

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790259

研究課題名(和文) Dent病における近位尿細管細胞内H⁺輸送の役割 Dent病の治療を目指して

研究課題名(英文) The role of proton transport in proximal tubule cells in Dent's disease.

研究代表者

白岩 有桂 (Shiraiwa, Yuka)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：20596605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：Cl⁻チャネルであるClC-5の機能異常は腎結石症の一因である。本研究ではClC-5が存在する尿細管細胞においてpH変化とCl⁻輸送、あるいはCa²⁺輸送との関係を明らかにすることを目的とした。食用蛙腎尿細管細胞周囲にCl⁻チャネル阻害剤を灌流すると管腔内液pH(pHTF)は上昇し、さらに管腔内液Ca²⁺濃度([Ca]²⁺TF)は低下する。この結果は尿細管においてカルシウム結石を沈澱させないためにpHTFによって[Ca]²⁺TFが調節されていると考えられることができる。以上より、ClC-5の機能異常によるDent病は尿細管細胞におけるH⁺の輸送異常が原因となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that dysfunction of ClC-5, Cl⁻ channel, produced the kidney stone. We recently demonstrated that ClC-5 existed in both the proximal and distal tubule cells in the bull frog, producing the calcium oxalic calculus in the kidney. Therefore, in this experiment, we purposed to clarify the relationship between the changes in Cl⁻ transport and those in H⁺ or Ca²⁺ transport in the bull frog tubule cells. The peritubular perfusion with the inhibitor of Cl⁻ transport, or with low Cl⁻ solution always produced the change in pH in both cytosolic and tubular fluid (pHTF) in proximal tubule or the pHTF in the distal tubule. When the pHTF increases, Ca²⁺ concentration in tubular fluids ([Ca]²⁺TF) always decreases in both proximal and distal tubules, indicating that [Ca]²⁺TF is regulated by pHTF against the sedimentation of calcium salt (calculus) in the urine. Thus, Dent's disease caused by dysfunction of ClC-5 might be induced by the change in H⁺ transport across the tubule cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、生理学一般

キーワード：ClC-5 V-ATPase 尿管結石 Ca輸送障害

1. 研究開始当初の背景

これまでに腎尿細管で作用する様々な膜輸送体蛋白の構造や機能が解明されてきた。そしてこれらの膜輸送蛋白が体液の水・電解質の homeostasis を維持するために働いていることが明らかとなった。さらに、これらの機能性分子をノックアウトした動物を作成し機能性蛋白の遺伝子を解析することで尿細管疾患の臨床像をより深く理解でき、これまで困難であった臨床診断も可能になってきた。特に Bartter 症候群、Gitelman 症候群、Liddle 症候群、近位尿細管性アシドーシス、Dent 病などの疾患では膜輸送蛋白の異常を伴っていることが明らかになっている。

Dent 病は低分子蛋白尿、高カルシウム尿、腎結石の三つの症候を特徴とし、尿細管 CIC-5 蛋白の機能異常による X 染色体性疾患であると考えられている。1994 年、Fisher らにより CIC-5 の異常が Dent 病の原因であることが報告され (Fisher SE et al., Hum Mol Genet. 1994)、その後 CIC-5 の機能、構造解析が進み現在では electrogenic Cl^-/H^+ antiporter であることが提唱されている (Miller C., Nature. 2006)。 H^+ の電気化学的勾配を利用して Cl^- は小胞内に流入し、この小胞内 Cl^- の濃度が近位尿細管での蛋白の再吸収に必要であることが示唆されている (Novarino G et al., Science. 2010)。高カルシウム尿、腎結石の発現と CIC-5 の関係は PTH、vitaminD の再吸収低下により間接的に引き起こされると言われている (Plans V et al., Pflugers Arch. 2009)。申請者は、細胞質の pH 調節、尿の酸性化に対して酸性小胞 (endosome) が関与している可能性を示唆してきた。尿の酸性化が抑制され細胞質の pH が上昇するときは細胞内酸性小胞内の pH が低下する (細胞質の H^+ が酸性小胞内に取り込まれる)。逆に小胞内から細胞質へ H^+ が拡散すると、細胞質は酸性化され管腔膜の Na/H 交換体が活性化し管腔液の酸性化をもたらすように働いていると考えられる。これらの研究結果から、CIC-5 は酸性小胞から細胞質への H^+ の拡散を主な役割とし、これに連動して Cl^- が動いていると考えられる。CIC-5 において H^+ の輸送に不可欠とされるグルタミン酸残基 (E211) を変異させ Cl^- のみを動くようにすると、蛋白の再吸収は障害されることが報告されている (Novarino G et al., Science. 2010) ことより、小胞内と細胞質の H^+ の動きが蛋白の再吸収などの重要な役割に関与すると考えられる。以上より、小胞内から細胞質への H^+ の動きに機能的な役割を考えることにより、CIC-5 の新たな生理的機能が明らかになってくる。

