

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461253

研究課題名(和文)腎臓の水・電解質輸送におけるclaudinの役割

研究課題名(英文)Roles of claudins in kidney water and electrolyte transport

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：近位尿細管のtight junction (Tj)に発現しているclaudin-2の欠失マウスでは、近位尿細管細胞間短絡路のNa再吸収障害をfurosemide、thiazide、amiloride感受性遠位側ネフロンからのNa再吸収増加によって完全に代償していることが考えられた。集合管のTjに発現しているclaudin-8の欠失マウスでは、尿中Ca排泄率増加を認めたが、血清Ca濃度の低下はなかった。腎臓で血管内皮細胞に限局して発現しているclaudin-15の欠失マウスでは、尿中Ca排泄率低下による高Ca血症と、尿中Mg排泄率増加による低Mg血症を認め、その機序については今後の検討を要する。

研究成果の概要(英文)：In mice lacking claudin-2, which is expressed mainly at the proximal tubule tight junction, a reduction in proximal tubule paracellular Na reabsorption may completely compensate by increasing Na reabsorption from the furosemide-, thiazide-, and amiloride-sensitive distal nephron segments. Mice lacking claudin-8, which is expressed at the collecting duct tight junction, exhibited elevated fractional Ca excretion without reduced serum Ca concentrations. Mice lacking claudin-15, which is expressed only at the kidney vascular endothelial cell tight junction, showed hypercalcemia with relatively reduced fractional Ca excretion and hypomagnesemia due to elevated fractional Mg excretion. Future studies will be required to clarify the mechanisms responsible for the observed urine electrolyte disorders in mice lacking claudin-15.

研究分野：医歯薬学

キーワード：claudin タイトジャンクション 細胞間短絡路 近位尿細管 集合管 腎臓血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)腎臓は、糸球体と尿細管から構成され、細胞外液量や組成の変化に対応し常に恒常性を維持している。尿生成の前半の過程は糸球体濾過であり、後半の過程は尿細管における再吸収や分泌である。いずれも、種々のホルモンやオータコイド、腎神経などによって巧みに調節されている。尿細管は、非対称で極性をもった上皮細胞と細胞間をシールしているタイトジャンクションとで構成され、水や電解質は2つの経路、すなわち1) 管腔側膜と基底側膜に特異的に発現している輸送体を介した経細胞経路(経細胞輸送)と、2) タイトジャンクションの細胞間短絡路(傍細胞輸送)を通して輸送される。これまで、尿細管における水・電解質輸送特性の研究は、輸送体阻害薬と種々の方法(腎クリアランス法や単離尿細管微小灌流法等)を使って行われ、管腔側膜と基底側膜に存在する輸送体活性の調節機序の解析など、経細胞輸送に焦点が充てられ、大きな成果をあげてきた。一方、傍細胞輸送についての研究は、特異的阻害薬がないため未開拓の分野であった。

(2)近年、分子生物学的手法の進歩により、タイトジャンクションに発現している細胞間接着分子であるclaudinの分子実体が明らかになった(引用文献)。claudinは、4回膜貫通型の23kDaの蛋白質で、20以上のサブタイプから成る遺伝子ファミリーを形成し、多くの細胞で複数のclaudinが種々の割合で細胞特異的に発現している。たとえば、細胞間短絡路の電気抵抗が低くこの上皮を介した電解質輸送が経上皮輸送の約1/3を占める近位尿細管ではclaudin-2と-10が発現しているのに対し、細胞間短絡路の電気抵抗が高くこの上皮を介した電解質輸送が僅少の集合管ではclaudin-3、-4、-8が発現している(引用文献)。一方、尿細管上皮細胞には発現せず、血管内皮細胞に局在しているclaudin-5や-15も存在する(引用文献)。これまでの培養尿細管上皮細胞を用いた研究で、発現しているclaudinの組み合わせによって、細胞間短絡路の電気抵抗やイオン選択性が決定されることが明らかになったが、intactな尿細管細胞での解析は皆無であった。この課題に対し、我々はclaudin-2遺伝子欠失(KO)マウスを用い、claudin-2が近位尿細管の細胞間短絡路の電気抵抗の低下と陽イオン透過選択性の維持に重要であることを初めて明らかにした(引用文献)。しかし、上記claudin-2 KOマウスを用いた我々の研究で、KOマウス近位尿細管S2分節では陽イオン透過選択性破綻によりNa再吸収量は低下するのに対し、腎臓全体では尿中Na排泄率は野生型(WT)マウスと不変であることから、近位尿細管でのNa再吸収抑制を遠位側ネフロンが代償している可能性があること等、新たな課題が見つかり、それらに対する取り組みの必要性が生じた。また、細胞間短絡路の

