

機関番号：32665
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2010
 課題番号：19390279
 研究課題名（和文） 小児嚢胞腎における腎不全病態の分子生理学的解析
 研究課題名（英文） Molecular physiological analyses of renal failure in pediatric cystic renal diseases

研究代表者
 根東 義明（KONDO YOSHIAKI）
 日本大学・医学部・教授
 研究者番号：00221250

研究成果の概要（和文）：

小児期嚢胞腎の病態を明らかにするため、48時間の長時間微小灌流後におけるマウス皮質部ヘンレの太い上行脚 cTAL の形質変化の有無を検討した結果形質変化はなかった。また、嚢胞腎モデル PCK ラットの皮質部ヘンレの太い上行脚における NaCl 再吸収機序の抗利尿ホルモン（AVP）感受性についても検討した結果、正常 SD ラットと同様の平常状態での経上皮電位および AVP 反応性がみられ、その生理機能がほぼ保たれていることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Among renal diseases in childhood, the rate of hereditary renal diseases such as cystic kidneys has been increased. To promote the analyses of these diseases, we conducted a series of studies including long-term in vitro microperfusion of renal tubules from normal mouse kidneys. The physiological properties of mouse cortical thick ascending limbs of Henle's loop including appearance and transepithelial voltages were not affected by 48 hours long-microperfused preparation, indicating that this new technique is applicable to many types of investigations for adaptation both rapid and slow of renal tubules to various experimental manipulations.

It has also been demonstrated the cortical thick ascending limbs of Henle's loop in PCK rat kidneys are as sensitive to vasopressin as those of tubules from normal SD rats.

Although we lost major parts of our research data due to disaster in March 2011 in Japan, our present research experiences strongly suggest that long-term in vitro microperfusion of renal tubules will give us important information on the physiology and pathophysiology of renal cystic diseases further.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	9,100,000	2,730,000	11,830,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学（小児腎・泌尿器学）

キーワード：微小単離尿管灌流法、嚢胞腎、経上皮電位、アポトーシス、中心繊毛、管腔内圧、ヘンレの太い上行脚、皮質部集合管

1. 研究開始当初の背景

小児期腎疾患は周知のごとく、先天的要因に基づく疾患群の比率が高まりつつあるが、とりわけ多嚢胞腎やネフロンろうなどの嚢胞性腎疾患は、小児期からすでに末期腎不全を発症する疾患群として、その病態と治療に関する研究が臨床的に大きな価値を持っている。

これまでの嚢胞性腎疾患の研究は、主に分子遺伝学的手法を中心としてその解析が進み、polycystins (PKD1、PKD2)・PKHD1、nephrocystins (NPHP1~5等)をはじめとして、多くの原因遺伝子が確認され、その局在も徐々に明確化してきた。その結果、自然発症を含めた疾患モデルマウスも数多く生み出され、その病態の解析と治療法の研究については、新しい可能性が生み出されつつある。

一方、病態研究についての現状をみると、これまでの研究は主に、尿細管レベルでの研究については、分子遺伝学的あるいは形態学的研究がその中心を占め、実際に尿細管の病態生理学的レベルでのダイナミックな嚢胞形成過程の研究は進んでこなかった。

その背景には、尿細管機能の長期間にわたる変化を詳細に捉えられる研究手法がまだ十分に確立してきていないという課題があり、これまでの我々の主力研究手法である微小単離尿細管灌流実験系においても、短時間における尿細管の機能検討は可能でも、数日以上にわたる細胞内のシグナル蛋白や膜輸送体蛋白などの変化を追跡する研究については、実現が難しい状況にあった。

ところが、最近こうした研究の新しい方向性として、無菌操作を含めた様々な研究手法の改善により、数日以上にわたる長期間にわたって、生体から単離された尿細管の微小灌流実験を行うことが可能となる状況が生まれ、現在その確立に向けて研究に注力する状況となってきた。

