルモンとして傍細胞的に作用し、組織ごとに多様な生理、病態作用を発揮することが知られており、腎臓においては体液調節や血流調節の維持に関わる重要な生理機能を担っている<sup>(1)</sup>。初期段階ではアラキドン酸から PGG<sub>2</sub> 及び PGH<sub>2</sub> へ変換され、その後 COX や各種 PG 合成酵素によって生理活性を持つ PG が合成される<sup>(2)</sup>。その中でも、主要な PG である PGE<sub>2</sub> はアラキドン酸から COX (Cyclooxygenase) や mPGES (microsomal prostaglandin E synthase) のような合成酵素を介して合成される。COX には、恒常型の COX-1 と誘導型の COX-2 が知られるが、腎臓では COX-1 は腎髄質の集合管や間質で発現し、COX-2 は腎皮質の傍糸球体装置 (Juxtaglomerular apparatus: JGA) のマクラデンサ細胞やヘンレ上行脚で発現している。MD 細胞やヘンレ上行脚における COX-2 の発現は、低塩分摂取、ループ利尿薬、脱水などにより発現が増加する事が報告されており<sup>(3-7)</sup>、管腔内の電解質流量の変化と大きく関係している。COX-2 により合成された PGE<sub>2</sub> は、腎皮質では糸球体の輸入細動脈を拡張させることで腎血流量・糸球体濾過量の調節を行い、輸入細動脈平滑筋に存在するレニン顆粒を刺激しレニン分泌を促進している<sup>(6,8)</sup>。PGE<sub>2</sub> は、腎髄質では抗利尿ホルモンに拮抗し、水再吸収の調節を担っている。腎皮質における PGE<sub>2</sub> を介した前述の機能に関しては、JGA の一部であり太いヘンレ上行脚と遠位尿細管の境界部分の糸球体に近接する場所に存在するマクラデンサ細胞による PGE<sub>2</sub> の分泌によって制御されている。腎皮質の遠位尿細管に存在するマクラデンサ細胞は、腎臓の灌流圧の低下、腎血流量の低下に伴う糸球体濾過量の低下による尿細管管腔内の塩濃度の量的変化を感知して、ネフロンにメサンギウム細胞を含む JGA にシグナルを送ることで糸球体濾過量 (GFR) を調節している<sup>(7)</sup>。このように PGE<sub>2</sub> が TGF における情報伝達物質として重要な役割を担っている。マクラデンサ細胞に発現する Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter 2

(NKCC2) を介した細胞内への電解質の再吸収により、遠位尿細管内の NaCl 流入量の減少を感知すると、extracellular-regulated kinase1/2 (ERK1/2) や p38 である MAP キナーゼの活性化が引き起こる。その結果、アラキドン酸の遊離促進が生じ、COX-2 の発現量の増加に伴って PGE<sub>2</sub> 産生が亢進し細胞外へと分泌される。このようにして、マクラデンサ細胞で PGE<sub>2</sub> の産生が行なわれているがマクラデンサ細胞からの PGE<sub>2</sub> の分泌機構については未だ明らかになっていない。

PGE<sub>2</sub> は生体膜脂質由来の物質であるが、PG は生理的な pH では電荷を持った有機アニオンとして存在するためにその膜透過には特異的な担体が関与すると考えられており、PGE<sub>2</sub> を輸送するトランスポーターがマクラデンサ細胞に存在する可能性が想定される。これまでに生体内における PG 輸送体としては、PGT (prostaglandin transporter), OAT (organic anion transporter), MRP (multidrug resistance protein) 4 などが報告されているが、マクラデンサ細胞での機能は解明されていない。これまでにマウスのマクラデンサ細胞株 MMDD1 細胞を用いたマイクロアレイ解析により、マクラデンサ細胞に発現する PG 輸送体の候補分子として MRP (multidrug resistance protein) 4 を見出している。有機アニオン性トランスポーターである MRP4 は、ATP 依存的に膜輸送を媒介する機能を有しており、ABC (ATP-Binding Cassette) タンパク質のファミリーの一つで多剤耐性タンパク質でもある。主に腎近位尿細管の管腔膜側に発現しており薬剤排泄および尿酸排泄に重要な働きを担っていることが知られているが、近位尿細管以外の部位での発現や機能に関する解析は為されていない。

