

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591224

研究課題名(和文) 酸塩基調節における腎尿細管カリウムチャネルの役割

研究課題名(英文) A role of kidney K channel for acid-base regulation

研究代表者

河原 克雅 (Kawahara, Katsumasa)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70134525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎の酸塩基調節能におけるKチャネルの役割を調べるため、”pH感受性Kチャネル(TASK2)”KOマウスを作製し、(1)TASK2のネフロン内局在、(2)KOマウスの血液・尿の性状、(3)酸・アルカリ負荷への応答を調べた。TASK2は、近位尿細管に発現し、糸球体・ヘンレループ・遠位部尿細管には発現していなかった。標準飼育KOマウス(8wk)の血漿pH、HCO₃⁻濃度はWTより有意に低かった。酸負荷において、WTとKOマウスは同程度の尿酸性化を示した。

研究成果の概要(英文)：The kidney regulates plasma acid-base balance by urinary excretion of acid. We investigated roles of TASK2, pH-sensitive K channel, for reabsorption of HCO₃⁻. By using a high sensitive ISH, we found that TASK2 mRNA was expressed in kidney proximal tubules (PT), but not in the medullary thick ascending limb or the cortical collecting duct. Interestingly, the level of TASK2 expression in mice PTs was not increased after application of 0.28 M NH₄Cl for 6 days. TASK2 KO mice were smaller (about 15%) in weight. Plasma pH showed weak acidosis in KO mice fed normal chow (pH: 7.23±/−0.01). After acid loading, plasma pH in WT mice significantly decreased, but not in KO mice. This suggests that renal acid excretion system and/or acid-base balance system may be blunted in KO mice, but their alternative system may be stimulated upon acid-loading. In conclusion, these results strongly suggest that TASK2 may be essential for reabsorption of HCO₃⁻ in PT to maintain plasma acid-base balance.

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：TASK2 Kチャネル acidosis

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)患者の高血圧・高カリウム(K⁺)血症・代謝性アシドーシスなどの異常は、腎機能のさらなる低下と心・循環器系の二次的障害を引き起こす。腎ネフロン内の K⁺チャネルは、尿中への K⁺分泌路として働くだけでなく、尿細管上皮細胞の膜電位形成・膜輸送体共益因子として重要である。

腎尿細管に発現する K⁺チャネルは、6 回膜貫通型(BK, Kv1-6, KvLQT)と 2 回膜貫通型(内向き整流性)に大きく分けられる。Flow 活性化、Ca²⁺活性化 K⁺チャネルは前者、K⁺分泌路や他の膜輸送体の調節因子として働く K⁺チャネル(ROMK, Kir4.1, Kir7.1)は後者に属する。pH 感受性 K⁺チャネル(TASK2)は、2 回膜貫通部がタンデムになっており、4 回膜貫通型として分類される。

TASK2 は pH 感受性 K⁺チャネルとして Lazdunski のグループによりヒト腎からクローン化され同定され、腎臓に特異的に発現し、遠位ネフロン-集合管に高発現していた(Reyes R et al, 1998)。電気生理学的性質は、ラット皮質集合管の pH 依存性 K⁺チャネルに類似していた。しかし、TASK2 KO マウスは近位尿細管性アシドーシスモデル動物として解析されている(Warth R et al, 2004)。

2. 研究の目的

TASK2 が酸塩基調節に関わっていることは、Warth R らの研究成果で明らかであったが、pH 感受性 K⁺チャネルの機能発現部位並びに TASK2 の腎ネフロン内発現分布と TASK2 KO による機能欠落所見は矛盾していた。我々は、TASK2 の腎ネフロン内局在と、尿細管酸分泌機構における pH 感受性 K⁺チャネル(TASK2)の役割、pH 感受性の細胞内分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス TASK2 mRNA の腎ネフロン内局在