一方、研究代表者らは、これまでの長年にわたる研究成果として、哺乳類の腎髄質内層に特異的に存在するヘンレの細い上行脚が尿濃縮に重要な役割を果たし、その NaCl 再吸収機序が受動的で、細胞内を Cl⁻ イオンが、細胞間隙を Na⁺ イオンが透過するユニークな過程であることを証明し、特に Cl⁻ イオンの透過性については 1990 年代前半に発見された Cl⁻ チャンネル CLC-K1 がそれに相当するということを実を明らかにしてきた。さらに、その後の一連の研究から、このヘンレの細い上行脚が、新生児期にはヘンレの太い上行脚としての能動的 NaCl 再吸収機序をもち、成長とともに本来の細い上行脚の性質をもつようになるという新しい知見を明らかにし、尿濃縮の過程が成熟鳥類型の NaCl 単独機序から、成熟哺乳類型の NaCl 濃縮機序に尿素濃縮機

序を積み上げた多重型の尿濃縮機序となっていることを仮説として提唱した。

近年、こうした仮説は実際のような輸送体遺伝子操作によるモデルマウスの研究でその正当性が明らかになってきていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、こうしたこれまでの小児の多嚢胞腎をとりまく様々な状況の下で、新しい研究手法としての微小単離尿細管長時間灌流実験系を用いて、その病態をモデルマウスの活用により明らかにし、今後の臨床及び基礎研究の発展につなげようとするものである。

3. 研究の方法

本研究では、当初の研究計画を慎重に検討し直し、2つの中心となる課題を持って遂行した。

(1) 長時間微小単離尿細管灌流実験系の再検討

これまでの研究において、*in vitro* での尿細管の長時間微小単離灌流の可能性が高いことは証明できていたが、詳細な検討が不十分であることから、さらに今回の研究計画の中軸として、その研究技術の改良を進めた。

具体的には、倒立顕微鏡上に設置した微小灌流槽に、無菌的に準備した専用の培養液加灌流溶液を作成し、毎分 1ml 以下の速度で溶液の灌流を行った、溶液は 5%CO₂ で飽和し、その溶液の pH を生理的範囲に保つことにより、より生体内に近い環境によって生体外に単離された尿細管細胞の障害を防ぐこととした。

表 1 長時間灌流実験に用いた灌流液の組成

	Burg's solution(mM)	*dissecting solution(mM)
NaCl	118	148
K ₂ HPO ₄	2.5	2.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.0	2.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.2	1.2
Na lactate	4.0	4.0
Na ₂ citrate	1.0	1.0
L-alanine	5.0	5.0
D-glucose	5.5	5.5
NaHCO ₃	25	0
		volume
DMEM/F-12 + NaHCO ₃ *		300 ml
Burg's solution**		500 ml
dissecting solution***		100 ml
100 × PCG+SM		10 ml
10 ⁻³ M dexamethasone		10 μl
100 × ITS mixture		10 ml
10 ⁻⁴ M triiodo-L-thyronine		300 μl
ddH ₂ O		up to 1000 ml
total		1000 ml

表1に長時間灌流実験系で用いた灌流液の組成を示す。研究手法の詳細は、研究結果とともに、研究成果の部分で詳述する。

今回の研究計画では、皮質部集合管を最終的な研究対象として、長時間灌流実験系の最終的な確立を目指したが、残念ながら常に安定性を持って長時間灌流が行えなかった。このため、皮質部集合管での研究の遂行を断念し、より安定性の高い皮質部ヘンレの太い上行脚(cTAL: cortical thick ascending limb)における長時間灌流後の尿細管の生理機能の詳細な検討を行うこととした。cTALは、表1に示した灌流液で48時間灌流を行い、灌流開始直後と48時間後における自発的経上皮電位(Vt: transepithelial voltage)の変化を検討した。また、cTALについては、その能動的NaCl再吸収の主要輸送体NKCC2の阻害薬フロセミドを管腔内に投与した時に起こるべき管腔正の経上皮電位の抑制についても観察を行った。

