

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19441

研究課題名(和文) 培養単離尿細管遺伝子発現調節系を用いた近位尿細管管腔側輸送体の解析

研究課題名(英文) Functional analysis for apical transporters by gene silencing in isolated and cultured renal proximal tubules.

研究代表者

中村 元信 (Nakamura, Motonobu)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40459524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近位尿細管(PT)管腔側Na依存性酸塩基輸送の全容を明らかにするために、単離PTと遺伝子発現調節を行った培養単離PTに各種阻害剤(NHE阻害剤EIPA、重炭酸/陰イオン輸送体阻害剤DIDS)を用いた細胞内pH測定を行った。結果、動物(マウス、ラット)とヒトにおいてPT管腔側Na依存性酸塩基輸送能の種差があることを見いだした。さらにPT管腔側には従来考えられていたNHE3だけではなくDIDS感受性の未知のNa依存性塩基輸送体が存在する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to explore the detailed mechanisms of sodium dependent acid base transport in the apical side of renal proximal tubules (PTs). Cell pH measurement was performed in freshly isolated PTs with several inhibitors including EIPA and DIDS, or in cultured PTs which was gene silenced with siRNA. Consequently, we revealed the existence of DIDS-sensitive components other than Na/H exchanger 3 in the apical side of PTs, which was a possible key in species differences of sodium dependent acid base transport among mice, rats and humans.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：水・電解質代謝学 ナトリウム - プロトン交換輸送体 NHE

1. 研究開始当初の背景

近位尿細管管腔側の主要な酸分泌機構とされている Na/H 交換輸送体 (NHE) 3 を欠損させたマウスでは、ごく軽度の酸血症のみを呈しているにとどまり (Nature Genet 19:282, 1998)、その原因として、NHE8 など他のナトリウム依存性酸分泌機構による代償機構が提唱されていた (J Clin Invest 105:1141, 2000)。

すなわち、NHE3 が近位尿細管の管腔側ナトリウム依存性酸塩基輸送体の中心と考えられていたが、NHE3 欠損マウスでも近位尿細管の NHE 様活性は約 50% 程度保たれていること (J Clin Invest 105:1141, 2000) や NHE3/NHE8 の二重欠損マウスでもごく軽度の酸血症のみを呈している (Am J Physiol 303:F1495, 2012) ということから、他の酸塩基輸送体の存在が示唆されていたが、その本態は不明なままであった。また、ヒトにおいても近位尿細管の Na 依存性酸塩基輸送体については不明な点が多く、近位尿細管管腔側の Na 依存性酸分泌機構には解決すべき大きな課題が残されている。

2. 研究の目的

単離尿細管微小灌流法は尿細管輸送研究に大きな貢献をしてきたが、時間的制約によりこの系で遺伝子発現の調節を行うのは困難であった。一方、遺伝子改変動物の作成には多くの費用と年月を要し、予想外の代償機構が発現することもある。申請者らはこれらの問題を解決するために、培養単離尿細管への siRNA 導入による遺伝子発現調節を樹立し、さらに改良を加えて微小灌流法によらない簡便な管腔側灌流法を確立した。本研究の目的はマウス、ラット、およびヒトの培養単離尿細管にこの新規実験系を応用して、未だ不明の点が多く残っている近位尿細管管腔側の Na 依存性および非依存性酸分泌機構の全容を明らかにすることである。

3. 研究の方法

マウス、ラット、ヒト近位尿細管による申請者らが確立し改良を加えた単離尿細管培養系を用いた新規実験手法を使用した。

マウス、ラットの腎臓から近位尿細管を単離し、ヒトについては腎臓悪性腫瘍を摘出時に得られた腎臓の正常腎皮質から近位尿細管を単離し使用した。

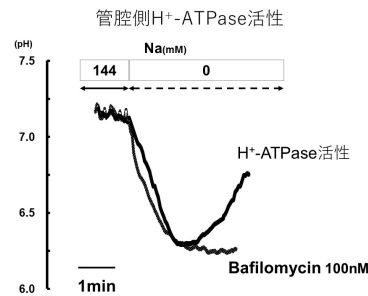
また、管腔側灌流については申請者らが開発した Cell Tak™ で処理したカバーガラスに近位尿細管を接着させ、さらに微小ガラス管で近位尿細管の管腔面を露出させることにより細胞内 pH を測定した (Pflugers Arch 468:1183-96, 2016)。

細胞内 pH 測定は pH 感受性蛍光色素 (BCECF/AM) を使用した。また、基底側 NBCe1 の影響を最小にするため灌流液は HCO₃⁻ を含まない HEPES 緩衝液を使用した。