・cRNA プロープの作製：マウス TASK2 mRNA (GenBank No.NM_021542)配列を元にプライマーを設計し、Anti-sense cRNA プロープの作製には anti-sense 側プライマーの 5'末端に T7 RNA polymerase のプロモーター領域の配列を加え、Sense cRNA プロープの作製には sense 側プライマーの 5'末端に同様の配列を加えたものを合成した。このプライマーを用い、マウス腎 total RNA を鋳型に RT-PCR を行った。PCR 産物を精製後、DIG RNA Labeling Kit (Roche)を用い、in vitro transcription を行うことにより DIG 標識 Anti-sense cRNA プロープおよび Sense cRNA プロープを作製した。

・in situ hybridization 法：C57Bl/6J マウス(オス、10 週令)を麻酔後、腎臓を摘出し、4% PFA で固定、パラフィン包埋後、3μm に薄切した。脱パラフィン後、1/15M PB で洗

浄、Protease K で蛋白分解酵素処理、4% PFA で後固定、0.2N HCl、0.25% 無水酢酸/トリエタノールアミン処理後、3% H₂O₂ で内因性ペルオキシダーゼ処理を行った。脱水系列で処理後、切片を乾燥、プローブを切片に載せ 50 で 16-18 時間反応させた。2 × SSC/50% formamide 洗浄、RNase A 処理、SSC 洗浄、TBST 洗浄の後、0.5% casein で非特異的反応のブロッキングを行い、HRP 標識抗 DIG 抗体を反応させた。TBST 洗浄後、ビオチン化 tyramide、HRP 標識ストレプトアビジンを反応させ、DAB 反応で可視化した。その後、ヘマトキシリンで核染、透徹、封入し、観察した。

(2) TASK2 KO マウスの解析

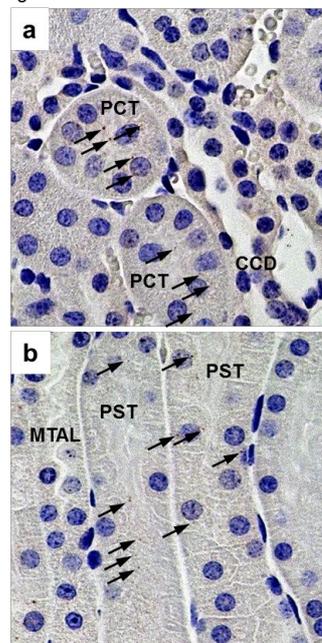
・体重の変化：TASK2 ヘテロ KO マウス同士を交配後、生まれた仔を 4 週令で genotyping し WT, ヘテロ KO, ホモ KO を判別後、5 週令から体重を 1 週間ごとに測定し変化を観察した。

・マウスへの酸塩基負荷：WT、KO マウスへ酸負荷として、0.28M NH₄Cl 溶液を自由飲水または 0.4M HCl 溶液を重量比 1:1 で粉末餌に混ぜ与えた。アルカリ負荷は 0.28M NaHCO₃ 溶液を自由飲水させた。5 日目の朝に代謝ケージに 1 匹ずつ入れ、6 日目の朝に 24 時間尿を採取した。マウスはイソフルレン麻酔下で採血した。尿、血液は pH、電解質濃度等を測定した。

4. 研究成果

(1) マウス TASK2 mRNA は、腎臓においては近位曲尿細管(PCT)、近位直尿細管(PST)に発現があり、糸球体(Glm)、ヘンレループ(HL)、遠位曲尿細管、集合管(CD)には発現していなかった(Fig.1)。近位尿細管の TASK2 mRNA は、酸負荷(0.28M NH₄Cl 溶液飲水)またはアルカリ負荷(0.28M NaHCO₃ 溶液飲水)によって発現量は変化しなかった。

Fig.1



(2) TASK2 KO マウスの表現型解析

・体重変化

TASK2 ヘテロ KO マウスは WT と有意な差はなかったが、ホモ KO マウスは測定開始 5 週令からすでに体重が少なく、測定期間 5~11 週令まで傾向は変わらず平均 14.3% 少ないままだった。

