



# Decreased Expression of Arginase II in the Kidneys of Dahl Salt-Sensitive Rats

岩田, 幸代

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-02-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2925

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002925>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 8 4 】

氏 名・（本 籍） 岩田 幸代 （ 鹿児島県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博ろ第2001号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成19年2月14日

【 学位論文題目 】

Decreased Expression of Arginase II in the Kidneys of Dahl Salt-Sensitive Rats

（ダール食塩感受性ラットの腎臓におけるアルキナーゼIIの  
発現低下の意義）

審 査 委 員

主 査 教 授 西尾 久英

教 授 横野 浩一

教 授 藤澤 正人

## 【序文】

アルギナーゼ (AR) は尿素サイクルを構成する一つの酵素であり、L-アルギニンを尿素と L-オルニチンに分解する。AR には 2 つのサブタイプがあり、I 型 (肝臓・細胞質型) II 型 (肝臓外の臓器・ミトコンドリア型) とに分けられる。

肝臓のみが完全な尿素サイクルをもっており、肝臓以外の臓器は不完全な尿素サイクルしかもたないため、尿素を合成できない。尿素はアンモニアを無毒化する過程で生じる主な最終産物であるが、腎では近位尿細管に存在する AR II によりアルギニンから尿素が産生され、腎髄質において浸透圧勾配をつくり、尿濃縮に重要な役割を果たすだけでなく、ヘンレ上行脚の Na-K-Cl 共輸送体を抑制し、Na 排泄を促進する働きなどを有する。ダール食塩感受性高血圧ラットで Na-K-Cl 共輸送体が増加しているとの報告やいくつかの高血圧モデルで尿素が血圧を下げたとの報告がある。

しかし、腎での尿素産生量は糸球体を濾過する量よりはるかに少なく、腎 AR による尿素産生の生理的役割はわかっていない。また、血圧と腎 AR との関係についての報告もない。我々はダール食塩感受性高血圧ラットでの AR 活性と発現、尿素投与による血圧と腎障害への影響をみるために研究を行った。

## 【方法】

① 4 週齢の雄ダール食塩感受性ラット (SS)、ダール食塩非感受性ラット (SR) を用い、Tail-cuff 法にて血圧を測定後 一部のラットで断頭し肝臓、腎臓、小脳を摘出した。残りのラットに 4 週間高食塩食 (NaCl 4%; SSH, SRH) とコントロール食 (NaCl 0.24%; SSL, SRL) 投与後、腎臓、肝臓、小脳の AR 活性と蛋白発現、遺伝子発現について検討した。血圧の影響を検討するため SSH の一部にヒドララジンを投与 (50mg/kg/day; SSH-Hy) した。AR 活性は Corraliza らの方法により定量した。また、AR II の mRNA 発現はノーザンブロット法にて、AR II の蛋白発現はウェスタンブロット法にて検討した。

② 4 週齢の雄ダール食塩感受性ラットを用い、高食塩+5%尿素食 (SSH-U) と高食塩+5%カオリン (potter's clay) (SSH-K) を投与し、血圧や体重を測定した。6 週間の負荷後に腎臓を摘出しホルマリン固定後、PAS 染色と Masson-trichrome 染色を行った。

## 【結果】

① 4 週齢では SS ラット、SR ラットの血圧、体重に差はみられなかった。この 4 週齢

時の腎臓での AR 活性は SS ラットで、SR ラットよりも低下していた (SS vs. SR:  $10.54 \pm 0.36$  vs.  $8.26 \pm 0.47 \mu\text{mol urea/mg protein}$ ;  $p < 0.01$ )。肝臓や小脳での AR 活性は SS ラットと SR ラットで差がなかった。

4 週間の食塩負荷により SSH 群のみで血圧上昇がみられ、SSH-Hy 群では血圧上昇は抑制された。腎臓での AR 活性は SS ラットで SR ラットよりも低下しており、食塩負荷は AR 活性に影響を与えなかった。(SRL vs. SRH vs. SSL vs. SSH vs. SSH-Hy:  $3.82 \pm 0.16$  vs.  $3.87 \pm 0.50$  vs.  $2.91 \pm 0.31^*$  vs.  $2.72 \pm 0.44^\dagger$   $3.37 \pm 0.53 \mu\text{mol urea/mg protein}$ ;  $* p < 0.05$  vs. SRL,  $^\dagger p < 0.05$  vs. SRH)。ヒドララジンの投与も AR 活性を増加させる傾向にあったが、有意差はみられなかった。

