

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07302

研究課題名（和文）遠位尿細管におけるNa⁺/Ca²⁺交換輸送制御の分子機序解明研究課題名（英文）Molecular mechanism of Na⁺/Ca²⁺ exchanger regulation in renal distal tubules

研究代表者

岩本 隆宏（Iwamoto, Takahiro）

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：20300973

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）：1型Na⁺/Ca²⁺交換輸送体（NCX1）は遠位尿細管の基底側膜に主に発現し、Ca²⁺再吸収に関与すると考えられている。しかし、NCX1の基底側膜への局在機構およびホルモンや生理活性物質による輸送制御機構については明らかになっていない。本研究では、膜局在異常型のNCX1変異体を遺伝子導入したMDCK細胞およびそのノックインマウスや遺伝子導入マウスを作製して、基底側膜へのNCX1発現局在が各種受容体刺激により調節され、腎臓のCa²⁺再吸収が制御されることをin vitro & in vivo実験系（細胞レベル&動物レベル）により実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型Na⁺/Ca²⁺交換輸送体（NCX1）は、細胞膜を介して3個のNa⁺と1個のCa²⁺を交換輸送する重要なCa²⁺トランスポーター（輸送担体）であり、Ca²⁺ホメオスタシス（恒常性）の維持やCa²⁺シグナルの形成に関わっている。本研究では、遠位尿細管基底側膜へのNCX1発現局在が各種受容体刺激により調節され、腎臓のCa²⁺再吸収が制御されることをin vitro & in vivo実験系により実証した。本研究の成果により、Ca²⁺代謝異常症（高Ca血症、低Ca血症）に関する病因・病態の解明が進むとともに、新規治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Na⁺/Ca²⁺ exchanger type 1 (NCX1) is abundantly expressed on the basolateral membrane of the distal tubule and is thought to be involved in renal Ca²⁺ reabsorption. However, the localization mechanism of NCX1 to the basolateral membrane and the regulation mechanism of transport by hormones and physiologically active substances have not been fully elucidated. In this study, we generated MDCK cells transfected with an NCX1 mutant with abnormal membrane localization and its knock-in and transgenic mice, and experimentally found that the localization of NCX1 to the basolateral membrane is regulated by various receptor stimuli, leading to the modulation of Ca²⁺ reabsorption.

研究分野：医歯薬学

キーワード：イオン輸送体 遠位尿細管 Ca²⁺再吸収 Ca²⁺シグナル 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

Na⁺/Ca²⁺交換輸送体 (NCX) は、3 個の Na⁺と 1 個の Ca²⁺を交換輸送する細胞膜トランスポーターであり、生体 Ca²⁺ホメオスタシスの維持や細胞内 Ca²⁺シグナルの形成に関わっている。哺乳類には 3 種の NCX 分子種が存在しており、NCX1 は心臓、血管、腎臓、脳に多く発現し、NCX2 と NCX3 は主に脳、骨格筋に発現している。腎臓において、NCX1 は遠位尿細管 (遠位曲部) の基底側膜に限局して発現し、能動的な Ca²⁺再吸収に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、NCX1 の基底側膜への発現局在を決定する制御機構やそのホルモンや生理活性物質による輸送制御機構については未だ十分に明らかになっていない。腎尿細管では、各尿細管部位に特異的なイオン輸送体やイオンチャネルが頂上膜および基底側膜の特定の膜ドメインに発現局在し、互いに機能的に共役することにより、部位特有のイオン輸送機構を構築している。これまで、腎 Na⁺輸送機構の解明には、腎尿細管に発現する Na⁺輸送体変異体 (遺伝子異常) やその遺伝子改変マウスの研究が貢献してきた。

