

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 11 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590942

研究課題名（和文）カルシウム感知受容体による尿酸性化調節機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of urine acidification mechanism through calcium-sensing receptor

研究代表者

森本 哲司 (MORIMOTO TETSUJI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：10344657

研究成果の概要（和文）：腎髄質にある太いヘンレの上行脚を手動的に単離した後に、灌流実験を行い、カルシウム感知受容体を介する pH 調節機構を解析した。その結果、生理的な重炭酸イオンを含む灌流液の下では、カルシウム感知受容体を刺激する薬剤を投与すると細胞内がアルカリ化されることが分かった。そして、この調節機構はナトリウムイオンには非依存性で、カリウムイオンに依存していることを初めて立証することに成功した。

研究成果の概要（英文）：We examined whether Calcium-sensing receptor (CaR) activation caused acid secretion in the medullary thick ascending limb of mouse kidney using *in vitro* microperfusion. We verified that Neomycin (which activates CaR) induced intracellular alkalinization in $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -buffer. Besides, we succeeded to establish that this regulatory mechanism is luminal K^+ -dependent but luminal Na^+ independent for the first time.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：カルシウム感知受容体、腎髄質部太いヘンレの上行脚、微小単離尿管灌流法

1. 研究開始当初の背景

1993 年、Brown らが初めて副甲状腺からカルシウム感知受容体 (CaR) をクローニングして以来、腎内の尿細管全部に CaR が分布し、数多くの生理的機能を果たしていることが予測されながら、その解析は進んでいない。モデルマウスや臨床的知見から、CaR の活性過剰型遺伝子変異のみならず、特定の SNP も

腎結石症との強い関連が示唆されていた。これらの腎結石症では、必ずしも血清カルシウム値が上昇しておらず、尿中カルシウム値のみが上昇する場合が少なくなく、副甲状腺に発現している CaR ではなく尿細管に発現している CaR の機能的異常のために腎結石症を発症することが強く示唆されていた。CaR の生理作用としては、ヘンレの太い上行脚と遠位

尿細管における NaCl 再吸収の抑制作用がよく知られており、高カルシウム血症の際に尿濃縮力低下は、臨床的に周知されている。しかしながら、尿路結石症の発症と腎内 CaR との病態生理学的関係に関して考えてみると、なぜ CaR の過剰活性化と高カルシウム尿が連関するかについては、尿細管レベルでのダイナミクスがほとんど未解明の状態だった。特に、結石生成に直結するカルシウムの脱イオン化と重要な関係をもつ尿中 pH の調節機構とカルシウム感知受容体の関連については、詳細な検討がなされていなかった。

2. 研究の目的

今回の研究目的は、上記の背景を踏まえマウスの尿細管（特に、腎髄質の太いヘンレの上行脚）における尿酸性化機構の調節に CaR が関与しているのか否かを検討することである。次に、1930 年代に Randall によって記述された腎結石症の初期病態像として、Randall's plaque が知られている。腎乳頭部に出現するこの病理所見と CaR との関連が 2007 年に入って急に脚光を浴びてきている。CaR 活性化変異モデルである Nuf ラットでも、やはり Randall's plaque が出現するという事実は、腎結石症の中で最も頻度の高い尿酸カルシウム結石症の原因解明は重要である。そこで、Nuf ラットの入手を試み、モデルラットを用いて腎結石症の発症と CaR との関連があるのかを検討する。さらに、尿酸結石症患者をはじめとする腎結石症患者の尿から落下尿細管細胞を培養し、様々な実験条件の検討を行いながら、CaR の腎における発現異常の有無も検討する。