本研究においては、これらの溶質分泌に関わる輸送体分子について実態解明を進めるとともに、Na<sup>+</sup>再吸収機能との機能的な共役機構を明らかにし、Na<sup>+</sup>再吸収による糸球体濾過のフィードバック調節メカニズムの解明を目指す。

## 2. 研究方法

### 2. 1. 実験動物の使用

野生型マウスおよび MRP4 ノックアウトマウスを用いて解析を行った。ループ利尿薬であるフロセミドを 0.94 μL/hr の用量で、Alzet 浸透圧ポンプを用いて皮下持続投

与した。また、マウスの脱水を防ぐために0.45% NaCl含有の水を飲水させた。8 - 12 週齢の雄の野生型及びMRP4<sup>+</sup>マウスを3日間代謝ケージで飼育し、投与3日目の最終日に24時間毎における尿量の測定、尿及び全血の採取を行った。

また、低塩分刺激によるCOX-2発現を誘導する事を目的に塩分負荷後に塩分制限を行った。8 - 12 週齢の雄の野生型及びMRP4<sup>+</sup>マウスを代謝ケージで飼育し、7日間の高塩分負荷の食餌後、1日間低塩分負荷させた。期間中24時間毎における尿量の測定、尿及び全血の採取を行った。高塩分負荷状態、低塩分負荷状態での観察を行う際は、それぞれ8% NaCl、NaCl無添加の食餌に変更した。

## 2.2 マウス腎皮質における定量的 mRNA 発現解析

マクラデンサ細胞におけるCOX-2発現について定量的RT-PCR (qRT-PCR)により実施した。マウスの腎臓を摘出し腎皮質と腎髄質に切り分け、摘出したマウスの腎皮質を、ポルトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いてtotal RNAを回収した。調製したtotal RNA 2 µgをもとにRandom primer (pd6) (タカラバイオ)、Omniscript RT-Kit (QIAGEN)を用いて逆転写反応を行い、生成したcDNAをqRT-PCRの鋳型に用いた。SYBR®Premix Ex Taq (タカラバイオ)を用いて以下のプライマーでABI PRISM 7000 (Applied Biosystems)により解析した。Forward primer (COX-2: 5'-TGGTTACAAAAGCTGGGAA-3') / Reverse primer (COX-2: 5'-ATGGGAGTTGGGCA GTCAT-3')。内在性コントロール遺伝子であるGAPDHにより標準化を行った。

## 2.3 マウスの腎皮質のタンパク質発現解析

摘出したマウスの腎皮質に500 µLのLysis buffer (150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4))を加え、ポルトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。それぞれのホモジネートを4°C, 10,000 × gで5 min遠心分離し、その上清を腎皮質のTotal tissue lysateとした。調製したマウスの腎皮質組織抽出液のタンパク質濃度は、BCA Protein Assay Kitで定量した。調製したタンパク質試料は、5 × Sample buffer (0.25 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% (w/v) SDS, 50% (w/v) Glycerol, 0.02% (w/v) Bromophenol blue)を用いてサンプルの条件を揃え、65°C

で10 min熱処理した。10% SDS-ポリアクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動を行った。PVDFメンブレンにトランスファーした後、5%スキムミルクでブロッキングを行い、4°C, O/Nにて一次抗体と反応させた。翌日、TBS-Tで洗浄し、HRP標識二次抗体で室温1時間の反応後、Immobilon (Merck)で化学発光させ、LAS-plus 3000 (富士フイルム)を用いて検出した。

## 2.4 腎皮質組織中のPGE<sub>2</sub>濃度測定

腎皮質組織中のPGE<sub>2</sub>濃度測定はMonoclonal Enzyme Immunoassay Kit (Cayman)を用いて、Cayman社のマニュアルに従い測定した。マウス腎皮質(100 mg)を1 mM EDTA, 10 µM indomethacinを含む生理食塩水1 mL中でPOLYTRON homogenizerを用いてホモジナイズし、4°C, 10,000 gで10分間遠心した。各試料を抗マウスIgGポリクローナル抗体がコートされている96 wellプレートにアプライ後、4°Cで18時間インキュベーションし、エルマン試薬を用いて90分間反応させ405 ~ 420 nmの吸光度を測定し、腎皮質組織中のPGE<sub>2</sub>濃度を求めた。

