

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08201

研究課題名(和文) 近位尿細管管腔側酸分泌におけるNBCn2の生理的・病態生理的意義

研究課題名(英文) Physiological and pathophysiological significance of NBCn2 in luminal acid secretion in proximal tubules.

研究代表者

鈴木 正志 (SUZUKI, MASASHI)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：90595662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近位尿細管管腔側のナトリウム依存性酸塩基輸送はNHE3が主に担っているとされていたが疑問も呈されていた。本研究では単離近位尿細管で酸塩基輸送を解析した。NHE阻害剤EIPAにより酸塩基輸送は10-50%抑制しか抑制されなかったが、DIDSにより30-50%、EIPA、DIDSの同時添加で80%以上が抑制された。近年DIDS感受性のNBCn2の近位尿細管への発現が報告されていた。NBCn2に対するsiRNAにより近位尿細管管腔側の酸塩基輸送は約50%抑制され、免疫組織染色によりNBCn2の発現を確認した。これらから近位尿細管管腔側にNBCn2が発現し、酸塩基輸送に関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では主にNa/H交換輸送体(NHE)3が司るとされてきた近位尿細管管腔側のナトリウム依存性酸塩基輸送がNHE3だけでなくNa-HCO₃共輸送体NBCn2により行われていることを示すことができた。ナトリウムは血液中の主要な電解質であり、血圧のコントロールに重要な役割を果たしている。一方、近位尿細管は糸球体で濾過されたナトリウムの約80%を再吸収しており、今後血圧調節のメカニズム解明や新たな降圧剤開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Sodium-dependent acid-base transport in the luminal side of the proximal tubule has been questioned, although NHE3 is thought to be mainly responsible for sodium-dependent acid-base transport. In the present study, we analyzed acid-base transport in isolated proximal tubules and found that the NHE inhibitor EIPA suppressed acid-base transport by 10-50%, whereas DIDS suppressed it by 30-50% and simultaneous addition of EIPA and DIDS by more than 80%. siRNA against NBCn2 suppressed acid-base transport in the proximal tubular lumen by about 50%, and immunohistochemistry confirmed the expression of NBCn2. NBCn2 expression on the proximal tubular lumen may be involved in acid-base transport.

研究分野：腎臓内科

キーワード：NBCn2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近位尿細管管腔側の酸塩基輸送は主にNa/H交換輸送体(NHE)3が担っていると長年考えられていたが、ヒト機能廃絶型変異症例で酸血症を来さない事などから疑問が呈されている。また、NHE3特異的阻害剤はラット単離近位尿細管でNa輸送を30%程度しか阻害せず、近位尿細管特異的NHE3ノックアウトマウスでも酸血症は軽度で、単離近位尿細管の酸塩基輸送能は36%のみの減少であった。これらは申請者らが報告してきた近位尿細管基底側ではNBCe1の50%以下の機能低下で重症の酸血症をきたす事とは対照的で、他の輸送機構の存在が考えられていたが、その内容は全く不明であった。我々は単離近位尿細管による予備実験によりNHE阻害剤EIPAにより抑制されず、DIDSで抑制される酸塩基輸送を確認した。NBCn2は脳神経系に多く発現し、神経細胞における機能、役割が研究されてきたが、腎臓での役割は不明であった。最近、PT管腔側にNBCn2が発現している事が報告され、数学的モデルにより酸塩基輸送に関わっている可能性が示されたが、近位尿細管での酸塩基輸送における役割は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は近位尿細管管腔側のナトリウム依存性酸塩基輸送におけるNBCn2の意義を明らかにするために、単離近位尿細管におけるNBCn2の生理的役割の度合いを明らかにする事である。申請者らはこれまでの近位尿細管イオン輸送研究の中で、NBCe1変異による眼症状、片頭痛を合併する酸血症の発症やインスリン抵抗性における高血圧発症メカニズムの一端を明らかにしてきた。最近ではsi-RNA導入による単離近位尿細管遺伝子発現を選択的かつ高率に抑制する実験系を確立し、遺伝子改変動物を作成する事なく特定遺伝子発現を抑制し、*ex vivo*の状態での尿細管の生理機能を評価できる極めて画期的な実験系として注目を集めている。さらに、近位尿細管split open法は煩雑な微量灌流を行わずに簡便な操作で近位尿細管管腔側の輸送体の評価を可能にする手法であり、既に成果もあげている。本研究はこうした申請者らの豊富な業績・知見に基づいて立案され成果が十分期待されるものでもある。またNHE3の意義についての通説を覆す可能性もあり、極めて独創的なものでもある。さらに、血圧調節におけるSGLT2とNBCn2との共役関係を明らかにする事により、SGLT2やNBCn2をターゲットとした新たな機序による降圧薬や血糖降下剤の創薬も期待でき、臨床的な意義も高いものである。

