

高血圧自然発症ラットの腎 20-hydroxyeicosatetraenoic acid 産生におけるアンドロゲンの役割

石塚 恒夫^{*1} 伊藤 修^{*2} 尾股 健^{*3} 伊藤 貞嘉^{*1}

Role of androgens in the renal production of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid
in spontaneously hypertensive rats

Tsuneo ISHIZUKA^{*1}, Osamu ITO^{*2}, Ken OMATA^{*3}, and Sadayoshi ITO^{*1}

^{*1}Division of Nephrology, Endocrinology and Vascular Medicine, Department of Medicine,

^{*2}Department of Internal Medicine and Rehabilitation Science, Tohoku University Graduate School of Medicine,

^{*3}Health Administration Center, Miyagi University of Education, Miyagi, Japan

The role of androgens in the production of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) was determined in the kidney of spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY). The renal production of 20-HETE and blood pressure were higher in males than in females at 9 weeks of age. The renal production of 20-HETE was significantly greater in male SHR than in male WKY, whereas it was significantly lower in female SHR than in female WKY. The differences in the renal production of 20-HETE were consistent with the cytochrome P-450 4A protein levels. Plasma free-testosterone levels in male SHR were twice as high as those in male WKY. Castration and treatment with the androgen receptor antagonist, flutamide, reduced blood pressure, the renal production of 20-HETE, and P-450 4A protein levels in both strains. The renal production of 20-HETE was significantly lower in castrated SHR than in castrated WKY. These results indicate that the renal production of 20-HETE and the expression of P-450 4A have gender and strain-differences, and high levels of plasma androgens induce the expression of P-450 4A and the production of 20-HETE in the kidney of male SHR. The androgen-induced production of 20-HETE may be associated with hypertension in male SHR.

Jpn J Nephrol 2004 ; 46 : 685-692.

Key words : 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, cytochrome P-450 4A, spontaneously hypertensive rats, gender, androgen

緒 言

20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) は、腎細動脈、糸球体、尿細管において産生される主要なアラキドン酸代謝物であり、腎血行動態、尿細管イオン輸送において重要な役割を担っている¹⁾。20-HETE は、近位尿細管において $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ や水再吸収を抑制し、ヘンレループの太い上行脚において NaCl 輸送を抑制する。また、20-HETE は腎細動脈において血管収縮作用を有す

る。20-HETE 産生の障害は、腎皮質および髄質血流を増加させ、腎血流自動調節能や尿細管-糸球体フィードバックを抑制する。20-HETE はチトクローム P-450 4A ファミリーの酵素系により産生される¹⁾。ラットでは P-450 4A1, 4A2, 4A3, 4A8 の4種類の isoform が現在までにクローニングされている。これらすべての isoform はラット腎臓に発現しているが、なかでも P-450 4A2 が尿細管や輸入細動脈に最も高く発現している²⁾。

高血圧自然発症ラット (SHR) の腎 20-HETE 産生量は対

^{*1} 東北大学大学院医学系研究科腎・高血圧・内分泌学, ^{*2} 同 内部障害学, ^{*3} 宮城教育大学保健管理センター (平成 16 年 7 月 23 日受理)

照の Wistar-Kyoto ラット (WKY) の産生量と比べて、5～11 週齢の成熟期において亢進している³⁾。この SHR の腎 20-HETE 産生の亢進は、P-450 4A2 mRNA 発現や P-450 4A 蛋白発現の増加による^{4,5)}。P-450 阻害薬や P-450 4A アンチセンスの投与が SHR の血圧を低下させることから⁶⁻⁸⁾、20-HETE が SHR の血圧調節で重要な役割を果たすことが示唆されている。しかし、SHR と Brown Norway ラットとの交配による F2 世代を用いた cosegregation 解析では、SHR の P-450 4A 遺伝子は血圧レベルに関連せず⁹⁾、別の何らかの因子が介在して SHR の腎臓で P-450 4A 発現や 20-HETE 産生を誘導していると考えられる。

ところで、SHR では WKY に比べて成熟早期から血漿 testosterone 濃度の上昇が認められる¹⁰⁾。また、P-450 4A2 は雌に比べて雄に高く発現しており、その機序はアンドロゲンによる誘導であることが明らかになっている^{11,12)}。したがって、雄 SHR において成熟早期から増加している血漿アンドロゲンが P-450 4A 発現や 20-HETE 産生を誘導し、さらに、このアンドロゲンによる 20-HETE 産生の誘導が SHR の高血圧の発症に関与している可能性がある。そこで、SHR の腎 20-HETE 産生におけるアンドロゲンの役割を明らかにするため、本研究は SHR と WKY における血圧と腎 20-HETE 産生の性差、さらに血圧と腎 20-HETE 産生に対する去勢やアンドロゲン拮抗薬の影響を検討した。