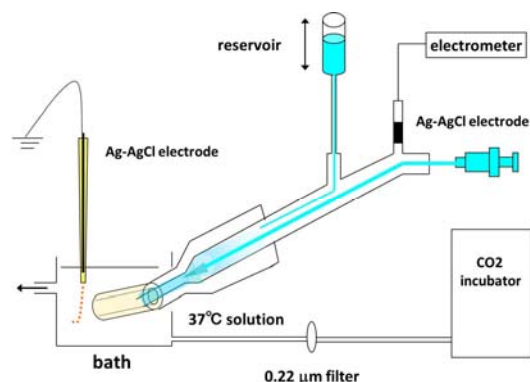
(2)PCKラットのヘンレの太い上行脚における抗利尿ホルモン感受性の変化の検討

PCKラットおよび対象となる正常SDラットよりcTALを微小単離し、倒立顕微鏡上に設置した灌流槽で37°Cの恒温状態で経上皮電位の測定を行った。また、浴液側に 10^{-10} MのAVPを投与した際に起こるVtの上昇の程度をPCKラットと正常SDラットの間で比較した。

4. 研究成果

まず初めに、Burg's溶液(表1)を基本とする灌流液を用いて、図1に示すシステムで研究を開始した。

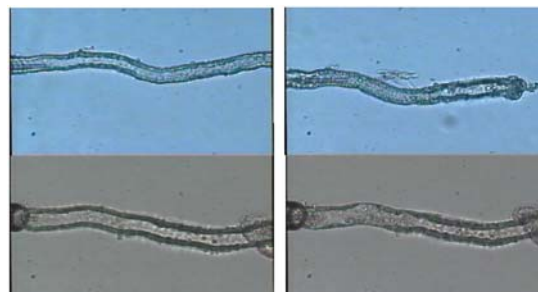
図1 長時間微小単離尿細管灌流システム



尿細管分節としては、cTALを用いた。また、Vtと尿細管の外観を指標に、尿細管細胞のviabilityを評価しながら長時間灌流を行った。しかし、実験時間が一晩も経過すると図2の如く、パーフュージョンピペット近傍の尿細管細胞が剥がれ落ち、尿細管の外観やVtが低下し始めた。原因として、細菌感染や灌流液中の栄養分不足の可能性があったため、

次のような工夫を凝らした。1)従来微小単離尿細管灌流法に用いるガラスは未滅菌のものを使用していたが、細菌や真菌のコンタミネーションを防ぐ目的に、乾熱滅菌で処理後にホールディングピペットやパーフュージョンピペットを作成し、実験に用いた。

図2 感染や化学薬品による汚染例



さらに、ガラス以外のチューブ類も可能な限り滅菌済みのものを使用するようにした。2)灌流液の全面的な見直しを図り、表1に示すような長時間灌流用の溶液を作成した。改善の主なポイントは、培養液に用いられているDMEM/F12やインスリン、デキサメサゾンなどを添加した。これらの改良により、最終的には、cTALを48時間程度は安定的に灌流することに成功した(図3)。

図3 長時間灌流に成功した際のcTAL外観

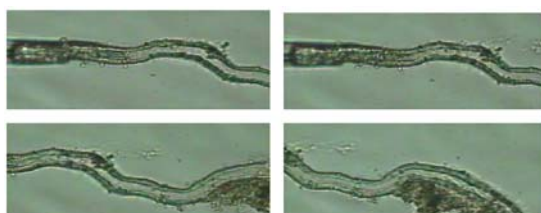
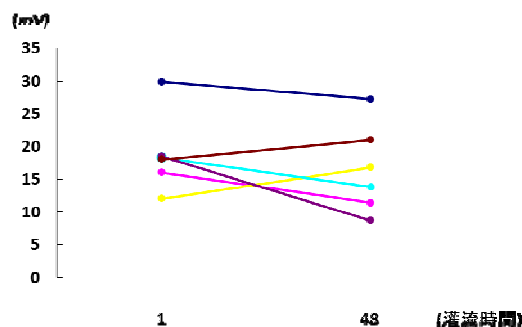


