

ラット腎臓におけるエンドセリンの免疫組織化学的研究

滋賀医科大学泌尿器科学教室 (主任: 友吉唯夫教授)

尾松 操, 友吉 唯夫

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON ENDOTHELIN IN RAT KIDNEY

Sou OMATSU and Tadao TOMOYOSHI

From the Department of Urology, Shiga University of Medical Science

To elucidate the role of endothelin (ET) in the kidney, we immunohistochemically examined the precise distribution of various forms of ET-peptides in the rat kidney, using specific polyclonal antibodies to each precursor (Big ET-1, Big ET-2 and Big ET-3), and anti-mature ET antibodies. Immunoreactivity of Big ET-1 was localized mainly in some vascular endothelial cells, glomerular mesangial cells and epithelial cells of proximal tubules in the renal cortex and inner-medullary collecting ducts. The distribution of immunoreactivity for mature ETs was similar to those of Big ET-1. These observations suggest that mature ET-1 after conversion from Big ET-1 is secreted from these cells. Since similar findings were obtained using anti-Big ET-2 and anti-Big ET-3 antibodies, these two isopeptides are also considered to have certain physiological actions in the kidney. Immunohistochemical studies for ET-A receptor were also performed. The distribution of this receptor was similar to those of Big ETs and mature ETs. This suggests that secreted ET acts on adjacent cells in an autocrine/paracrine manner in the kidney.

(Acta Urol. Jpn. 43: 109-114, 1997)

Key words: Endothelin, Receptor, Rat, Kidney, Immunohistochemistry

緒 言

エンドセリン (endothelin: ET) は強力かつ持続的な血管平滑筋収縮作用を有する血管内皮由来のペプチドとして同定された¹⁾ ET はアミノ酸配列と薬理活性が異なる3種のイソペプチド (ET-1, ET-2 と ET-3) からなるファミリーを構成している。これらは21アミノ酸からなり、その配列は環状部分で一部異なるが直鎖部分は共通で、動物種差はきわめて少ない。それぞれの成熟ペプチド (mature endothelin: mET) は、それぞれの前駆体ペプチド (Big ET-1, Big ET-2 と Big ET-3) から変換酵素によりC端側ペプチドが切断されてできあがる。ただし mET になってから分泌されるのか、分泌後 Big ET から mET への変換がおこるのかはよくわかっていない。

ET は当初血管内皮細胞から分泌される心血管系の調節因子として発見された¹⁾ その後の研究で腎臓、腸管、副腎、脳、肺など多種にわたる臓器にその存在が確認されてきた。これら ET ファミリーの遺伝子発現には組織特異性があり、種々の組織で広範に生理活性を有することも明らかにされてきた。とくに最近では、心血管収縮調節因子としてのみならず、細胞の増殖・分化や形態形成を調節する、いわゆる cytokine/growth factor としての役割も注目されている²⁾

ET 受容体は哺乳類ではA型とB型の2種類が知られており、いずれも膜を7回貫通するGタンパク質共役型の受容体である。A型受容体 (ET-AR) は、 $ET-1 \geq ET-2 \gg ET-3$ という親和性序列をもち、血管では平滑筋に多く発現することから、おもに血管の収縮に関与していると考えられている。一方、B型受容体 (ET-BR) は、3種類のイソペプチドにほぼ等しい親和性をもっているが、ET-1 に対する親和性は両受容体ともほぼ等しい。

今回の研究ではラット腎臓をもちい、前駆体である各 Big ET、成熟型ペプチド (mETs) および受容体 (ET-AR) という3段階のレベルでの発現を、免疫組織化学的手法により検討し、腎臓におけるエンドセリンの組織学的局在を明らかにするとともに、ET の分泌と作用機構につき考察した。

対 象 と 方 法

成熟雄性的のウイスター系ラットを sodium pentobarbital (50 mg/kg) の腹腔内投与で麻酔したのち、4%ホルムアルデヒド緩衝溶液で灌流固定した。両腎を摘出し、短軸方向に割を施したのち、同じ組成の固定液に24時間浸漬した。さらにゼラチン包埋したのち、凍結切片を作成した。切片は0.3% H₂O₂ にて内因性 peroxidase 活性を失活させてから1次抗体と反応させた。この1次抗体として抗 Big ET-1、抗 Big

