

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17711

研究課題名（和文）ウロモジュリンによる糸球体濾過の調節と新たな腎保護メカニズムの解明

研究課題名（英文）Uromodulin and tubulo-glomerular feedback mechanisms

研究代表者

高田 知朗（Takata, Tomoaki）

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70835686

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、尿中へ分泌されたウロモジュリンが尿細管上皮細胞の働きに対する生理的な作用について検討した。ウロモジュリンの集合管上皮細胞アクアポリンへの働きについて、*in vitro*において、ウロモジュリンはアクアポリン活性化および細胞膜上皮細胞への発現に関与することが明らかとなった。同様に *In vivo*において、ウロモジュリンは集合管上皮細胞のアクアポリン活性に関与する事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、ウロモジュリンが集合管細胞のアクアポリン-2活性に関与することが明らかとなった。腎尿細管は水とナトリウムの再吸収調節を介して体液維持を行っているが、過剰な水あるいはナトリウムの再吸収は高血圧の原因となる。集合管におけるアクアポリン-2活性の詳細なメカニズムを解明することで、あらたな利尿薬の標的の発見につながる。ウロモジュリンの制御を介した新しい機序による高血圧治療薬の開発に繋がる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the physiological function of uromodulin on renal epithelial cells. Uromodulin activated the water channel, aquaporin, of collecting duct cells *in vitro*. Uromodulin is also involved in the apical trafficking of aquaporin in collecting duct cells. *In vivo* studies with uromodulin deficient mice revealed that uromodulin is involved in the activation of aquaporin in collecting duct cells.

研究分野：腎臓病学

キーワード：ウロモジュリン

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓は生体恒常性を司る臓器であり、糸球体濾過量の調節ならびに尿細管における水とナトリウムの再吸収調節が重要な働きを担っている。糸球体濾過量の調節は、マクラデンサを中心とした尿細管糸球体フィードバック機構によって制御されるが、マクラデンサでは尿細管腔側に発現する Na 輸送体である NKCC2 によって尿流（尿中 Cl 濃度）を感知して NO や COX-2 およびレニンなどを分泌することで糸球体濾過量を一定に維持する働きを有する。糸球体濾過量を一定に保つことは、様々な病態における腎機能保護の観点から合理的な生体反応である。

一方で、ウロモジュリンはヘンレループの太い上行脚 (TAL) で産生、尿中へ分泌される蛋白である。ウロモジュリンは、発現部位である TAL において NKCC2 の活性を制御していることが明らかとなった他、塩分感受性高血圧への関与も示されている。前述のマクラデンサにおいてはウロモジュリンが産生されていないが、TAL から分泌されたウロモジュリンは尿細管腔側から尿流に沿ってマクラデンサに到達する。ウロモジュリンはマクラデンサの NKCC2 にも生理的な働きを有すると予想され、NKCC2 を介した尿流の感知への作用を介して糸球体濾過ならびに尿細管での水ナトリウム調節を制御していると考えられる (図 1)。

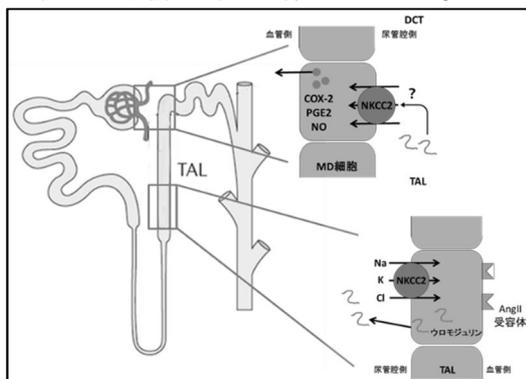


図 1

## 2. 研究の目的

本研究では、体液バランス維持の観点から、ウロモジュリンの産生および尿中分泌調節機構を明らかにすることならびに、尿中へ分泌されたウロモジュリンによる糸球体濾過量の調節機構について明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