電気抵抗が高い集合管で発現しているclaudin-3、-4、-8や、血管内皮細胞のみに発現しているclaudin-5や-15の水・電解質輸送における役割も不明である。

2. 研究の目的

本研究では、1)細胞間短絡路の電気抵抗が低い近位尿細管で発現しているclaudin-2、2)細胞間短絡路の電気抵抗が高い集合管で発現しているclaudin-8、3)腎臓では血管内皮細胞に限局して発現しているclaudin-15に着目し、これらのKOマウスをジーンターゲット法によって作成し、腎臓の水・電解質輸送における役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) claudin-2 KOマウス、WTマウスを用いた研究

2群の雄マウス(8週以降)の尾静脈より、3種類の利尿薬(furosemide、thiazide、amiloride)(5mg/kg体重)を含んだ2%食塩液を投与し、2群で尿中Na排泄率を比較した。

2群の雄マウス(8週以降)より、近位尿細管S1分節とS3分節を単離・灌流後、基底側にNaポンプ阻害薬ouabainを添加し、経細胞輸送をブロックした状態で、管腔側または基底側のNaCl濃度を50 mM減らし(sucroseで浸透圧を調整)管腔内外にNaCl濃度勾配を形成した時の経上皮電位(V_t)を測定し、NaとClの透過性の比(PNa/PCl)を算出した。

(2) claudin-8 KOマウス、WT/ヘテロ型マウスを用いた研究

2群の雄マウス(8週以降)に対し、尾動脈非観血的血圧測定装置(BP-98A、ソフトロン、東京)を用いて収縮期血圧と拡張期血圧、脈拍数を測定した。

2群の雄マウス(8週以降)を代謝ケージ内、飲水自由摂取下で24時間飼育し、尿量、便量、飲水摂取量、食餌摂取量および血清と尿のクレアチニン、Na、Cl、K、Ca、P、Mg濃度を測定した。

(3) claudin-15 KOマウス、WT/ヘテロ型マウスを用いた研究

2群の雄マウス(8週以降)に対し、尾動脈非観血的血圧測定装置(BP-98A、ソフトロン、東京)を用いて収縮期血圧と拡張期血圧、脈拍数を測定した。

2群の雄マウス(8週以降)を代謝ケージ内、飲水自由摂取下で24時間飼育し、尿量、便量、飲水摂取量、食餌摂取量および血清と尿のクレアチニン、Na、Cl、K、Ca、P、Mg濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) claudin-2 KOマウス、WTマウスを用いた

研究

尾静脈より3種類の利尿薬(furosemide, thiazide, amiloride)を含む2%食塩液を投与し、2群で尿中Na排泄率を比較したところ、K0マウスではWTマウスに比べ有意な増加を認められた。以上より、K0マウスでは、近位尿管細胞間短絡路のNa再吸収障害を、上記利尿薬感受性遠位側ネフロンからのNa再吸収増加によって代償していることが考えられた。

WTマウスS1分節のVtは、管腔側のNaCl濃度を減らすと正にシフトしたのに対し、基底側のNaCl濃度を減らすと負にシフトし、電位変化は同程度で、対称的であった。WTマウスS3分節のVtは、管腔側のNaCl濃度を減らすと正又は負にシフトしたのに対し、基底側のNaCl濃度を減らすと負又は正にシフトし、電位の変化は同程度で、S1分節に比べ小さかった。K0マウスS1分節、S3分節のVtはいずれも、管腔側のNaCl濃度を減らすと負にシフトしたのに対し、基底側のNaCl濃度を減らすと正にシフトし、電位の変化は同程度で、S1分節の方が大きかった。以上より、1)WTマウスS1分節はNa選択透過性を有しているのに対し、K0マウスS1分節のタイトジャンクションはCl選択透過性を有していること、2)WTマウスS3分節のタイトジャンクションはCl選択透過性を有していること、3)K0マウスS3分節のタイトジャンクションもCl選択透過性を有しているが、その程度はS1分節に比し小さいことが明らかになった。こうした2群のマウスの近位尿管長軸に沿ったタイトジャンクションのNa/Cl選択透過性の違いは、そこに発現しているclaudin-2を含むclaudinの種類と組み合わせによって決定されることが推測され、今後検討する予定である。