## 2.5 血漿および尿における生化学的分析

代謝ケージによる解析の最終日にマウスの全血を採取し、4°C, 3,000 × gで15 min遠心分離した後上清を回収、血漿試料とした。同日にスポット尿の採取を行い、室温, 3,000 × gで15 min遠心分離し、上清を尿試料とした。得られた血漿試料と尿試料に対し、富士DRI-CHEM 4000 (富士フイルム)やSpotchem EL (アークレイ)を用いてNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>について電極法、クレアチニンについて比色法による濃度測定を行った。血漿試料については、後述の血漿レニン活性 (plasma renin activity: PRA) 測定にも用いた。クレアチニンクリアランス (CCr)については次式により算出した。CCr (mL/min) = Ucr (mg/dL) × V (mL) / (Pcr (mg/dL) × T (min)) Ucr : 尿中クレアチニン濃度, Pcr : 血漿中クレアチニン濃度, V : 尿量, T : 尿採取時間を表す。

## 2.6 血圧及び心拍数の測定

マウスの血圧測定は、Softron BP-98A (ソフトロン)を使ってTail cuffを用いた非観血的血圧測定法によって行い、平常時の収縮期血圧 (SBP), 拡張期血圧 (DBP), 心拍数 (HR)を計測した。

### 3. 研究結果

#### 3. 1. 野生型及び MRP4<sup>-/-</sup>マウスの腎皮質における COX-2 の発現解析

低塩分及びフロセミドの刺激時における腎皮質における COX-2 の発現レベルについて MRP4 を欠損した場合の影響を確認するために、COX-2 の qRT-PCR 解析を行った。その結果、COX-2 の発現レベルは、低塩分で刺激を行うと、未刺激時と比べて野生型マウスで 1.6 倍に増加していた。一方で、MRP4<sup>-/-</sup>マウスでは刺激後に有意な増加は見られず、刺激時には野生型マウスと比べて有意な低下が見られた (Fig. 1)。また、フロセミドで刺激を行うと、未刺激時と比べて野生型マウスで COX-2 mRNA 発現は 1.2 倍に増加していたが、MRP4<sup>-/-</sup>マウスでは低塩分刺激時と同様に有意な発現増加は見られず、フロセミドの刺激時において野生型マウスと比べて有意に低い発現レベルを示した (Fig. 1)。

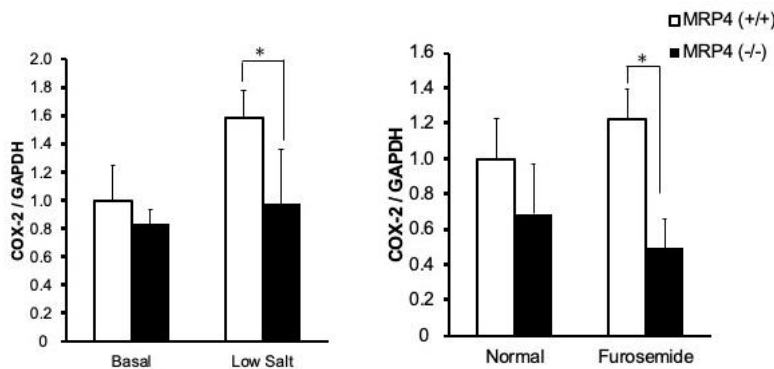


Fig.1 低塩分食条件、フロセミド投与時の qRT-PCR による腎皮質における COX-2 mRNA の発現比較

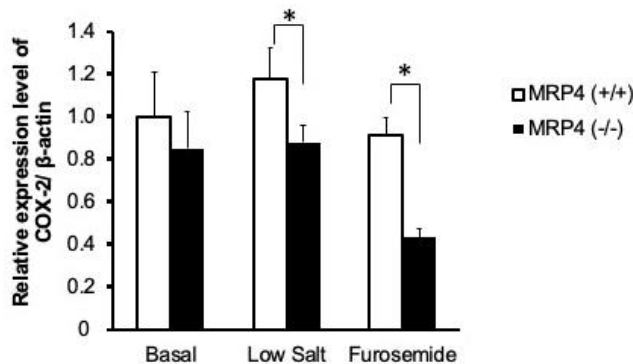


Fig.2 低塩分食条件、フロセミド投与時の腎皮質における COX-2 タンパク質の発現比較

同条件において腎皮質における COX-2 のタンパク質発現レベルについても検討を行ったところ、同様に未刺激時と比べて低塩分刺激により、野生型マウスで 1.2 倍に増加したが、MRP4<sup>-/-</sup>マウス間では有意な上昇は見られず野生型マウスよりも低い値を示した (Fig. 2)。