・TASK2 KO マウスの解析

標準飼育下における KO (8 週令) の血漿 pH, HCO_3^- 濃度は WT より有意に低く (pH: WT 7.38 ± 0.01 , KO 7.23 ± 0.01 ($P < 0.005$), HCO_3^- (mM): WT 18.8 ± 0.9 , KO 15.4 ± 1.0 ($P < 0.05$)), 軽度の代謝性アシドーシスを示した。また、10 ヶ月令の KO マウスにおいても体重 (g) は有意に少なく (WT 41.9 ± 6.1 , KO 30.1 ± 2.4), 血漿 pH, HCO_3^- も有意に低下したままだった (血漿 pH: WT 7.36 ± 0.02 , KO 7.29 ± 0.02 ($P < 0.005$), 血漿 HCO_3^- (mM): WT 19.3 ± 0.9 , KO 17.8 ± 0.4 ($P < 0.05$))。アシドーシスを改善させるための治療をすることなく飼育した TASK2 KO マウスは、18 ヶ月齢以上生存し、早期の死亡率は高くなかった。

・酸 (NH_4Cl , HCl) 負荷

WT, KO マウスに、0.28 M NH_4Cl 溶液を 6 日間飲水させてアシドーシスを誘導し、血液・尿成分を調べた。KO の血漿 pH, HCO_3^- は、 NH_4Cl 負荷で追加的低下 (酸性化) は見られなかった (血漿 pH: + NH_4Cl , WT 7.35 ± 0.01 , KO 7.20 ± 0.01 ($P < 0.005$), 血漿 HCO_3^- (mM): + NH_4Cl , WT 15.6 ± 0.6 , KO 14.8 ± 1.8)。一方、尿 pH は WT, KO に有意な差はなく、 NH_4Cl 負荷で共に低下した。尿中 $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 排泄量 (mg/d) も、WT, KO に有意な差はなく、 NH_4Cl 負荷で増加した (Control, WT 0.5 ± 0.1 , KO 0.4 ± 0.1 ; + NH_4Cl , WT 14.1 ± 1.0 , KO 12.0 ± 1.5)。 NH_4Cl 負荷では、アシドーシスによって産生されたアンモニア排泄量を測定することが困難であるため、 HCl 負荷によるアシドーシス誘導も試みた。経口 HCl 負荷 (6 日間) においても、血漿 pH, HCO_3^- は WT, KO 共に低下した (血漿 pH: + HCl , WT 7.28 ± 0.01 , KO 7.15 ± 0.06 ($P < 0.05$) (Fig.2), 血漿 HCO_3^- (mM): + HCl , WT 13.1 ± 0.6 , KO 12.7 ± 0.7) (Fig.3)。尿 pH は WT, KO に有意な差はなく、 HCl 負荷で共に低下した (Fig.4)。 $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 排泄量は WT, KO に有意差なく、KO は酸負荷により NH_3 を産生していた (+ HCl , WT 16.9 ± 1.8 , KO 21.8 ± 3.0) (Fig.5)。TASK2 KO マウスは、近位尿管細胞における NH_3 産生の閾値 (感受性) が低下していると考えられた。

・アルカリ (NaHCO_3) 負荷

KO, WT マウスに、0.28 M NaHCO_3 溶液を自由飲水させてアルカリ負荷を行った (6 日間)。WT, KO 共に、血漿 pH, HCO_3^- は、 NaHCO_3 負荷で増加した (血漿 pH: + NaHCO_3 群, WT 7.43 ± 0.01 , KO 7.38 ± 0.04 ($P < 0.005$), 血漿 HCO_3^- (mM): + NaHCO_3 群, WT 23.2 ± 1.1 , KO 22.4 ± 1.7)。KO, WT の

血漿 Na^+ , K^+ , Cl^- , Pi , Ca^{2+} 、クレアチニン濃度に有意な差はなかった。予期された事ではあるが、TASK2 KO マウスへの 0.28 M NaHCO_3 飲水負荷は、アシドーシスを改善させた。

以上のことから、TASK2 KO マウスは 型尿細管性アシドーシスを示し成長が遅滞したが、アルカリ補充療法をするとアシドーシスは改善した。しかし、アルカリ補充治療なしでも長期間生存し、型尿細管性アシドーシスのモデル動物として有用であると考えられた。