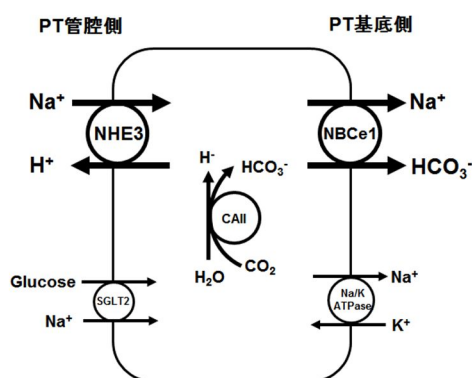


図1. PTナトリウム・酸塩基輸送機構 (従来のモデル)

3. 研究の方法

ラットおよび腎癌摘出時に得られたヒトの単離近位尿細管の管腔側を露出させ(split open法)重炭酸を含まないHPES灌流液からナトリウムを除去した際の細胞内pHの変化を測定する事により、近位尿細管管腔側における酸塩基輸送を解析した。細胞内pHの測定は倒立蛍光顕微鏡上のMetaFluor®システムを用い、pH感受性蛍光色素(BCECF-AM)により測定を行った。単離近位尿細管に対し、NHE阻害剤EIPA、重炭酸輸送体阻害剤DIDSを作用させ輸送能の変化を測定した。また、NBCn2に対するsiRNAを単離近位尿細管に作用させ、酸塩基輸送への影響を調べた。さらに、ラット、ヒトの腎皮質組織をNBCn2に対する抗体を使用し免疫組織染色を行い蛍光顕微鏡で近位尿細管への発現を評価した。

4. 研究成果

ラットおよび腎癌摘出時に得られたヒトの単離近位尿細管の管腔側を露出させ(split open法)重炭酸を含まないHPES灌流液からナトリウムを除去した際の細胞内pHの変化を測定する事により、近位尿細管管腔側における酸塩基輸送を解析した。近位尿細管管腔側の酸塩基輸送はNa/H交換輸送体(NHE)3が主に担っていると考えられてきたが、NHE阻害剤EIPAにより酸塩基輸送は10-50%抑制しか抑制されなかった。一方、重炭酸輸送体阻害剤DIDSにより近位尿細管管腔側の酸塩基輸送が30-50%抑制された。さらにEIPA、DIDSの同時添加により近位尿細管管腔側の酸塩基輸送の80%以上が抑制された。このこ

