V1aノックアウトマウスを用いた抗利尿ホルモン受容体機能解析と新たな利尿薬開発

（課題番号17590833）

平成17年度ー18年度科学研究費補助金（基盤研究（C））

研究成果報告書

平成 19 年 5 月

研究代表者　野々口　博史

（熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科）

（研究者番号30218341）

研究組織

研究代表者：野々口　博史（熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科）

研究分担者：冨田公夫（熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科）

交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	180千円	0	180千円
平成18年度	170千円	0	170千円
総計	350千円	0	350千円

様 式 C－19

平成 18 年度科学研究費補助金研究成果報告書概要

1. 機関番号 | 1 | 7 | 4 | 0 | 1 |　　2. 研究機関名 熊本大学

3. 研究種目名 基盤研究 (C)　　4. 研究期間 平成 17 年度 ～ 平成 18 年度

5. 課題番号 | 1 | 7 | 5 | 9 | 0 | 8 | 3 | 3 |

6. 研究課題名 V1aノックアウトマウスを用いた抗利尿ホルモン受容体機能解析と新たな利尿薬開発

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
30218341	ノノグチ ヒロシ 野々口 博史	大学院・医学薬学研究部	准教授

8. 研究分担者(所属研究機関名は，研究代表者の所属研究機関と異なる場合に記入すること)

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名
40114772	トミタ キミオ 冨田公夫	大学院・医学薬学研究部	教授
	フリガナ		
	フリガナ		
	フリガナ		
	フリガナ		

9. 研究成果の概要(当該研究期間のまとめ，600字～800字，図，グラフ等は記載しないこと)

尿希釈濃縮は、腎臓の最も重要な働きであり、その中核をなすのが抗利尿ホルモン(AVP)である。抗利尿ホルモン V1a 受容体による V2 受容体を介した抗利尿作用の抑制をこれまで、単離尿細管を用いて示して来たが、今回は、promoter 活性の調節を介しているのかを検討するために、LLC-PK1 細胞を用いて V1a 受容体を恒常的に多量発現する cell line を我々は作成した。V2 受容体のプロモーターをラットの IMCD mRNA を用いて PCR クローニングし、luciferase reporter vector にサブクローニングし、このコンストラクトを先に作成した cell に一過性にトランスフェクションを行った。その後種々の濃度の AVP を細胞培養液中に加え、培養し、3-48 時間後に細胞のルシフェラーゼ活性を測定したところ、AVP の V1a 受容体の存在が、V2 受容体転写活性を抑制していることが判明した。この論文は、Am J Physiol Renal Physiol に掲載された。一つのホルモンの二つの受容体が、一つの細胞内で局在を異にして存在し、他方の受容体の転写活性を調節しているということを、初めて、我々は明らかにした。

また、脱水時に V2 受容体の発現が、予想とは逆に減少する事が知られていたが、それは、腎髄質でのプロスタグランディン産生によることを明らかにし、Am J Physiol Renal Physiol に掲載された。

V1a ノックアウトマウスでは、多量飲水時において顕著であるが、正常時や脱水時にも、wild タイプに比べて尿量が多い事が判明した。この事は、予想と逆であるが、V1a 受容体欠損では、新たなタイプも腎性尿崩症が起きている可能性が示唆され、きわめてすばらしい発見である。V1a 受容体の機能は、V2 受容体の抑制的な機能調節のみならず、促進的な機能調節にも関与している可能性が示唆された。引き続き、V1a, V2 受容体によるお互いの活性調節の機序から利尿機構の機序解明に迫っていきたい。

10. キーワード

(1)集合尿細管　(2)ヘンレの太い上行脚　(3)V2受容体

(4)V1a受容体　(5)抗利尿ホルモン　(6)プロモーター

(7)利尿　(8)V1aノックアウト

(裏面に続く)

11. 研究発表（印刷中も含む。）

〔雑誌論文〕　計（ 6 ）件

著者名	論文標題
Nonoguchi H, Nakayama Y, et al	Target haemoglobin concentrations in chronic kidney disease.

雑誌名	巻・号	発行年	ページ
Lancet	369	2007	1517

著者名	論文標題
Izumi Y, Nonoguchi H, et al	Downregulation of vasopressin V2 receptor promoter activity via V1a receptor pathway.

雑誌名	巻・号	発行年	ページ
Am J Physiol Renal Physiol.	292・5	2007	F1418-26

著者名	論文標題
Machida K, Nonoguchi H, et al.	Downregulation of the V2 vasopressin receptor in dehydration: mechanisms and role of renal prostaglandin synthesis.

雑誌名	巻・号	発行年	ページ
Am J Physiol Renal Physiol.	292・4	2007	F1274-82

著者名	論文標題
Matsuzaki T, Nonoguchi H, et al.	Downregulation of organic anion transporters in rat kidney under ischemia/reperfusion-induced acute renal failure.

