

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591211

研究課題名(和文) 細いヘンレの上行脚における細胞間隙ナトリウムイオン輸送の解析

研究課題名(英文) Analysis of paracellular sodium ion transport in the thin ascending limb of Henle's loop

研究代表者

森本 哲司 (MORIMOTO, TETSUJI)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：10344657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の尿濃縮機構において重要な役割を担っている細いヘンレの上行脚において、細胞と細胞の間を通過するナトリウムイオンの輸送機構を生理学的実験法により解析した。今回は、アルドステロンおよびインスリンといったホルモンの影響を検討したが、いずれのホルモンもこの尿細管分節におけるナトリウムイオン輸送には関与していないことが示唆された。また、実験回数が少なかったもののインスリン様成長因子-1も同様の結果を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed paracellular sodium ion transport mechanism in the thin ascending limb, which plays an important role in mammalian urine-concentrating mechanism, using in vitro microperfusion technique. We examined whether aldosterone and insulin affected the transepithelial voltages or not. However, the transepithelial voltages remained unchanged. These results meant that both of them did not affect a sodium ion transport in this segment. Besides, according to just a few experiments, insulin like growth factor - 1 also suggested the same result.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床学・腎臓内科学

キーワード：細いヘンレの上行脚 細胞間隙 ナトリウムイオン輸送

### 1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループは、四半世紀にわたって尿濃縮機構において極めて重要な尿細管分節である細いヘンレの上行脚におけるイオン輸送などの解析を微小単離尿細管灌流実験法を用いて行ってきた。この分節におけるクロライドイオン輸送は経上皮的に行われており、その輸送を担うクロライドイオンチャンネルは1995年に同定された。また、このチャンネルのノックアウトマウスでは腎性尿崩症を呈することが1999年に証明され、如何にこの分節が尿濃縮にとって重要であるかが既に立証されている。

2010年に研究代表者は、カルシウムイオンやカルシウム感知受容体作動薬がこの細いヘンレの上行脚における細胞間隙を介するナトリウムイオン輸送を抑制し、当初の予想を覆して、この現象はカルシウム感知受容体を介していないという事実を報告した。

細胞間隙イオン輸送を調節する分子実体は長らく不明だったが、1998年に月田らがタイト結合構成分子であるクローディン-1, 2を初めて報告し、現在までに20を超えるファミリーメンバーが報告されている。これまでの検討結果からは、クローディンは細胞の膜領域を頂部領域と側底部領域に区分するフェンス機能と管腔側と血管側との物質透過性を制御するバリア機能を持っていると考えられている。

これまでに、クローディン-16や-19の遺伝子変異で家族性の低マグネシウム血症が惹起されることが判明しているが、細いヘンレの上行脚における細胞間隙イオン輸送とクローディンの関連については、詳細な検討が行われていない。

### 2. 研究の目的

上述の研究背景から、(1)細いヘンレの上行脚における細胞間隙ナトリウムイオン輸送は、どのようなシグナル伝達経路を介しているのか？を検討することにした。これまでの研究成果から、細胞間隙のナトリウムイオン輸送はカルシウム感知受容体を介するシグナル経路とは関連性が無いことが示唆されていたため、その他のシグナル伝達経路との関連性を詳細に検討し、カルシウムイオンやカルシウム感知受容体作動薬の投与直後にみられるナトリウムイオン輸送の抑制が、そもそもシグナル伝達経路を介するものか否かを証明することにした。また、(2)細胞間隙ナトリウムイオン輸送の調節にタイト結合主要構成分子クローディンは関与しているのか？を証明することも研究目的とした。従来の研究から、クローディンファミリーの中でクローディン-4が尿濃縮に関わる細いヘンレの上行脚や集合尿細管に存在することが知られており、われわれはクローディン-4と細胞間隙ナトリウムイオン輸送の関連性を絞って、研究を行うことにした。

### 3. 研究の方法

(1)8週齢のC57BL/6NcrSlc マウスから両側の腎臓を摘出し、フェザーで数個の横断面を作成した。その後、実体顕微鏡下でDumont社のNo.5ピンセットを用いて腎乳頭部先端から皮質部に向けて尿細管の束を作り、最終的に髄質部の太いヘンレの上行脚を一部附着した状態で細いヘンレの上行脚を単離した。この際に、出来る限り強い張力が尿細管にかからないように努めた。

(2)単離した尿細管をガラスピペットで倒立顕微鏡のステージ上に設置された専用チャンネルに移し、微小単離尿細管灌流実験を行った。具体的には、太いヘンレの上行脚をホールディングピペットで把持し、パーフュージョンピペットを太いヘンレの上行脚管腔に挿入することで、尿細管を灌流させた。実験のプロトコールは、灌流開始後30分間インキュベーションを行い、その後血液側の灌流液を変更することで管腔側と血液側の間に100mMのNaCl濃度勾配をつけ、経上皮電位を測定した。細いヘンレの上行脚では、細胞間隙ナトリウムイオン輸送に比べ、経上皮クロライドイオン輸送が圧倒的に優位に行われているため、陽性電位が発生することになる。経上皮電位が安定するまで(約25分から30分間)待った後に、各種ホルモンなどを血液側に添加することで、そのホルモンが経上皮電位に及ぼす影響を観察した。