3. 研究の方法

(1) 微小単離尿細管灌流実験は、ペントバルビタール麻酔下に、水分および飼料に自由アクセスとした 4-6 週令の C57BL/6 マウスを開腹し、両側腎臓を摘出後、4°C に冷却した HEPES 緩衝リンゲル液中に移した。その後、実体顕微鏡上に設置されたペトリ皿の上で目的とする尿細管分節を 2 本のピンセットを用いて単離した。次に、単離した尿細管分節をトランスファーピペットで、倒立顕微鏡のステージ上に設置したチャンバーに移した。チャンバーは、常に灌流される溶液を事前に 37°C に加温することで、恒温実験条件を設定し、生理的な温度環境を構築した。細胞内 pH の測定のため、細胞内 pH 感受性蛍光色素 BCECF-AM (2', 7' -bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6-) -carboxyfluorescein) -acetoxymethyl ester を細胞内に取り込ませ、30 分間インキュベーションした後に、浜松フオトニクス社製の細胞内イオン分布測光装置 AquaCosmos を用いて、経時的かつ画像的に細胞内の pH 変化を観察した。特に、CaR 刺激時

(CaR 作動薬であるネオマイシンを浴液側に加えた際) の細胞内 pH 変化を詳細に記録した。さらに、CaR が細胞内 pH 調節に関与することが明らかになった尿細管分節については、どのイオン輸送体をどのようなシグナル伝達系を介して刺激ないしは抑制しているかを詳細に検討した。下記に、今回の研究で用いた灌流液の組成を示す。

	HEPES-buffered	CO ₂ /HCO ₃ ⁻ -buffered		
		Standard	Na ⁺ -free	K ⁺ -free
Hepes	10	0	0	0
CaCl ₂	1.5	1.5	1.5	1.5
NaCl	135	115	0	117
Na acetate	1	1	0	1
D-glucose	5.5	5.5	5.5	5.5
L-alanine	5	5	5	5
KCl	3	3	3	0
MgCl ₂	1	1	1	1
KH ₂ PO ₄	2	2	2	0
NaH ₂ PO ₄	0	0	0	2
NaHCO ₃	0	25	0	25
Cholin Cl	0	0	140	0
Choline HCO ₃	0	0	25	0

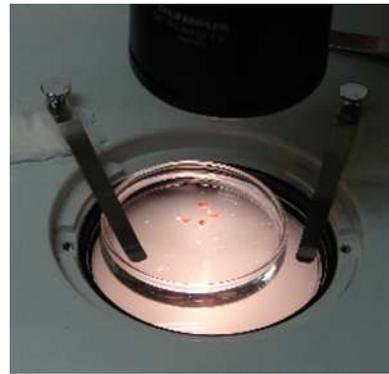


図 1 ; 実体顕微鏡上の摘出したマウス腎臓
摘出したマウス腎臓をフェザーで薄切した後、実体顕微鏡を用い、ピンセットで目的とする尿細管分節を単離する。



図 2 ; 単離されたマウス mTAL
最終的には、1 本の尿細管として単離した。この尿細管は、mTAL である。灌流前なので mTAL の管腔は閉じた状態である。



図 3 ; 灌流中のマウス mTAL

図 3 は、実際に灌流されているマウス mTAL である。尿細管全体をホールディングピペットで把持し、尿細管管腔側に極めて細いガラス管（パーフュージョンピペット）を挿入してある。

4. 研究成果

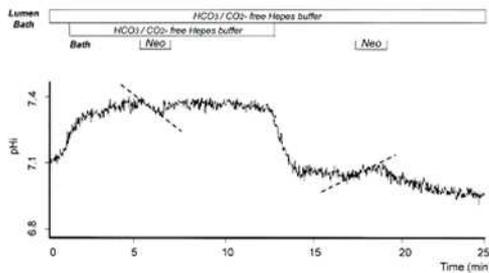


図 4 ; マウス腎髄質の太いヘンレの上行脚 (mTAL) に CaR 作動薬ネオマイシン (0.4mM) を加えた際の細胞内 pH の変化。

重炭酸イオンを含まない溶液で灌流されている mTAL の浴液側にネオマイシンを加えると、細胞内 pH は酸性に傾いた。しかし、より生理的な状態である重炭酸イオンを含む溶液下で同じ実験を行うと細胞内 pH はアルカリ性に変化することがわかった。実測値としては、重炭酸イオンを含む溶液下の定常状態の細胞内 pH は 7.17 ± 0.01 (n=19) で、ネオマイシンによって CaR を刺激すると細胞内 pH は 7.28 ± 0.02 (n=19) にアルカリ化された。