ET-2, 抗 Big ET-3, 抗 mETs および抗 ET-AR 抗体をもちい, それぞれと120時間反応させたのち, Vector 社の Vectastain キットをもちいた ABC-peroxidase 法にて検出し, 3, 3'-diaminobenzidine にて発色させた. さらにヘマトキシリンで対比染色もおこなった. なお抗 mETs, 抗 ET-AR の両抗体は滋賀医科大学解剖学第二講座・山田久夫助教授から提供を受けた^{2,3)}. 抗 mETs ポリクローナル抗体は, ETs のC末端を覆うかたちで認識するため, イソペプチドの区別は不可能であるが, 前駆型の Big ET はまったく認識しないので, 生理活性を有する mETs のみを認識することになる. また抗 ET-AR は, C末端の64アミノ酸を認識するポリクローナル抗体である. 抗 Big ET-1, 抗 Big ET-2 と抗 Big ET-3 抗体はペプチド研究所 (大阪) のものを購入し使用した. これらのポリクローナル抗体は, 切り落とされるC端側ペプチド部 (3者でアミノ酸配列が著しく異なる部分) を認識している. なお, 抗原となるペプチドを加えた抗体液にてラット腎臓の切片を染色したところ, 加えるペプチドの量に応じて染色性が低下し, 10 μ M の添加で完全に反応が認められなくなった. すなわち, これらの抗体をもちいた免疫組織化学法は吸収テストに合格していることになる.

結 果

Big ET

抗 Big ET 抗体に対して一部の血管内皮細胞が陽性を呈していた. 糸球体内では Big ET-1 に強陽性を示すメサンギウム細胞が認められたが, この染色程度は糸球体間や個体間でばらつきが多く, 弱陽性のものも存在していた (Fig. 1a). しかし抗 Big ET-2 と抗 Big ET-3 に対しては常に弱陽性であった.

皮質部近位尿細管のほとんどの上皮細胞は陽性を呈していた (Fig. 1a). 皮質部遠位尿細管 (Fig. 1a), 髓質外帯部集合管 (Fig. 1b), 髓質内帯部集合管 (Fig. 1c) の上皮細胞にも陽性反応を認めた. 髓質内帯部集合管細胞は約半数が強陽性で, 陽性反応を示さない集合管の間に索状に配列していた (Fig. 1c). 乳頭部集合管上皮細胞は弱陽性反応を呈していた (Fig. 1d). これらの所見に, イソペプチドの違いによる分布の差異は特に認められなかったが, Big ET-1 や Big ET-3 に比し, Big ET-2 がより染色されやすい傾向を有していた.

mETs

血管内皮細胞の一部以外では, 糸球体メサンギウム細胞が中等度～強陽性反応を呈していた (Fig. 2a). 一方, 皮質部近位尿細管の上皮細胞は陽性であった (Fig. 2a). 皮質部遠位尿細管 (Fig. 2a), 髓質外帯部集合管 (Fig. 2b) と乳頭部集合管 (Fig. 2d) の上皮

