

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390229

研究課題名(和文)片頭痛発症における脳内pH調整機構の意義

研究課題名(英文)The mechanism of regulation to occur the migraine

研究代表者

山田 秀臣 (Yamada, Hideomi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60396752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：片頭痛の広義の意味で発症の可能性があるかを現在までデータベースで報告されているNBCe1のSNPを作成し、発現機能をチェックしたところK558Rの変異はWTと比べて機能は半分以下であった。このことから人口で1%程度のSNPがNBCe1の機能が落ちる可能性を報告した。更にNBCe1は二量体を形成することが知られているがDominant Negative効果が他の近似輸送体(重炭酸輸送体群)で知られている。このことから膜発現をしないL522P変異をWTで共発現したところ、明らかなDominant Negative効果が起こり、WTの機能も著明に低下することを報告した。

研究成果の概要(英文)：For pathogenic mechanism of migraine, NBCe1 presents nerve synaptic cleft side in the membrane of the glia-cells. Genetic abnormalities of the NBCe1 cause proximal renal tubular acidosis in an autosomal recessive. We presented the possibility of onset migraine that this NBCe1 adjusts pH the synaptic cleft. Mutations K558R, reported a SNP in the database, is shown less than half functions as WT. Other Bicarbonate transporters have known dimmer-form and Dominant Negative(DN) effect. We think that NBCe1 is also dimmer-form, must have DN effect. We show that co-expressed WT and L522P mutations (No expression the membrane) clearly decreases the function of NBCe1. We lead the conclusion that the migraine possibility of NBCe1 dysfunction may be more frequent as expected.

研究分野：神経内科

科研費の分科・細目：8206

キーワード：NBCe1 IRBIT 片頭痛

1. 研究開始当初の背景

片頭痛は約1千万人が罹患する機能性神経疾患であり、遺伝因子と環境因子の双方が関与する。優性遺伝形式をとる家族性片麻痺性片頭痛の知見から神経細胞の過剰興奮が片頭痛の発症基盤であると推測されている。最近腎・眼などに加え脳内アストロサイトに発現するナトリウム重碳酸共輸送体 NBCe1 の変異により片頭痛が発症することを見出した。

2. 研究の目的

NBCe1 による遺伝性の片頭痛発症メカニズムを研究することにより、普遍的な片頭痛発症メカニズムの可能性を探る。

3. 研究の方法

作成した NBCe1 のノックインマウスや NBCe1 のサブタイプである NBCe1-B,C に結合する IRBIT のノックアウトマウスを用いて発症メカニズムを探った。また従来からの *Xenopus* Oocyte を用いた遺伝子発現実験や各標識を用いた細胞内局在など一般的な分子生物学的手法を用いた。

4. 研究成果

NBCe1 の SNP でエクソンのアミノ酸変異を起こすものをデータバンクより見だし、機能発現を確認した。変異は全部で4種類 (E122G, E122G, S356Y, K558R, N640I) 認め、各発現実験をおこなった。E122G, S356Y, N640I の三つに関しては *Xenopus* Oocyte による発現実験も、HEK293 や MDCK 細胞による発

現実験でも WT と同様であった。しかし、WT と比べて K558R は NBCe1-A の輸送活性は 47% 落ちており、WT の機能の約半分程度であった (上図 a)。また K558R は培養細胞の膜発現は WT と同様であったが Na 輸送活性を測定すると 41-47%程度に低下していた (上図 b)。以上から現在も確認数が増えている、SNPs の中にはアミノ酸変異を引き起こし、次に説明する結果と合わせて普遍的な片頭痛発症の解析に近づいた。