方 法

1. 動 物

5 週齢の雌雄の SHR/Izm と WKY/Izm を日本 SLC より入手し、東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設で 4 週間飼育した。一部の雄 SHR と WKY には 5 週齢で去勢手術、もしくはアンドロゲン拮抗薬である flutamide (日本化薬、50 mg/kg/日) の経口投与を開始して、4 週間後に実験に用いた。血圧は、小動物自動血圧測定装置 (ウェダ製作所、UR-5000) を用いて tail-cuff 法により測定した。すべてのプロトコールは東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を得て、動物実験取り扱い指針に則して遂行した。

2. 血漿 testosterone 濃度の測定と腎ミクロゾーム分画の調整

ペントバルビタール (50 mg/kg, ip) 麻酔後、ラットを断頭、血液を採取し、血漿 free-testosterone 濃度をラジオイ

ムノアッセイ法により測定した。また、腹部を正中切開し、腎動脈を切断して両側の腎臓を素早く取り出し、腎皮質を 250 mM ショ糖、1 mM EDTA、0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.7) でホモジナイズした。ホモジネートを 3,000 g で 5 分間遠心し、その上清を 9,000 g で 15 分間、続いて 100,000 g で 1 時間遠心した。沈殿したミクロゾーム分画を 30 % グリセロール、1 mM dithiothreitol (DTT)、0.1 mM PMSF を含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.25) に溶解した。サンプルの蛋白濃度は、Bradford 比色法 (Bio-Rad Laboratories) によりウシ γ グロブリンを標準として測定した。腎ミクロゾームは液体窒素で凍結し、20-HETE 産生量の測定やイムノブロットの実験まで -80°C で保存した。

3. 20-HETE 産生量の測定

腎 20-HETE 産生量は、既報の方法¹³⁾ により測定した。腎ミクロゾーム蛋白 (250 μg) を 10 μM アラキドン酸と 1 mM NADPH の存在下で 30 分間、 37°C で 100 mM リン酸カリウム緩衝液 1 ml (pH 7.4) 中でインキュベートした。0.1 M 塩酸により緩衝液の pH を 4.0 とした後、内部標準として 1 μM cis-10-heptadecenoic acid (Sigma) を加え、アラキドン酸代謝物を 3 ml の酢酸エチルで 2 回抽出し、窒素気流下で乾固した。乾固したサンプルに蛍光試薬 36.4 mM 2-(2,3-naphthalimino) ethyl trifluoromethanesulfonate (Molecular Probe) 20 μl と触媒 N,N-diisopropylethylamine (Sigma) 10 μl を加え、30 分間室温で反応させた。反応終了後、サンプルを 40 % アセトニトリル 1 ml に溶解し、SEP-PAK C₁₈ カートリッジカラム (Waters) に注入した。未反応の蛍光試薬を除去するため、50 % アセトニトリル 5 ml でカラムを洗浄し、酢酸エチル 500 μl でカラムから蛍光ラベルされたサンプルを溶出した。これを窒素気流下で乾固し、メタノール 100 μl に溶解し、その 20 μl を移動相 メタノール/水/酢酸 (85/15/0.1)、流速 1.1 ml/分の条件で C₁₈ カラム (Waters) を用いた逆相 HPLC 法により分離した。サンプルの蛍光強度を蛍光検出器 (島津製作所) により持続的に記録し、ピーク面積を内部標準の面積と比較することにより、20-HETE を定量した。

4. イムノブロット法

P-450 4A と内部標準である β -actin の蛋白発現は、イムノブロット法により検討した。腎ミクロゾーム蛋白 (20 μg) を 10×20 cm, 8.5 % sodium dodecyl sulfate ポリアクリルアミドゲルで 150 V, 1.5 時間の電気泳動により分離し、さらにニトロセルロース膜に電気泳動により移動させ

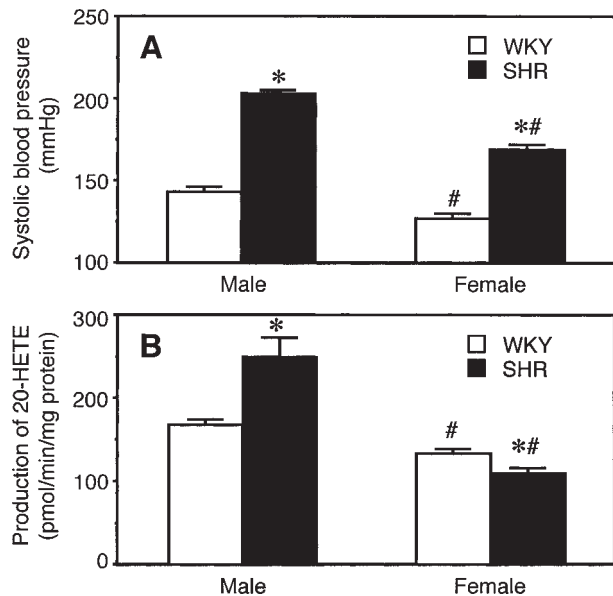


Fig. 1 Gender and strain-differences in systolic blood pressure (A), and renal production of 20-HETE (B) in 9-week-old rats

Values are presented as mean $\pm$ standard error from 6 rats. *Significant difference ($p < 0.05$) from the corresponding value in WKY. #Significant difference ($p < 0.05$) from the corresponding value in male rats.

