

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590962

研究課題名 (和文) 皮質集合管のナトリウム再吸収と連動しないカリウム分泌機序の解明

研究課題名 (英文) Mechanisms for K secretion uncoupled with Na reabsorption in cortical collecting duct

研究代表者

武藤 重明 (MUTO SHIGEAKI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：40190855

研究成果の概要：尿中への K 排泄に重要な役割を担っている皮質集合管細胞では血管側 K 濃度をわずかに増やすと、1)管腔内 Na 存在下では、管腔側膜の Na チャネルと基底側膜の起電性 Na ポンプの活性化を介した Na 再吸収の増加と連動して基底側膜の起電性 Na ポンプと管腔側膜の K チャネルが活性化し K 分泌が増加すること、2)管腔内 Na 非存在下では、基底側膜の Na/H 交換輸送体を介した起電性 Na ポンプの活性化およびそれと連動した基底側膜と管腔側膜の K チャネルの活性化を介して K 分泌が増加することが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：皮質集合管、カリウム分泌、ナトリウム再吸収

1. 研究開始当初の背景

腎臓は経口摂取したカリウム(K)の約9割を排泄する臓器で、集合管起始部や皮質集合管(CCD)に存在する集合管細胞(CD cell)(または主細胞)がその役割を中心的に担っている(Muto, S., *Physiol. Rev.* 81: 85-116, 2001)。CD cell における K 分泌はナトリウム(Na)再吸収と連動して起こり、基底側膜の Na ポンプと K チャネル、管腔側膜の Na チャネルおよび K チャネルが司っている。すなわち、管腔側膜に存在する Na チャネルと基底側膜に存在す

る起電性 Na ポンプを介して再吸収された Na と連動して、K は基底側膜の起電性 Na ポンプと管腔側膜の K チャネルを介して管腔内に分泌される。Na ポンプを介して細胞内に取り込まれた K の一部は基底側膜に存在する K チャネルを介して血管内へリークする。

CCD では血中 K 濃度のわずかな上昇を見逃すことなく感知し、尿中へ K を分泌することにより、生命に重篤な高 K 血症の発生を防いでいる。その 1 例として、われわれはウサギ腎 CCD を単離後、管腔内 Na 存

在下で灌流し、血管側 K 濃度を 2.5 から 8.5mM に急速に上げると、正味の K 分泌量と Na 再吸収量がともに増加することを報告した (Muto, S., et al., Am. J. Physiol. 255:F105-F114, 1988)。

しかし、CCD は CD cell に加え、H 輸送や K 再吸収に関与する α 、 β 間在細胞など機能の異なる数種類の細胞から構成されているため、K の正味輸送量を測定しても、どの細胞がいかなる機序で K 分泌を調節しているのか不明であった。これに対し、われわれは K 分泌を司る CD cell に微小電極を刺入し、血管側 K 濃度のわずかな上昇に対する基底側膜と管腔側膜の Na、K 輸送体の反応を観察した。その結果、生理的範囲の血管側 K 濃度の急速な増加に対して、経上皮電位および基底側膜電位は二相性の変化、すなわち一過性の急激な過分極相とそれに続くゆるやかな脱分極相を認め、過分極相は基底側膜の起電性 Na ポンプ活性の増加、脱分極相は管腔側膜 Na チャネル活性および K チャネル活性が同時に増加することによって生じることを明らかにした (Muto, S., et al., Am. J. Physiol. 276: F143-F158, 1999)。従って、血管側 K 濃度の生理的範囲内の急激な上昇に対して、基底側膜起電性 Na ポンプと、管腔側膜 Na チャネルと K チャネルとが緊密に連動していること、すなわち "membrane crosstalk"、が明らかになった。また、この membrane crosstalk は、管腔内 Na 濃度に依存し、管腔内 Na 濃度が少なくなると減弱することも判明した (Muto, S., et al., Am. J. Physiol. 285: F945-F954, 2003)。

ここで、管腔内 Na 濃度が 0 になったら K 分泌は完全に消失してしまうのかという疑問が生じる。一方、Na が皆無で K 含有量が豊富なバナナを摂取している南米奥地に住むヤノマモインディアンでは、尿中 Na 排泄量はほとんど 0 であるのに対し、尿中 K 排泄量は 200 mEq/日以上と著明に多いことが報告されている (Oliver, WJ, et al. Circulation 52:146-151, 1975)。また、遠位側ネフロンを管腔側膜に存在する Na チャネル活性をアミロライドで抑制したイヌでは、尿中 K 排泄量は極端に減少するが、KCl を静脈内に急性に負荷すると、尿中 K 排泄が増加することが報告されている (Yeyati, NL, et al., Renal Physiol. Biochem. 13:190-199, 1990)。こうした報告から、CD cell では Na 再吸収とは連動しない K 分泌機序が存在する

ことが推測されるが、直接証明には至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、CD cell における Na 再吸収と連動しない K 分泌機序と、K 分泌に関与するトランスポーターの同定およびその細胞内情報伝達機序を解明し、Na 再吸収と連動した K 分泌機序と比較することを目的とする。

3. 研究の方法

通常の Na 含有食を投与した正常日本白色ウサギ (雌、1.5-1.8kg) 腎より単離・灌流した CCD を実験に用いる。管腔側 Na 濃度を 0 mM に固定し、血管側は Na 存在下で灌流後、血管側の K 濃度を 2.5 から 8.5mM に急速に増加させ以下の実験を行ない、管腔側 Na 存在下 (146.8 mM) の場合と比較した。

(1) 2 種類の管腔内 Na 濃度で CCD を灌流し、血管側 K 濃度を増加させた時の正味 K 分泌量と正味 Na 再吸収量を測定した。

(2) 微小電極を CD cell に刺入し、血管側の K 濃度を増加させた時の経上皮電位と基底側膜電位を測定すると共に、管腔内より微小電流を通電し、ケーブル解析を利用して経上皮抵抗と分画管腔側膜抵抗を算出した。

