

令和元年6月20日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K12904

研究課題名(和文)慢性腎臓病治療の新たなターゲットとなるNa<sup>+</sup>吸収輸送体の輸送機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of transport mechanism of NHE3 for novel therapeutic target in chronic kidney disease.

研究代表者

石塚 典子(Ishizuka, Noriko)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：30440283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：消化管に発現しているNa<sup>+</sup>吸収輸送体であるNHE3は、細胞内pHが中性付近では不活化状態であり、酸性化により活性化される。NHE3はゆっくりと活性化しており、このことはNHE3活性化には二量体形成のような立体構造変化が関与している可能性を示している。また、NHE3はいくつかの異なる輸送体とカップルし、複数の輸送モードを持つと考えられている。本研究ではNHE3特異的阻害剤として、対称構造を有しNHE3との結合部位が2箇所あることが想定されているテナパノールを用いて活性化機序の検討を行った。テナパノールは不可逆的にNHE3に結合する可能性と、NHE3の異なる輸送モードを認識することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体(NHE)3はNa<sup>+</sup>吸収と交換にH<sup>+</sup>を細胞外に排出している。このためNHE3は、Na<sup>+</sup>吸収と同時に、細胞内pH調節にも関与する。本研究ではNHE3阻害剤を用いて、NHE3の機能活性をNaCl吸収機能(Cl<sup>-</sup>輸送体とカップルする)とH<sup>+</sup>排出機能(H<sup>+</sup>依存性ペプチド吸収とカップルする)として評価した。NHE3阻害剤は前者を大きく抑制しないが、後者を強く抑制した。これはNHE3とカップルする輸送体によりNHE3阻害剤の作用機構が異なることが理由として考えられた。研究成果は新たな腸管からのNa<sup>+</sup>吸収抑制機序の発見に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transport activity of intestinal Na/H exchanger 3 isoform (NHE3) is sensitive to intracellular pH (pHi). At resting pHi, a large fraction of transporters resides in an inactive state. When the H<sup>+</sup> concentration of the cytosol rises, the transporters are converted into an active state. We have previously shown that NHE3 is slowly activated over the course of minutes, implying involvement of a conformational change of NHE3 such as dimerization in heterogenous expression systems. Under physiological conditions, NHE3 is thought to be coupled with other transporters in a concerted manner. To gain insight into the activation mechanism of NHE3, we used the NHE3 specific inhibitor tenapanor, which has a symmetrical structure with two proposed binding sites. Our results suggested that tenapanor may irreversibly bind to NHE3 and recognize the different NHE3 transport modes.

研究分野：生理学

キーワード：NHE3 消化管 NaCl吸収

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

新たな国民病といわれる慢性腎臓病 (CKD) の患者は、1300 万人以上と推定されている。CKD が進行すれば、末期腎不全となり、腎代替療法である血液透析を要することや、心血管疾患・脳血管疾患の重大な危険因子になることが注目されている。血液透析に至ると、その治療は生涯続き、患者本人の生活の質の低下のみならず、生涯にわたる高額な医療費のための社会的損失も大きい。このため、CKD の重症化に至らない為の進行予防策を講じることが、今後の高度高齢化社会を考慮すると喫緊の課題であるといえる。CKD の増悪因子として、食塩摂取が密接に関係していることは良く知られており、生活習慣の是正と食事療法が重要である。

近年、腸管からの  $\text{Na}^+$  吸収を抑制することにより、同時に腸管  $\text{K}^+$  分泌を亢進させる治療薬がアメリカで臨床試験中である (総説: Spencer AG et al. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015)。テナパノールや SAR2218034 などの薬剤は、腸管の主要な  $\text{Na}^+$  吸収機構である  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体 (NHE) 3 の阻害薬であり、腸管からの  $\text{Na}^+$  吸収を抑制し、尿中  $\text{Na}^+$  排泄の減少と便中  $\text{Na}^+$  排泄の増加を促す。テナパノールは CKD 患者において、SAR2218034 は高血圧のモデルラットにおいて血圧を低下させることが報告されている (Spencer AG et al. *Sci Transl Med.* 2014、Linz D et al. *Hypertension.* 2012)。しかしながら、これら薬剤のターゲットである NHE3 のイオン輸送の機序の詳細は十分に検討されていない。更に興味深いことに、テナパノールは分子が鏡面構造を有しており、薬剤の結合部位が 2 カ所あることが予測されるが、その検討は一切なされていない。