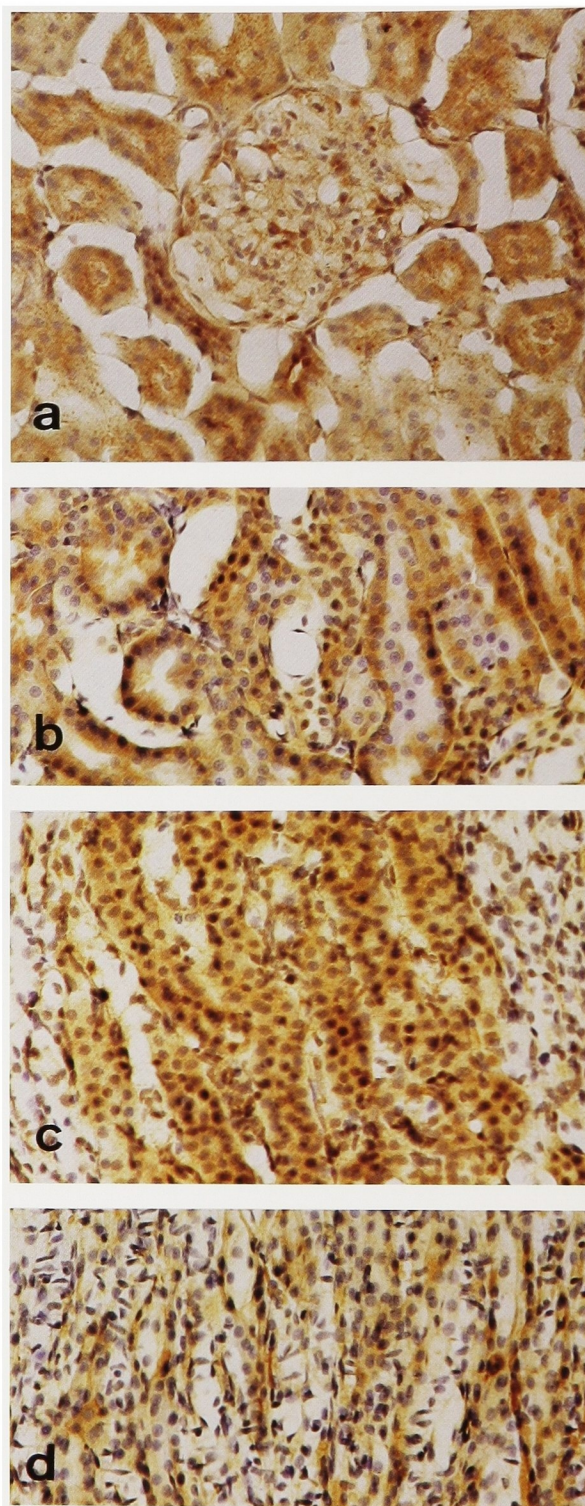


Fig. 1. Photomicrographs show coronal sections of a rat kidney, after immunostaining with anti-Big ET-1 antibodies. Cells with positive immunoreactivity are stained dark brown. a: cortical zone, b: outer zone of medulla, c: inner zone of medulla, d: medullary papilla. a-d: $\times 200$

細胞は弱～中等度の陽性反応を呈していた. 髓質内帯部集合管の上皮細胞も約半数が強陽性であった (Fig. 2c). 糸球体や尿細管系における染色パターンは, Big ETs の場合と同様であった.