#### 3. 2. 野生型及び MRP4<sup>-/-</sup>マウスの腎皮質組織中の PGE<sub>2</sub> 濃度測定

低塩分及びフロセミド刺激時における腎局所の PGE<sub>2</sub> 濃度について、MRP4 を欠損した場合の影響を確認するために、EIA で測定を行った。その結果、基礎状態及びフロセミド刺激時において、野生型マウスに比べて MRP4<sup>-/-</sup>マウスで有意に低い値を示した。一方で、低塩分刺激時には野生型マウスと MRP4<sup>-/-</sup>マウス間で有意な差は見られなかった (Fig. 3)。

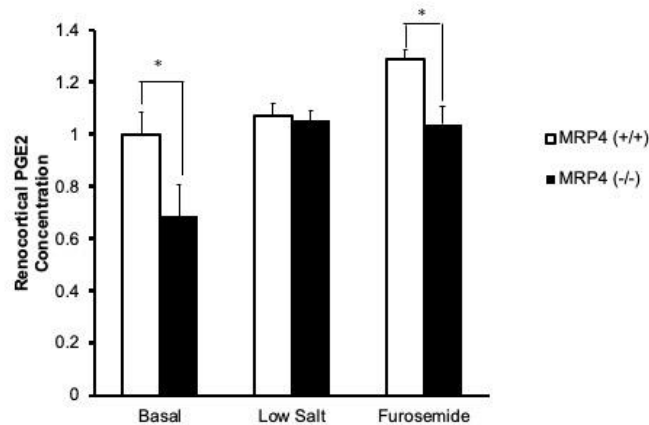


Fig. 3 低塩分食条件、フロセミド投与時の腎皮質における腎皮質組織中 PGE<sub>2</sub> 蓄積量

### 3. 3. 尿及び血液の生化学解析

MRP4 の欠損による体重、尿量への影響を確認するため、野生型及び MRP4<sup>-/-</sup>マウスを代謝ケージに入れ、24 時間毎の体重・尿量・飲水量の値を測定した。野生型及び MRP4<sup>-/-</sup>マウス間で計測開始日からの体重変化・尿量・飲水量、尿量についても野生型マウス、MRP4<sup>-/-</sup>マウス間で有意な差はなかった。代謝ケージによる解析の最終日にマウスの全血及びスポット尿を採取し、野生型マウス及び MRP4<sup>-/-</sup>マウスにおける血漿及び尿中の Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, クレアチニンの濃度に有意な差は見られなかったが、クレアチニンクリアランスについては MRP4<sup>-/-</sup>マウスにおいて減少が見られた (Table 1)。また、尿細管における再吸収能

を評価するため、各電解質における分画排泄率 (Fractional Excretion: FE) を算出したが Na<sup>+</sup>分画排泄率に野生型マウスと MRP4<sup>-/-</sup>マウス間で有意な差は見られなかった (Table 1)。

### 3. 4. MRP4 欠損による血圧の変化

野生型マウス及び MRP4<sup>-/-</sup>マウスに対して、血圧及び心拍数の測定を行った。野生型マウス及び MRP4<sup>-/-</sup>マウス間で血漿中の電解質バランスに違いは見られなかったが、収縮期 (SBP) の血圧において、野生型マウスに比べて MRP4<sup>-/-</sup>マウスでは有意に低下していた (Fig. 4)。有意な差は見られなかったが、実験期間を通じて MRP4<sup>-/-</sup>マウスで収縮期血圧が低い傾向が見られた。