Fig.2

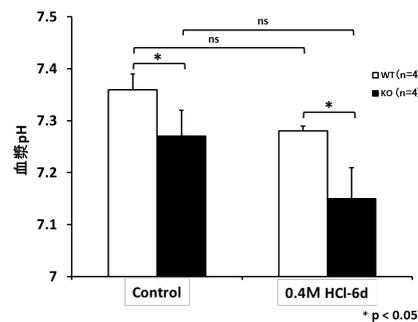


Fig.3

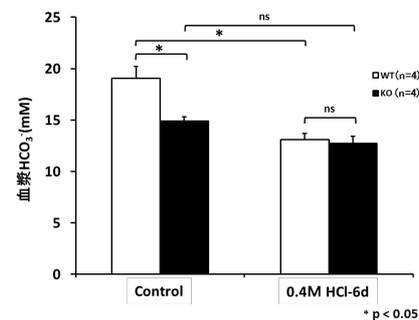


Fig.4

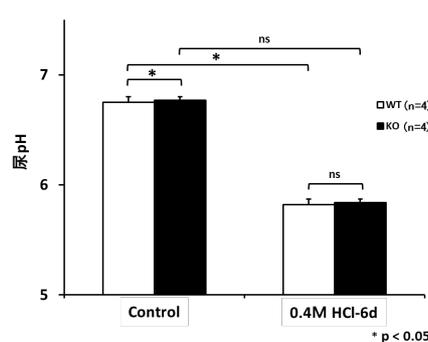
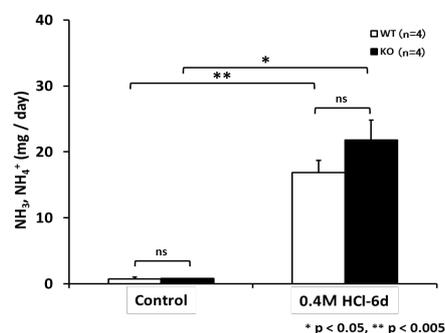


Fig.5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Tanemoto M, Abe T, Uchida S, Kawahara K. Mislocalization of K^+ channels causes the renal salt wasting in EAST/SeSAME syndrome. *FEBS Lett* 588, 899-905 (2014), 査読有, doi: 10.1016/j.febslet.2014.02.024.

Yasuoka Y, Kobayashi M, Sato Y, Zhou M, Abe H, Okamoto H, Nonoguchi H, Tanoue A, Kawahara K. The intercalated cells of the mouse kidney OMCDs are the target of the vasopressin V1a receptor axis for urinary acidification. *Clin Exp Nephrol* 17, 783-792 (2013), 査読有, doi: 10.1007/s10157-013-0783-y.

Yasuoka Y, Kobayashi M, Sato Y, Nonoguchi H, Tanoue A, Okamoto H, Kawahara K. Decreased expression of aquaporin 2 in the collecting duct of mice lacking the vasopressin V1a receptor. *Clin Exp Nephrol* 17, 183-190 (2013), 査読有, doi: 10.1007/s10157-012-0686-3

Nonoguchi H, Izumi Y, Nakayama Y, Matsuzaki T, Yasuoka Y, Inoue T, Inoue H, Mouri T, Kawahara K, Saito H, Tomita K. Effects of Atrial Natriuretic Peptide on Bicarbonate Transport in Long- and Short-Looped Medullary Thick Ascending Limbs of Rats. *PLOS one* 8:e83146 (2013), 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0083146.

Fukuda H, Hirata T, Nakamura N, Kato A, Kawahara K, Wakabayashi S, Chang MH, Romero MF, Hirose S. Identification and properties of a novel variant of NBC4 (Na^+/HCO_3^- co-transporter 4) that is predominantly expressed in the choroid plexus. *Biochem J* 450, 179-87 (2013), 査読有, doi: 10.1042/BJ20121515.

Zhou M, He HJ, Tanaka O, Sekiguchi M, Kawahara K, Abe H. Localization of the ATP-sensitive K^+ channel regulatory subunits SUR2A and SUR2B in the rat brain. *Neurosci Res* 74, 91-105 (2012), 査読有, doi: 10.1016/j.neures.2012.08.005.