た。この膜を P-450 4A1, 4A2, 4A3 isoform を認識するラット P-450 4A1 に対するヤギポリクローナル抗体(第一化学, 2,000 倍希釈)と 2 時間インキュベートし, さらに horseradish peroxidase を結合した 2 次抗体 (Santa Cruz, 4,000 倍希釈) と 1 時間インキュベートした。また, マウス抗 β -actin モノクローナル抗体 (Sigma, 4,000 倍希釈) と 1 時間インキュベートし, さらに horseradish peroxidase を結合した 2 次抗体 (Santa Cruz, 4,000 倍希釈) と 1 時間インキュベートした。イムノブロットを ECL キット (Amersham) により発光させ, それを X 線フィルムに記録し, P-450 4A 蛋白については 50~52-kD のバンドを, β -actin については 43-kD のバンドを検討した。

5. 統計学的検定

データは平均 $\pm$ 標準誤差として表記した。平均値の有意差は分散分析 (ANOVA) および Duncan 多変量解析を用いて検定した。 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

結 果

1. SHR と WKY の血圧と腎 20-HETE 産生量における性差

9 週齢における収縮期血圧は, 雌雄ともに SHR で

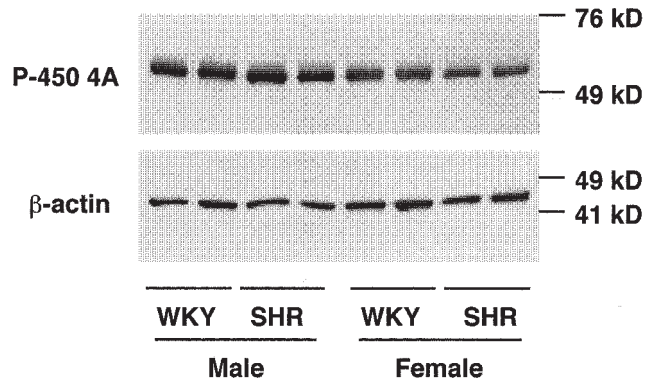


Fig. 2 Strain-differences in the expression of P-450 4A protein in the kidney of males and females

Each lane was loaded with microsomes (20 μ g) prepared from the renal cortex of 9-week-old WKY and SHR.

WKY に比べて高く, 両系統ともに雄の収縮期血圧が雌の血圧に比べて高かった (SHR: 203 ± 2 vs. 169 ± 3 mmHg, $p < 0.01$, WKY: 143 ± 3 vs. 130 ± 3 mmHg, $p < 0.01$) (Fig. 1A)。腎 20-HETE 産生は, 雄 SHR では雄 WKY に比べて亢進していた (247 ± 24 vs. 168 ± 7 pmol/min/mg protein, $p < 0.01$)。一方, 雌 SHR では雌 WKY に比べて腎 20-HETE 産生が減弱していた (107 ± 7 vs. 133 ± 5 pmol/min/mg protein, $p < 0.05$)。 (Fig. 1B)

2. SHR と WKY の腎臓における P-450 4A 蛋白発現の性差

9 週齢の腎臓における P-450 4A 蛋白発現は, 雄 SHR では雄 WKY に比べて増強しており, 一方, 雌 SHR では雌 WKY に比べて減弱していた (Fig. 2)。内部標準である β -actin 蛋白発現では性差やラットの系統間の差を認めなかった。

3. 雄 SHR と WKY の血漿 free-testosterone 濃度

雄 SHR の血漿 free-testosterone 濃度は, 雄 WKY の濃度に比べて高値であった (7.32 ± 0.32 vs. 3.57 ± 0.38 pg/ml, $p < 0.01$)。また, 雌ラットと去勢ラットの血漿 free-testosterone 濃度は, SHR と WKY とともに測定限界 (0.6 pg/ml) 以下であった。

4. 雄 SHR と雄 WKY の血圧と腎 20-HETE 産生量に対する flutamide 投与と去勢の影響

雄 SHR と雄 WKY の収縮期血圧の週齢変化を Fig. 3 に示した。SHR と WKY とともに, flutamide 投与の開始や去勢を施行した 5 週齢では雄コントロール群, flutamide 投与群, 去勢群の 3 群間の収縮期血圧に有意差は認めなかった。SHR では, 去勢群の収縮期血圧は 8 週齢と 9 週齢で雄コントロール群の収縮期血圧に比べて有意に低下した。