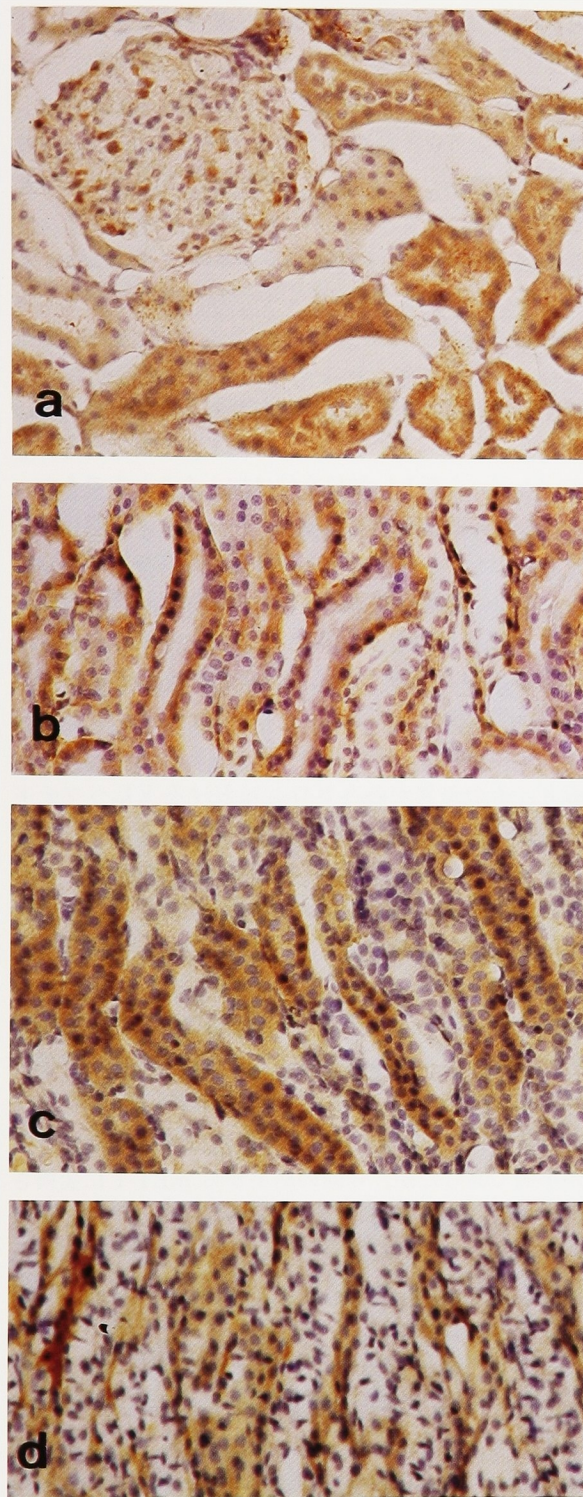


Fig. 2. Photomicrographs show coronal sections of a rat kidney, after immunostaining with anti-mature ET antibodies. Cells with positive immunoreactivity are stained dark brown. a: cortical zone, b: outer zone of medulla, c: inner zone of medulla, d: medullary papilla. a-d: $\times 200$

ET-AR

ET-AR の分布は Big ETs の場合や mETs の場合と基本的に同じであった。すなわち皮質部近位尿細管の上皮細胞のほぼすべてが陽性を示し (Fig. 3a), 皮

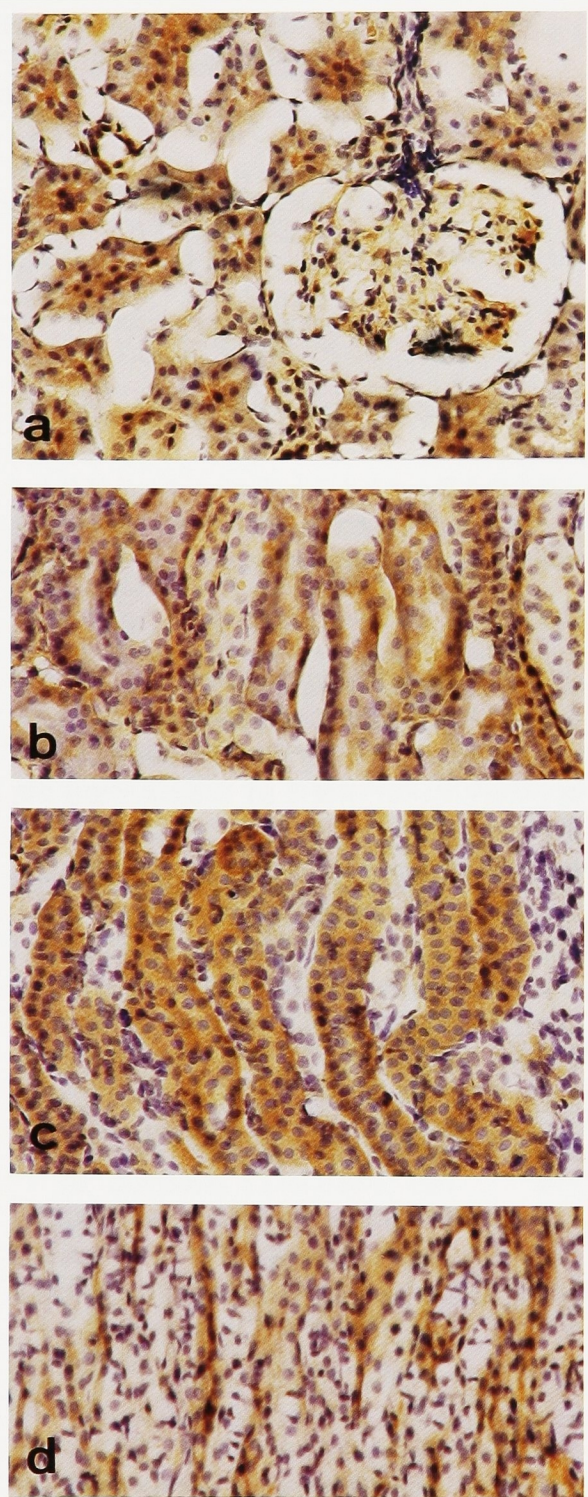


Fig. 3. Photomicrographs show coronal sections of a rat kidney, after immunostaining with anti-ET-AR antibodies. Cells with positive immunoreactivity are stained dark brown. a: cortical zone, b: outer zone of medulla, c: inner zone of medulla, d: medullary papilla. a-d: $\times 200$