2. 研究の目的

CIC-5 が存在する尿細管細胞において pH 変化と Cl^- 輸送との関係を明らかにすることを目的とする。さらに、近位尿細管細胞の Ca^{2+} 輸送についても調べることにより、現時点で

解明されていない Dent 病における Ca^{2+} 輸送障害による高 Ca^{2+} 尿症 (腎結石、尿管結石の原因も含めて) の原因を解明し、尿管結石症や Dent 病の治療に役立たせることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 尿細管細胞内外の pH と Ca^{2+} の測定

主として食用蛙を用いて実験を行う。尿細管細胞内外をリンゲル液で灌流しながら、その時の細胞膜電位 (PD) と細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}]_i$) の測定を経時的に行う。また、その時の細胞質 pH (pH_i) も測定する。実験モデル図を図 1 に示す。

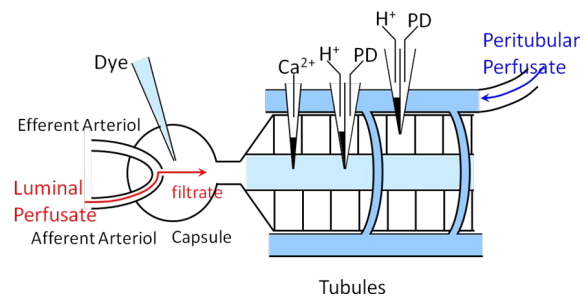


図 1 尿細管における細胞膜電位と細胞質 pH 測定の実験モデル

当教室で用いている Ca^{2+} 電極は polyvinylchloride (PVC) を用いてゲル状のイオン交換剤を作成し、微小ガラスピペットに充填した後、約 1 ヶ月間 4℃ に保存してゆっくりと固体状のイオン交換剤にする。従来の PVC を含まない市販されている溶液状のイオン交換剤よりは疎水性、安定性、反応速度 (電極抵抗が低い) にすぐれており、先端も強固なため組織を穿刺するには適している。

(2) 腎結石を持つ食用蛙と持たない食用蛙腎組織の形態的な差の検討

パラフィン包埋切片を作成し熱による抗原賦活化を行った。抗体は抗マウス CIC-5 抗体 (HPA000401, Atlas Antibodies, 50 倍希釈) を用いた。検出は Novolink Polymer detection system (Leica) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 近位尿細管における pH 変化

Cl^- 輸送が尿細管細胞内外の pH に与える影響を検討するため、 Cl^- チャネル阻害剤である NPPB を用いた。 2×10^{-6} M NPPB 負荷により細胞内 pH は初期に上昇し後期には低下した。一方、管腔内液 pH (pH_{TF}) は NPPB を負荷すると pH 7.5 から 7.9 まで変化した。

これら一連の変化は、陰イオン輸送 (Cl^- 及び HCO_3^-) が阻害されたために細胞内が一時的にアルカリ性に傾きナトリウム水素イオン交換体が抑制された結果尿の酸性化が抑制され、同時に著名な利尿が起こったと考えられた (図 2)。