4. 研究成果

灌流液の Na 濃度を急速に除去することにより、Na 依存性酸塩基輸送体活性を評価した。pH が Na 濃度依存性に低下した後、自然に上昇し、この pH 上昇は H⁺-ATPase の特異的な阻害剤である bafilomycin (100nM) の添加により完全に抑制された (図 1)。

図 1

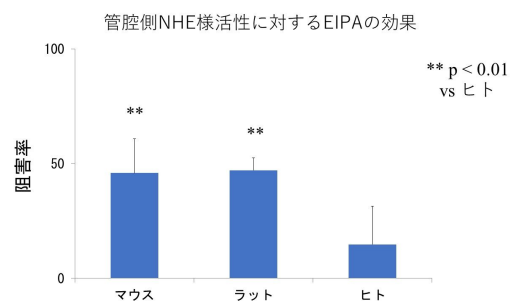


以上の結果から、この反応は管腔側に存在する H⁺-ATPase によるものと考えられたため、細胞内 pH 変化に対する影響を考慮し、全ての灌流液に bafilomycin の添加を行った。

管腔側 Na 依存性酸塩基輸送体活性の中心と考えられている Na/H 交換輸送体 (NHE) 3 の活性の評価をマウス、ラット、ヒトの近位尿細管を使用して行った。

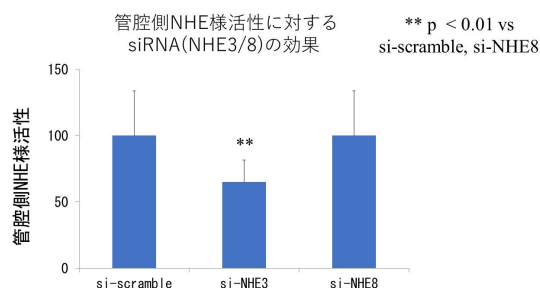
マウスの近位尿細管では、NHE 阻害剤である EIPA の添加により Na 依存性酸塩基輸送体活性は約 50% 抑制され、ラットでも同程度であったが、ヒトでは 15% 程度の抑制効果であった (図 2)。

図 2



さらに、si-RNA を用いたマウスの遺伝子発現調節近位尿細管により管腔側 Na 依存性酸塩基輸送体活性を評価したところ、anti-NHE3 による NHE3 を発現抑制した近位尿細管では約 50% の Na 依存性酸塩基輸送体活性の抑制効果を認めしたが、anti-NHE8 による NHE8 を発現抑制した近位尿細管ではほぼ変化を認めなかった (図 3)。

図 3

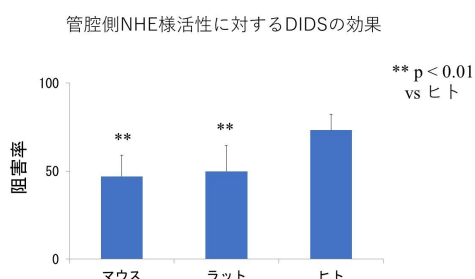


これらの結果から、管腔側 Na 依存性酸塩基輸送体に種差が存在する可能性が示唆された。

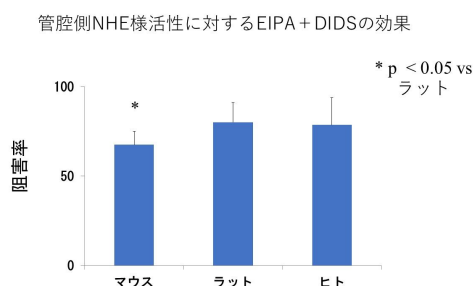
NHE 阻害剤により抑制されない反応として陰イオンの輸送が伴う輸送体が考えられるため、陰イオン輸送体阻害剤である DIDS による Na 依存性酸塩基輸送体活性の効果について検討を行った。

DIDS の添加により、マウス、ラットの管腔側 Na 依存性酸塩基輸送体活性は約 50% の抑制効果を認めたが、ヒトでは約 30% 程度の抑制効果を認めた (図 4)。

図 4



EIPA と DIDS の同時添加による管腔側 Na 依存性酸塩基輸送体活性は、マウス、ラットおよびヒトにおいて約 80% 程度の抑制効果を認めた (図 5)。



これらの結果から、従来考えられていた近位尿細管管腔側の Na 依存性酸塩基輸送体に種差が存在し、さらに、NHE 様の活性を有する既報にはない DIDS 感受性の輸送体の存在が示唆された。

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 5 件)

Satoh N, Suzuki M, Nakamura M, Suzuki A, Horita S, Seki G, Moriya K. Functional coupling of V-ATPase and CLC-5. *World J Nephrol.* 6:14-20, 2017.