NHE3 ノックアウトマウスでは、腸での  $\text{Na}^+$  吸収低下により、 $\text{Na}^+$  を多く含む下痢と代謝性アシドーシスを起こすことが報告されており、NHE3 が腸管での主要な  $\text{Na}^+$  吸収輸送体であると考えられている (Schultheis PJ et al. *Nat Genet.* 1998)。NHE3 は、細胞外の  $\text{Na}^+$  と細胞内の  $\text{H}^+$  を 1 対 1 で交換する二次性の能動輸送体である。この輸送体の駆動力は、小腸上皮細胞基底膜に存在する一次性能動輸送体である  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) により維持される内向きの  $\text{Na}^+$  の電気化学勾配を利用している。細胞内  $\text{Na}^+$  濃度は細胞外の約 1/10 になっているため、この  $\text{Na}^+$  勾配を利用して常に NHE3 が働くと、細胞内の  $\text{H}^+$  濃度は細胞外の 1/10 になり、pH 8 となることが予期されるが、実際には細胞内 pH は中性 (pH7.0) 付近に保たれている。この機序として、NHE3 のイオン輸送活性は pH センサーにより制御されており、細胞内 pH が中性付近では静止状態にあり、細胞内 pH が酸性化されると NHE3 は活性化状態に移行すると考えられている。この活性化の機序に関しては、NHE3 のリン酸化、他の機能調節タンパク質との相互作用、脂質ラフトの関与等が検討されてきている。また、活性化の機序の一つとして、NHE3 は二量体を形成して機能することが提唱されているが (Fafournoux P et al. *J Biol Chem.* 1994)、実際に NHE3 の機能活性に二量体の形成が必要か否かの検討は全く行われていない。

## 2. 研究の目的

慢性腎臓病 (CKD) の患者は、人口構成の高齢化に伴い増加が予想され、更に CKD の病態が進行すると、血液透析患者が増加することが懸念されている。このため、CKD が重症化に至らない為の進行予防策を講じることが喫緊の課題である。CKD の増悪因子として食塩摂取が問題となるが、最近 CKD の治療薬として腸管の  $\text{Na}^+$  吸収輸送体である NHE3 の抑制剤が注目を浴びている。しかし、これら薬剤のターゲットである NHE3 のイオン輸送の機序の詳細は十分に検討されていない。本研究では NHE3 分子が、どのような機構で  $\text{Na}^+$  を輸送しているかを明らかにし、更に薬剤の作用機序を明らかにすることにより、今後の NHE3 をターゲットとする治療の基礎研究とする。

## 3. 研究の方法

本研究では NHE3 の活性化機序を検討するため、NHE3 特異的阻害剤として、対称構造を有し NHE3 との結合部位が 2 カ所あることが想定されているテナパノールと、従前より用いられている S3226 とを比較した。

- (1) 内因性  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送活性を欠損した PS120 細胞に、リポフェクション法を用いて NHE3 遺伝子を導入し、酸負荷および限界希釈法により安定形質発現株を作成した。NHE3 の機能活性は、pH 感受性蛍光色素 BCECF を細胞に負荷し、酸負荷後の  $\text{Na}^+$  依存性細胞内 pH ( $\text{pH}_i$ ) 回復速度を蛍光顕微測定法を用い測定した。

- (2) マウス腸管より粘膜標本を作製し、Ussing チャンバー法にて NHE3 輸送活性を評価した。  
マウス小腸上皮におけるペプチド誘発性短絡電流上昇 ( $H^+$ 依存性ペプチド吸収) を NHE3 機能活性として評価した。  
マウス大腸上皮における経上皮  $^{22}Na^+$ フラックス ( $Na^+$ 吸収) を NHE3 活性の指標として測定した。