Table 1 MRP<sup>+/+</sup>及び MRP<sup>-/-</sup>マウスの血液・尿生化学的解析結果

		Basal		Low Salt		Furosemide	
		MRP4 <sup>(+/+)</sup>	MRP4 <sup>(-/-)</sup>	MRP4 <sup>(+/+)</sup>	MRP4 <sup>(-/-)</sup>	MRP4 <sup>(+/+)</sup>	MRP4 <sup>(-/-)</sup>
Plasma	Na <sup>+</sup> , mmol/L	153.0 ± 0.3	153.7 ± 1	151.3 ± 0.9	151.5 ± 0.9	153.3 ± 1.7	150.7 ± 0.9
	K <sup>+</sup> , mmol/L	6.4 ± 0.3	6.6 ± 0.5	6.3 ± 0.4	6.4 ± 0.3	6.0 ± 0.4	5.8 ± 0
	Cl <sup>-</sup> , mmol/L	117.4 ± 1.6	116.8 ± 2.3	114.7 ± 1.6	113.4 ± 1.1	103.0 ± 1.5	107.0 ± 0
Ccr, mL/min	—	—	1.26 ± 0.15	0.73 ± 0.12*	1.30 ± 0.16	0.76 ± 0.07*	
	FENa <sup>+</sup> , %	0.02 ± 0	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.09
	FEK <sup>+</sup> , %	1.62 ± 0.3	1.20 ± 0.4	3.99 ± 1.1	2.6 ± 0.6	5.69 ± 0.5	3.79 ± 2.5
	FECl <sup>-</sup> , %	0.03 ± 0	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.25 ± 0.05	0.20 ± 0.13

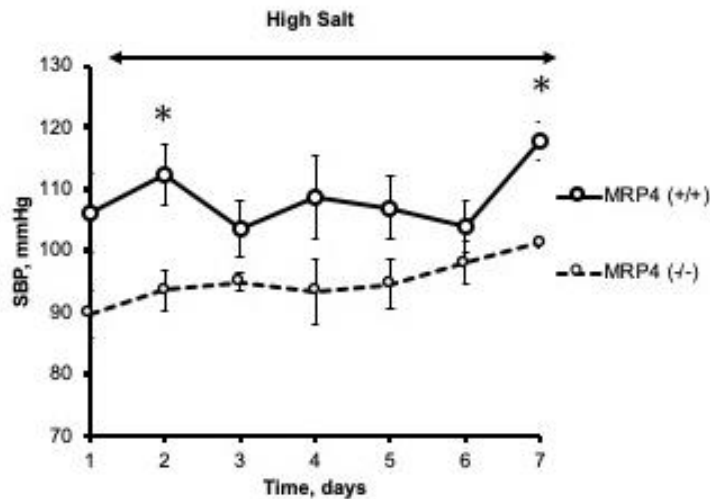


Fig. 4 高塩分負荷時の収縮期血圧変動

#### 4. 考 察

これまでにマウスの腎組織における免疫蛍光染色において、Tamm-Horsfall 蛋白 (THP) 陰性であるマクラデンサ細胞の basolateral 側において MRP4 の発現を確認しており、MRP4 がアラキドン酸から COX-2 により合成された PGE<sub>2</sub> の細胞外への分泌を担う輸送体分子である可能性を示唆する結果を得ている。

フロセミドを投与した腎皮質におけるマクラデンサ細胞では、COX-2 の mRNA 及びタンパク質レベルでの発現が上昇することが報告されている<sup>(4)</sup>。マクラデンサ細胞株である MMDD1 細胞では、低塩濃度条件下において MAP キナーゼである ERK1/2 や p38 の活性化により PG 産生を促進し、COX-2 の mRNA 及びタンパク質レベルでの発現が上昇することが報告されている<sup>(6)</sup>。本研究での結果より、フロセミド投与及び低塩分摂取した野生型マウスでは、COX-2 の mRNA 及びタンパク質レベルでの発現上昇は過去の報告と類似する結果を示した。一方で、MRP4<sup>-/-</sup>マウスでは COX-2 の mRNA 及びタンパク質レベルでの発現上昇は見られなかった。低塩分摂取、フロセミド投与での COX-2 の発現上昇は、MD 細胞の apical 膜側における Cl<sup>-</sup> の取込み量に依存していることが報告されており<sup>(6)</sup>、NKCC2 を介した輸送機能と大きく関連している。

以前に、Lin らのグループは MRP4 ノックアウトマウス胎仔由来線維芽 (mouse embryonic fibroblast: MEF) 細胞で

は、MRP4 の欠損に伴い COX-2 の発現が低下することが報告されている<sup>(10)</sup>。MRP4 は、細胞内から細胞外へと PGE<sub>2</sub> を輸送するだけでなく、環状ヌクレオチドである cAMP、cGMP の輸送にも関わっており<sup>(11)</sup>、MRP4 を欠損させると細胞外への cAMP 分泌が低下し、細胞内の cAMP 濃度が上昇する。MEF 細胞が長時間 cAMP に曝露されることで cAMP-response element-binding protein (CREB) の Ser133 の脱リン酸化が起こり、cAMP 依存性の Protein kinase (PKA) の触媒ユニットの欠損を引き起こし CREB の転写活性を減弱させる可能性が示唆されている。COX-2 の発現は CREB によって制御されており<sup>(12)</sup>、MRP4 を欠損させることにより COX-2 の発現が低下するものと考えられる。in vivo においてもフロセミド投与及び低塩分摂取した MRP4<sup>-/-</sup>マウスでは、野生型マウスに比べて COX-2 mRNA 及びタンパク質レベル発現の低下が見られており、MEF 細胞の報告と類似した機構が腎皮質のマクラデンサ細胞でも働いていると考えられる。従って、MRP4 を欠損することで細胞内の cAMP が上昇し、negative feedback 機構が働くことで、COX-2 の発現が低下したということが示唆される。