図4に灌流開始1時間後と48時間後のcTALの経上皮電位の結果を示す。灌流開始1時間後のVtは平均でおよそ20mVで、48時間後のVtも変わらなかった。両者の値は、東日本大震災によるデータ保存上の問題からその詳細を示すことができなかったが、統計学的な有意差は無く、cTALの経上皮電位が長時間保持できたことを示している。

図4 長時間灌流時のcTAL経上皮電位の変化



1 48 (灌流時間)

引き続き、常染色体劣性遺伝形式の多嚢胞腎では、集合管から嚢胞形成が始まることが知られていたため、皮質部集合管 (CCD : cortical collecting duct) を用いて同様の実験を行った。ところが、cTAL で成功した際と同じシステムと灌流液を用いたものの、残念ながら 24 時間以上安定的に灌流することは不可能だった。この研究には半年以上の時間を費やし、様々な検討も行ったが解決の糸口が見つからなかったため、実験計画を一時保留とし、他の研究を優先することとした。

一方、並行して多発性嚢胞腎のモデル動物の解析を行うことにした。多発性嚢胞腎モデル動物は、表 2 に示したように数多く知られているが、日本国内で速やかに入手することを検討した結果、藤田保健衛生大学疾患モデル教育研究センター長尾准教授の研究室で飼育されている PCK ラットを解析することにした。この動物の特性や嚢胞形成過程に関することは、長尾らが JASN 誌 (JASN, 17:2220-2227, 2006) に詳しく報告している。

図 5 PCK ラットの腎臓
(Nagao S et al. JASN 17:2220-2227, 2006)



図 5 に成熟ラットの腎臓断面を示したが、腎臓内に多数の嚢胞を認めている。嚢胞拡張については、細胞内 cyclic AMP 増加を介す

る嚢胞液の分泌増大や細胞増殖が関連していることが、従来の研究で明らかにされたので、AVP に対する細胞応答が正常ラットと異なっているのではないかと仮説を立て、髄質部の太いヘンレの上行脚 (mTAL: medullary thick ascending limb) を用い、浴液側に 10^{-10} M の AVP を添加した際に生じる経上皮電位の変化を測定した。初めにコントロール実験を Wild type の SD ラット mTAL で行った。その結果、AVP 投与前の経上皮電位 (Vt : transepithelial voltage) は平均 3.53 mV で、AVP 投与後安定化した時点での Vt は平均 4.80 mV (n=4) だった。この AVP 添加後の経上皮電位の変化は、統計学的有意差を認めた。引き続き、PCK ラットの mTAL を用いて同様の実験を行なった。しかし、これらのデータは残念ながら、東日本大震災の際に研究データを保存していたパーソナルコンピューターが損傷を受け、データの再抽出を試みるも現時点で回収できていないため、上記の平均値はメモとして残っていたデータを記載したものであり、統計的有意差についても、記憶していた内容を記載するにとどまっている。しかしながら、正確な値を出すことは不可能だったが、AVP を投与した際の Vt の変動は Wild type と比較して明らかに統計的有意差はないと判断できるものだった。

以上の結果から、本研究の成果は残念ながら統計的解析結果を持って提示することができなかったが、48 時間程度の長時間にわたり、腎皮質部ヘンレの太い上行脚は生体外においてその形質を保ったまま研究の対象とすることができることが確認できたこと、嚢胞腎モデルラットである PCK ラットにおいては、ヘンレの太い上行脚における AVP 感受性は障害を受けておらず、嚢胞腎の形成には AVP によるヘンレループの障害は関与していないと考えられることなどが推論づけられた。

表 2 代表的な多発性嚢胞腎モデルマウス

動物種	モデル	疾患	遺伝子	遺伝形式	病態
ラット	PCK	ARPKD	Pkhd1	AR	多発性嚢胞腎・肝
マウス	pcy		NPHP3	AR	多発性嚢胞腎
ラット	Han:SPRD-Cy		Pkdr1	AD	多発性嚢胞腎
マウス	cpk		Cys1	AR	多発性嚢胞腎
マウス	bpk		Bicc1	AR	多発性嚢胞腎・肝
マウス	orpk		TgN737Rpw	AR	多発性嚢胞腎