次に NBC1 は細胞内では以前発表した論文で患者からの変異体の一つの S982NfsX4 (C 末端部欠損) が *Xenopus* Oocyte での WT と同様の機能発現を認めるにも関わらず、患者では軽度な RTA と重い眼症状や片頭痛を引き起こすのは WT と 2 量体を形成して dominant Negative 効果であると推定されていた。そこで NBC1 変異体の有する Dominant Negative 作用が関与する可能性をみるために NBC1 野生型の C 末に Myc-His タグ、変異体については GFP 融合コンストラクトを作成し、MDCK 細胞およびラット C6 グリオーマ細胞などに発現させた。まずレジンを用いた免疫沈降法により、NBC1 は 2 量体を形成することを確認し

た上で、ビオチン化 Western blot 法により、変異体共発現による野生型 NBC1 細胞膜発現の変化を定量化した。この結果、共発現時に明らかかな野生型 NBC1 膜発現の低下を認め、Dominant Negative 作用を確認できた。

また共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞内 NBC1 発現分布の実験を C6、MDCK 細胞で行った。両細胞に置いて変異型との共発現では細胞内に野生型 NBC1 が留まっているのが確認できた。

以上のことから変異体 NBC1 では野生型の膜発現の低下を起こす Dominant Negative 効果により片頭痛が起こりうる可能性を証明し、多くの患者が存在する片頭痛の新しい発症機序を提示することができた。

NBCe1 のノックインマウスと IRBIT のノックアウトマウスを用いた実験では IRBIT のノックアウトマウスは残念ながら片頭痛を示す症状を認めなかった。NBCe1 のノックインマウス (ホモ) は重曹の腹腔内投与により若干の延命が図れたが短命のために更なる実験は行えなかった。また NBCe1 のノックインマウス (ヘテロ) は全く所見がなく、IRBIT ノックアウトマウスとの掛け合わせによっても所見は認めなかった。

5. 主な発表論文等

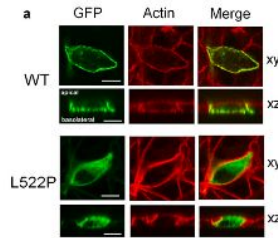
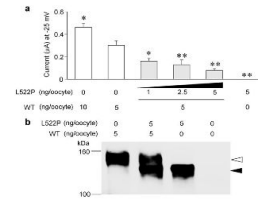
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 20 件)
査読あり

Lo Y, BS, Yang S, Seki G, Yamada H, Horita S, Yamazaki O, Fujita T, MD, Usui T, Tsai J, Yu I, PhD6, Lin S, Lin S: Severe Metabolic Acidosis Causes Early Lethality in NBC1 W516X Knock-in Mice as a Model of Human Isolated Proximal Renal Tubular Acidosis. *Kidney Int* 79, 730-741, 2011

Yamada H, Horita S, Suzuki M, Fujita F, Seki G: Functional role of a putative carbonic anhydrase II-binding domain in the electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCe1 expressed in *Xenopus* oocytes. *Channels* 5:2, 1-4, 2011

Yamazaki O, Yamada H, Suzuki M, Horita S, Shirai A, Nakamura M, Seki G, Fujita T: Functional characterization of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the electrogenic Na⁺-HCO₃⁻



cotransporter NBCe1A. *Pflugers Arch* 461: 249-259, 2011

Endo Y, Suzuki M, Yamada H, Horita S, Kunimi M, Yamazaki O, Shirai A, Nakamura M, Iso-O N, Li Y, Hara M, Tsukamoto K, Moriyama N, Kudo A, Kawakami H, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Kume H, Enomoto Y, Homma Y, Seki G, Fujita T: Thiazolidinediones enhance sodium-coupled bicarbonate absorption from renal proximal tubules via PPAR γ -dependent non-genomic signaling. *Cell Metab* 13, 550-561, 2011

Hurd TW, Edgar Otto EA, Mishima E, Gee HY, Hana Inoue4, Inazu M, Yamada H, Halbritter J, Seki G, Konishi M, Zhou W, Yamane T, Murakami S, Caridi G, Ghiggeri G, Abe T, Hildeb F. Mutation of the renal Mg $^{2+}$ transporter SLC41A1 in a nephronophthisis-like phenotype. *J Am Soc Nephrol* 2013,24:967-77, doi: 10.1681/ASN.2012101034.