#### 4. 研究成果

- (1) NHE3 発現細胞にアンモニアパルス法で酸負荷を行い、 $Na^+$ 依存性 pH 回復速度を測定した。酸負荷時間の増加に伴い、 $Na^+/H^+$ 交換輸送活性が高くなった。酸負荷時間 1 分間と 10 分間を比較すると、10 分間では pH 回復速度は約 10 倍に活性化され、NHE3 はゆっくりと活性化された。テナパノールは酸負荷時間 1 分間、10 分間共に用量依存的に抑制し、その阻害定数 ( $IC_{50}$ ) はそれぞれ 1.26、3.02nM であった。これは NHE3 のゆっくりとした活性化にはテナパノールの化学構造 (想定される NHE3 の結合部位が 2 カ所あること) は関与しないことを示唆した。しかし興味深いことに、テナパノールを含む液で細胞をインキュベーションし、その後外液を洗浄し NHE3 輸送活性を測定すると、テナパノール非存在下にも関わらず NHE3 輸送活性は用量依存的に抑制され、テナパノールは不可逆的に NHE3 に結合することが示唆された。

- (2) 小腸上皮に発現する  $H^+$ 依存性ペプチド吸収輸送体 (PepT1) は NHE3 と機能的に共役しているため、ペプチド誘発性短絡電流上昇は間接的に NHE3 輸送活性の指標として評価することができる。マウス小腸上皮におけるペプチド誘発性短絡電流上昇は、S3226 およびテナパノール添加により、いずれも用量依存的に抑制された。 $IC_{50}$  は S3226 では 5.9  $\mu M$ 、テナパノールでは 6.3nM であり、テナパノールが低濃度で作用することが示された。また、生体組織においてもテナパノールは不可逆的に NHE3 を抑制した。

大腸上皮における  $NaCl$  吸収は NHE3 と  $Cl^-/HCO_3^-$ 交換輸送体 (DRA) による電気的中性輸送機構によって担われている。マウス大腸上皮における経上皮  $^{22}Na^+$ フラックスは S3226 により完全に抑制されたが、テナパノールでは、 $H^+$ 依存性ペプチド吸収に対する阻害効果を示す濃度よりもはるかに高い 100nM を添加しても約 40% の抑制しか観察されなかった。

以上の結果から、テナパノールは細胞内酸性化により活性化された NHE3 は強く抑制するが、 $Na^+$ 吸収に関与している NHE3 に対する抑制は弱く、NHE3 の異なる輸送モードを認識し抑制している可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ishizuka N, Nakayama M, Watanabe M, Tajima H, Yamauchi Y, Ikari A, Hayashi H.: Luminal  $Na^+$  homeostasis has an important role in intestinal peptide absorption in vivo. *Am J Physiol* 315: G799-G809, 2018.

〔学会発表〕(計 4 件)

Ishizuka N, Koido S, Hayashi H.: The mode of action of the NHE3 inhibitor tenapanor in intestinal  $Na$  absorption. Physiology 2019 (Aberdeen, UK) 2019 年 7 月 8 日 (予定)

Ishizuka N, Koido S, Hayashi H.: Oligomerization of  $Na^+/H^+$  exchanger isoform 3 (NHE3) and its role in the transport mechanism. 9<sup>th</sup> FAOPS (Kobe) 2019 年 3 月 29 日

石塚典子、林久由: 小腸ペプチド吸収における管腔  $Na$  恒常性の重要性. 第 49 回日本消化吸収学会総会 (千葉) 2018 年 11 月 17 日

石塚典子、林久由: 消化管  $Na^+$ 吸収輸送体 NHE3 の活性化機序の検討. 第 49 回日本消化吸収学会総会 (千葉) 2018 年 11 月 17 日

〔図書〕(計 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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。