マクラデンサにおけるウロモジュリンの作用について、マクラデンサ細胞の培養を行う。マウス腎からマクラデンサ細胞を含む尿細管フラグメントを採取の後に、マクラデンサ細胞特異的に発現する nNOS 誘導性の標識マーカーを導入し、セルソーティングによって回収する。次に、培養したマクラデンサ細胞を用いてウロモジュリン投与による NKCC2 活性の変化について検討する。マクラデンサ細胞の採取が困難であった際には、ヒト胎児腎細胞へ NKCC2、COX-2、nNOSなどを独自の技術である人工染色体を用いて導入後にウロモジュリンの作用について検討する。モデルマウスを用いた検討として、野生型およびウロモジュリン欠損マウスを用いて塩分負荷による体液過剰モデルおよび飲水制限による体液減少モデルを作成し、ウロモジュリンの調節系およびマクラデンサにおける尿細管糸球体フィードバックについて検討する。

## 4. 研究成果

本研究ではまず、マクラデンサ細胞の単離培養に着手した。マウス腎臓を用いて microdissection により TAL ~ 遠位尿細管までのフラグメントを採取した (Glaudemans B et al. Pflugers Arch 2014; 466: 343-356)。採取された細胞は heterogenic であることから、nNOS を標的としてマクラデンサ細胞を特異的に回収することを試みたが困難であったことから、ヒト胎児腎細胞へ人工遺伝子導入を行って検討を行うことを想定し、人工染色体ベクターを搭載したヒト胎児腎細胞に作成した NKCC2 遺伝子を導入した。同時に、腎臓での体液調節系において、集合管での自由水の再吸収は Na-K-Cl2 共輸送体による間質浸透圧の維持と共同で作用することから、尿中へ分泌されたウロモジュリンの尿細管上皮細胞の働きに対する生理的な作用についての検討を行うことを優先させることとし、ウロモジュリンの到達部位である集合管上皮細胞における働きについて検討した。

ウロモジュリンの集合管上皮細胞アクアポリンへの働きについて、集合管細胞株を用いた in vitro の系において解析した。集合管細胞におけるアクアポリン-2 のリン酸化と尿細管上皮細胞膜上への発現が自由水再吸収を規定することから、集合管細胞を cell permeable sheet 上に

培養し、間質側からのバゾプレッシン刺激による集合管細胞での cAMP 誘導とアクアポリン-2 のリン酸化亢進を確認した (図 2)。

次に、バゾプレッシン投与下に尿管腔側へウロモジュリンを培地添加し、アクアポリン-2 活性の変化について検討した。ウロモジュリン/アクアポリン-2 のリン酸化を促進させることが明らかとなった (図 3)。

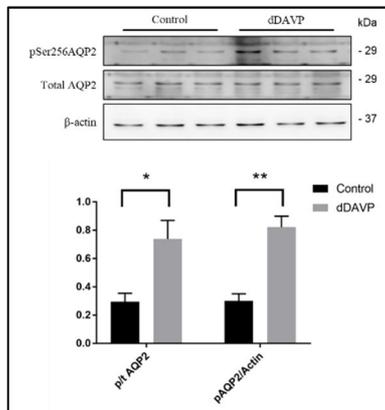


図 2

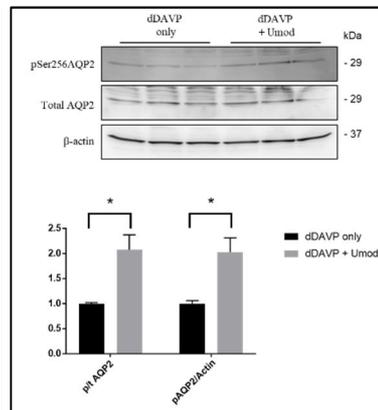


図 3

In vivo でのウロモジュリンと集合管上皮細胞機能との関連を解析した。まず、野生型マウスを用いて飲水制限に伴うウロモジュリンの産生調節について検討を行った。飲水制限によって、生理的な反応であるアクアポリン-2 のリン酸化が亢進したのと同時に、腎組織中および尿中へ分泌されるウロモジュリンの発現亢進が認められた (図 4)。加えて、尿中へ分泌されたウロモジュリンが集合管上皮細胞へ接着することが確認された (図 5)。