Horita S, Nakamura M, Suzuki M, Satoh N, Suzuki A, Homma Y, Nangaku M. The role of renal proximal tubule transport in the regulation of blood pressure. *Kidney Res Clin Pract* 36:12-21, 2017.

Horita S, Nakamura M, Suzuki M, Satoh N, Suzuki A, Seki G. Selective Insulin Resistance in the Kidney. *Biomed Res Int.* 2016:5825170, 2016.

Satoh N, Yamada H, Yamazaki O, Suzuki M, Nakamura M, Suzuki A, Ashida A, Yamamoto D, Kaku Y, Sekine T, Seki G, Horita S. A pure chloride channel mutant of CLC-5 causes Dent's disease via insufficient V-ATPase activation. *Pflugers Arch.* 468:1183-96, 2016.

Satoh N, Nakamura M, Suzuki M, Suzuki A, Seki G, Horita S. Roles of Akt and SGK1 in the Regulation of Renal Tubular Transport. *Biomed Res Int.* 2015:971697, 2015.

[学会発表] (計 10 件)

鈴木 淳司、鈴木 正志、中村 元信、佐藤 信彦、関 常司、佐藤 悠佑、本間 之夫、堀田 晶子、南学 正臣。近位尿細管管腔側 Na 依存性酸塩基輸送体の検討。第 60 回 日本腎臓学会学術総会、仙台国際センター (宮城県、仙台市) 2017 年 5 月 27 日。

中村 元信、鈴木 正志、佐藤 信彦、鈴木 淳司、塚田 弘之、関 常司、佐藤 悠佑、本間 之夫、堀田 晶子、南学 正臣。近位尿細管ナトリウム輸送調節における WNK1/OSR1/SPAK の意義。第 60 回 日本腎臓学会学術総会、仙台国際センター (宮城県、仙台市) 2017 年 5 月 28 日。

中村 元信、鈴木 正志、佐藤 信彦、鈴木 淳司、塚田 弘之、関 常司、佐藤 悠佑、本間 之夫、堀田 晶子、南学 正臣。インスリンは IRS1/Akt2/mTORC

を介して近位尿細管糖新生を抑制する。
第 60 回 日本腎臓学会学術総会、仙台国際センター(宮城県、仙台市) 2017 年 5 月 28 日。

Motonobu Nakamura, Nobuhiko Satoh, Masashi Suzuki, Atsushi Suzuki, Yusuke Sato, Yukio Homma, George Seki, Shoko Horita, and Masaomi Nangaku. Insulin stimulates renal proximal tubule sodium transport via Akt2/mTORC2 pathway. Annual meeting of American Society of Nephrology, Chicago, Nov 19, 2016.

鈴木 淳司、鈴木 正志、中村 元信、佐藤 信彦、関 常司、久米 春喜、本間 之夫、堀田 晶子、南学 正臣。近位尿細管管腔側 Na 依存性酸塩基輸送機構の種差。第 59 回 日本腎臓学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市) 2016 年 6 月 17 日。

中村 元信、鈴木 正志、佐藤 信彦、鈴木 淳司、関 常司、久米 春喜、本間 之夫、堀田 晶子、南学 正臣。インスリンによる近位尿細管 Na 再吸収亢進作用は Akt2 と mTORC2 を介している。第 59 回 日本腎臓学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市) 2016 年 6 月 18 日。

中村 元信、堀田 晶子、鈴木 正志、佐藤 信彦、榎本 裕、久米 春喜、本間 之夫、関 常司。インスリンの近位尿細管 Na 輸送亢進作用は進行した糖尿病性腎症の高血圧維持に重要である。第 58 回日本腎臓学会学術総会、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市) 2015 年 6 月 6 日。

佐藤 信彦、中村 元信、鈴木 正志、堀田 晶子、関 常司。微小灌流法を用いない単離近位尿細管管腔側輸送体機能の新規解析法。第 58 回日本腎臓学会学術総会、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市) 2015 年 6 月 6 日。

Motonobu Nakamura, Nobuhiko Sato, Masashi Suzuki, Atsushi Suzuki, Haruki Kume, Yukio Homma, George Seki, Shoko Horita. Insulin Stimulates Renal Proximal Tubule Sodium Transport in Overt Type 2 Diabetic Nephropathy. Annual meeting of American Society of Nephrology, San Diego. Nov.7, 2015.

Nobuhiko Satoh, Motonobu Nakamura, V-ATPase in Luminal Membrane of Renal Proximal Tubule Requires B2 Subunit and CLC-5 for Its Full Functional Activity. Annual meeting of American Society of Nephrology, San Diego. Nov.7, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
中村 元信 (Motonobu Nakamura)
東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40459524

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()