

令和元年6月6日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08505

研究課題名(和文)腎集合管B型間在細胞の酸塩基バランス機構：Ca感知受容体のシグナルネットワーク

研究課題名(英文)Role of calcium sensing receptor in Kidney Type B Intercalated Cells

研究代表者

安岡 有紀子 (Yasuoka, Yukiko)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：50348504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：カルシウム感知受容体(CaSR)は、腎集合管の間在細胞type-B(IC-B)の側底膜に発現している。IC-BにおけるCaSRの機能を調べるため、Pendrin KOマウスとWTマウスに低リン食を7日間負荷し、高Ca血症モデルを作成した。WTマウスの血液は酸性化、尿はアルカリ化し、CaSRとPendrinの発現量が増加したが、Pendrin KOマウスの尿は酸性化、CaSRの発現量は増加しなかった。このことから、低リン食負荷時の高Ca血症はIC-BのCaSRを活性化し、CaSRシグナルの下流にあるPendrinを発現量増加、活性化し、アルカリ分泌を亢進させていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルシウム感知受容体(CaSR)は、腎集合管間在細胞type-Aの管腔膜側に発現し、高Ca尿時に酸分泌を亢進させ、尿路結石の予防に関与していると考えられてきた。しかしながら、CaSRは腎集合管間在細胞type-B(IC-B)に発現し、CaSRのシグナルはPendrinに作用しアルカリ分泌を亢進させていることを明らかにした。また、低リン食負荷による高Ca血症誘導時には、IC-Bからアルカリが過剰に分泌され、血液は酸性化する。このようなメカニズムによるアシドーシスはこれまで報告がなく、新しい病態モデルに成り得る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Calcium sensing receptor localized in the basolateral membrane of type B intercalated cell (IC-B) of cortical collecting duct. We investigated the role of CaSR in IC-B by using Pendrin KO and WT mice treated for 7 days with low Pi diet (0.02% Pi). Serum [Ca] were significantly increased in Pendrin KO and WT mice with low Pi diet, compared with normal diet. Plasma pH was decreased significantly in WT mice but not changed in Pendrin KO mice. Urine pH was increased in WT mice, decreased in Pendrin KO mice. In conclusion, alkalinuria with low Pi diet was derived from luminal Pendrin in mouse kidney IC-B. Basolateral CaSR in IC-B may activate the Pendrin with hypercalcemia.

研究分野：腎生理

キーワード：カルシウム感知受容体 CaSR 集合管 アルカリ分泌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類のカルシウム感知受容体(CaSR)は、副甲状腺、脳・腎臓・腸・骨など広範囲に発現し、細胞外液のカルシウム代謝調節に寄与する。腎遠位部ネフロン(ヘンレループの太い上行脚 TAL、遠位曲尿細管 DCT)の側底膜 CaSR は、血漿  $Ca^{2+}$ 濃度上昇により活性化され尿中  $Ca^{2+}$ の再吸収を抑制する。集合管の CaSR は、「PC・IC-A 管腔膜に発現し、多尿・尿酸性化を誘発する」と考えられてきた。しかし、我々は、*in situ* hybridization 法と抗 CaSR 抗体を用いて、「マウス腎集合管 CaSR は、PC・IC-A 管腔膜ではなく、IC-B 側底膜に発現していること」を明らかにした。この結果は、CaSR の活性型/不活性型突然変異を持つ患者や、活性型 CaSR 変異マウス、腎特異的 CaSR 欠失マウスの実験データ(尿量、尿 pH の異常はない)に合致した。さらに、局在は網羅的遺伝子解析結果にも合致した(Lee JW, et al. 2015)。