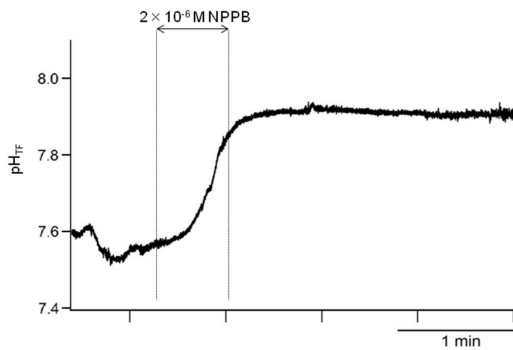


図2 近位尿細管管腔内における NPPB 投与時の pH_{TF} の変化

(2) 遠位尿細管における pH 変化

NPPB の投与により遠位尿細管 pH_{TF} はアルカリ性へと変化し、管腔内電位 (TP) は 10mV から 15mV 程度まで徐々に上昇した。これに伴い、管腔内液 Ca²⁺ 濃度 ([Ca]_{TF}) は 0.8mM から 0.2mM 程度低下した。一方、V-ATPase 阻害剤である 10⁻⁶M バフィロマイシン A1 (BAFA) を投与すると、pH_{TF} はアルカリ性へと変化し [Ca]_{TF} も同様に低下するが TP は変化しないかむしろ低下した (図3)。

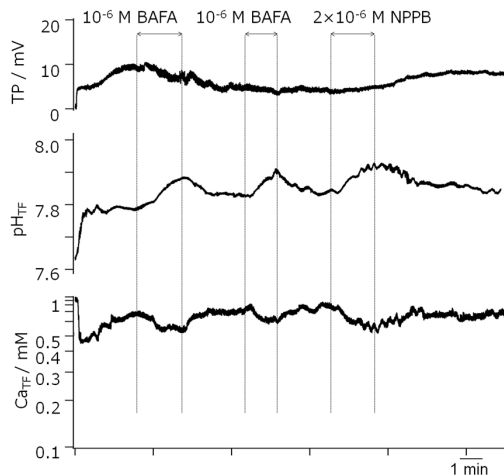


図3 遠位尿細管管腔内における BAFA, NPPB 投与時の pH_{TF}, [Ca]_{TF} の効果

この結果より、遠位尿細管管腔内 Ca²⁺ の再吸収は正の管腔内電位による受動的な細胞間輸送ではなく pH_{TF} の変化によって調節を受ける輸送経路を通る可能性が示唆された。遠位曲尿細管、接合尿細管では TRPV5 がカルシウム輸送を担うとされており、この TRPV5 は管腔内 pH がアルカリ化すると管腔膜への動員が増加すると言われている。この報告は今回の実験結果と一致するものであり、ヘンレのループ内でも TRPV5 もしくはそれに類似する性質を持つカルシウムチャンネルの存在が示唆された (図4)。(2014年3月16日、第91回日本生理学会大会にて発表) 生体は尿 pH がアルカリ化する際には、尿中のカルシウム濃度を低下させて沈澱しないように調節していると考えることができ、非常に合理的

である。一方、細胞内へ目を向けると、管腔内からの Ca²⁺再吸収が増加することで一過性に [Ca]_i が上昇する。この状態が長期に及べば、Ca²⁺再吸収は抑制され高 Ca²⁺尿症を引き起こすことになる。このような細胞質や尿細管の高 Ca²⁺状況は、腎結石や腎石灰化を生じやすい環境となると考えられる。

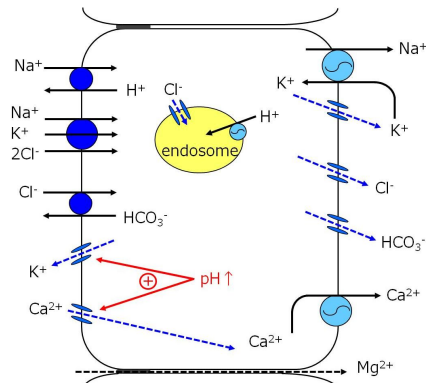


図4 遠位尿細管細胞における水素イオン分泌モデル図

(3) 腎組織の免疫染色

腎結石を有するものと有さないものとの間に分布の違いは認められず、どちらも尿細管細胞の細胞質が顆粒状に染色された。一方腎動脈、及び腎静脈よりカテーテルを挿入しリンゲル液で灌流を行った腎組織では、近位尿細管細胞において管腔膜直下で有意に染色が認められ、遠位尿細管細胞において細胞質全体が染色された。近位尿細管のみならず尿細管全体にわたって分布していることが確認された。以下に腎組織の免疫染色の図を示す。