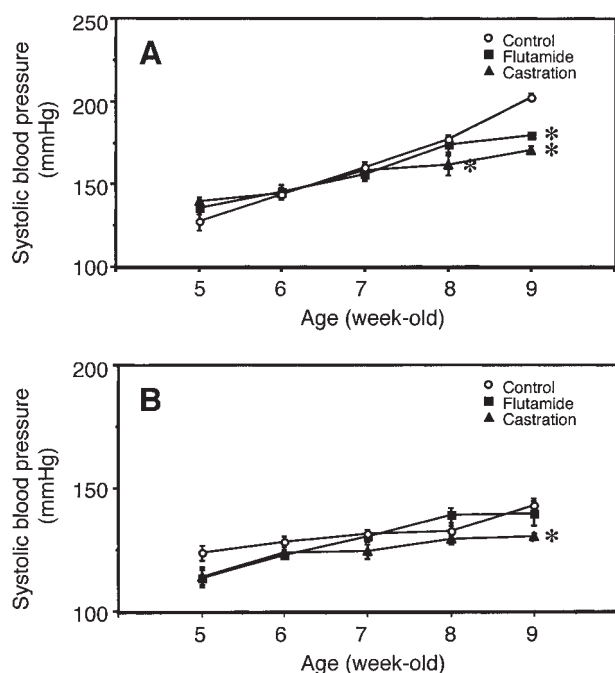


Fig. 3 Age-dependent changes in systolic blood pressure in control, flutamide-treated, and castrated SHR (A) and WKY (B)

Flutamide (50 mg/kg/day) was given orally at 5 to 9 weeks of age. Castration was performed at 5 weeks of age. Values are presented as mean $\pm$ standard error from 6 rats. *Significant difference ($p < 0.05$) from corresponding value in control male rats.

また, flutamide 投与群の収縮期血圧も 9 週齢で雄コントロール群の収縮期血圧に比べて有意に低下した (Fig. 3A)。WKY では, 去勢群の収縮期血圧は 9 週齢で雄コントロール群の収縮期血圧に比べて有意に低下したが, flutamide 投与群の収縮期血圧は 5~9 週齢において雄コントロール群の収縮期血圧に比べて有意差はなかった (Fig. 3B)。

9 週齢において, SHR の雄コントロール群の収縮期血圧に比べて flutamide 投与群と去勢群の収縮期血圧は低下していた (flutamide: 179 ± 2 mmHg, $p < 0.05$, castration: 166 ± 2 mmHg, $p < 0.01$)。雄 WKY の去勢群の収縮期血圧は雄コントロール群の血圧に比べて低下していたが (129 ± 3 mmHg, $p < 0.01$), flutamide 投与群の収縮期血圧は雄コントロール群の血圧に比べて有意差を認めなかった (139 ± 5 mmHg) (Fig. 4A)。また, 雄 SHR と雄 WKY とともに flutamide 投与群と去勢群ではコントロール群に比べて腎 20-HETE 産生が低下していた。flutamide 投与群では SHR と WKY の腎 20-HETE 産生には有意差はなく (142 ± 5 vs. 126 ± 7 pmol/min/mg protein), 去勢群では腎

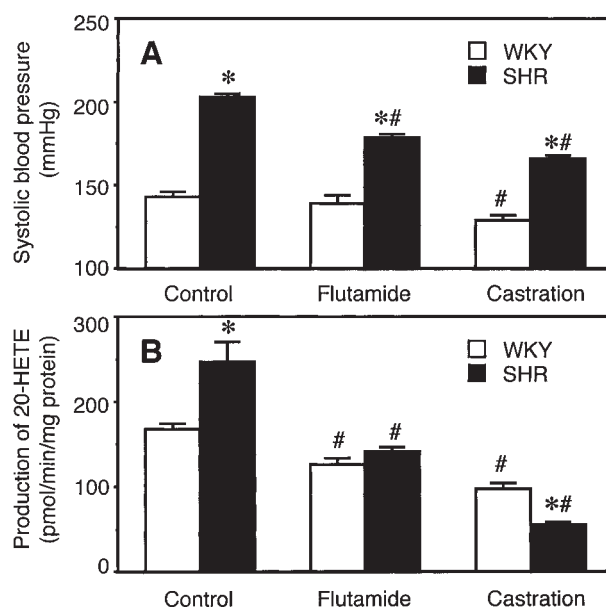


Fig. 4 Effects of flutamide and castration on systolic blood pressure (A) and renal production of 20-HETE (B) in 9-week-old male SHR and WKY

Values are presented as mean $\pm$ standard error from 6 rats. *Significant difference ($p < 0.05$) from the corresponding value in WKY. #Significant difference ($p < 0.05$) from the corresponding value in control male rats.