腎集合管 IC-B 細胞は、 $Cl^-/HCO_3^-$ 輸送蛋白 Pendrin を発現し、尿中に  $HCO_3^-$ 分泌することにより、酸塩基バランスを保っている。興味深い事に、血漿 $[Ca^{2+}]$ の増減を受容する側底膜 CaSR は、微細な pH の上昇を感知する。実際、ヒト胎児腎細胞(HEK293)に発現させた CaSR は、同一 $[Ca^{2+}]$ 刺激に対し、アルカローシス条件下(pH 8.5)で細胞内 $[Ca^{2+}]$ を大きく上昇させた(Quinn SJ, et al. 2004)。このような特性を持つ IC-B 側底膜の CaSR は、IC-B において尿中  $HCO_3^-$ 分泌の起点となりうると考えられた。

#### 2. 研究の目的

マウス腎集合管 CaSR は、IC-B 側底膜に発現している。IC-B は皮質集合管のみに存在する特異な細胞であり、さらに PC・IC-A と混在しているため、IC-B 単独の機能解析は困難であった。そのため、IC-B の  $HCO_3^-$ 分泌調節に必要な IC-B 発現分子群の詳細は明らかではない。我々は、血漿 $[Ca^{2+}]$ の上昇を刺激の起点とする「IC-B 細胞の調節性  $HCO_3^-$ 分泌」の解明を目的とした。

#### 3. 研究の方法

- (1) 高 Ca 血症、低 Ca 血症のマウスモデルを作製し、血漿 $[Ca^{2+}]$ 変化による、血漿 pH、尿 pH、電解質変化および集合管の CaSR と酸塩基調節関連遺伝子・蛋白群(Pendrin, AE4 等)の発現量変化を解析した。
- (2) Pendrin KO マウスに高 Ca 血症を誘発し、血漿 pH、尿 pH、電解質変化を WT マウスと比較した。
- (3) CaSR 活性化薬(NPS R-568)、CaSR 阻害薬(NPS2143)を投与したマウスの血液尿成分を解析した。

#### 4. 研究成果

- (1) 高 Ca 食(2.5% Ca) [塩化カルシウム、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム、シュウ酸カルシウム]、低 Ca 食(0.05% Ca)をマウスに7日間投与した。血漿 $[Ca^{2+}]$ が有意に変化(増加)したのは、塩化カルシウム、クエン酸カルシウム投与食であった。しかしながら、塩化カルシウム投与マウスの尿 pH は有意に低下し、クエン酸カルシウム投与マウスの尿 pH は有意に増加していた。カルシウム投与実験では、血漿 $[Ca^{2+}]$ と尿 pH に相関関係はなかった。

低リン食(0.02% Pi, 1% Ca)をマウスに7日間投与した。血漿 $[Ca^{2+}]$ は増加し、尿 pH も有意に増加していたが、血漿 pH は有意に低下していた。血漿[Pi]は正常値に維持されていた。集合管 IC-B の CaSR、Pendrin は増加し、IC-A の

H-ATPase、AE1 は減少していることを、IHC 法、免疫組織化学法により確認した。

以上のことから、高カルシウム食を負荷した場合は、各カルシウム塩の性質（酸およびアルカリ）が影響し、酸・アルカリ排泄能を解析することは困難であると考えた。一方、低リン食負荷時に血漿[Ca<sup>2+</sup>]を上昇させているカルシウムは、マウス自身の骨由来であり、低リン食負荷マウスは、アシドーシスであるにもかかわらず尿 pH が増加（アルカリ化）していた。CaSR の機能解析には、低リン食負荷マウス（高 Ca 血症）を用いることにした。

