

## 論文の内容の要旨

論文題目 1-O-hexadecyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (azPC) はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$ を介して近位尿細管ナトリウム再吸収を亢進させる

氏名 水野 智仁

酸化リン脂質は、主にグリセロール骨格の sn-2 位に位置する多価不飽和脂肪酸が酸化ストレスによる過酸化反応を受けることで生成され、内皮細胞障害、マクロファージの接着や遊走、サイトカイン産生、血管平滑筋細胞増殖、アポトーシスなどに関与することで、粥状硬化形成に寄与する。粥状硬化は高血圧の危険因子の一つであるが、粥状硬化に伴う高血圧発症機序は十分に解明されていない。

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) は核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子で、リガンド依存的にレチノイド X 受容体とヘテロ二量体を形成後、PPAR 応答配列 (PPAR-responsive regulatory element; PPRE) に結合することで標的遺伝子の転写調節を引き起こす genomic 作用と、遺伝子発現に直接的には影響を与えない non-genomic 作用の両者を有する。PPAR $\gamma$  のリガンドは、外因性と内因性に大別され、多数存在し、また、標的遺伝子も多岐にわたるため、PPAR $\gamma$  は糖・脂質代謝、炎症反応、酸化ストレス、細胞周期、アポトーシスなど多様な細胞機能制御に関わる。チアゾリジン誘導体 (TZDs) は代表的な外因性の PPAR $\gamma$  アゴニストで、インスリン抵抗性改善作用を有する経口血糖降下薬として臨床応用されているが、体重増加や浮腫などの副作用が報告されている。TZDs による体液量増加の機序の一つとして、近位尿細管におけるナトリウム再吸収亢進作用があり、これは、PPAR $\gamma$ /ERK 経路を介した non-genomic 作用であることが証明されている。また、この TZDs による近位尿細管での non-genomic 作用には種差が存在し、ラット、ウサギ、ヒトでは認めるが、マウスでは認められない。

一方で、PPAR $\gamma$  には、多価不飽和脂肪酸やその代謝産物、及び、酸化 LDL や酸化リン脂質といった、数多くの内因性リガンドも知られている。それらの中で、酸化リン脂質の一つである 1-O-hexadecyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (azPC) は、PPAR $\gamma$  の有力な内因性アゴニストとして知られ、チアゾリジン誘導体 (TZDs) と機能的な相同性が示唆されている。しかし、PPAR $\gamma$  内因性リガンドの作用は不明な点も多く、近位尿細管における生理的意義は十分に解明されていない。

本研究では、TZDs が近位尿細管ナトリウム再吸収を亢進させる点に着目し、粥状硬化より産生される酸化リン脂質の一つである azPC を使用して、PPAR $\gamma$  内因性リガンドが腎臓近位尿細管ナトリウム輸送に及ぼす影響を検討することで、粥状硬化症に伴う高血圧発症機序の解析を試みた。

最初に、C57BL/6 マウスの管腔側 NHE 活性の評価を行った。管腔側 NHE 活性は、既報に

に基づき、単離近位尿細管の管腔を露出させた状態で、bafilomycin A<sub>1</sub> (200nM) 含有の灌流液中のナトリウム濃度を 144 mM から 0 に急速に変化させた際の、初期細胞内 pH 変化速度から解析した。その結果、azPC を 3 分間添加しても管腔側 NHE 活性に変化は見られず、既報の TZDs と同様の結果を得た。