研究代表者は、NCX 阻害薬 (KB-R7943、SEA0400、SN-6、YM-244769) や各種 NCX 遺伝子改変マウス (NCX1/NCX2/NCX3 の KO・TG マウス) を開発・応用することにより、NCX の生理学的役割・病態学的意義の解明および NCX 阻害薬の創薬応用について、幅広く研究を展開してきた。これまでに、食塩感受性高血圧の発症には動脈平滑筋細胞の NCX1 を介する Ca²⁺流入が主要な機序となること¹⁾、また、脳・脾島の虚血再灌流障害には、NCX1 を介する Ca²⁺過負荷が関与することを明らかにしてきた^{2,3)}。また、NCX ホモログの X 線結晶構造解析から Ca²⁺輸送機構の構造基盤を解明した⁴⁾。これらの研究成果は、本研究計画の実施において大きな推進力となっている。

2. 研究の目的

研究代表者は、先行論文において⁵⁾、NCX1 が遠位尿細管の基底側膜に限局して発現し、能動的な Ca²⁺再吸収および電解質排泄に重要な役割を果たすことを報告した。しかし、NCX1 の基底側膜への局在機構およびホルモンや生理活性物質による輸送制御機構については未だ十分に明らかになっていない。本研究では、膜局在異常型の NCX1 変異体 (研究代表者が以前の NCX1 変異機能解析で見出したもの) を遺伝子導入した MDCK 細胞およびそのノックインマウスを作製・応用して、基底側膜への NCX1 発現局在が各種受容体刺激により調節され、腎臓の Ca²⁺再吸収が制御されることを *in vitro* & *in vivo* 実験系 (細胞レベル & 動物レベル) により実証することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 培養腎尿細管細胞を用いた野生型 NCX1 および膜局在異常型 NCX1 変異体の膜局在解析
EGFP 標識した野生型 NCX1 を遺伝子組換え実験により構築し、MDCK 細胞 (培養腎上皮細胞) に遺伝子導入して、EGFP 非標識の野生型 NCX1 と膜局在を比較したところ、EGFP 標識した野生型 NCX1 は EGFP 非標識の野生型 NCX1 と同様に、基底側膜に発現局在することを確認した (EGFP 蛍光観察および抗 NCX1 抗体の免疫蛍光観察)。そこで、EGFP 標識した膜局在異常型 NCX1 変異体を構築し、MDCK 細胞に遺伝子導入して、EGFP 標識した野生型 NCX1 と比較して、生細胞レベルでそれらの膜局在を共焦点レーザー顕微鏡 (CSU-X1) を用いて観察した。さらに、各種ホルモンおよび受容体刺激薬を処置して、EGFP 標識した野生型 NCX1 および膜局在異常型 NCX1 変異体の膜局在に及ぼす影響を調べた。

(2) 培養腎尿細管細胞の細胞内 Ca²⁺濃度と NCX1 膜局在の同時測定

EGFP 標識した野生型および膜局在異常型 NCX1 変異体を遺伝子導入した MDCK 細胞を用いて、EGFP と波長特性の異なる Ca²⁺蛍光色素を負荷し、各種ホルモンおよび受容体刺激薬を処置した時の細胞内 Ca²⁺濃度と NCX1 膜局在を同時観察した (横河高速二波長切替共焦点レーザー顕微鏡システム)。

(3) 膜局在異常型 NCX1 変異体のノックインマウスおよび遠位尿細管特異的遺伝子導入マウスの作製

基底側膜への NCX1 発現局在が各種受容体刺激により調節され、腎臓の Ca²⁺再吸収が制御されることを *in vivo* 実験系で実証するため、膜局在異常型 NCX1 変異体のノックインマウスおよび EGFP 標識した野生型および膜局在異常型 NCX1 変異体の遠位尿細管特異的遺伝子導入マウスを作製した。得られたマウスを用いて、各種ホルモンおよび受容体刺激薬を処置した時の NCX1 膜局在に及ぼす影響を腎スライスもしくは生体腎レベルで解析した。