- (1) Pendrin KO マウスと WT マウスに低リン食を負荷し、高 Ca 血症を誘導し、血液・尿成分を比較した。低リン食負荷後、両マウスは共に高 Ca 血症を示し、WT マウスは尿がアルカリ化したが、KO マウスは変化しなかった（尿 pH, 標準食: KO, 5.17±0.04、WT, 6.18±0.08、低リン食負荷: KO, 4.97±0.05、WT, 7.31±0.09\*\*, \*\*P<0.005, vs. 標準食）。このことから、低リン食負荷時の高 Ca 血症は IC-B の CaSR を活性化し、CaSR シグナル下流にある Pendrin の発現量増加および活性化に關与することが示唆された。
- (2) CaSR agonist（ネオマイシン）、CaSR antagonist（NPS2143）を用いた CaSR の機能解析も行った。ネオマイシン投与後、Ca 排泄量は有意に増加し、尿 pH は低下した（投与前 pH6.31、投与後 pH5.31）。ネオマイシンにより、IC-B の CaSR が活性化すれば尿はアルカリ化すると予測したが、酸性化した。一方、NPS2143 投与は、Ca 排泄量を減少させ、尿 pH を低下させた（投与前 pH6.5、投与後 pH5.8）。この結果は、IC-B の CaSR が阻害されれば尿は酸性化するという予測に合致した。しかしながら、agonist、antagonist の全身的な投与は、腎集合管 IC-B の CaSR の機能のみを表してはいない。次の段階として、IC-B 特異的 CaSR KO マウスの作製に着手しており、今後の研究に用いる予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yasuoka Y, Izumi Y, Nagai T, Fukuyama T, Nakayama Y, Inoue H, Horikawa K, Kimura M, Nanami M, Yanagita K, Oshima T, Yamazaki T, Uematsu T, Yamamura R, Kobayashi N, Shimada Y, Nagaba Y, Nakanishi T, Yamashita T, Mukoyama M, Sato Y, Kawahara K, Nonoguchi H. Fludrocortisone stimulates erythropoietin production in the intercalated cells of the collecting ducts. *Biochem Biophys Res Commun*. 503(4):3121-3127, 2018. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.102.

Izumi Y, Inoue H, Nakayama Y, Eguchi K, Yasuoka Y, Matsuo N, Nonoguchi H, Kakizoe Y, Kuwabara T, Mukoyama M. TSS-Seq analysis of low pH-induced gene expression in intercalated cells in the renal collecting duct. *PLoS One*. 12(8):e0184185, 2017. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0184185.

〔学会発表〕(計 16 件)

Yukiko Yasuoka, Tomomi Oshima, Yuichi Sato, Hiroshi Nonoguchi, Noriko Takahashi, Katsumasa Kawahara. Low-Pi diet-induced metabolic acidosis with alkaluria was reversed in the Pendrin KO mice. 第 9 回アジア-オセアニア生理学会大会. 2019 年 3 月 29 日、神戸

河原克雅、安岡有紀子、大嶋友美、高橋倫子、佐藤雄一、戸恒和人、関根慎、錦谷まりこ、野々口博史. pH感受性2孔型Kチャンネル(TASK2)KOマウスにおける酸塩基イオンバランス：アルカリ補充療法の適量評価. 第22回日本病態栄養学会学術集会. 2019年1月13日、横浜

Yukiko Yasuoka, Tomomi Oshima, Yuichiro Izumi, Yuichi Sato, Noriko Takahashi, Hiroshi Nonoguchi, Katsumasa Kawahara. Fludrocortison stimulates erythropoietin (Epo) protein expression in the distal tubules of mouse kidney. アメリカ腎臓学会. 2018年10月26日、サンディエゴ

安岡有紀子、大嶋友美、高橋倫子、野々口博史、河原克雅. 低リン食で誘発された逆説的アシドーシス-アルカリ尿はPendrin KOマウスで正常化した. 第48回日本腎臓学会東部学術大会. 2018年10月20日、新宿

安岡有紀子、大嶋友美、佐藤雄一、野々口博史、河原克雅、高橋倫子. 酸負荷マウスにおけるアンモニア輸送関連遺伝子の発現量解析. 第61回日本腎臓学会学術総会. 2018年6月10日、新潟

安岡有紀子、大嶋友美、佐藤雄一、野々口博史、河原克雅. Biphasic increase of fludrocortisone-induced plasma erythropoietin concentrations in mice. 第95回日本生理学会大会. 2018年3月30日、高松