質部遠位尿細管 (Fig. 3a), 髄質外帯部集合管 (Fig. 3b) および乳頭部集合管 (Fig. 3d) の上皮細胞には弱陽性反応が認められた。約半数の髄質内帯部集合管の上皮細胞も陽性を呈していた (Fig. 3c)。糸球体で

Table 1. The distribution of Big ET-1, Big ET-2, Big ET-3, mature ETs (mETs) and ET-A receptor (ET-AR) in the rat kidney

	Big ET-1	Big ET-2	Big ET-3	mETs	ET-AR
Mesangial Cell	±~++	±~+	±~+	+~++	±
Proximal Tubule in Cortex	+	+	+	+	+
Distal Tubule in Cortex	±~+	±~+	±~+	±~+	±~+
Outer Medullary Collecting Duct	+	±	±	±	±
Inner Medullary Collecting Duct	-~++	-~++	-~++	-~++	-~++
Papillary Duct	+	±~+	±~+	+	±~+

(++): strongly positive, (+): positive, (±): slightly positive, (-): negative

は弱陽性の反応産物が散見されただけであった (Fig. 3a).

以上の結果をまとめると Table 1 のようになる。なお染色の濃淡により強陽性 (++)、中等度陽性 (+)、弱陽性 (±) および陰性 (-) に分類した。

考 察

エンドセリン (ET) のイソペプチドによる組織特異性は、各 ET の生理的役割の相違を反映していると考えられ、このペプチドの局所調節因子としての役割を示唆している。腎臓は ET にきわめて密接な関係をもつ臓器のひとつであり、とくに ET-1 は昇圧作用のほかにも少量で腎血管収縮作用を有し、腎血管抵抗の増減により糸球体濾過量に変化をおよぼすと考えられている⁴⁾。さらに最近の報告では、腎疾患における ET の病態生理学的役割が注目されており、ET が腎不全⁵⁻⁷⁾や腎移植後の急性拒絶反応⁷⁾などにも関与していると推測されている。また、腎臓における嚢胞形成にさいし、尿細管細胞の増殖因子、さらには嚢胞内分泌促進因子のひとつとしての ET が注目されている⁸⁾。

ラット腎臓における ET の存在については ET-1 についてよく検討されている。¹²⁵I-ET-1 をもちいた in vivo autoradiography では、糸球体の内皮細胞とメサンギウム細胞にその取り込みを認めている⁹⁾。Big 型か mature 型かの区別はできないが ET-1 に特異的なポリクローナル抗体をもちいると、皮質・髄質・乳頭部に陽性反応がみられ、とくに乳頭管が強陽性を示し、次いで糸球体のメサンギウム細胞や尿細管に陽性反応を認めたとの報告もある¹⁰⁾。また RT-PCR 法により、糸球体と髄質内帯部集合管に ET-1 mRNA の発現を認め¹¹⁾、腎臓ではおもに糸球体と髄質内帯部集合管で ET-1 が産生されと考えられるようになった。さらに培養細胞をもちいた研究からも、血管平滑筋細胞¹²⁾、メサンギウム細胞¹³⁾および尿細管上皮細胞¹⁴⁾が ET-1 を産生すると考えられている。Big ET-1 と mETs がおもに糸球体、尿細管上皮細胞、髄質内帯部集合管上皮細胞に分布しているという今回の免疫組織化学的所見は、これまでの報告に矛盾

せず、さらにより詳細な分布が判明したことになる。また他のイソペプチド、とくに ET-2 も腎で利用されているという新しい知見を付け加えることもできた。しかし今回の結果では糸球体メサンギウム細胞は陽性であったものの糸球体間や個体間でばらつきがみられた。また、髄質内帯部集合管上皮細胞では陽性のものと非陽性のものがみられた。これらの理由としては (1) ET は半減期が短く、ET を有するすべての細胞が同時に染色されるとはかぎらないこと (2) ネフロンは常時機能しているのではなく、休止中のものもあり、その差異が各ネフロンにおける ET ペプチドの含量の差に反映している可能性が考えられる。