(3) 管腔側膜の Na チャネル活性をアミロライドで、また K チャネル活性をバリウムで抑制した後、血管側の K 濃度を上げ、上記電氣的パラメーターを比較した。

(4) 基底側膜の K チャネル活性をバリウムで、また Na ポンプ活性をウアバインで抑制した後、血管側の K 濃度を上げ、上記電氣的パラメーターを比較した。

(5) 基底側の Na/H 交換輸送体活性をエチルイソプロピルアミロライドで抑制した後、血管側の K 濃度を上げ、上記電氣的パラメーターと正味 K 分泌量を比較した。

(6) 管腔内から pH 感受性蛍光色素の BCECF-AM を負荷し、エチルイソプロピルアミロライド非存在下または存在下で血管側 K 濃度を上げ、細胞内 pH を測定した。

4. 研究成果

(1) 管腔内 Na 存在下

① ウサギ腎より単離した CCD を管腔内 Na

存在下で灌流し血管側 K 濃度を 2.5 から 8.5mM に急速に増加させると、正味 K 分泌量と正味 Na 再吸収量の増加が観察された。

②血管側 K 濃度を 2.5 から 8.5mM に急速に増加させると、経上皮電位と基底側膜電位は一過性の急激な過分極とそれに続く緩やかな脱分極を認め、前者は基底側膜の起電性 Na ポンプ活性の増加、後者は管腔側膜 Na チャネル活性と K チャネル活性の増加によって起こることを確認した。

(2)管腔内 Na 非存在下

①単離・灌流したウサギ腎 CCD を、管腔内 Na 非存在下で灌流し血管側 K 濃度を 2.5 から 8.5mM に増加させると、Na 存在下に比べその程度は小さいが、正味 K 分泌量は増加した。

②血管側 K 濃度を 2.5 から 8.5mM に増加させると、経上皮電位と基底側膜電位はいずれも脱分極を示し、管腔内 Na 存在下で出現した過分極相は認められなかった。また、経上皮コンダクタンスと分画管腔側膜抵抗はともに増加した。

③血管側 K 濃度増加による経上皮電位と基底側膜電位の脱分極および経上皮コンダクタンスと分画管腔側膜抵抗の増加は、K チャネル阻害薬バリウムの管腔内または血管側への投与によって部分的に抑制されたが、Na チャネル阻害薬アミロライドの管腔内投与では不変であった。

④血管側 K 濃度増加による経上皮電位と基底側膜電位の脱分極および経上皮コンダクタンスと分画管腔側膜抵抗の増加は、Na/H 交換輸送体阻害薬エチルイソプロピルアミロライドの血管側への投与によって部分的に抑制された。

⑤血管側 K 濃度を 2.5 から 8.5mM に増加させると正味 K 分泌量の増加に加え、細胞内アルカリ化を認め、これらは Na/H 交換輸送体阻害薬エチルイソプロピルアミロライドを血管側に投与するといずれも抑制された。一方、管腔内 Na 存在下では、エチルイソプロピルアミロライドの投与の有無にかかわらず、血管側 K 濃度の増加に対し、正味 K 分泌量と正味 Na 再吸収量は増加した。

以上より、ウサギ CCD では血管側 K 濃度の増加に対し、1)管腔内 Na 存在下では、管腔側膜 Na チャネルを介して細胞内に流入した Na が基底側膜の起電性 Na ポンプを活性化し、それと連動して細胞内

に取り込まれた K が管腔側膜の K チャネルを介して管腔内に分泌されることで K 分泌増加が起こるのに対し、2)管腔内 Na 非存在下では、基底側膜の Na/H 交換輸送体を介して細胞内に入った Na が起電性 Na ポンプを活性化し、それと連動して細胞内に入った K の多くは基底側膜の K チャネルを介してリサイクルするが、一部は管腔側膜の K チャネルを介して管腔内に分泌されることにより K 分泌が増加することが判明した。管腔内 Na 存在下では、管腔側膜の Na チャネルが起電性 Na ポンプの Na に対するプロバイダーとなるが、管腔内からの Na 流入がない緊急事態が発生した場合には、管腔内 Na 存在下では静止状態にあった基底側膜の Na/H 交換輸送体が活性化し Na ポンプの Na に対するプロバイダーとなり Na ポンプを活性化するという代償機転が存在することが明らかとなった。CD cell の基底側膜には Na/Ca 交換輸送体も報告されており、この輸送体も管腔内 Na 非存在下での Na ポンプ活性化に関与していることが推測され、今後検討する予定である。また、基底側膜と管腔側膜の Na、K 輸送体の crsstalk にかかわる細胞内情報伝達機序についても今後解明したいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Muto S., Tsuruoka S., Miyata Y., Fujimura A., Kusano E., Wang WH, Seldin D., Giebisch G.: Basolateral Na⁺/H⁺ exchange maintains potassium secretion during diminished sodium transport in the rabbit cortical collecting duct. *Kidney Int.* 75: 25-30, 2009, 査読有。

[学会発表] (計 1 件)

武藤重明、草野英二: K代謝異常と皮質集合管のK輸送、第 50 回日本腎臓学会東部学術総会、2007 年 10 月 6 日、さいたま。

6. 研究組織

(1)研究代表者

武藤 重明 (MUTO SHIGEAKI)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：40190855

(3)連携研究者

宮田 幸雄 (MIYATA YUKIO)
自治医科大学・医学部・客員研究員
研究者番号：00285777

岩津 好隆 (IWAZU YOSHITAKA)
自治医科大学・医学部・病院助教
研究者番号：40424014