(3)細いヘンレの上行脚に発現しているクローディン-4と細胞間隙ナトリウムイオン輸送の関連性を立証するために、クローディン-4の特異的阻害薬であるウエルシュ菌エンテロトキシンのカルボキシル末端ペプチド断片をプラスミドから大量に精製し、これを細いヘンレの上行脚を灌流後に血管側に添加して、経上皮電位の変化を測定した。

### 4. 研究成果

(1)まず初めに、アルドステロンが細いヘンレの上行脚の経上皮電位に及ぼす影響を示す。

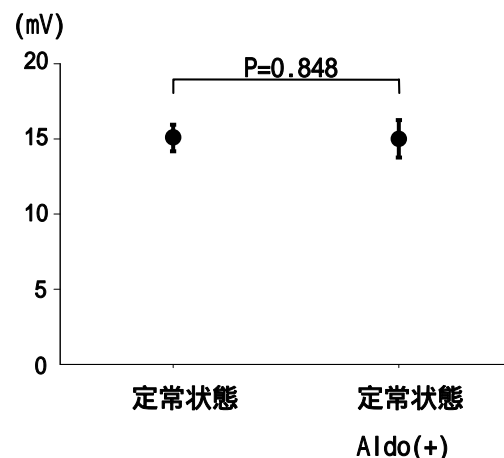


図 1. アルドステロン ( $10^{-9}\text{M}$ ) 添加前後の定常状態における経上皮電位。 (n=4)

アルドステロン添加前の経上皮電位は  $15.3 \pm 1.1\text{mV}$  であり、添加後は  $15.3 \pm 1.6\text{mV}$  だった。アルドステロン添加前後の定常状態における経上皮電位に統計学的有意差は認められなかった。

また、図 2 に示すようにアルドステロン添加前後で  $0.1\text{mM}$  のネオマイシン (カルシウム感受容体作動薬) を血管側に加えた際の経上皮電位の変化 ( $V_d$ ) は、前が  $1.06 \pm 0.27\text{mV}$  で、後が  $1.12 \pm 0.37\text{mV}$  であり統計学的有意差は認められなかった。

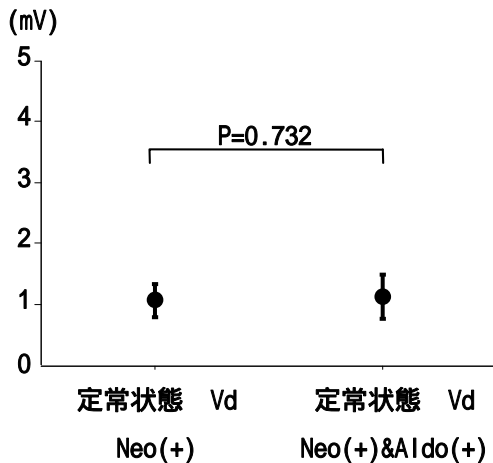


図 2. アルドステロン ( $10^{-9}\text{M}$ ) 添加前後の定常状態におけるネオマイシンを加えた際にみられた経上皮電位の変化。 (n=4)

(2)次に、上皮型成長因子を用いた実験につき報告する。上皮型成長因子がクローディングに影響を及ぼすためには、4時間近いプレインキュベーションが必要であることが細胞培養系の実験結果から判明していたため、長時間尿細管灌流実験を行なった際に自然経過的に経上皮電位が変化しないか否かの確認実験を先に行った。計3回の実験を行なった結果、経上皮電位は実験を開始してから3~4時間目までは安定的に測定することが可能であったが、それ以上長く灌流を続けると徐々に経上皮電位が低下傾向になることが判明したため、上皮型成長因子を用いた実験は継続困難と判断した。

(3)ウエルシュ菌エンテロトキシンのカルボキシル末端ペプチド断片をプラスミドから大量に精製し、灌流実験を行なう予定だったが、研究に必要な十分量の純度の高いウエルシュ菌エンテロトキシンのカルボキシル末端ペプチド断片を精製することが困難だったため、この系の実験を3年間に行うことは不可能と判断した。

(4)そこで、インスリンが細いヘンレの上行

脚の経上皮電位に及ぼす影響を検討した。その結果、インスリン添加前の経上皮電位は  $14.5 \pm 0.4\text{mV}$  であり、添加後は  $14.2 \pm 0.8\text{mV}$  だった。インスリン添加前後の定常状態における経上皮電位に統計学的有意差は認められなかった。