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- ①Nomura, N., Tajima, M., Sugawara, N., Morimoto, T., Kondo, Y., Ohno, M., Uchida, K., Mutig, K., Bachmann, S., Soleimani, M., Ohta, E., Ohta, A., Sohara, E., Okado, T., Rai, T., Jentsch, T. J., Sasaki, S., Uchida, S., Generation and analyses of R8L barttin knockin mouse. *Am J Physiol Renal Physiol.* 301(2):p.F297-307, 2011.
- ②Sugawara, N., Morimoto, T., Farajov, E. I., Kumagai, N., Aslanova, U. F. Rai, T., Uchida, S., Sasaki, S., Tsuchiya, S., Kondo, Y., Calcium and calcimimetics regulate paracellular Na⁺ transport in the thin ascending limb of Henle's loop in mouse kidney. *Pflugers Arch.* 460(1): p.197-205, 2011.
- ③Farajov, E. I., Morimoto, T., Aslanova, U. F., Kumagai, N., Sugawara, N., Kondo, Y., Calcium-sensing receptor stimulates luminal K⁺-dependent H⁺ excretion in medullary thick ascending limbs of Henle's loop of mouse kidney. *Tohoku J Exp Med*, 216(1): p.7-15, 2008.
- ④Inoue, C. N., Chiba, Y., Morimoto, T., Nishio, T., Kondo, Y., Adachi, M., Matsutani, S., Tonsillectomy in the treatment of pediatric Henoch-Schonlein nephritis. *Clin Nephrol*, 67(5): p.298-305, 2007.
- ⑤Yang, S. S., Morimoto, T., Rai, T., Chiga, M., Sohara, E., Ohno, M., Uchida, K., Lin, S. H., Moriguchi, T., Shibuya, H., Kondo, Y., Sasaki, S., Uchida, S., Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a Wnk4(D561A/+) knockin mouse model. *Cell Metab* 5(5):p.331-44, 2007.
- ⑥Nishino, M., Morimoto, T., Nishio, T., Aslanova, U. F., Farajov, E. I., Kumagai, N., Sugawara, N., Takahashi, S., Ohsaga, A., Maruyama, Y., Tsuchiya, S., Kondo, Y., Gestational length affects a change in the transepithelial voltage and the rNKCC2 expression pattern in the ascending thin limb of Henle's loop. *Pediatr Res* 61(2): p.171-175, 2007.

〔学会発表〕(計2件)

- ①Morimoto T, Sugawara N, Uchida S, Farajov EI, Kamada F, Kumagai N, Aslanova UF, Sasaki S, Tsuchiya S, Kondo Y: Calcium, Magnesium, and Calcimimetics

Decrease Paracellular Na⁺ Permeability in Mouse Thin Ascending Limb of Henle's Loop, 第42回アメリカ腎臓学会, San Diego, 2009.10-11

- ②Morimoto T, Sugawara N, Kumagai N, Farajov EI, Kondo Y, Tsuchiya S: Sustained In Vitro Microperfusion of Mouse Nephron Segments for Elucidating Long-Span Changes of Tubular Functions. 第40回アメリカ腎臓学会, San Francisco, 2007.11

〔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〕

特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根東 義明 (KONDO YOSHIAKI)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 00221250

(2) 研究分担者

大浦 敏博 (OHURA TOSHIHIRO)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 10176828
(H19)

藤原 幾磨 (FUJIWARA IKUMA)
東北大学・病院・講師
研究者番号: 10271909
(H19)

宗形 光敏 (MUNAKATA MITSUTOSHI)
東北大学・医学系研究科・非常勤講師
研究者番号: 30312573
(H19)

内田 信一 (UCHIDA SHINICHI)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 50262184
(H19)

(3) 連携研究者

藤原 幾磨 (FUJIWARA IKUMA)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 10271909
(H20→H22)

宗形 光敏 (MUNAKATA MITSUTOSHI)
東北大学・医学系研究科・その他
研究者番号：30312573
(H20→H22)

内田 信一 (UCHIDA SHINICHI)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・
准教授
研究者番号：50262184
(H20→H22)