

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 土田 陽平
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 563 号
学位授与の日付 平成 25 年 9 月 20 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

博士論文名 Up-regulation of prolactin receptor in the proximal tubular cells was induced in cardiac dysfunction model mice
(心機能低下マウスにおける近位尿細管プロラクチン受容体の発現増加)

論文審査委員 主査 河内 裕
副査 成田 一衛
副査 矢尾板 永信

博士論文の要旨

【背景】心腎連関、あるいは心腎症候群といわれる病態は最近大きな注目を集めている。その病因として腎鬱血、renin-angiotensin-aldosterone 系・交感神経系の慢性的な活性化、循環・標的物質双方における炎症物質、内分泌因子の関与などが挙げられている。

【目的】心腎連関の一因として、心不全による腎臓での Na homeostasis への影響を調べるため、心不全モデルマウスにおける尿細管 Na 輸送体の変化を解析した。

【方法】8 週齢のマウスにおいて、腎虚血の影響を回避するため、腎動脈分岐下の腹部大動脈縮搾(aortic banding ; Ab)をすることで心不全モデルマウス (Ab マウス) を作成した。コントロールマウスに対しては同時期に sham operation を行った。処置から 8 週間後に心臓超音波検査、採血、腎摘出を行い、種々の遺伝子や蛋白発現の解析を行った。

【結果】Ab マウスでは、左室駆出率の有意な低下を認めた。ELISA で測定した血清 Cystatin C 値で評価した腎機能の変化は認めなかった。腎臓から抽出した total RNA を用いて、real time PCR で尿細管細胞に存在する Na 輸送体の RNA 発現量の変化を評価した。その結果、Ab マウスにおいてプロラクチン受容体 (Prolactin receptor ; Pr1R) variant1 の発現が増加していることが確認された。同様に Pr1R variant2、3 も Ab マウスの腎臓で発現が増加していた。ELISA により測定した血清プロラクチン (Pr1) 濃度は両群間で有意差を認めなかった。腎以外の主要な臓器においては Pr1R mRNA の発現は確認されず、Ab マウスにおけるプロラクチン受容体 long isoform の mRNA 発現増加は腎臓特異的であることが判明した。in-situ hybridization で評価した Pr1R mRNA の発現部位は皮髄境界の近位尿細管直部細胞に局在しており、Ab マウスでその発現は顕著となっていた。また免疫染色でも mRNA 発現部位に一致した近位尿細管細胞に Pr1R 蛋白の発現が確認された。皮髄境界部が低酸素状態になり易い部位であることから、

低酸素状態により Pr1R 発現が上昇した可能性を考え、腎虚血再灌流マウスの腎臓を用いて real time PCR で Pr1R の発現を調べた。結果、全 variant の Pr1R の発現は、むしろ低下していた。次に内因性 Pr1 の役割を調べるため、Pr1 分泌阻害薬であるブロモクリプチンを両群のマウスに経口的に 8 日間投与した。ブロモクリプチン投与により両群の血清 Pr1 濃度は検出感度以下となった。血清シスタチン C、尿中 K 排泄は影響を受けなかったが尿中 Na 排泄は両群で有意に低下した。Pr1 と Pr1R 結合が果たす役割を調べるため、羊 Pr1 を両群のマウスに腹腔投与した。Pr1 投与は両群の血清シスタチン C、尿中 Na 排泄には影響を与えなかったが、尿中 K 排泄は Ab マウスで有意に増加した。高塩分負荷時の Na、K homeostasis を調べるため、8%食塩が添加された餌を与えた Ab およびコントロールマウス、ならびに、与えていない両群の尿中 Na、K 排泄を評価した。高塩分負荷により両群ともに尿中 Na 排泄の増加を認めた。尿中 K 排泄は高塩分負荷の影響を受けなかった。高塩分負荷時の両群マウスに内生 Pr1 分泌阻害、Pr1 投与を行い、尿中 Na、K 排泄を調べた。結果、コントロールマウスの尿中 Na 排泄は減少傾向、Ab マウスでは有意に減少した。両群とも尿中 K 排泄に変化は認めなかった。

【考察】 Pr1 は下垂体前葉で産生、分泌され、授乳、黄体刺激、免疫反応、血管新生、浸透圧調整等に関わる。Pr1R はサイトカイン受容体スーパーファミリーに属し、ヒトおよびマウスでは、細胞内ドメインの長さが異なる long isoform と short isoform が存在する。long isoform はあらゆる臓器で発現している。その一方で肝などでは short isoform が主に発現している。マウスの Pr1R は long isoform である variant1、および short isoform である variant2、3 が確認されている。魚類や両生類で、Pr1 が鰓や腎臓で Na^+ や水の透過性を減らすことで浸透圧を調整すること、ほ乳類で Pr1 は用量依存的に腎近位尿細管の Na^+/K^+ -ATPase 活性を阻害し、糸球体濾過量や血圧に影響することなく、Na 利尿を起こすことが知られている。今回申請者は Ab 処置で皮髄境界部の近位尿細管細胞に Pr1R の発現が増加することを明らかにした。内因性 Pr1 分泌の阻害で既知の Na 排泄が低下することが確認されたが、同作用はコントロールマウスでも確認された。その一方で高塩分負荷では Ab マウス特有の Na 排泄低下が確認されことから近位尿細管細胞で発現した Pr1R は心不全で高塩分が負荷された際に大きな役割を果たしていると考えられた。外因性 Pr1 投与により Ab マウス特有の K 排泄増加を認めたことから、皮髄境界部の Pr1R は過剰な Pr1 の存在下で K 排泄にも関与している可能性が示唆された。Ab 処置により Pr1R は皮髄境界部の近位尿細管直部に発現が亢進した。同部位の解剖学的特徴として低酸素であること、心不全では腎灌流の低下、腎鬱滞が起きること、今回腎虚血再灌流マウスでは Pr1R の発現が増強しなかったことから、軽度かつ慢性的な低酸素状態が Pr1R 発現を誘発すると考えられた。

【結論】 Ab 処置で近位尿細管細胞に Pr1R の発現が増加することを明らかにした。既知の Na 排泄作用に加え、K 排泄にも関与している可能性が示唆された。

審査結果の要旨

本論文は、心腎連関の機序を明らかにするため、心不全による腎臓での Na 恒常性への影響を解析したものである。まず、心不全モデルマウスにおける尿細管 Na 輸送体の発現変化を解析した。腎動脈分岐下の腹部大動脈縮窄(aortic banding ; Ab)により心不全モデルマウス (Ab マウス) を作成し、その心機能低下に伴って、近位尿細管細胞に、プロラクチン受容体が遺伝子レベルおよび蛋白質レベルで高発現すること、他の Na 輸送体には変化がないことを明らかにした。

さらに Ab マウスに対し、プロラクチンあるいはブロモクリプチンを投与し、プロラクチン受容体を

介したシグナルが、心不全状態による慢性的な腎低酸素状態において、Na およびK 排泄調節に関与していることを明らかにした。

本論文は独自の実験系により、心腎連関の新たな機序の可能性を示した点で、学位論文としての価値を認める。