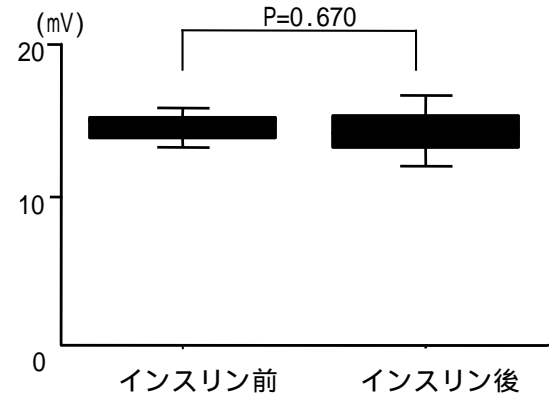


図 3. インスリン ( $10^{-6}\text{M}$ ) 添加前後の定常状態における経上皮電位。 (n=5)

(5)さらに、IGF-1 が細いヘンレの上行脚の経上皮電位に及ぼす影響を検討した。管腔側と血管側との間に  $100\text{mM}$  の  $\text{NaCl}$  濃度勾配下で、経上皮電位が安定した時点で、 $5 \times 10^{-10}\text{M}$  の IGF-1 を血管側に加えた。図 4 に示したように、IGF-1 添加直前の電位は  $15.8\text{mV}$ 、添加 30 分後は  $15.6\text{mV}$  だった。わずかに 1 回の実験結果から結論付けることは難しいが、生理的濃度の IGF-1 は細いヘンレの上行脚におけるナトリウムイオンやクロライドイオン輸送に影響しないことが示唆された。

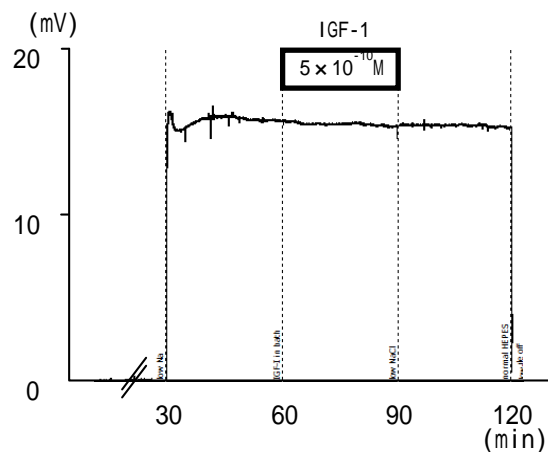


図 4. IGF-1 ( $5 \times 10^{-10}\text{M}$ ) を血管側に添加した際の経上皮電位の経時的推移。 (n=1)

(6)最後に、Angiotensin II が細いヘンレの上行脚の経上皮電位に及ぼす影響を解析した。図 5 に経時的な経上皮電位の推移を示す。30 分間のプレインキュベーション後の経上皮電位は  $16.3\text{mV}$  だった。その後、血管側に  $10^{-6}\text{M}$  の angiotensin II を添加して 30 分後の電位は  $15.4\text{mV}$  まで低下した。ただ、研究分

担者の根東らがハムスターの細いヘンレの上行脚におけるバソプレシンの影響を検討した際に観察された電位変化と異なり、Angiotensin II が効果を示し始めた時点は判然とせず、あたかも自然経過的に経上皮電位が徐々に低下していったと考えられたため、今回の実験結果だけでは、Angiotensin II がこの分節の NaCl 輸送に影響を及ぼしているか否かを判断することは、困難だった。

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

(3) 連携研究者：なし。

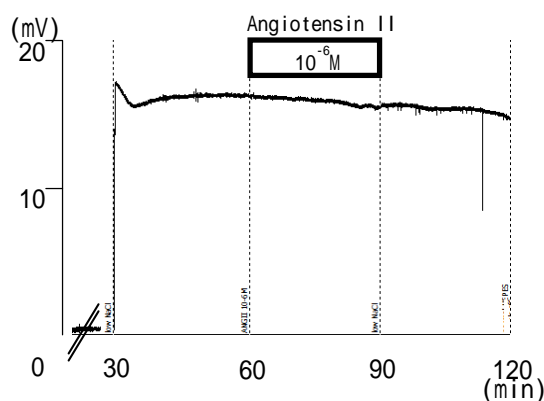


図 5. Angiotensin II ( $10^{-6}\text{M}$ ) を血管側に添加した際の経上皮電位の経時的推移。(n=1)

最終的に今回の研究結果からは、アルドステロンやインスリンなどのホルモンは、細いヘンレの上行脚における NaCl 輸送に影響を及ぼさないことが示唆された。

#### 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 0 件)

〔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：なし。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森本 哲司 (MORIMOTO, Tetsuji)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：10344657

##### (2) 研究分担者

根東 義明 (KONDO, Yoshiaki)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：00221250