Yamazaki O, Yamada H, Suzuki M, Horita S, Shirai A, Nakamura M, Satoh N, Fujita T, Seki G. Identification of dominant negative effect of L522P mutation in the electrogenic Na $^{+}$ -HCO $_{3}^{-}$ cotransporter NBCe1. *Pflugers Arch* 2013, 465:1281-91. doi: 10.1007/s00424-013-1277-1

Shirai A, Yamazaki O, Horita S, Nakamura M, Satoh N, Yamada H, Suzuki M, Kudo A, Kawakami H, Hofmann F, Nishiyama A, Kume H, Enomoto Y, Homma Y, Seki G. Angiotensin II dose-dependently stimulates human renal proximal tubule transport by the Nitric Oxide/ Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate pathway. *J Am Soc Nephrol*.2014 in press.

(査読なし)

1. Horita S, Seki G, Yamada H, Suzuki M, Koike K, Fujita T: Insulin resistance, obesity, hypertension and renal sodium transport. *Int J Hypertension* Volume 2011, Article ID 391762, 2011 (doi:10.4061/2011/391762)
2. Seki G, Yamada H, Horita S, Suzuki M, Yamazaki O, Van Paesschen W, Yang S, Lin S: Physiological and pathophysiological roles of the electrogenic Na $^{+}$ -HCO $_{3}^{-}$ cotransporter NBCe1. *Open Journal of Molecular and Integrative Physiology* 1, 9-16, 2011
3. Horita S, Seki G, Yamada H, Suzuki M, Nakamura M, Fujita T. Metabolic syndrome and insulin signaling in kidney. *Endocrinol Metabol Syndrome* S1:005. Doi : 10.4172/2161-1017.S1-005, 2011
4. Seki G, Endo Y, Suzuki M, Yamada H, Horita S, Fujita T: Role of renal proximal tubule transport in thiazolidinediones-induced volume expansion. *World Journal*

of *Nephrology* 6; 1(5): 146-150, 2012

5. Suzuki M, Seki G, Yamada H, Horita S, Fujita T. Functional roles of electrogenic sodium bicarbonate cotransporter NBCe1 in ocular tissues. *The Open Ophthalmology Journal* 6: 36-41, 2012
6. Seki G, Horita S, Suzuki M, Yamazaki O, Yamada H. Pathophysiological roles of mutations in the electrogenic Na $^{+}$ -HCO $_{3}^{-}$ cotransporter NBCe1. *Mutations in Human Genetic Disease*, pp167- pp180, 2012 ISBN 978-953-51-0790-3, edited by David N. Cooper and Jian-Min Chen

1. 山田 秀臣, 関 常司: 酸塩基平衡を調節するトランスポーター。 *B10 Clinica* Vol26 No11, 34-40, 2011
2. 山田 秀臣: ファンコニ症候群。 *内科*, Vol109, No6, 1381-1383, 2012
3. 山田 秀臣: リドル症候群。 *内科*, Vol109, No6, 1386-1387, 2012
4. 山田 秀臣: Bartter 症候群と Gitelman 症候群。カラー版内科学書, 1528-31, 2012 (西村書店)
5. 山田 秀臣, 関常司: 尿細管性アシドーシスの分類とその機序。 *Nephrology Frontier* 2013 年6月号
6. 山田 秀臣: 酸塩基平衡について(仮題)。スライド講義による ER 型救急医療: ER Grand Rounds (仮称)(中外医学社)(予定)

[学会発表](計13件)

白井 雅弓, 山崎 修, 中村 元信, 山田 秀臣, 堀田 晶子, 鈴木 正志, 榎本 裕, 久米 春喜, 本間 之夫, 関 常司, 藤田 敏郎: アンジオテンシン II のヒト近位尿細管作用における NO/sGC/cGMP 経路の意義。第54回日本腎臓学会学術総会 2011年6月15日 横浜