とからDIDS感受性の未知の輸送機構が存在する可能性が示唆された。また、Na - HCO₃ 共輸送体NBCn2が近位尿細管管腔側に発現していることが近年報告されていたが、その役割は明らかにされていなかった。このため、NBCn2に対するsiRNAを単離近位尿細管に作用させ、酸塩基輸送への影響を調べる実験を行ったところ、近位尿細管管腔側の酸塩基輸送は約50%抑制された。さらに、ラット、ヒトの腎皮質組織をNBCn2に対する抗体を使用し免疫組織染色を行ったところ、近位尿細管管腔側が染色され、NBCn2が発現していることを確認した。これらの結果から近位尿細管管腔側にNBCn2が発現し、これまで酸塩基輸送の主体と考えられてきたNHE3だけでなくNBCn2が酸塩基輸送に大きく関与している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Motonobu, Tsukada Hiroyuki, Seki George, Satoh Nobuhiko, Mizuno Tomohito, Fujii Wataru, Horita Shoko, Moriya Kyoji, Sato Yusuke, Kume Haruki, Nangaku Masaomi, Suzuki Masashi	4. 巻 97
2. 論文標題 Insulin promotes sodium transport but suppresses gluconeogenesis via distinct cellular pathways in human and rat renal proximal tubules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 316 ~ 326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2019.08.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Vachel Laura, Shcheynikov Nikolay, Yamazaki Osamu, Fremder Moran, Ohana Ehud, Son Aran, Shin Dong Min, Yamazaki-Nakazawa Ai, Yang Chin-Rang, Knepper Mark A., Muallem Shmuel	4. 巻 11
2. 論文標題 Modulation of Cl- signaling and ion transport by recruitment of kinases and phosphatases mediated by the regulatory protein IRBIT	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaat5018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aat5018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamazaki Osamu, Ishizawa Kenichi, Hirohama Daigoro, Fujita Toshiro, Shibata Shigeru	4. 巻 133
2. 論文標題 Electrolyte transport in the renal collecting duct and its regulation by the renin angiotensin aldosterone system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Science	6. 最初と最後の頁 75 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/CS20180194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishizawa Kenichi, Wang Qin, Li Jinping, Yamazaki Osamu, Tamura Yoshifuru, Fujigaki Yoshihide, Uchida Shunya, Lifton Richard P., Shibata Shigeru	4. 巻 116
2. 論文標題 Calcineurin dephosphorylates Kelch-like 3, reversing phosphorylation by angiotensin II and regulating renal electrolyte handling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 3155 ~ 3160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1817281116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 塚田 弘之、中村 元信、水野 智仁、佐藤 信彦、佐藤 悠佑、堀田 晶子、関 常司、久米 春喜、南学 正臣、鈴木 正志
2. 発表標題 副甲状腺ホルモンはPKC/FOXO1を介して近位尿細管糖新生を亢進させる
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Tsukada, Motonobu Nakamura, Shoko Horita, Wataru Fujii, Tomohito Mizuno, Nobuhiko Satoh, Yusuke Sato, George Seki, Haruki Kume, Masaomi Nangaku, Masashi Suzuki.
2. 発表標題 Parathyroid Hormone Enhances Gluconeogenesis via the PKC/FoxO1 Pathway in Proximal Tubules
3. 学会等名 Annual Meeting of The American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motonobu Nakamura, Nobuhiko Satoh, Hiroyuki Tsukada, Tomohito Mizuno, Wataru Fujii, Shoko Horita, Masaomi Nangaku, Masashi Suzuki
2. 発表標題 Insulin Stimulates V-ATPase on Renal Proximal Tubules via the Akt/mTORC2 Pathway
3. 学会等名 Annual Meeting of The American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura, M, Suzuki, A, Horita, S, Satoh, N, Tsukada, H, Sato, Y, Seki, G, Kume, H, Nangaku, M, Suzuki, M
2. 発表標題 ROLES OF NA ⁺ /HCO ₃ ⁻ COTRANSPORTER NBCN2 IN ACID-BASE TRANSPORT IN THE APICAL MEMBRANE OF RENAL PROXIMAL TUBULES
3. 学会等名 ISN World Congress of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsukada, H, Nakamura, M, Satoh, N, Mizuno, T, Sato, Y, Horita, S, Seki, G, Kume, H, Nangaku, M, Suzuki, M
2. 発表標題 EFFECTS OF PARATHYROID HORMONE ON GLUCOSE METABOLISM IN RENAL PROXIMAL TUBULES
3. 学会等名 ISN World Congress of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村元信、佐藤信彦、塚田弘之、水野智仁、佐藤悠佑、堀田晶子、関常司、鈴木正志、久米春喜、南学正臣
2. 発表標題 近位尿細管ナトリウム輸送調節におけるWNK1/OSR1経路の意義
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚田 弘之、佐藤信彦、中村 元信、水野智仁、佐藤悠佑、堀田晶子、関常司、鈴木正志、久米春喜、南学正臣
2. 発表標題 副甲状腺ホルモンは近位尿細管ナトリウム輸送と糖新生に関与している
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motonobu Nakamura, Shoko Horita, Nobuhiko Satoh, George Seki, Tomohito Mizuno, Hiroyuki Tsukada, Yusuke Sato, Haruki Kume, Masaomi Nangaku, Masashi Suzuki.
2. 発表標題 A Pivotal Role of WNK1/OSR1 Pathway in Regulation of Renal Proximal
3. 学会等名 Annual Meeting of The American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Osamu Yamazaki, Maho Yamashita, Jinping Li, Tadashi Yoshida, Junichi Hirahashi, Shigeru Shibata, Matsuhiko Hayashi.
2. 発表標題 A Novel I551F Mutant of Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ Cotransporter NBCe1 Has Cytosolic Retention and Diminishes Transport Activity
3. 学会等名 Annual Meeting of The American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	堀田 晶子 (Horita Shoko) (20534895)	東京大学・医学部附属病院・届出診療員 (12601)	
研究分担者	中村 元信 (Nakamura Motonobu) (40459524)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	佐藤 信彦 (Sato Nobuhiko) (80572552)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	山崎 修 (Yamazaki Osamu) (80757229)	帝京大学・医学部・講師 (32643)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------