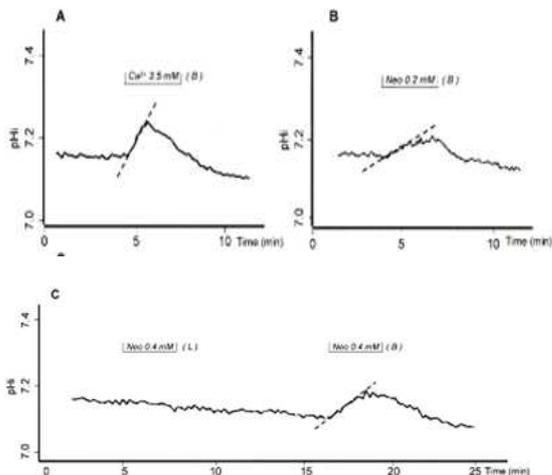


図 5 ; (A) 3.5mM のカルシウム濃度に調整した溶液を浴液側に加えると細胞内 pH はアルカリに傾いた。(B&C) CaR 作動薬ネオマイシンの濃度依存性の反応を調べた。0.2mM のネオマイシンを浴液側 (B) に加えた際の細胞内 pH 変動幅は 0.06 ± 0.02 (n=5, $P < 0.02$) で、0.4mM のネオマイシンの場合は 0.11 ± 0.03 (n=19, $P < 0.03$) の pH 変動があり、細胞内 pH の変動はネオマイシンの濃度依存性であることが判明した。また、mTAL の管腔側には CaR の発現はないので、管腔側 (L) にネオマイシンを加えても細胞内 pH の変動は全く観察されなかった。

次に、我々は重炭酸イオンを含む溶液下でネオマイシンを加えた際にみられる mTAL 細胞内の pH がアルカリ化される現象に、ナトリウムイオン、カリウムイオン、プロトン ATPase が関与しているか否かを確かめた。

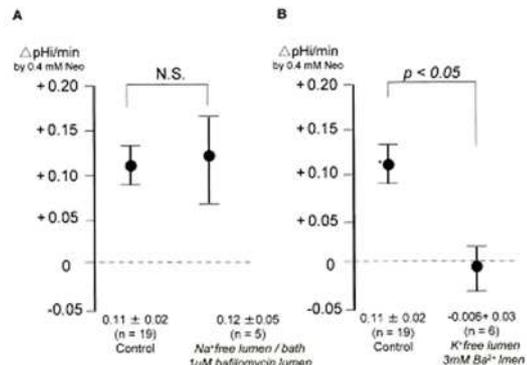


図 6 ; (A) mTAL を用いて、プロトン ATPase 阻害薬バフィロマイシン $1 \mu\text{M}$ を管腔側に加え、さらに浴液側の溶液をナトリウム不含液に置換して実験を行った。しかし、この際には 0.4mM のネオマイシンを浴液に加えると重炭酸イオン含有標準液使用下と同じく、細胞内 pH のアルカリ化が観察された。(B) 次に、管腔側に 3mM の Ba^{2+} (カリウムチャネル阻害薬) を加え、さらにカリウム不含液に管腔側を置き換えて実験を行った。その結果、管腔側にネオマイシンを加えても、細胞内 pH のアルカリ化が生じなくなった。実測値は Ba^{2+} 添加前のネオマイシン負荷時は $\Delta\text{pHi}/\text{min}$ 0.11 ± 0.02 であり、添加後のネオマイシン負荷時は $\Delta\text{pHi}/\text{min}$ -0.006 ± 0.03 だった。両者の値を比較すると統計学的有意差を認めた ($p < 0.05$)。以上の結果から、ネオマイシンによる細胞内アルカリ化現象は、ナトリウムイオン非依存性で、カリウムイオンに依存性であることが立証された。