また、本研究において MRP4<sup>-/-</sup>マウスにおいて野生型マウスに比べて組織中の PGE<sub>2</sub> 濃度の低下がみられた。MRP4 は細胞内から細胞外へと PGE<sub>2</sub> を輸送することから、MRP4 を欠損させるとマクラデンサ細胞で COX-2 によって

合成された PGE<sub>2</sub> の間質中への輸送が障害されるものと考えられる。しかし、前述の様に MRP4<sup>-/-</sup> マウスでは野生型マウスに比べて COX-2 の発現低下が生じており、MRP4 を介した PGE<sub>2</sub> の輸送機能の有無を評価することは現状では非常に難しい状況にある。マクラデンサ細胞での PGE<sub>2</sub> の放出機能に関しては、このような点で *in vivo* での解析は困難であり、今後はマクラデンサ細胞不死化細胞株などを用いた *in vitro* での解析によりその役割を明らかにしていく必要があるものと考えられる。

PGE<sub>2</sub> は、オータコイドとして腎皮質におけるレニン分泌を制御すると共に糸球体血行動態を調節することが報告されている<sup>(6)</sup>。MRP4<sup>-/-</sup> マウスでは結果としてマクラデンサ細胞での PGE<sub>2</sub> 産生機能が低下しているものと考えられ、レニン分泌や尿細管-糸球体フィードバック機構も十分な機能が保たれていない可能性がある。MRP4<sup>-/-</sup> マウスにおいて、様々な刺激条件下においても尿及び血漿中の電解質のバランスは正常に保たれていた。しかし MRP4<sup>-/-</sup> マウスでは、血圧の低下やクレアチニンクリアランスの減少傾向がみられており、糸球体濾過量を下げることによって電解質や体液調節を維持していることが示唆される。

以上のことより、MRP4 をノックアウトすることで、マクラデンサ細胞では細胞内の cAMP が上昇し、negative feedback 機構が働くことで、COX-2 の発現が低下したということが示唆される。さらに、高塩分刺激条件下において MRP4<sup>-/-</sup> マウスで血圧の低下がみられたことから、血圧への影響に対して今後より詳細な解析が必要であると考えられる。MRP4 を介したマクラデンサ細胞における PG の輸送機能の異常は、本態性高血圧症のような疾患との関わりがある可能性も考えられる。更に今後 PG の局所的な作用の制御機構を明らかにしていくことで疾患に合わせた薬物の選択や新薬の開発などにつながる可能性があるかもしれない。

## 5. 今後の課題

マクラデンサ細胞は腎臓の局所に一部だけ存在する細胞であり、その解析は非常に困難である。マクラデンサ細胞における遺伝子やタンパク質発現の特徴についても、十分に解明されているとは言えない状況であり、従来の生理学的な解析だけではその機能を明らかにしていくことは難しく、新しい発想が必要である。マクラデンサ細胞にお

いて NKCC2 を介したナトリウム、カリウム、塩化物イオンの輸送とその感知が尿細管-糸球体フィードバック調節のトリガーとなることは、これまでの研究によって明らかにされているが、その下流のメカニズムの解明に取り組んでいく必要がある。我々は、マクラデンサ細胞特異的に蛍光タンパク質を発現するモデル動物の作製を進め、single cell RNA sequence により、マクラデンサ細胞特異的な遺伝子群の存在を明らかにするための研究を進めている。MRP4 の欠損によって引きこされる COX-2 発現の変化や PGE<sub>2</sub> 産生の変化、更には周囲の糸球体外メサンギウム細胞における遺伝子発現に及ぼす影響なども含めて、詳細な検討を進めていく必要がある。