腎臓に主に発現している AR II の mRNA 発現 (SRL vs. SRH vs. SSL vs. SSH;  $1.00 \pm 0.02$  vs.  $0.95 \pm 0.02$  vs.  $0.72 \pm 0.02^{**}$  vs.  $0.75 \pm 0.01^\dagger$ ;  $** p < 0.01$  vs. SRL,  $^\dagger p < 0.05$  vs. SRH) と AR II の蛋白の発現 (SRL vs. SRH vs. SSL vs. SSH;  $1.00 \pm 0.04$  vs.  $0.98 \pm 0.04$  vs.  $0.84 \pm 0.05^*$  vs.  $0.82 \pm 0.03^\dagger$ ;  $* p < 0.05$  vs. SRL,  $^\dagger p < 0.01$  vs. SRH) も同様に SS ラットで SR ラットよりも低下していた。

肝臓や小脳における AR 活性は SS ラットと SR ラットで差はなかった。

② 6 週間の尿素含有食は SS ラットにおいて尿中窒素排泄と血中尿素窒素を増加させ、高血圧発症を抑制した。体重には差がみられなかった。また、糸球体硬化と微小血管の中膜肥厚を抑制し、腎障害を軽減した。

## 【考察】

食塩感受性高血圧に対する AR の役割を明らかにするために、ダールラットにおける AR の活性と発現を検討した。腎での AR 活性、AR II の mRNA 発現や蛋白発現は食塩負荷や高血圧進展によらず SS ラットで SR ラットよりも低下していた。このことは腎 AR の低下が SS ラットでの血圧上昇に寄与していることを示唆する。腎 AR の活性は血圧が上昇する前の 4 週齢において、すでに SS ラットで SR ラットより低下していたため、腎での AR 活性低下が血圧上昇に直接的影響を及ぼしていることは少ないと思われるが、SS ラットでは血圧が上昇するよりも前に、食塩負荷に対する Na 排泄低下といった種々の身体的異常がみられ、AR 活性の低下が食塩感受性と関連している可能性がある。食塩感受性の関与の少ない自然発症高血圧ラットの AR 活性が正常高血圧の Wistar Kyoto ラットと同じであったことも AR 活性と食塩感受性との関連を示唆するものといえるかもしれない。

AR はアルギニンから尿素と L-オルニチンを産生する。Levillain らによれば尿素の産生は皮質近位尿細管やヘンレのループの入り口にある髄質外層の近位直尿細管で

増加している。宮中らの報告による AR II の腎臓での局在は、髄質外層外帯の近位直尿細管と皮質の一部の近位尿細管である。尿素はループ利尿薬のプロセミドのように、髄質ヘンレ上行脚において Na-K-Cl 共輸送体を抑制するため、近位尿細管における尿素産生が Na 再吸収を調節する可能性がある。

我々はまた、食塩を負荷した SS ラットに尿素を投与することにより、血圧上昇抑制と腎硬化の改善することを示した。AR 活性の低下は局所的な尿素産生の低下を介して SS ラットにおける食塩感受性高血圧と腎硬化を進展させるのかもしれない。

しかし、腎臓での Na 排泄と血圧調整における尿素産生の役割はまだ、推測の域をでない。というのは、この腎臓での代謝過程の割合は、糸球体由来の尿素流の割合と比べると非常に低く、結果として腎臓での尿素の産生は最終尿での尿素含有増加の原因とはならないからである。我々の研究において、尿素の負荷は単に浸透圧利尿として働いた可能性がある。

もう一つの反応産物である L-オルニチンはポリアミンの前駆物質である。ポリアミンはブトレシン、スペルミジン、スペルミンからなる天然の脂肪族アミンであり、正常細胞に含まれる。また、オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) というポリアミン産生の律速酵素が近位尿細管に存在する。最近、我々は SS ラットで腎 ODC 活性と尿中ポリアミン排泄が低下していること、スペルミジン投与により SS ラットの食塩投与による血圧上昇を抑制することを報告した。AR 活性の低下はポリアミン産生を低下させることにより食塩感受性高血圧をひき起こすのかもしれない。