(2) claudin-8 K0マウス、WT/ヘテロ型マウスを用いた研究

tail-cuff法で測定した収縮期血圧、拡張期血圧、脈拍は、claudin-8 K0マウスとWT/ヘテロ型マウスで有意差を認めなかった。

代謝ケージ内、飲水/食餌自由摂取下で2群のマウスを1日飼育し、metabolic balance studyを行った。体重は2群のマウスで有意差を示さなかった。1日当たりの尿量、便量、飲水量、食餌摂取量は、いずれも2群で不変であった。体重当たりの腎重量比も2群で有意差を認めなかった。また、血清クレアチニン濃度、Na濃度、K濃度、Ca濃度、Mg濃度、P濃度、クレアチニンクリアランス、尿中Na排泄率、K排泄率、Mg排泄率、P排泄率は、いずれも2群で不変であった。一方、尿中Ca排泄率は、K0マウスで、WT/ヘテロ型マウスに比べ有意に増加していた。以上より、claudin-8が腎臓のCaの排泄に重要な役割を担っていることが示唆された。claudin-8を過剰発現させたイヌの腎遠位尿管細胞株MDCK細胞では、Naのような1価の陽イオン

の透過性低下に加え、Caのような2価の陽イオンの透過性も低下することから、claudin-8はMDCK細胞の細胞間短絡路で陽イオンのバリアを形成すると考えられている(引用文献)。このMDCK細胞を用いた研究結果から、claudin-8の欠損で、1価や2価の陽イオンに対するバリアが解除され、細胞間短絡路の陽イオン透過性が亢進することが推測され、これが上記metabolic balance studyの結果とどのように関連するのか、今後の検討課題である。

(3) claudin-15 K0マウス、WT/ヘテロ型マウスを用いた研究

tail-cuff法で測定した収縮期血圧、拡張期血圧、脈拍は、claudin-15 K0マウスと野生型/ヘテロ型マウスで有意差を認めなかった。

代謝ケージ内、飲水/食餌自由摂取下で2群のマウスを1日飼育し、metabolic balance studyを行った。体重は2群のマウスで有意差を認めなかった。1日当たりの尿量、便量、飲水量、食餌摂取量は、いずれも2群で不変であった。体重当たりの腎重量比は、claudin-15 K0欠損マウスでWT/ヘテロ型マウスに比べ有意な増加を示した。血清クレアチニン濃度、K濃度、P濃度、クレアチニンクリアランス、尿中K排泄率、Ca排泄率、P排泄率は、いずれも2群で不変であった。一方、claudin-15 K0マウスではWT/ヘテロ型マウスに比べ、血清Ca濃度の有意な増加と血清Mg濃度の有意な低下を認めた。また、尿中Mg排泄率は、claudin-15 K0マウスで有意に増加していた。以上より、claudin-15 K0マウスでは、尿中Ca排泄率の相対的低下によって高Ca血症が、また尿中Mg排泄率増加によって低Mg血症が出現することが考えられた。さらに、claudin-15 K0マウスでは、血清Na濃度はWT/ヘテロ型マウスと比べ不変であったが、尿中Na排泄率の増加を認めた。こうした尿中電解質排泄率の変動に、腎臓で血管内皮細胞のみに発現しているclaudin-15がどのように関与しているのか、今後の検討を要する。

<引用文献>

Furuse M, Fujita K, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141,1998, 1539-1550

Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 13,2002,875-886

Muto S, Hata M, Taniguchi J, Tsuruoka

S, Moriwaki K, Saitou M, Taniguchi J, Tsuruoka S, Moriwaki K, Saitou M, Furuse K, Sasaki H, Fujimura A, Imai M, Kusano E, Tsukita S, Furuse M. Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. Proc Natl Acad Sci USA 107,2010,8011-8016

Yu ALS, Enck AH, Lencer WI, Schneeberger EE. Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. J Biol Chem 278, 2003,17350-17359

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Muto S: Physiological roles of claudins in kidney paracellular transport. Am J Physiol Renal Physiol 査読有,312,2017,F9-F24
DOI:10.1152/ajprenal.00204.2016

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

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

古瀬 幹夫(FURUSE MIKIO)
自然科学研究機構生理学研究所・脳形態解析研究部門・教授
研究者番号:90281089