さらに、我々はカリウムイオン依存性のメカニズムを解明するために、 $\text{H}^+ - \text{K}^+$ -ATPase 阻害薬 SCH-28080 を $20 \mu\text{M}$ 管腔側の溶液に加えた状態で、実験を行った。

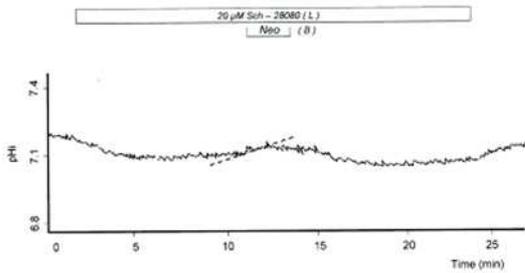


図7；管腔側溶液に20 μ MのSCH-28080存在下では、0.4mMのネオマイシンを溶液側に加えても、細胞内pHの変動は起こらなかった。実測値は、ネオマイシン投与前 ipH 7.07 \pm 0.02で投与後は7.08 \pm 0.01だった。さらに、H⁺-K⁺-ATPase 阻害薬であるウアバイン 1.5mMを管腔側に加えた状態で同様の実験を実施した。

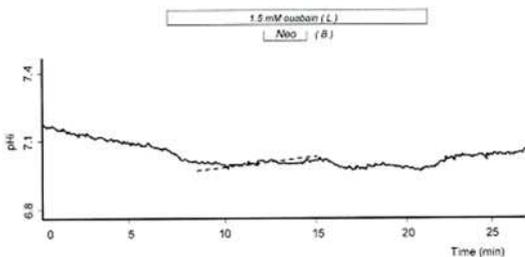


図8；管腔側溶液に1.5mMのウアバイン存在下で、0.4mMのネオマイシンの効果をみた。その結果、Sch-28080を用いた実験と同様に、ネオマイシンを加えても、細胞内pHの変化はほとんど生じなかった。実測値は、ネオマイシン投与前 ipH 7.06 \pm 0.03で投与後は7.08 \pm 0.03だった。

(考察) 今回の研究結果から、マウス腎髄質太いヘンレの上行脚においてCaR作動薬ネオマイシンを血管側に投与すると、重炭酸イオンを含むより生理的な溶液下では尿細管細胞内がアルカリ化されることがわかった。この現象は、図5に示した如く、ネオマイシンの濃度に依存して起きることが判明した。さらに、この調節機構はナトリウムイオンには非依存性で、カリウムイオンに依存していることが判明した(図6参照)。また、プロトンATPase阻害薬バフィロマイシンやウアバインを用いた実験からは、CaR作動薬ネオマイシンによって誘導される細胞内アルカリ化現象は、mTALの管腔側に発現しているH⁺-K⁺-ATPaseを介するプロトン排泄亢進であることが示唆された(図7&8参照)。

なお、研究開始当初はCaR活性化変異モデルであるNufラットを用いた研究や尿酸結石症患者をはじめとする腎結石症患者の尿から落下尿細管細胞の培養を確立させる計画だった。しかしながら、前者は諸般の事情で入手が困難だった。また、後者については成人領域では非常に一般的な疾患であるが、予想以上に小児領域としては患者数が少なく、今回の研究期間では対象者を集めることがで

きなかった。本研究の結論は、マウスmTALにはCaRを介する尿酸性化機構の存在が示唆され、酸性化のメカニズムとしては管腔側に発現しているH⁺-K⁺-ATPaseを介するプロトン排泄亢進であると考えられた。

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 哲司 (MORIMOTO TETSUJI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：10344657

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：