Big ET-1 を mET-1 に変換する endothelin converting enzyme (ECE) は、膜結合型金属プロテアーゼの一種で、腎臓にもその存在が知られている¹⁵⁾。血中には mET-1 よりもその前駆体である Big ET-1 が数倍多く存在しているが、Big ET/mET の変換効率は臓器によって異なっているとされている。腎臓では、Big ET-1 として分泌されたのち mET-1 に変換されるのか、mET-1 に変換されてから分泌されるのか不明であったが、今回の結果から mET-1 に変換されたのち分泌されることが明らかとなった。ET-2 と ET-3 についても同様と推定されるが、ET-2 と ET-3 に対する ECE はまだ同定されておらず、今後さらなる検討が必要である。

ラット腎臓における ET 受容体に関しては、ET-AR と ET-BR の両方が存在するとされている。¹²⁵I-ET-1 による in vitro autoradiography では、糸球体、髄質内帯部、直細血管束にその結合が認められている¹⁶⁾が、この方法では A 型と B 型の区別ができない。ET-AR に関して考察すると、RT-PCR 法をもちいて、ET-AR mRNA が糸球体、直細血管束、弓状動脈に認められている¹⁷⁾。また in situ RT-PCR 法では、ET-AR は髄質外帯部および内帯部の直細血管束周囲の間質細胞に発現していたとされている¹⁸⁾。さらに培養メサンギウム細胞においても、ET-AR の存在が薬理的に確認されている¹⁹⁾。今回の研究実験段階では抗 ET-BR 抗体の入手が不可能であったため、ET-BR の分布に関しては検索できなかったが、

本研究により ET-AR の分布が組織学的に詳細に判明した。

血中 ET-1 濃度は 1 pg/ml と低く, かつ半減期が短いこと, ET の分布と ET 受容体の分布が多くの器官で一致することを考慮すると, ET は循環ホルモンとしてではなく, 局所ホルモンとして autocrine または paracrine という様式で作用している可能性が高い。今回の結果では, ラット腎臓において Big ET や mET と ET-AR の分布がほぼ一致していることから, 腎臓においても局所ホルモンとして autocrine/paracrine 様式で作用していることを支持する所見であった。

ET は endothelin degradation enzyme (EDE) により代謝される。EDE の発現は腎臓や肺で確認されていて, その活性および ET-1 のクリアランスは, 肺より腎臓のほうが高い²⁰⁾。腎臓は ET の生成および作用の場であるだけでなく, ET の代謝にも深くかわる主要な臓器であるといえる。近年ヒト尿中 ET の測定が RIA 法により可能となった。尿中の ET-1 はおもに尿管管に由来しており, 腎疾患患者では尿中に ET-1 が多量に排泄されているため, 腎障害の指標になりうるとの報告がある²¹⁾。腎不全では血中 ET-1 の上昇が認められる⁵⁻⁷⁾が, ET-1 のクリアランス低下あるいはその合成促進を反映しているのか, また ET-1 の作用の増強があるのかはまだ明らかではない。今後 ET がさまざまな病態とどのように深くかわっているか解明していくためにも, ECE や EDE を含め, さらなる検討が必要である。

結 語

1) エンドセリン (ET) の前駆体である Big ET-1 は血管内皮細胞のほか, 糸球体や尿管管系に存在し, 従来の報告が追認されるとともに, より詳細な組織学的分布が明らかとなった。

2) 同じ細胞が ET の成熟体である mature ET をも有することから, 糸球体や尿管管系で ET-1 の合成が行われ, mature peptide に変換されてから分泌されることが明らかとなった。

3) ET-2 や ET-3 もほぼ同じ細胞が染色され, 腎臓では他のイソペプチド群も利用されていることが判明した。

4) A 型受容体もほぼ同じ細胞に認められることから, ET は腎臓でも局所ホルモンとして autocrine/paracrine 様式で作用している可能性が示唆された。