血圧が AR 産生に影響しているかどうかについて、食塩負荷 SS ラットにヒドララジンを投与して検討した。SSH-Hy 群での AR 活性は増加傾向にあったものの、SSH 群と有意な差はなかった。血圧や腎循環の変化が腎 AR 活性に及ぼす影響は明らかではないが、ヒドララジンは血圧低下以外のメカニズムにより AR 産生に関与している可能性がある。しかし、現存する AR の拮抗薬は I 型 (肝臓) と II 型 (肝臓外) の両方を抑制してしまうため、糸球体からの尿素の濾過も局所の尿素の産生も共に減少させてしまい、確定的な結果を得るに至っていない。腎臓での AR の病態生理学的役割の解明はまだ始まったばかりであり、AR II のノックアウトマウスもまだ作製されていない。成人哺乳類においては約 60% のアルギニンが腎臓で産生されており、腎 AR 活性の血中アルギニン濃度に及ぼす影響は興味深いものである。

アルギニンはまた、NO 産生酵素 (NOS) の唯一の基質でもある。Chen らはダール SS ラットでは NO 産生が低下しており、アルギニンを投与することでその高血圧進展を抑制すると報告している。NO は腎における Na 排泄に重要な役割を果たしており、我々も神経型 NOS 活性がダール SS ラットで低下していることを報告している。他方 AR II は RAW264.7 細胞において IFN- $\gamma$  や LPS による NO 産生を down-regulation するとの報告がある。我々は当初、AR 活性が SS ラットの腎臓で増加し、アルギニン合成が低下しているのではないかと考えたが、AR 活性は我々の予想に反して SS ラッ

トで低下していた。また、SS ラットと SR ラットの血中アルギニン濃度に差がないことは我々や他のグループの研究で報告されている。腎 AR 活性の低下が腎臓から全身へのアルギニン供給に及ぼす影響は小さいと考えられ、腎 AR が食塩感受性高血圧に及ぼす病態生理学的役割を明らかにするためには更なる実験が必要である。

#### 【結論】

腎臓でのアルギナーゼ (AR) 活性、AR II mRNA 発現や蛋白発現は SS ラットで、SR ラットよりも低下していた。また、尿素投与は高食塩負荷 SS ラットにおいて血圧上昇を抑制し、腎障害を軽減した。腎臓での AR の低下は食塩感受性ラットにおける高血圧発症に一部関与していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

受 付 番 号	乙 第 2004 号	氏 名	岩 田 幸 代
論 文 題 目 Title of Dissertation	Decreased Expression of Arginase II in the Kidneys of Dahl Salt-Sensitive Rats  ダール食塩感受性ラットの腎臓におけるアルギナーゼ II の発現低下の意義		
審 査 委 員 Examiner	主 査 西尾久英 Chief Examiner 副 査 横野浩一 Vice-examiner 副 査 蔭澤正人 Vice-examiner		
審 査 終 了 日	平成 19 年 1 月 17 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【序文】

アルギナーゼ(AR)は尿素サイクルを構成する一つの酵素であり、L-アルギニンを尿素とL-オルニチンに分解する。ARには2つのサブタイプがあり、I型(肝臓・細胞質型)II型(肝臓外の臓器・ミトコンドリア型)とに分けられる。  
肝臓のみが完全な尿素サイクルをもっており、肝臓以外の臓器は不完全な尿素サイクルしかもたないため、尿素を合成できない。尿素はアンモニアを無毒化する過程で生じる主な最終産物であるが、腎では近付尿細管に存在するARIIによりアルギニンから尿素が産生され、腎髄質において浸透圧勾配をつくり、尿濃縮に重要な役割を果たすだけでなく、ヘンレ上行脚のNa-K-Cl共輸送体を抑制し、Na排泄を促進する働きなどを有する。ダール食塩感受性高血圧ラットでNa-K-Cl共輸送体が増加しているとの報告やいくつかの高血圧モデルで尿素が血圧を下げたとの報告がある。  
しかし、腎での尿素産生量は糸球体を濾過する量よりはるかに少なく腎ARによる尿素産生の生理的役割はわかっていない。また、血圧と腎ARとの関係についての報告もない。我々はダール食塩感受性高血圧ラットでのAR活性と発現、尿素投与による血圧と腎障害への影響をみるために研究を行った。