20-HETE 産生は SHR で WKY に比べて低下していた (55 ± 4 vs. 97 ± 7 pmol/min/mg protein, $p < 0.01$) (Fig. 4B)。

5. SHR の腎臓の P-450 4A 蛋白発現における性差および flutamide 投与, 去勢の影響

9 週齢の腎臓における P-450 4A 蛋白発現は雄 SHR で雌 SHR に比べて増強していた。また, flutamide 投与群と去勢群の SHR の P-450 4A 蛋白発現はコントロールである雄 SHR の発現に比べて減弱していた (Fig. 5)。内部標準である β -actin 蛋白発現には flutamide 投与や去勢による影響を認めなかった。

考 察

本研究では, SHR と WKY におけるアンドロゲン依存性のチトクローム P-450 アラキドン酸代謝および血圧調節が明らかになった。これまでに, SHR の腎 20-HETE 産生は WKY に比べて亢進しているとのいくつかの報告^{3,5,9,14)}があったが, その研究対象はすべて雄ラットであり, 雌ラットを対象とした検討はなかった。本研究におい

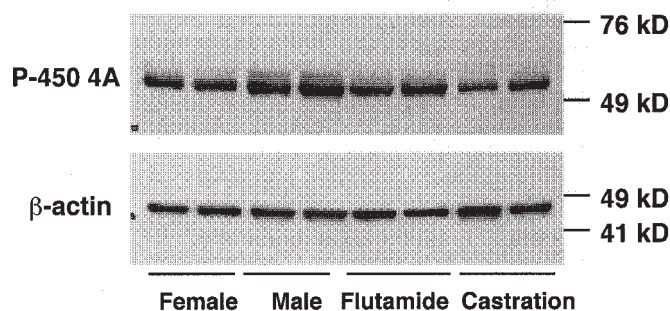


Fig. 5 Expression of P-450 4A protein in the kidney of female, male, flutamide-treated, and castrated SHR

Each lane was loaded with microsomes (20 μ g) prepared from the renal cortex of 9-week-old SHR.

でも従来の報告と同様に、腎 20-HETE 産生は雄 SHR では雄 WKY に比べて亢進していたが、雌 SHR では雌 WKY に比べてむしろ減弱していた。この結果から、SHR の腎 20-HETE 産生の亢進は雄に特異的であることが初めて明らかになった。また、雄 SHR でも 5~11 週齢の成熟期においてのみ 20-HETE 産生が亢進している報告や³⁾、SHR と Brown Norway ラットとの交配による F2 世代における cosegregation 解析では、SHR の P-450 4A 遺伝子が血圧レベルに関連しないとの報告からも⁹⁾、別のなんらかの因子が介在して雄 SHR の腎臓で P-450 4A 発現や 20-HETE 産生を誘導している可能性が考えられた。

雄 SHR の腎臓におけるアンドロゲンによる 20-HETE 産生の誘導を予想し、本研究では腎 20-HETE 産生に対するアンドロゲン拮抗薬や去勢の影響をさらに検討した。アンドロゲン拮抗薬の投与や去勢により腎 20-HETE 産生が WKY に比べて SHR でより大きく低下し、去勢 SHR では去勢 WKY に比べて腎 20-HETE 産生はむしろ減弱していた。この両系統の去勢ラット間で観察された関係は、両系統の雌ラット間で観察された関係と同様であり、アンドロゲンが雄 SHR の腎臓で 20-HETE 産生を強く誘導していることが示された。実際に、SHR は WKY に比べ、成熟早期から血中 testosterone 濃度の上昇があることが報告されており⁹⁾、本研究でも 9 週齢の雄 SHR の血漿 free-testosterone 濃度は、同週齢の雄 WKY の濃度の約 2 倍であった。P-450 4A2 発現はアンドロゲンにより誘導されることが報告されていた^{11,12)} が、去勢された SHR や WKY においても testosterone の投与により P-450 4A 蛋白発現や 20-HETE 産生量の増加は同程度に認められた¹⁵⁾。P-450 4A 遺伝子上流領域の解明はいまだ途上にあり、アンドロゲンによる P-450 4A 発現の誘導の機序は不明であるが、アンドロゲン受容体は P-450 4A 蛋白と同様に近位

尿細管に高く発現していることから^{2,16)}、P-450 4A はアンドロゲン受容体を介して誘導されている可能性がある。

アンドロゲンは SHR の血圧調節において重要な役割を担っていることが知られている¹⁷⁾。雄 SHR では雌 SHR に比べて圧-利尿反応が減弱しているが、この雄 SHR の減弱している圧-利尿反応は去勢により回復した¹⁸⁾。アンドロゲン拮抗薬の投与や去勢により雄 SHR の血圧が低下した本研究の結果は、雄 SHR の高血圧の発症および進展へのアンドロゲンの関与を示しているが、雄 SHR を 9 週齢で去勢すると血圧は低下する一方で、25 週齢で去勢しても血圧は低下しなかったとの報告がある¹⁹⁾。この結果は、SHR の高血圧の発症および進展にはアンドロゲンが重要である一方で、その高血圧の維持にはアンドロゲンが関与しないことを示している。さらに、SHR の Y 染色体が高血圧の発症および進展に関与しているとの報告もある²⁰⁾。SHR の Y 染色体を WKY に導入したコンソミックラットでは、血漿 testosterone 濃度が WKY に比べて 4 週齢早期から増加し、同時に血圧も上昇した¹⁰⁾。これらの報告から、SHR では、その Y 染色体に制御されている血漿アンドロゲンの成熟早期からの上昇が血圧上昇に関与していると推測される。