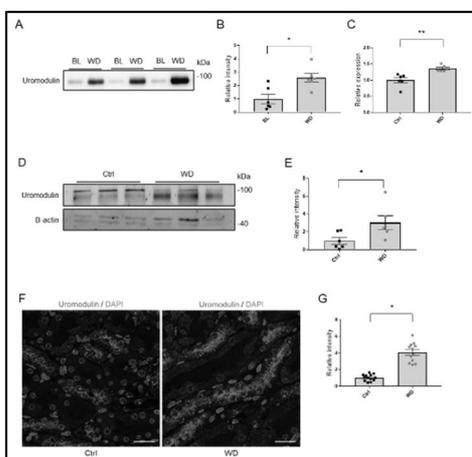


図 4

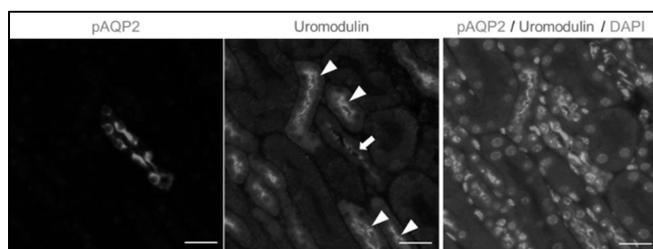


図 5

ウロモジュリンの欠損に伴うアクアポリン-2 の変化についても in vivo で検討を加えることとした。当初の計画では、海外の協力機関から遺伝子改変マウスにつき協力が得られる見込みであったが、協力機関での動物の準備が進まず供与を断念せざるを得なかった。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いてウロモジュリン KO マウスを作成した。ウロモジュリンの欠損は PCR および電気泳動によって確認し、腎組織中ならびに尿中へのウロモジュリン蛋白が欠損していることをそれぞれ確認した (図 6)。

このマウスを用いて、同様に飲水制限によるアクアポリン-2 変化について検討したところ、野生型マウスにおいてはリン酸化活性化が促進された一方、ウロモジュリン KO マウスでは、アクアポリン活性化の減弱がみられたことから、ウロモジュリンはアクアポリン-2 の活性維持に関与していることが明らかとなった。

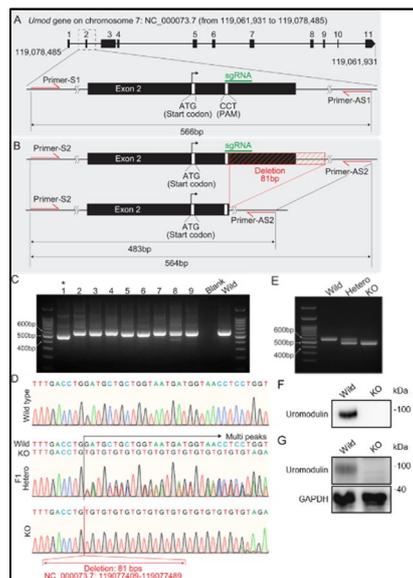


図 6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高田知朗、山田健太郎、濱田晋太郎、山本真理絵、前ゆかり、井山拓治、磯本一
2. 発表標題 ウロモジュリンによるアクアポリンを介した尿濃縮制御
3. 学会等名 第51回日本腎臓学会西部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takata T, Yamada K, Hamada S, Yamamoto M, Mae Y, Iyama T, Isomoto H
2. 発表標題 The activity of aquaporin-2 is regulated by uromodulin
3. 学会等名 Asia Pacific Congress of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------