## 6. 文献

1. Imig JD. Eicosanoid regulation of the renal vasculature. *Am J Physiol Renal Physiol.* 279: F965-981, 2000
2. Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J. Clin Invest.* 94, 2504-2510, 1994
3. Singh I, Pham H, Sun D, Smart A, Schnermann JB, Briggs JP. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol.* 274:F481-489, 1998
4. Mann B, Hartner A, Jensen BL, Kammerl M, Krämer BK, Kurtz A. Furosemide stimulates macula densa cyclooxygenase-2 expression in rats. *Kidney Int.* 59, 62-68, 2001
5. Yang T, Schnermann JB, Briggs JP. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in renal medulla by tonicity in vivo and in vitro. *Am J Physiol.* 277:F1-9, 1999
6. Harris RC, Breyer MD. Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281:F1-11, 2001
7. 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.* 275, 37922-37929, 2000
8. Peti-Peterdi J, Harris RC. Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release. *J Am Soc Nephrol.* 21:1093-1096, 2010
  9. Höcherl K, Kammerl MC, Schumacher K, Endemann D, Grobecker HF, Kurtz A. Role of prostanoids in regulation of the renin-angiotensin-aldosterone system by salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283:F294-301, 2002
  10. Lin ZP, Zhu YL, Johnson DR, Rice KP, Nottoli T, Hains BC, McGrath J, Waxman SG, Sartorelli AC. Disruption of cAMP and prostaglandin E2 transport by multidrug resistance protein 4 deficiency alters cAMP-mediated signaling and nociceptive response. *Mol Pharmacol.* 73:243-51, 2008
  11. Borst P, Balzarini J, Ono N, Reid G, de Vries H, Wielinga P, Wijnholds J, and Zelcer N. The potential impact of drug transporters on nucleoside-analog-based antiviral chemotherapy. *Antiviral Res* 62:1-7, 2004
  12. Ghosh R, Garcia GE, Crosby K, Inoue H, Thompson IM, Troyer DA, Kumar AP. Regulation of Cox-2 by cyclic AMP response element binding protein in prostate cancer: potential role for nexrutine. *Neoplasia.*: 9:893-9, 2007



## The Molecular Mechanism of Na<sup>+</sup> sensing and Feedback Regulation of Glomerular Filtration in the Kidney

Ryo Hatano, Takashi Miki

Department of Medical Physiology, Chiba University Graduate School of Medicine

### Summary

Kidney plays important roles in the regulation of body fluid volume and blood pressure by reabsorption of electrolytes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, etc.) from filtered fluids through glomerular filtration units. Filtered nutrient such as glucose, and amino acids, are almost completely reabsorbed in the proximal tubules, and are backed to the circulation. On the other hand, 60 % of filtered Na<sup>+</sup> are reabsorbed in the proximal tubules for the Na<sup>+</sup> dependent reabsorption of the nutrients, and remaining Na<sup>+</sup> was reabsorbed through the distal nephron including thick ascending limb of Henle (TALH), and collecting duct for the water reabsorption. The renal macula densa (MD) cells, which are packed specialized cells lining the wall of the TALH at the transition to the distal convoluted tubule. MD cells sense the luminal concentration of NaCl in TALH, and mediate the feedback regulation of glomerular filtration, so-called "tubule-glomerular feedback". MD cells sense the luminal concentration of NaCl in TALH, and release several kinds of signaling molecules including prostaglandins (PGs) and adenosine to regulate the glomerular hemodynamics by the vasodilation or vasoconstriction of afferent arterioles. Recently, we found that MRP4 (Multidrug Resistance Protein 4) as a candidate transporter for PG release in MD cells. In the present study, we examined physiological roles of MRP4 in the regulation of PG release from renal MD cells by using MRP4 knockout mice. Urinary and plasma concentrations of electrolytes, creatinine, and fractional excretion of electrolytes were not significantly different between wild type mice (WT) and MRP4<sup>(-/-)</sup> mice during the experimental period. However, MRP4<sup>(-/-)</sup> mice displayed hypotensive phenotype compared with WT mice. MRP4<sup>(-/-)</sup> mice also exhibited the lower level of PGE<sub>2</sub> production in the renal cortex, possibly due to the significantly decreased COX-2 expression level in the cortex of MRP4<sup>(-/-)</sup> mice. Our findings suggest that MRP4 plays an important role in the control of renal function, although it seems to be responsible for the regulation of PGE<sub>2</sub> production rather than PGE<sub>2</sub> release from MD cells.