雑誌名	巻・号	発行年	ページ
Kidney Int.	71・6	2007	539-47

著者名	論文標題
Naruse M, Nonoguchi H, et al.	A novel method for dry weight assessment in hemodialysis patients: utilization of inferior vena cava flat ratio to correct for individual variations in vessel diameter.

雑誌名	巻・号	発行年	ページ
Ther Apher Dial.	11・1	2007	42-8

著者名	論文標題
Nakayama Y, Nooguchi H, et al.	Long-term renoprotective effect of combination therapy with prostaglandin E1 and angiotensin-converting enzyme inhibitor in patients with chronic renal failure.

雑誌名	巻・号	発行年	ページ
Hypertens Res.	28・9	2006	733-9

〔図　書〕　計（ 0 ）件

著者名	出版社

書名	発行年	総ページ数

12. 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

計（ 0 ）件

工業所有権の名称	発明者	権利者	工業所有権の種類、番号	出願年月日	取得年月日

様 式 C－20

ABSTRACTS OF RESEARCH PROJECT, GRANT－IN－AID FOR SCIENTIFIC RESEARCH (C)

1. RESEARCH INSTITUTION NUMBER : 17401

2. RESEARCH INSTITUTION : Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences

3. CATEGORY : Scientific Research (C)

4. TERM OF PROJECT (2005 ～ 2006)

5. PROJECT NUMBER : 17590833

6. TITLE OF PROJECT : Functional analysis of antidiuretic hormone receptor using V1a knockout mice and invention of new diuretics.

7. HEAD INVESTIGATOR	REGISTERED NUMBER	NAME	INSTITUTION, DEPARTMENT,TITLE OF POSITION
	30218341	Hiroshi Nonoguchi	Kumamoto Univ., Dept of Nephrology, Associate Professor

8. INVESTIGATORS		REGISTERED NUMBER	AME	INSTITUTION, DEPARTMENT,TITLE OF POSITION
	(1)	40114772	Kimio Tomita	Kumamoto Univ., Dept of Nephrology, Professor
	(2)	〃	〃	〃
	(3)	〃	〃	〃
	(4)	〃	〃	〃
	(5)	〃	〃	〃

9. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

Vasopressin V(1a) and V(2) receptors (V(1a)R and V(2)R, respectively) distribute in the collecting duct of the kidney. Although the function of V(2)R mediating the antidiuretic effect of AVP has been investigated in detail, the role of V(1a)R in the collecting ducts has not been elucidated. In the present study, we have investigated the role of the V(1a)R pathway in V(2)R promoter activity. We cloned the 5'-flanking region of rat V(2)R (rV(2)R) and investigated rV(2)R promoter activity in the LLC-PK(1) cell line transfected to express rat V(1a)R (rV(1a)R) dominantly (LLC-PK(1)/rV(1a)R). AVP induced a transient increase, followed by a sustained decrease, of rV(2)R promoter activity in these cells. This AVP-induced decrease of rV(2)R promoter activity was inhibited by V(1a)R, but not V(2)R, antagonist. PMA mimicked this decrease of rV(2)R promoter activity. On the contrary, cpt-cAMP increased rV(2)R promoter activity. These PMA- and cpt-cAMP-induced effects were not observed on the deletion segment of the 5'-flanking region lacking CAAT and SP1 sites. In conclusion, 1) expression of the V(2)R is downregulated via the V(1a)R pathway in LLC-PK(1)/rV(1a)R cells, and 2) expression of the V(2)R is downregulated by the PMA-induced PKC pathway and upregulated by the cAMP-PKA pathway. These opposite effects of PKC and PKA appear to be regulated by the same promoter region of CAAT and SP1 (published in Am J Physiol.)

We also investigated the mechanisms of downregulation of V2 receptor in dehydration. Our results indicated that increased production of prostaglandin in renal medulla play a key role for the downregulation. The urine volume of V1a knockout mice was smaller than that of wild type, suggestting that V1a knockout mice show a new type of nephrogenic diabetic insipidus.

10. KEY WORDS

(1) V1a knockout mice (2) V1a receptor (3) V2 receptor

(4) arginine vasopressin (5) collecting ducts (6) medullary thick ascending limbs

(7) promoter (8) prostaglandin

(CONTINUE TO NEXT PAGE)

11. REFERENCES

AUTHORS , TITLE OF ARTICLE	JOURNAL, VOLUME·NUMBER,PAGES CONCERNED, YEAR

1: Nonoguchi H, Nakayama Y, Inoue T, Kohda Y, Tomita K. Target haemoglobin concentrations in chronic kidney disease. Lancet. 2007 May 5;369(9572):1517.