4. 研究成果

(1) 培養腎尿細管細胞を用いた野生型 NCX1 および膜局在異常型 NCX1 変異体の膜局在解析
EGFP 標識した野生型 NCX1 を遺伝子導入した MDCK 細胞に各種ホルモンおよび受容体刺

激薬を処置したところ、細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させる受容体刺激において野生型 NCX1 は基底側膜への発現局在が亢進することを観察した。さらに、細胞内 Ca^{2+} 濃度と NCX1 膜局在の同時測定において、野生型 NCX1 の基底側膜への局在亢進は細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加シグナルと時間的に一致することを確認した。一方、EGFP 標識した膜局在異常型 NCX1 変異体を遺伝子導入した MDCK 細胞に各種ホルモンおよび受容体刺激薬を処置したところ、EGFP 標識した野生型 NCX1 で観察された細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させる受容体刺激による基底側膜への局在亢進は観察されなかった。なお、EGFP 非標識の野生型 NCX1 および膜局在異常型 NCX1 変異体を用いて、細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させる受容体刺激の基底側膜への NCX1 発現局在に対する作用を検証した (EGFP 標識の影響はないと考えられる)。

(2) 膜局在異常型 NCX1 変異体のノックインマウスおよび遠位尿細管特異的遺伝子導入マウスを用いた解析

野生型マウスと膜局在異常型 NCX1 変異体ノックインマウスの遠位尿細管における NCX1 の発現局在を解析した。野生型マウスに細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させる受容体刺激薬を処置したところ、基底側膜への NCX1 の発現局在が亢進していた。一方、膜局在異常型 NCX1 変異体ノックインマウスでは、細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させる受容体刺激薬の処置により、基底側膜への NCX1 の局在亢進は観察されなかった。

さらに、EGFP 標識した野生型 NCX1 および膜局在異常型 NCX1 変異体の遠位尿細管特異的遺伝子導入マウスを用いて、腎スライスもしくは生体腎の NCX1 イメージング解析を行い、同様の受容体刺激薬による基底側膜への NCX1 発現局在に対する作用を検証した。また現在、野生型マウスと膜局在異常型 NCX1 変異体ノックインマウスを用いて、各種ホルモンおよび受容体刺激薬を処置した時の血中 Ca^{2+} 濃度・尿中 Ca^{2+} 排泄量に及ぼす影響を解析中である。