大嶋友美、安岡有紀子、福田英一、高橋倫子、河原克雅. Physiological role of Ca-sensing receptor expressed in type B intercalated cells of the mouse kidney cortical collecting duct. 第95回日本生理学会大会. 2018年3月30日、高松

河原克雅、佐々木裕子、安岡有紀子、野々口博史、猪岡英二、関野慎. 自尿を有する透析患者の水電解質・栄養指導. 第8回日本腎臓リハビリテーション学会学術集会. 2018年3月17日、仙台

Yukiko Yasuoka, Tomomi Oshima, Yuichi Sato, Hiroshi Nonoguchi, Katsumasa Kawahara. Fludrocortisone-regulated production of erythropoietin (Epo) in mouse kidney nephron. アメリカ腎臓学会. 2017年11月4日、ニューオーリンズ

Hiroshi Nonoguchi, Yukiko Yasuoka, Yuichiro Izumi, Yushi Nakayama, Hideki Inoue, Takanori Nagai, Masayoshi Nanami, Takeshi Nakanishi, Masashi Mukoyama, Yuichi Sato, Katsumasa Kawahara. Fludrocortisone Time-Dependently Up-Regulates Erythropoietin (Epo) mRNA Expression via HIF2a Pathway in Rat Kidney. アメリカ腎臓学会. 2017年11月4日、ニューオーリンズ

安岡有紀子、大嶋友美、佐藤雄一、野々口博史、河原克雅. NH<sub>4</sub>Cl負荷マウスの尿酸性化にTALのアンモニア(NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)輸送は必須である. 第60回日本腎臓学会学術総会. 2017年5月28日、仙台

安岡有紀子、大嶋友美、佐藤雄一、野々口博史、河原克雅. Epithelial ammonia transport through the thick ascending limb of Henle's loop may be required for the compensatory H<sup>+</sup> excretion in kidney collecting duct. 第94回日本生理学会大会. 2017年3月30日、浜松

Yukiko Yasuoka, Tomomi Oshima, Yuichi Sato, Masato Ohtsuka, Minoru Kimura, Hiroshi Nonoguchi, Katsumasa Kawahara. Decreased Renal Threshold for

Urinary Excretion of Ammonia Underlies Proximal Renal Tubular Acidosis in TASK2 K Channel-Deficient Mice. アメリカ腎臓学会. 2016年11月19日、シカゴ  
Hiroshi Nonoguchi, Yuichiro Izumi, Yukiko Yasuoka, Yushi Nakayama, Takanori Nagai, Masayoshi Nanami, Takeshi Nakanishi, Masashi Mukoyama, Katsumasa Kawahara. Aldosterone and Vasopressin Are Erythropoietic Hormones. アメリカ腎臓学会. 2016年11月18日、シカゴ  
河原克雅、安岡有紀子. 腎尿細管のイオン輸送機構. 第46回日本腎臓学会東部学術大会. 2016年10月8日、東京  
安岡有紀子、大嶋友美、佐藤雄一、野々口博史、河原克雅. 低Pi食飼育マウスの代謝性アシドーシス-アルカリ尿の病態生理機序. 第59回日本腎臓学会学術総会. 2016年6月19日、横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：佐藤 雄一

ローマ字氏名：Yuichi Sato

所属研究機関名：北里大学

部局名：医療衛生学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 30178793

研究分担者氏名：野々口 博史

ローマ字氏名：Hiroshi Nonoguchi

所属研究機関名：北里大学

部局名：北里大学メディカルセンター

職名：部長(医師)

研究者番号(8桁): 30218341

研究分担者氏名：河原 克雅

ローマ字氏名：Katsumasa Kawahara

所属研究機関名：北里大学

部局名：医学部

職名：名誉教授

研究者番号(8桁): 70134525

研究分担者氏名：大塚 正人

ローマ字氏名：Masato Ohtsuka

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 90372945

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。