2: Naruse M, Sakaguchi S, Nakayama Y, Nonoguchi H, Tomita K. A novel method for dry weight assessment in hemodialysis patients: utilization of inferior vena cava flat ratio to correct for individual variations in vessel diameter. Ther Apher Dial. 2007 Feb;11(1):42-8.

3: Matsuzaki T, Watanabe H, Yoshitome K, Morisaki T, Hamada A, Nonoguchi H, Kohda Y, Tomita K, Inui K, Saito H. Downregulation of organic anion transporters in rat kidney under ischemia/reperfusion-induced qacute renal failure. Kidney Int. 2007 Mar;71(6):539-47.

4: Izumi Y, Nakayama Y, Mori T, Miyazaki H, Inoue H, Kohda Y, Inoue T, Nonoguchi H, Tomita K. Downregulation of vasopressin V2 receptor promoter activity via V1a receptor pathway. Am J Physiol Renal Physiol. 2007 May;292(5):F1418-26.

5: Machida K, Wakamatsu S, Izumi Y, Yosifovska T, Matsuzaki T, Nakayama Y, Kohda Y, Inoue T, Saito H, Tomita K, Nonoguchi H. Downregulation of the V2 vasopressin receptor in dehydration: mechanisms and role of renal prostaglandin synthesis. Am J Physiol Renal Physiol. 2007 Apr;292(4):F1274-82.

6: Wakida N, Kitamura K, Tuyen DG, Maekawa A, Miyoshi T, Adachi M, Shiraishi N, Ko T, Ha V, Nonoguchi H, Tomita K. Inhibition of prostasin-induced ENaC activities by PN-1 and regulation of PN-1 expression by TGF-beta1 and aldosterone. Kidney Int. 2006 Oct;70(8):1432-8.

7: Shiraishi N, Kitamura K, Miyoshi T, Adachi M, Kohda Y, Nonoguchi H, Misumi S, Maekawa Y, Murayama T, Tomita M, Tomita K. Successful treatment of a patient with severe calcific uremic arteriolopathy (calciphylaxis) by etidronate disodium. Am J Kidney Dis. 2006 Jul;48(1):151-4.

8: Shimada H, Kitamura K, Anraku M, Miyoshi T, Adachi M, Tuyen DG, Wakamatsu S, Nonoguchi H, Tanaka M, Tomita K. Effect of telmisartan on ambulatory blood pressure monitoring, plasma brain natriuretic peptide, and oxidative status of serum albumin in hemodialysis patients. Hypertens Res. 2005 Dec;28(12):987-94

9: Nakayama Y, Nonoguchi H, Kiyama S, Kohda Y, Inoue T, Tomita K. Long-term renoprotective effect of combination therapy with prostaglandin E1 and angiotensin-converting enzyme inhibitor in patients with chronic renal failure. Hypertens Res. 2005 Sep;28(9):733-9.

10: Sakuma Y, Nonoguchi H, Takayama M, Yang T, Terada Y, Inoue T, Nakayama Y, Kohda Y, Sasaki S, Tomita K. Differential effects of hyperosmolality on Na-K-ATPase and vasopressin-dependent cAMP generation in the medullary thick ascending limb and outer medullary collecting duct. Hypertens Res. 2005 Aug;28(8):671-9.

11: Tanaka M, Ohashi T, Kobayashi M, Eto Y, Miyamura N, Nishida K, Araki E, Itoh K, Matsushita K, Hara M, Kuwahara K, Nakano T, Yasumoto N, Nonoguchi H, Tomita K. Identification of Fabry's disease by the screening of alpha-galactosidase A activity in male and female hemodialysis patients. Clin Nephrol. 2005 Oct;64(4):281-7.

12: Miyazaki H, Anzai N, Ekaratanawong S, Sakata T, Shin HJ, Jutabha P, Hirata T, He X, Nonoguchi H, Tomita K, Kanai Y, Endou H. Modulation of renal apical organic anion transporter 4 function by two PDZ domain-containing proteins. J Am Soc Nephrol. 2005 Dec;16(12):3498-506.

13: Anzai N, Jutabha P, Enomoto A, Yokoyama H, Nonoguchi H, Hirata T, Shiraya K, He X, Cha SH, Takeda M, Miyazaki H, Sakata T, Tomita K, Igarashi T, Kanai Y, Endou H. Functional characterization of rat organic anion transporter 5 (Slc22a19) at the apical membrane of renal proximal tubules. J Pharmacol Exp Ther. 2005 Nov;315(2):534-44.

14: Wakida N, Tuyen DG, Adachi M, Miyoshi T, Nonoguchi H, Oka T, Ueda O, Tazawa M, Kurihara S, Yoneta Y, Shimada H, Oda T, Kikuchi Y, Matsuo H, Hosoyamada M, Endou H, Otagiri M, Tomita K, Kitamura K. Mutations in human urate transporter 1 gene in presecretory reabsorption defect type of familial renal hypouricemia. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Apr;90(4):2169-74.