本研究は滋賀医科大学附属実験実習機器センターおよび同解剖学第二講座 (主任: 越智淳三教授) の設備・機器を利用しておこなった。ここに心からの謝意を表します

本論文の要旨は, 第48回日本泌尿器科学会西日本総会で報

告した。また本研究の一部は文部省科学研究費奨励研究 A (No. 07771296) の援助を受けておこなわれた。

文 献

- 1) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**: 411-415, 1988
- 2) Yamada H and Ochi J: Histochemical and functional aspects on the "brain-vascular peptides" *J Anat (Tokyo) (Kaibogaku Zasshi)* **70**: 422-435, 1995
- 3) Yamada H, Kurokawa K, Nishimura T, et al.: Histochemical studies on endothelin, a brain-vascular peptide. I. Strategy to analyze its distribution and function. *Acta Histochem Cytochem* **29** (Suppl.): 429-430, 1996
- 4) Badr KF, Murray JJ, Breyer MD, et al.: Mesangial cell, glomerular and renal vascular responses to endothelin in the rat kidney. Elucidation of signal transduction pathways. *J Clin Invest* **83**: 336-342, 1989
- 5) Tomita K, Ujiie K, Nakanishi T, et al.: Plasma endothelin levels in patients with acute renal failure. *N Engl J Med* **321**: 1127, 1989
- 6) Stockenhuber F, Gottsauner-Wolf M, Marosi L, et al.: Plasma levels of endothelin in chronic renal failure and after renal transplantation: impact on hypertension and cyclosporin A-associated nephrotoxicity. *Clin Sci* **82**: 255-258, 1992
- 7) 増井則昭, 熊野和雄, 真下節夫, ほか: 腎移植後早期における血中エンドセリン動態. *日泌尿会誌* **85**: 1622-1628, 1994
- 8) 中村 司, 富野康日己: 嚢胞腎における遺伝子発現. *泌尿器外科* **7**: 1017-1022, 1994
- 9) Furuya S, Naruse S, Nakayama T, et al.: Effect and distribution of intravenously injected ¹²⁵I-endothelin-1 in rat kidney and lung examined by electron microscopic radioautography. *Anat Embryol* **185**: 87-96, 1992
- 10) Wilkes BM, Susin M, Mento PF, et al.: Localization of endothelin-like immunoreactivity in rat kidneys. *Am J Physiol* **260**: F913-F920, 1991
- 11) Ujiie K, Terada Y, Nonoguchi H, et al.: Messenger RNA expression and synthesis of endothelin-1 along rat nephron segments. *J Clin Invest* **90**: 1043-1048, 1992
- 12) Resink TJ, Hahn AWA, Scott-Burden T, et al.: Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **168**: 1303-1310, 1990
- 13) Sakamoto H, Sasaki S, Hirata Y, et al.: Production of endothelin-1 by rat cultured mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **169**: 462-468, 1990
- 14) Shichiri M, Hirata Y, Emori T, et al.: Secretion of

- endothelin and related peptides from renal epithelial cell lines. *FEBS Lett* **253**: 203-206, 1989
- 15) Fujita K, Matsumura Y, Kita S, et al.: Phosphoramidon-sensitive conversion of Big endothelin-1 and degradation of endothelin-1 in rat kidney. *Hypertension* **24**: 227-233, 1994
- 16) Kohzuki M, Johnston CI, Chai SY, et al.: Localization of endothelin receptors in rat kidney. *Eur J Pharmacol* **160**: 193-194, 1989
- 17) Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, et al.: Different localization of two types of endothelin receptor mRNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription and polymerase chain reaction assay. *J Clin Invest* **90**: 107-112, 1992
- 18) Chow LH, Subramanian S, Nuovo GJ, et al.: Endothelin receptor mRNA expression in renal medulla identified by in situ RT-PCR. *Am J Physiol* **269**: F449-F457, 1995
- 19) Kohno M, Horio T, Yokokawa K, et al.: Endothelin modulates the mitogenic effect of PDGF on glomerular mesangial cells. *Am J Physiol* **266**: F894-F900, 1994
- 20) Edano T, Arai K, Ohshima T, et al.: Purification and characterization of endothelin-1 degradation activity from porcine kidney. *Biol Pharmacol Bull* **17**: 379-382, 1994
- 21) Ohta K, Hirata Y, Shichiri M, et al.: Urinary excretion of endothelin-1 in normal subjects and patients with renal disease. *Kidney Int* **39**: 307-311, 1991

(Received on October 7, 1996)

(Accepted on December 4, 1996)