Hori K, Nagai T, Izumi Y, Kimura M, Hasuike Y, Nakayama Y, Nanami M, Tokuyama M, Otaki Y, Kuragano T, Kohda Y, Obinata M, Kawahara K, Tanoue A, Tomita K, Nakanishi T, Nonoguchi H. Vasopressin V1a receptor is required for nucleocytoplasmic transport of mineralocorticoid receptor. *Am J Physiol* 303, F1080-8 (2012), 査読有, doi: 10.1152/ajprenal.00052.2012.

Souma T, Abe M, Moriguchi T, Takai J, Yanagisawa-Miyazawa N, Shibata E, Akiyama Y, Toyohara T, Suzuki T, Tanemoto M, Abe T, Sato H, Yamamoto M, Ito S. Luminal alkalization attenuates

proteinuria-induced oxidative damage in proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 22, 635-48 (2011), 査読有, doi: 10.1681/ASN.2009111130.

Tanemoto M, Uchida S. Angiotensin II induced phosphorylation of the sodium chloride cotransporter. *Kid Int* 79, 1381 (2011), 査読有, doi: 10.1038/ki.2011.92.

Kobayashi M, Yasuoka Y, Sato Y, Zhou M, Abe H, Kawahara K, Okamoto H. Upregulation of calbindin D28k in the late distal tubules in the potassium-loaded adrenalectomized mouse kidney. *Clin Exp Nephrol* 15, 355-62 (2011), 査読有, doi: 10.1007/s10157-011-0414-4.

〔学会発表〕(計 19 件)

Yasuoka Y, Kawahara K. Regulation of water and electrolytes transport in kidney tubule cells: Vasopressin V1a receptor and calcium sensing receptor. 第 91 回日本生理学会大会 2014 年 3 月 15 日 鹿児島
Izumi Y, Yasuoka Y, Nagai T, Hori K, Nakayama Y, Nanami M, Nakanishi T, Tanoue A, Tomita K, Kawahara K, Nonoguchi H. Mechanisms of erythropoietin production by aldosterone in the intercalated cells. アメリカ腎臓学会 2013 年 11 月 7 日 アトランタ

Yasuoka Y, Sato Y, Nonoguchi H, Kawahara K. Calcium salts affect acid-base by stimulating differently type A and B intercalated cells in mouse kidney collecting duct. アメリカ腎臓学会 2013 年 11 月 7 日 アトランタ

種本雅之 カリウム代謝異常 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 2013 年 5 月 10 日 東京

安岡有紀子, 佐藤雄一, 野々口博史, 河原克雅 マウス腎集合管間在細胞(type B)におけるカルシウム感受性受容体(CaSR)の役割 第 56 回日本腎臓学会学術総会 2013 年 5 月 10 日 東京

安岡有紀子, 佐藤雄一, 河原克雅 A role of Ca-sensing receptor (CaSR) expressed in type B intercalated cells along the mouse kidney collecting duct. 第 90 回日本生理学会大会 2013 年 3 月 29 日 船堀

河原克雅, 福田英一 Characterization of a novel variant of the Na^+/HCO_3^- cotransporter 4 (NBC4) expressed in rat choroid plexus. 第 90 回日本生理学会大会 2013 年 3 月 29 日 船堀

河原克雅, 安岡有紀子 Metabolic acidosis caused by insufficient vasopressin V1a receptor in kidney collecting duct. 第 90 回日本生理学会大会 2013 年 3 月 29 日 船堀

安岡有紀子、佐藤雄一、河原克雅
Upregulation of mice carbonic anhydrase XII in the α -intercalated cell of outer medullary collecting duct during acidosis. アメリカ腎臓学会 2012年11月2日 サンディエゴ

種本雅之 保存期腎不全でのその他の水・電解質・酸塩基平衡異常 第42回日本腎臓学会東部学術大会 2012年10月14日 新潟

安岡有紀子、佐藤雄一、河原克雅 腎近位尿細管 K チャネル (TASK2) の酸塩基調節における役割 第42回日本腎臓学会東部学術大会 2012年10月14日 新潟