SHR の高血圧の発現および進展における 20-HETE の役割については、十分な解明には至っていない。灌流圧上昇に対する輸入細動脈の血管収縮反応は、SHR では WKY に比べて亢進しており、腎皮質ミクロゾームによる 20-HETE 産生量に両系統間で差を認めない 10~12 週齢において、この輸入細動脈の圧-血管反応は P-450 阻害薬により SHR で WKY に比べて著明に抑制された²¹⁾。この結果は、SHR の 20-HETE に対する血管収縮反応性の亢進もしくは輸入細動脈局所における 20-HETE 産生の増強を示唆するものである²¹⁾ が、SHR の輸入細動脈局所における P-450 4A 発現の増強を証明した報告は現時点ではない。本研究では雄 SHR の腎皮質における P-450 4A 蛋白発現の亢進を認めたが、腎臓全体で認められる P-450 4A2 mRNA 発現の性差が前糸球体細動脈においては全く認められないという以前の研究結果から²⁾、雄 SHR の輸入細動脈におけるアンドロゲンによる P-450 4A 発現の誘導の可能性については否定的である。しかし、SHR の腎臓では phospholipase A や C の活性が増強しており²²⁾、P-450 4A 発現量に変化がなくてもアラキドン酸の遊離により 20-HETE の産生が亢進している可能性や、近位尿細管での産生が亢進している 20-HETE がパラクラインとして輸入細動脈に作用している可能性は否定できない。

覚醒下の SHR の血圧に対していくつかの P-450 阻害実験が行われている^{7,8)} が、それらの結果は一致をみていない。脈管系細胞に取り込まれやすい一方で、尿細管細胞には取り込まれ難いアンチセンスの投与による P-450 4A 遺伝子の抑制では持続性の降圧が認められるのに対し⁸⁾、脈管系と尿細管細胞の両方に作用する P-450 阻害薬の投与は SHR において一過性の降圧作用しか示さなかった⁷⁾。これらの実験結果が一致をみない理由としては、20-HETE が血管収縮作用のみならず、近位尿細管やヘンレループの太い上行脚において Na 再吸収抑制作用を有するためと考えられ¹⁾、実際に P-450 阻害薬により SHR の尿中 Na 排泄量は減少した⁷⁾。さらに、P-450 阻害薬の慢性投与では Sprague-Dawley ラットにおいて食塩感受性高血圧を発症させることから²³⁾、病態により昇圧と降圧のどちらの方向にも働くという 20-HETE の血圧調節に対する二面性が示唆される。SHR における 20-HETE の尿細管作用の意義については不明であるが、その高血圧の発症や進展には成熟期における輸入細動脈の血管抵抗の上昇や血管反応性の亢進が重要な機序であり²¹⁾、この成熟期において腎内産生が急激に増加する 20-HETE は、SHR の輸入細動脈において血管抵抗の更なる上昇に働いていると考えられる。

最近、P-450 4a14 ノックアウトマウスにおいて、雄に特異的な高血圧を呈することが報告された²⁴⁾。雄 P-450 4a14 ノックアウトマウスでは血漿アンドロゲン濃度が増加していたことから、P-450 4a14 はアンドロゲン代謝に関与している可能性が示唆される。また、この雄ノックアウトマウスの腎臓では、アンドロゲンにより誘導される P-450 4a12 発現と 20-HETE 産生が増加していた。このマウスを去勢すると血圧は正常化し、P-450 4a12 発現や 20-HETE 産生量は減少した。また、去勢された雄や雌ノックアウトマウスにアンドロゲンを投与すると、腎臓での P-450 4a12 発現と 20-HETE 産生が増加した。これらの結果から、P-450 4a12 はラット P-450 4A2 と同様にアンドロゲンにより誘導され、雄ノックアウトマウスではアンドロゲンによる P-450 4a12 発現の誘導に伴う 20-HETE 産生の亢進により血圧上昇をきたしていると考えられる。さらに、このノックアウトマウスの輸入細動脈径は減少していた。この雄ノックアウトマウスと雄 SHR の表現型の類似は、雄 SHR の高血圧の発症および進展におけるアンドロゲンや 20-HETE の関与を支持している。

