

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08248

研究課題名(和文)細胞内シグナル伝達分子の活性化が髄質内層集合管の水・尿素透過性に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文) Studying the effects of activation of intracellular signaling on water and urea permeability in the inner medullary collecting duct

研究代表者

森本 哲司 (MORIMOTO, TETSUJI)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：10344657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス腎臓から髄質内層集合尿細管を単離して、タンパク質キナーゼAアンカータンパク質やタンパク質キナーゼAが、この尿細管の尿素透過性や水透過性に及ぼす影響を検討する計画だった。想定外に髄質内層集合尿細管単離が困難だったため、不死化細胞を用いた代替実験に変更した。しかし、凍結細胞を解凍する際にトラブルが発生し、研究成果をあげることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回は、研究計画作成時に想定した研究成果が得られなかったため、学術的意義や社会的意義はない。

研究成果の概要(英文)：I planned the following experiments. I dissect inner medullary collecting duct from the mouse kidney and then I will confirm whether protein kinase A anchor protein and protein kinase A affect to the water and urea permeability of this tubule using in vitro microperfusion study. However, it was unexpectedly difficult. I decided to do an alternative experiment using immortal cells. But some troubles happened when I thawed the frozen cells. Finally, I could not produce any research results.

研究分野：水電解質

キーワード：腎髄質内層集合尿細管 水透過性 尿素透過性

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性腎性尿崩症は、腎臓の集合管における尿濃縮が障害され、多量の尿が排泄される疾患であり、その約 90%がアルギニンバソプレシン V2 受容体(以下、V2 受容体)の遺伝子異常で起こることが知られている。主な発症メカニズムは、遺伝子変異のために V2 受容体が血管側膜に挿入されないことで、アルギニンバソプレシンと結合ができず細胞内シグナル伝達が生じないため、尿素輸送体(UT-A1:Urea Transporter-A1)やアクアポリン 2(AQP2)が管腔側膜に誘導されず尿濃縮力が低下する。研究レベルでは、遺伝子変異のために小胞体に留まっている V2 受容体を血管側膜に移行させる治療の開発が進められているが実用化に至っておらず、現時点では尿量を十分に減少させる抜本的な治療方法は確立されていない。このような流れの中で、我々は 2016 年に Wnt5a がアルギニンバソプレシンとは異なる経路で AQP2 の水透過性を増大させる(尿濃縮力を高める)という新たな AQP2 の制御機構を立証した(Ando F, Morimoto T, Kondo Y, Uchida S et al. Nat commun 2016)。

最大尿濃縮力を得るためには、腎髄質部の間質の浸透圧が高く維持されている必要があり、その主要な浸透圧物質は尿素と NaCl である。また、集合管は皮質・髄質外層・髄質内層の 3 つに大別されるが、尿素透過性が高くアルギニンバソプレシンによって尿素透過性が亢進する尿細管分節は、髄質内層集合管(IMCD: Inner Medullary Collecting Duct)だけである。そして、管腔側の尿素透過性を担っている分子が UT-A1 であり、特に IMCD 終末部に強く発現している。そこで、今回の研究では、この IMCD を用いて検討することにした。

以上の背景と 15 年以上に及ぶ尿濃縮に関連する研究成果を踏まえ、我々はアルギニンバソプレシンと V2 受容体の結合後の細胞内シグナル伝達経路の下流に存在する分子を直接的に活性化させることができれば、最大尿濃縮力を得るために必須の UT-A1 や AQP2 が細胞膜に誘導され、V2 受容体が機能を消失していても尿濃縮力が回復するのではないか?という考えに至った。今回の研究で、V2 受容体を介さない機序で尿素透過性や水透過性を高めることが証明できれば、腎性尿崩症の新規治療薬に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、V2 受容体を介さない細胞内シグナル伝達経路の下流に存在する分子の活性化が、IMCD における尿素および水透過性(尿濃縮)に及ぼす影響を調べることである。具体的には、UT-A1(尿素輸送体-A1)と AQP2(水チャネル 2)の両方が豊富に発現している髄質内層集合管において、cAMP よりも下流に存在する分子(主に PKA(プロテインキナーゼ A))を直接的に活性化させた際に、UT-A1 や AQP2 を介する尿素透過性や水透過性が亢進するか否かを調べることで、本研究の目的である。