天野慶子、十九浦るり子、小林加奈、大野弘毅、島田勝、猪上剛敏、街稔、清水淑子、種本雅之、内田俊也 アルドステロン拮抗薬内服下の発汗過多は低 Na 血症を助長する 第55回日本腎臓学会学術総会 2012年6月1日 東京

安岡有紀子、佐藤雄一、野々口博史、田上昭人、河原克雅 尿濃縮におけるバソプレッシン V1a 受容体の役割. 第55回日本腎臓学会学術総会 2012年6月1日 東京

河原克雅、久保川学 Regulatory mechanisms of water and electrolyte transport in kidney and intestinal epithelia 第89回日本生理学会 2012年3月30日 松本

安岡有紀子、佐藤雄一、河原克雅 A role of vasopressin V1aR in the urine concentration. 第89回日本生理学会 2012年3月30日 松本

Yasuoka Y, Sato Y, Izumi Y, Nonoguchi H, Kawahara K. Acid decreased the expression of Ca-sensing receptor in type-B of mouse kidney collecting duct intercalated cells. アメリカ腎臓学会 2011年11月10日 フィラデルフィア

福田英一、河原克雅 プロスタグランジン E2-EP4 シグナルはマウスマクラデンサ細胞株 (NE-MD) の COX-2 発現を維持する 第41回日本腎臓学会東部学術大会 2011年10月15日 東京

三島英換、竹内陽一、秋山泰利、鈴木健弘、阿部高明、種本雅之、内田俊也、伊藤貞嘉 尿細管ヘンレ上行脚 Na⁺輸送を制御する新たな機構の解明 第54回日本腎臓学会 2011年6月15日 横浜

安岡有紀子、小林瑞佳、佐藤雄一、野々口博史、田上昭人、河原克雅 バソプレッシン V1a 受容体 (V1aR) KO マウスにおける腎集合管 V2R-AQP2 軸 第54回日本腎臓学会 2011年6月15日 横浜

管機能、2013、p.60-67

河原克雅、南江堂、人体の構造と機能及び疾病の成り立ち 各論、腎・泌尿器系、2013、p.343-351

河原克雅、日本腎臓学会誌、特集：腎臓学この一年の進歩 腎生理、2013、p.21-27

河原克雅、下浜孝郎、長沼英明、メディカルレビュー社出版、特集：高血圧と体液管理 利尿薬による体液コンパートメントの変化 Fluid Management Renaissance、2012、p.42-49

河原克雅、安岡有紀子、腎と透析 特集：水代謝の基礎と機能障害 水の調節機構、2012、p.21-26

河原克雅、西村書店、内科学 (カラー版) : 3.Liddle 症候群、2012、p.1531-1533

河原克雅、MC メディカ出版、透析ケア：腎臓・透析療法・透析患者の体のすべて 「糸球体濾過の仕組み」、2012、p.14-24

河原克雅、東京医学社、腎と透析 特集 Klotho と腎臓病 “Klotho とカリウムチャンネル”、2012、p.335-340

河原克雅、北隆館、BIO Clinica 腎臓 トランスポーター異常による疾患 “湯治客の放射線被爆”、2011、p.13

河原克雅、安岡有紀子、東京医学社、腎と透析 水電解質・腎機能に関する最近の話題：キーワードから学ぶ “Ca sensing receptor”、2011、p.453-456

河原克雅、安岡有紀子、東京医学社、腎と透析 特集：腎代替療法の問題点を再考する “塩と血圧のいい関係”、2011、p.408

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 克雅 (KAWAHARA, Katsumasa)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：70134525

(2) 研究分担者

種本 雅之 (TANEMOTO, Masayuki)
帝京大学・医学部・准教授
研究者番号：40303945

安岡 有紀子 (YASUOKA, Yukiko)
北里大学・医学部・助教
研究者番号：50348504

〔図書〕(計 11 件)

河原克雅、中山書店、認定医・専門医のための輸液・電解質・酸塩基平衡：尿細