本研究ではアンドロゲン拮抗薬の投与や去勢により P-450 4A 蛋白発現の減少を認めたが、減少した P-450 4A

isoform の特定には至っていない。Nakagawa らは、雌雄の Sprague-Dawley ラットに高用量 (40~120 mg/kg/日) の testosterone や 5- α dihydrotestosterone を投与したところ、血圧上昇をきたし、腎 20-HETE 産生が増加した一方、肝臓での産生は変化がなかったと報告している²⁵⁾。この報告によると、アンドロゲン投与により雌ラットの腎臓では P-450 4A8 と 4A2 mRNA が増加し、雄ラットの腎臓では P-450 4A8 mRNA のみが増加した²⁵⁾。高用量のアンドロゲン投与とは対照的に、Imaoka らは、去勢された雄や雌の Sprague-Dawley ラットに低用量 (10 mg/kg/日) の testosterone を投与したところ、腎臓と肝臓で P-450 4A2 蛋白発現が増加したと報告している¹¹⁾。定常状態では腎臓と肝臓における P-450 4A2 mRNA や蛋白発現は、雌に比べて雄ラットで高い^{2,11)}。一方、P-450 4A8 の発現は肝臓では認められず^{2,26)}、その発現は腎臓では性差がない²⁾。われわれの検討でも、肝 20-HETE 産生は、腎産生と同様に雄 WKY に比べ雄 SHR で上昇していたが、雌では両ラット間に差はなく、去勢により SHR と WKY とともに肝 20-HETE 産生は低下した (未発表データ)。したがって、SHR の腎臓や肝臓でアンドロゲンにより誘導されている P-450 4A isoform は P-450 4A2 であると推測されるが、各 isoform 間のホモロジーがきわめて高いため²⁾、抗体による isoform の特定は本研究でも明らかのように困難である。P-450 4A isoform を特定するためには、各 isoform 特異的なプライマーを用いた reverse transcription PCR 法²⁾による更なる検討が必要であると考えられる。

雌 SHR では雌 WKY に比べて、腎 20-HETE 産生が低下していた本研究の結果から、雌 SHR の高血圧の発症および進展には腎 20-HETE の関与は少ないと考えられる。また、去勢された雄ラットでは雌ラットに比べて腎 20-HETE 産生がさらに低下していた結果から、雌ラットでは腎 20-HETE 産生を誘導する他の機序がアンドロゲンとは別個に働いている可能性が示唆される。雄ラットにおけるアンドロゲンの作用と同様に、雌ラットにおいてはエストロゲンが P-450 4A 発現や 20-HETE 産生を調節している可能性がある。実際、雌 Sprague-Dawley ラットの妊娠中に腎 20-HETE 産生が増加するという報告がある²⁷⁾。妊娠中にはエストロゲン産生と同様に nitric oxide (NO) 産生も増加することから²⁸⁾、NO が腎臓の P-450 4A 発現や 20-HETE 産生の増加に介在している可能性も考えられる^{27,29)}。また、ラット P-450 4F isoform も 4A isoform と同様に 20-HETE の産生能を有すること、さらにその発現がエストロゲンにより誘導されることが最近報告されている^{30,31)}。

これらの報告から、雌ラットの腎機能や血圧調節においても 20-HETE が関与している可能性があり、雌ラットの各種病態での 20-HETE の役割についても今後の解明が必要であると考えられる。

結 語

ラットの腎 20-HETE 産生や血圧には性差がある。雄 SHR では雄 WKY に比べて成熟早期から増加している血漿アンドロゲンが腎 20-HETE 産生を誘導しており、これが雄 SHR の高血圧の発症および進展に一部関与していると考えられた。一方、雌 SHR では雌 WKY に比べて腎 20-HETE 産生は低下しており、雌 SHR の高血圧の発症および進展に 20-HETE の関与は少ないと考えられた。