3. 研究の方法

研究方法は、次のとおりである。

- (1) タンパク質キナーゼ A アンカータンパク質(AKAP)とタンパク質キナーゼ A(PKA)の結合阻害薬である Ht31(ペプチド)および FMP-API-1(小分子化合物)に着眼し、これらの阻害薬が浴液側に存在する条件下で、IMCD における尿素透過性や水透過性が亢進するか否かを調べる。尿素透過性は、IMCD 管腔内外に 5mM の尿素濃度勾配がある状態で尿細管を通過してきた管腔液をガラスピペットで回収し、これを尿素測定キット用の 96 穴マイクロプレートに移して化学反応を起こさせた後に、マイクロプレートリーダーで吸光度を求め、尿素透過性を計

算する。水透過性は、Volume marker に蛍光色素で標識されたデキストランを用い、管腔液原液と回収液中の蛍光強度差を求め、算出する。

- (2) AMPK(adenosine monophosphate kinase)活性化薬がIMCDの尿素透過性や水透過性を亢進させたという既報があり、このAMPK活性化薬とAKAP/PKA結合阻害薬を用い、尿素透過性や水透過性に相乗効果がみられるか否かを調べる。研究方法は(1)に準じる。
- (3) これらのAKAP/PKA結合阻害薬を添加した際に、IMCD細胞内でcAMPの産生が亢進していないことを確認するために、単離したIMCDの長さ当たりのcAMP濃度を測定する。IMCDを単離後に、Ht31(50 μ M)またはFMP-API-1(900 μ M)存在下に37℃で15分間インキュベーション(陽性コントロールに10⁻⁹Mのアルギニンバソプレシンを用いる)する。これ以後は、使用するcAMP測定キット(EIA法)のマニュアルに沿って実験を行う。細胞数に起因する測定感度の問題が生じた場合は、後述と同様にIMCD細胞懸濁液を用いて、実験を行う予定とした。
- (4) IMCDの細胞懸濁液を作成し、Ht31(50 μ M)またはFMP-API-1(900 μ M)存在下に30分間インキュベートした後に、ビオチン標識を行う。標識された蛋白を用いてウェスタンブロッティングを行い、AKAP/PKA結合阻害薬によるUT-A1やAQP2の管腔側膜上の発現量の変化を調べ、尿素や水透過性の変化が生じるメカニズムの一端を明らかにする。

4. 研究成果

研究の第一段階である髄質内層集合管の単離が、予想以上に困難だった。様々な工夫を重ねたが、この分節の尿細管の単離が出来なかったため、代替実験に切り替えることにした。当初の研究計画では、髄質内層集合管の細胞懸濁液を作成して実験を行うことにしていた。しかし、上述のごとく、同部位の尿細管を他の分節が混じることなく単離することができなかつたので、この計画は断念した。そこで、ATCC社の不死化細胞mIMCD-3を継代培養してその細胞懸濁液を用いて(3)や(4)の実験を行う計画を立てた。しばらく振りの細胞培養実験だったため、凍結保存していたmIMCD-3を解凍・培養するステップで問題が発生してしまい、この代替実験を完遂することが不可能になってしまった。従って、今回の研究ではV2受容体を介さない細胞内シグナル伝達経路の下流に存在する分子の活性化が、IMCDにおける尿素および水透過性(尿濃縮)に及ぼす影響を調べることに、すなわちUT-A1(尿素輸送体-A1)とAQP2(水チャネル2)の両方が豊富に発現している髄質内層集合管におけるcAMPよりも下流に存在する分子(主にPKA(プロテインキナーゼA))を直接的に活性化させた際に、UT-A1やAQP2を介する尿素透過性や水透過性が亢進するか否かを確かめることができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	根東 義明 (KONDO YOSHIAKI) (00221250)	日本大学・医学部・教授 (32665)	
研究分担者	安藤 史顕 (ANDO FUMIAKI) (80804559)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座助教 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関