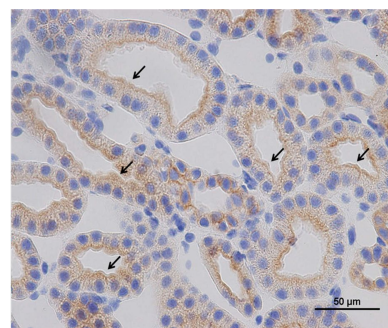
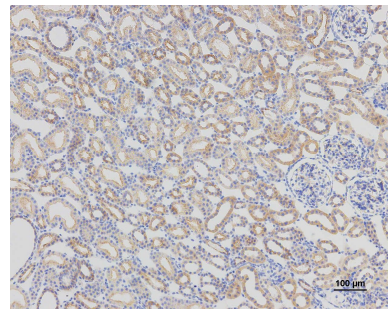


図5 食用蛙腎組織における CIC-5 の分布 (矢印:近位尿細管細胞の管腔膜直下で有意に染色されている。)

(4) まとめ

今回の実験では、Cl⁻に連動して pH、さらには[Ca]_{TF}までもが変化しこれらのイオンが互いに影響しあいながら輸送されている様子が組織レベルで観察できた。Cl⁻は主に容積維持のために大きな役割を担うと同時に電荷的には HCO₃⁻と常にバランスを取りながら動いている。Cl⁻チャンネルブロッカーにより Cl⁻の動きを封じると HCO₃⁻も動きを止めてしまうため pH への影響が出てくると考えられる。Cl⁻が Ca²⁺に対して直接的に影響を及ぼすかどうかは明らかではないが、pH 変化を利用した合理的な Ca²⁺の再吸収調節機構が存在することが示唆された。今後この Ca²⁺再吸収調節機構についてさらに調べることにより現時点で解明されていない Dent 病における Ca²⁺輸送障害の原因解明につながると考える。

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2件)

K. HASEGAWA, Y. SHIRAIWA, M. SAITO, E. DAIKOKU, J. YAMAJI, A. MORI, M. MIYAMOTO, R. KAWATA, and T. KUBOTA: Ca²⁺ Concentration in Endolymphatic Surface Cells Modulates the Endocochlear Potential and Transepithelial Resistance in Guinea Pigs. Bull Osaka Med Coll 59(2):45-58, 2013

窪田隆裕、白岩有桂、長谷川恵子、大黒恵理子、齊藤昌久、山路純子、宮本学、河田了、蝸牛内リンパ液の組成とその役割、大阪医科大学雑誌、72(33-41) 2013

[学会発表](計5件)

白岩有桂、他、食用蛙遠位尿管における水素イオン分泌機構、第91回日本生理学会大会、2014年3月16日、鹿児島

大黒恵理子、白岩有桂、他、蝸牛内電位および内リンパ腔内イオン濃度を維持するための claudin-14 の役割、第91回日本生理学会大会、2014年3月17日、鹿児島

長谷川恵子、白岩有桂、他、Ca²⁺濃度はモルモットにおける蝸牛内電位および蝸牛管経上皮細胞抵抗を調節する、第23回日本耳鼻科学会2013年11月24日、宮崎

長谷川恵子、白岩有桂、他、モルモット蝸牛の内リンパ腔に面した細胞のカルシウム濃度は蝸牛内リンパ腔電位と

蝸牛管上皮抵抗を調節する、第90回日本生理学会大会、2013年3月27日、船堀

白岩有桂、他、食用蛙近位尿管細胞内の水素イオン輸送に対するClC-5の役割、第90回日本生理学会大会、2013年3月27日、船堀

大黒恵理子、白岩有桂、他、食用蛙近位尿管の pH 調節に対する液胞型 H⁺-ATPase の役割、第89回日本生理学会大会、2012年3月31日、松本

6. 研究組織

(1)研究代表者

白岩 有桂 (SHIRAIWA, Yuka)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：20596605