関 常司, Sung-Sen Yang, 山崎 修, 石黒 洋, 山田 秀臣, Shih-Hua Lin: Na-HCO $_{3}$ トランスポーターNBCe1 変異体ノックインマウスと尿細管性アシドーシス。第54回日本腎臓学会学術総会 2011年6月15日 横浜

山崎 修, 山田 秀臣, 鈴木 正志, 堀田 晶子, 遠藤 陽子, 白井 雅弓, 中村 元信, 関 常司, 藤田 敏郎: NBCe1 の L522P 変異体はドミナントネガティブ効果を有する。第54回日本腎臓学会学術総会 2011年6月16日 横浜

中村 元信, 山崎 修, 白井 雅弓, 山田 秀臣, 堀田 晶子, 鈴木 正志, 榎本 裕, 久米 春喜, 本間 之夫, 関 常司, 藤田 敏郎: インスリンの近位尿細管輸送亢進作用はインスリン抵抗性でも保たれる。第54回日本腎臓学会学術総会 2011年6月16日 横浜

白井 雅弓, 山崎 修, 中村 元信, 山田 秀臣, 堀田 晶子, 鈴木 正志, 榎本 裕, 久米 春喜, 本間 之夫, Franz Hofmann, 関 常司, 藤田 敏郎: アンジオテンシン(Ang)II の

ヒト近位尿管特異的作用機序。第55回日本腎臓学会学術総会 2012年6月1日横浜
中村 元信、山崎 修、白井 雅弓、山田 秀臣、堀田 晶子、鈴木 正志、榎本 裕、久米 春喜、本間 之夫、関 常司、藤田 敏郎：インスリン抵抗性におけるインスリンの近位尿管輸送亢進作用機序。第55回日本腎臓学会学術総会 2012年6月2日 横浜
山崎 修、山田 秀臣、鈴木 正志、堀田 晶子、関 常司：上皮輸送と細胞内外 pH 調節機構における Na-HCO₃ 共輸送体 NBCe1 の意義。2012 年度生理研研究会「粘膜防御における上皮膜輸送の役割とその破綻による疾病発症メカニズム」2012年12月 岡崎
山田秀臣：重炭酸輸送体の創薬可能性について。2013年度生理学会プレワークショップ 2014年3月 鹿児島国際学会
Yamada H; Transporter diseases. Humboldt Colloquium Kyoto 2011.
Yamazaki O, Yamada H, Suzuki M, Horita S, Nakamura M, Seki G, Fujita T; The cytosolic mutant L522P of NBCe1 has a dominant negative effect. Annual Meeting of American Society of Nephrology 2011.
Nakamura M, Yamazaki O, Yamada H, Suzuki M, Horita S, Seki G, Fujita T; Stimulatory effect of insulin on renal proximal Na transport is preserved in obesity-induced insulin resistant rats. Annual Meeting of American Society of Nephrology 2011.
Shirai A, Yamazaki O, Nakamura M, Yamada H, Suzuki M, Horita S, Homma Y, Seki G; NO/sGC/cGMP/ERK pathway mediates a unique dose-dependent stimulation of human proximal transport by angiotensin II. Annual Meeting of American Society of Nephrology 2012.
Nakamura M, Shirai A, Yamazaki O, Yamada H, Suzuki M, Horita S, Homma Y, Seki G; Stimulatory effect of insulin on renal proximal Na transport is preserved in insulin resistance. Annual Meeting of American Society of Nephrology 2012.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0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 0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

山田秀臣 (YAMADA, Hideomi)
東京大学・医学部・助教
研究者番号：60396752

(2) 研究分担者

後藤順 (GOTO, Jun)
東京大学・医学部・講師
研究者番号：10211252

堀田晶子 (HORITA, Shoko)
東京大学・医学部・助教
研究者番号：20534895

関常司 (Seki, George)
東京大学・医学部・講師
研究者番号：30206619

(3) 連携研究者

徳永勝士 (TOKUNAGA, Katsushi)
東京大学・医学部・教授
研究者番号：40163977