【方法】

①4週齢の雄ダール食塩感受性ラット(SS)、ダール食塩非感受性ラット(SR)を用い、Tail-cuff法にて血圧を測定後一部のラットで断頭し肝臓、腎臓、小脳を摘出した。残りのラットに4週間高食塩食(NaCl 4%; SSH,SRH)とコントロール食(NaCl 0.24%; SSL,SRL)投与後、腎臓、肝臓、小脳のAR活性と蛋白発現、遺伝子発現について検討した。血圧の影響を検討するためSSHの一部にヒドララジンを投与(50mg/kg/day; SSH-Hy)した。AR活性はCorralizaらの方法により定量した。また、ARIIのmRNA発現はノーザンブロット法にて、ARIIの蛋白発現はウェスタンブロット法にて検討した。

②4週齢の雄ダール食塩感受性ラットを用い、高食塩+5%尿素食(SSH-U)と高食塩+5%カロリーン(potter's clay)(SSH-K)を投与し、血圧や体重を測定した。6週間の負荷後に腎臓を摘出しホルマリン固定後、PAS染色とMasson-trichrome染色を行った。

【結果】

①4週齢ではSSラット、SRラットの血圧、体重に差はみられなかった。この4週齢時の腎臓でのAR活性はSSラットで、SRラットよりも低下していた(SS vs. SR:  $10.54 \pm 0.36$  vs.  $8.26 \pm 0.47 \mu\text{mol urea/mg protein}$ ;  $p < 0.01$ )。肝臓や小脳でのAR活性はSSラットとSRラットで差がなかった。

4週間の食塩負荷によりSSH群のみで血圧上昇がみられ、SSH-Hy群では血圧上昇は抑制された。腎臓でのAR活性はSSラットでSRラットよりも低下しており、食塩負荷はAR活性に影響を与えなかった。(SRL vs. SRH vs. SSL vs. SSH vs. SSH-Hy:  $3.82 \pm 0.16$  vs.  $3.87 \pm 0.50$  vs.  $2.91 \pm 0.31^*$  vs.  $2.72 \pm 0.44 \uparrow$   $3.37 \pm 0.53 \mu\text{mol urea/mg protein}$ ;  $*p < 0.05$  vs. SRL,  $\uparrow p < 0.05$  vs. SRH)。ヒドララジンの投与もAR活性を増加させる傾向にあったが、有意差はみられなかった。

腎臓に主に発現しているARIIのmRNA発現(SRL vs. SRH vs. SSL vs. SSH;  $1.00 \pm 0.02$  vs.  $0.95 \pm 0.02$  vs.  $0.72 \pm 0.02^{**}$  vs.  $0.75 \pm 0.01 \uparrow$ ;  $**p < 0.01$  vs. SRL,  $\uparrow p < 0.05$  vs. SRH)とARIIの蛋白の発現(SRL vs. SRH vs. SSL vs. SSH;  $1.00 \pm 0.04$  vs.  $0.98 \pm 0.04$  vs.  $0.84 \pm 0.05^*$  vs.  $0.82 \pm$

0.03  $\uparrow$   $\dagger$ : \*  $p < 0.05$  vs. SRL,  $\uparrow$   $\dagger p < 0.01$  vs. SRH)も同様に SS ラットで SR ラットよりも低下していた。

肝臓や小脳における AR 活性は SS ラットと SR ラットで差はなかった。

②6 週間の尿素含有食は SS ラットにおいて尿中窒素排泄と血中尿素窒素を増加させ、高血圧発症を抑制した。体重には差がみられなかった。また、糸球体硬化と微小血管の中膜肥厚を抑制し、腎障害を軽減した。

#### 【考察】

食塩感受性高血圧に対する AR の役割を明らかにするために、ダールラットにおける AR の活性と発現を検討した。腎での AR 活性、ARII の mRNA 発現や蛋白発現は食塩負荷や高血圧進展によらず SS ラットで SR ラットよりも低下していた。このことは腎 AR の低下が SS ラットでの血圧上昇に寄与していることを示唆する。腎 AR の活性は血圧が上昇する前の 4 週齢において、すでに SS ラットで SR ラットより低下していたため、腎での AR 活性低下が血圧上昇に直接的影響を及ぼしていることは少ないと思われるが、SS ラットでは血圧が上昇するよりも前に、食塩負荷に対する Na 排泄低下といった種々の身体的異常がみられ、AR 活性の低下が食塩感受性と関連している可能性がある。食塩感受性の関与の少ない自然発症高血圧ラットの AR 活性が正常高血圧の Wistar Kyoto ラットと同じであったことも AR 活性と食塩感受性との関連を示唆するものといえるかもしれない。