以上、本研究の結果から、遠位尿細管基底側膜への NCX1 発現局在が各種受容体刺激により調節され、腎臓の Ca^{2+} 再吸収が制御されることが示唆された。

< 引用文献 >

- 1) Iwamoto T et al. Salt-sensitive hypertension is triggered by Ca^{2+} entry via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger type-1 in vascular smooth muscle. *Nature Med.* 10:1193-1199, 2004.
- 2) Morimoto N et al. Preferential involvement of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger type-1 in the brain damage caused by transient focal cerebral ischemia in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 429:186-190, 2012.
- 3) Mera T et al. Pretreatment of donor islets with the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger inhibitor improves the efficiency of islet transplantation. *Am J Transplant.* 13:2154-2160, 2013.
- 4) Nishizawa T et al. Structural basis for the counter-transport mechanism of a $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. *Science.* 341:168-172, 2013.
- 5) Gotoh Y et al. Genetic knockout and pharmacologic inhibition of NCX2 cause natriuresis and hypercalciuria. *Biochem Biophys Res Commun.* 456:670-675, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagata A, Tagashira H, Kita S, Kita T, Nakajima N, Abe K, Iwasaki A, Iwamoto T.	4. 巻 529
2. 論文標題 Genetic knockout and pharmacologic inhibition of NCX1 attenuate hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 793-798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.06.045.	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 岩本隆宏	4. 巻 39
2. 論文標題 SLC41 Mg ²⁺ 輸送体の最近の話題	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 マグネシウム	6. 最初と最後の頁 30-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Kon N, Wang HT, Kato YS, Uemoto K, Kawamoto N, Kawasaki K, Enoki R, Kurosawa G, Nakane T, Sugiyama Y, Tagashira H, Endo M, Iwasaki H, Iwamoto T, Kume K, Fukada Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger mediates cold Ca ²⁺ signaling conserved for temperature-compensated circadian rhythms.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Adv	6. 最初と最後の頁 eabe8132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abe8132.	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 Numaga-Tomita T, Shimauchi T, Kato Y, Nishiyama K, Nishimura A, Sakata K, Inada H, Kita S, Iwamoto T, Nabekura J, Birnbaumer L, Mori Y, Nishida M.	4. 巻 180
2. 論文標題 Inhibition of transient receptor potential cation channel 6 promotes capillary arterIALIZATION during post-ischaemic blood flow recovery.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Br J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 94-110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bph.15942	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 Nemoto T, Tagashira H, Kita T, Kita S, Iwamoto T.	4. 巻 151
2. 論文標題 Functional characteristics and therapeutic potential of SLC41 transporters.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 94-110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2022.12.003	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 Shinoda Y, Nemoto T, Iwamoto T.	4. 巻 50
2. 論文標題 The Sigma-1 receptor: Pathophysiological roles and therapeutic potential in neurodegenerative diseases.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Med Bull Fukuoka Univ	6. 最初と最後の頁 43-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tagashira H, Nagata A, Kita T, Kita S, Iwamoto T.
2. 発表標題 The pathophysiological role of vascular smooth muscle NCX1 for pulmonary arterial hypertension.
3. 学会等名 65th Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tagashira H, Nemoto T, Kita T, Tsujita Y, Kita S, Iwamoto T.
2. 発表標題 Mild hypomagnesemia and increased vulnerability to catecholamine-induced arrhythmias in CNNM2-deficient mice.
3. 学会等名 The 40th Annual Meeting of Japanese Society for Magnesium Research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 喜多紗斗美、田頭秀章、岩本隆宏
2. 発表標題 NCX1を標的とした肺高血圧症の治療戦略
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金尚宏、岩本隆宏、深田吉孝
2. 発表標題 体内時計におけるNa ⁺ /Ca ²⁺ 交換輸送体の役割とその創薬応用
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田頭秀章、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 TRPM7/CNNM2遺伝子改変マウスを用いたMg代謝異常による心血管病態解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田頭秀章、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 心筋特異的NCX1ノックアウトマウスの突然死の特性
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 喜多知、田頭秀章、根本隆行、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 褐色脂肪組織熱産生におけるNCX1の機能的役割
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根本隆行、若崎るみ枝、喜多知、中嶋尚子、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 虚血性急性腎不全発症における遠位尿細管Caオーバーロードの重要性
3. 学会等名 第6回日本臨床薬理学会 九州・沖縄地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 根本隆行、若崎るみ枝、田頭秀章、喜多知、中嶋尚子、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 遠位尿細管特異的NCX1欠損/高発現マウスを用いた急性腎障害機序の解析
3. 学会等名 第51回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 喜多知、篠田康晴、根本隆行、小松知広、上原吉就、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 阻害薬非感受性NCX1変異体ノックインマウスを用いた薬効評価系の確立
3. 学会等名 第75回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 根本隆行、若崎るみ枝、喜多知、中嶋尚子、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 虚血性急性腎障害における遠位尿細管NCX1の重要性
3. 学会等名 第41回日本マグネシウム学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩本隆宏
2. 発表標題 NCX輸送体を標的とした肺高血圧症治療戦略
3. 学会等名 第52回日本心脈管作動物質学会シンポジウム
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>福岡大学医学部薬理学 https://www.med.fukuoka-u.ac.jp/pharmaco/</p>
--

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	喜多 知 (Kita Tomo) (50797107)	福岡大学・医学部・講師 (37111)	

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
---------	---------