Wistar ラットから単離した近位尿細管を用いて、同様の方法で、azPC が管腔側 NHE 活性へ与える影響を評価した。3 分間の azPC 添加により、ラットの近位尿細管管腔側 NHE 活性は濃度依存性に亢進した。次に、本作用が、NHE 由来であることを裏付けるために、NHE 阻害剤である EIPA を用いて検証した。その結果、EIPA (100  $\mu$ M) 添加により、azPC によるこの活性作用が完全に抑制されたことから、azPC は NHE 活性を亢進させることが示された。近位尿細管には各種 NHE アイソフォームが存在するが、その中で主要な働きをするのは、管腔側に発現する NHE3 と基底側に発現する NHE1 である。そのため、azPC による NHE 活性亢進作用における NHE1 の影響を評価するために、NHE1 阻害剤である cariporide での検証を行った。その結果、cariporide (1  $\mu$ M) を添加しても、azPC による NHE 活性亢進作用に変化は見られず、本作用が NHE1 でなく NHE3 による作用であることが示唆された。つづいて、azPC による NHE3 活性亢進作用が PPAR $\gamma$  に依存しているかどうかを調べるために、PPAR $\gamma$  特異的アンタゴニストである GW9662 の作用を検証した。その結果、GW9662 (5  $\mu$ M) は NHE3 活性の基礎値には影響を与えず、azPC による NHE3 活性亢進作用を完全に抑制した。さらに、PPAR $\gamma$  特異的遺伝子発現抑制の効果を調べるために、s-scramble と anti-PPAR $\gamma$  siRNA (si-PPAR $\gamma$ ) を用いて検証を行った。その結果、si-scramble で処理した培養単離近位尿細管では、azPC による NHE3 活性亢進作用を認めたが、si-PPAR $\gamma$  (40 nM) で処理した培養単離近位尿細管では、azPC による NHE3 活性亢進作用を認めなかった。以上から、azPC による NHE3 活性亢進作用は、PPAR $\gamma$  に依存していることが示された。

次に、ラットの単離近位尿細管を用いて、azPC が NBCe1 活性へ与える影響を評価した。NBCe1 活性は、既報に基づき、単離近位尿細管の管腔を虚脱させた状態で、灌流液中の重炭酸濃度を 25 mM から 12.5 mM に急速に変化させた際の、初期細胞内 pH 変化速度から解析した。3 分間の azPC 添加により、ラット近位尿細管の NBCe1 活性は濃度依存性に亢進した。さらに、この azPC による NBCe1 活性亢進作用は、GW9662 (5  $\mu$ M) で完全に抑制された。また、si-scramble あるいは si-PPAR $\gamma$  で処理した培養単離近位尿細管による検討においては、si-scramble で処理した培養単離近位尿細管では、azPC による NBCe1 活性亢進作用を認めたが、si-PPAR $\gamma$  (40 nM) で処理した培養単離近位尿細管では、azPC による NBCe1 活性亢進作用を認めなかった。以上から、azPC による NBCe1 活性亢進作用は、NHE3 と同様に、PPAR $\gamma$  に依存していることが示された。

azPC による NHE3 及び NBCe1 の活性亢進作用が、TZDs による PPAR $\gamma$ /ERK 経路を介した近位尿細管ナトリウム再吸収亢進作用と同様かどうか調べるために、MEK 阻害剤である PD98059 を使用して実験を行った。その結果、PD98059 (10  $\mu$ M) 添加により、azPC による NHE3 及び NBCe1 の活性亢進作用は、ともに完全に阻害された。さらに、ウェスタンブロッ

ティングで、ラット腎皮質における ERK のリン酸化を解析した。azPC 添加により ERK のリン酸化は濃度依存性に亢進し、azPC による ERK リン酸化亢進作用は GW9662 及び PD98059 の両者で抑制された。以上から、ラットにおいて、azPC は PPAR $\gamma$ /MEK/ERK 経路を介して NHE3 活性及び NBCe1 活性を亢進させることが示された。

最後に、ヒトの単離近位尿細管及び腎皮質を用いて、同様の検討を行った。その結果、ヒトでも、ラットと同様に、azPC は PPAR $\gamma$ /ERK 経路を介して NHE3 活性及び NBCe1 活性を亢進させることが示された。

以上より、azPC は、ラット及びヒトにおいて、PPAR $\gamma$ /MEK/ERK 経路を介して NHE3 活性及び NBCe1 活性を亢進させることで、近位尿細管におけるナトリウム再吸収を亢進させることが示された。本研究結果は、粥状硬化症より産生される酸化リン脂質が体液貯留に寄与する可能性を示したものであり、粥状硬化症に伴う高血圧発症機序の一つである可能性がある。