文 献

1. 伊藤 修. チトクローム P450 依存性アラキドン酸代謝物の腎・心血管作用. 血管 2003 ; 26 : 155-165.
2. Ito O, Alonso-Galicia M, Hopp KA, Roman RJ. Localization of cytochrome P-450 4A isoforms along the rat nephron. *Am J Physiol* 1998 ; 274 : F395-404.
3. Omata K, Abraham NG, Escalante B, Schwartzman ML. Age-related changes in renal cytochrome P-450 arachidonic acid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1992 ; 262 : F8-16.
4. Iwai N, Inagami T. Isolation of preferentially expressed genes in the kidneys of hypertensive rats. *Hypertension* 1991 ; 17 : 161-169.
5. Schwartzman ML, Silva JL, Lin F, Nishimura M, Abraham NG. Cytochrome P450 4A expression and arachidonic acid omega-hydroxylation in the kidney of the spontaneously hypertensive rat. *Nephron* 1996 ; 73 : 652-663.
6. Sacerdoti D, Escalante B, Abraham NG, McGiff JC, Levere RD, Schwartzman ML. Treatment with tin prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Science* 1989 ; 243 : 388-390.
7. Su P, Kaushal KM, Kroetz DL. Inhibition of renal arachidonic acid ω -hydroxylase activity with ABT reduced blood pressure in the SHR. *Am J Physiol* 1998 ; 275 : R426-438.
8. Wang MH, Zhang F, Marji J, Zand BA, Nasjletti A, Schwartzman ML. CYP4A1 antisense oligonucleotide reduces mesenteric vascular reactivity and blood pressure in SHR. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001 ; 280 : R255-261.
9. Stec DE, Trollet MR, Krieger JE, Jacob HJ, Roman RJ. Renal cytochrome P-450 4A activity and salt-sensitivity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1996 ; 27 : 1329-1336.
10. Ely DL, Falvo J, Dunphy G, Caplea A, Salisbury R, Turner M. The spontaneously hypertensive rat Y chromosome produces an early testosterone rise in normotensive rats. *J Hypertens* 1994 ; 12 : 769-774.
11. Imaoka S, Yamazoe Y, Kato R, Funae Y. Hormonal regulation of rat renal cytochrome P450s by androgen and the pituitary. *Arch Biochem Biophys* 1992 ; 15 : 179-184.
12. Sundseth SS, Waxman DJ. Sex-dependent expression and clofibrate inducibility of cytochrome P450 4A fatty acid omega-hydroxylases : Male specificity of liver and kidney CYP4A2 mRNA and tissue-specific regulation by growth hormone and testosterone. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 3915-3921.
13. Ishizuka T, Ito O, Tan L, Ogawa S, Kohzuki M, Omata K, Takeuchi K, Ito S. Regulation of cytochrome P-450 4A activity by peroxisome proliferator-activated receptors in the rat kidney. *Hypertens Res* 2003 ; 26 : 929-936.
14. Imaoka S, Funae Y. Hepatic and renal cytochrome P-450s in spontaneously hypertensive rats. *Biochim Biophys Acta* 1991 ; 1074 : 209-213.
15. Ito O, Ishizuka T, Kohzuki M, Omata K, Ito S. Role of androgens in elevating production of 20-hydroxy-eicosatetraenoic acid (20-HETE) in the kidney of SHR. *Hypertension* 2003 ; 42 : 419. (Abstract)
16. Henington BS, Henegar L, Sinning AR, Granger JP, Reckelhoff JF. Localization of androgen receptors in the kidney of male rats. *Hypertension* 1997 ; 30 : 510. (Abstract)
17. Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation on blood pressure. *Hypertension* 2001 ; 37 : 1199-1208.
18. Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998 ; 31 : 435-439.
19. Ganten U, Schroder G, Witt M, Zimmermann F, Ganten D, Stock G. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats : effects of anti-androgen treatment. *J Hypertens* 1989 ; 7 : 721-726.
20. Ely DL, Turner M. Hypertension in the spontaneously hypertensive rat is linked to the Y chromosome. *Hypertension* 1990 ; 16 : 277-281.
21. Gebremedhin D, Ma YH, Imig JD, Harder DR, Roman RJ. Role of cytochrome P-450 in elevating renal vascular tone in spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res* 1993 ; 30 : 53-60.
22. Kawaguchi H, Okamoto H, Saito H, Yasuda H. Renal phospholipase C and diglyceride lipase activity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1987 ; 10 : 100-106.
23. Hoagland KM, Flasch AK, Roman RJ. Inhibitors of 20-HETE formation promote salt-sensitive hypertension in rats. *Hypertension* 2003 ; 42 : 669-673.
24. Holla VR, Adas F, Imig JD, Zhao X, Price E Jr, Olsen N,

- Kovacs WJ, Magnuson MA, Keeney DS, Breyer MD, Falck JR, Waterman MR, Capdevila JH. Alterations in the regulation of androgen-sensitive Cyp 4a monooxygenases cause hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 98 : 5211-5216.
25. Nakagawa K, Marji JS, Schwartzman ML, Waterman MR, Capdevila JH. The androgen-mediated induction of the kidney arachidonate hydroxylases is associated with the development of hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003 ; 284 : R1055-1062.
26. Stromstedt M, Hayashi S, Zaphiropoulos PG, Gustafsson JA. Cloning and characterization of a novel member of the cytochrome P450 subfamily IV A in rat prostate. *DNA Cell Biol* 1990 ; 9 : 569-577.
27. Wang MH, Zand BA, Nasjletti A, Schwartzman ML. Renal 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002 ; 282 : R383-389.
28. Alexander BT, Miller MT, Kassab S, Novak J, Reckelhoff JF, Kruckeberg WC, Granger JP. Differential expression of renal nitric oxide synthase isoforms during pregnancy in rats. *Hypertension* 1999 ; 33 : 435-439.
29. Ito O, Omata K, Ito S, Hoagland KM, Roman RJ. Effects of converting enzyme inhibitors on renal P-450 metabolism of arachidonic acid. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001 ; 280 : R822-830.
30. Xu F, Falck JR, Ortiz de Montellano PR, Kroetz DL. Catalytic activity and isoform-specific inhibition of rat cytochrome P450 4F enzymes. *J Pharmacol Exp Ther* 2004 ; 308 : 887-895.
31. Kalsotra A, Anakk S, Boehme CL, Strobel HW. Sexual dimorphism and tissue specificity in the expression of CYP4F forms in Sprague Dawley rats. *Drug Metab Dispos* 2002 ; 30 : 1022-1028.