AR はアルギニンから尿素と L-オルニチンを産生する。Levillain らによれば尿素の産生は皮質近付尿細管やヘンレのループの入り口にある髄質外層の近付直尿細管で増加している。宮中らの報告による ARII の腎臓での局在は、髄質外層外帯の近付直尿細管と皮質の一部の近付尿細管である。尿素はループ利尿薬のプロセミドのように、髄質ヘンレ上行脚において Na-K-Cl 共輸送体を抑制するため、近付尿細管における尿素産生が Na 再吸収を調節する可能性がある。

我々はまた、食塩を負荷した SS ラットに尿素を投与することにより、血圧上昇抑制と腎硬化の改善することを示した。AR 活性の低下は局所的な尿素産生の低下を介して SS ラットにおける食塩感受性高血圧と腎硬化を進展させるのかもしれない。しかし、腎臓での Na 排泄と血圧調整における尿素産生の役割はまだ、推測の域をでない。というのは、この腎臓での代謝過程の割合は、糸球体由来の尿素流の割合と比べると非常に低く、結果として腎臓での尿素の産生は最終尿での尿素含有増加の原因とはならないからである。我々の研究において、尿素の負荷は単に浸透圧利尿として働いた可能性がある。

もう一つの反応産物である L-オルニチンはポリアミンの前駆物質である。ポリアミンはブトレシン、スベルミジン、スベルミンからなる天然の脂肪族アミンであり、正常細胞に含まれる。また、オルニチン脱炭酸酵素(ODC)というポリアミン産生の律速酵素が近付尿細管に存在する。最近、我々は SS ラットで腎 ODC 活性と尿中ポリアミン排泄が低下していること、スベルミジン投与により SS ラットの食塩投与による血圧上昇を抑制することを報告した。AR 活性の低下はポリアミン産生を低下させることにより食塩感受性高血圧をひき起こすのかもしれない。

血圧が AR 産生に影響しているかどうかについて、食塩負荷 SS ラットにヒドララジンを投与して検討した。SSH-Hy 群での AR 活性は増加傾向にあったものの、SSH 群と有意な差はなかった。血圧や腎循環の変化が腎 AR 活性に及ぼす影響は明らかではないが、ヒドララジンは血圧低下以外のメカニズムにより AR 産生に関与している可能性がある。しかし、現存す

る AR の拮抗薬は I 型(肝臓)と II 型(肝臓外)の両方を抑制してしまうため、糸球体からの尿素の濾過も局所の尿素の産生も共に減少させてしまい、確定的な結果を得るに至っていない。腎臓での AR の病態生理学的役割の解明はまだ始まったばかりであり、ARII のノックアウトマウスもまだ作製されていない。成人哺乳類においては約 60%のアルギニンが腎臓で産生されており、腎 AR 活性の血中アルギニン濃度に及ぼす影響は興味深いものである。

アルギニンはまた、NO 産生酵素(NOS)の唯一の基質でもある。Chen らはダール SS ラットでは NO 産量が低下しており、アルギニンを投与することでその高血圧進展を抑制すると報告している。NO は腎における Na 排泄に重要な役割を果たしており、我々も神経型 NOS 活性がダール SS ラットで低下していることを報告している。他方 ARII は RAW264.7 細胞において IFN- $\gamma$  や LPS による NO 産生を down-regulation するとの報告がある。我々は当初、AR 活性が SS ラットの腎臓で増加し、アルギニン合成が低下しているのではないかと考えたが、AR 活性は我々の予想に反して SS ラットで低下していた。また、SS ラットと SR ラットの血中アルギニン濃度に差がないことは我々や他のグループの研究で報告されている。腎 AR 活性の低下が腎臓から全身へのアルギニン供給に及ぼす影響は小さいと考えられ、腎 AR が食塩感受性高血圧に及ぼす病態生理学的役割を明らかにするためには更なる実験が必要である。

#### 【結論】

腎臓でのアルギナーゼ(AR)活性、ARII mRNA 発現や蛋白発現は SS ラットで、SR ラットよりも低下していた。また、尿素投与は高食塩負荷 SS ラットにおいて血圧上昇を抑制し、腎障害を軽減した。腎臓での AR の低下は食塩感受性ラットにおける高血圧一発症に一部関与していると考えられた。

本研究は、ダール食塩感受性ラットについて、その高血圧発生機序を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった腎臓におけるアルギナーゼ II 活性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。