

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790950

研究課題名（和文）腎臓のカルシウム輸送体の発現調節とリン代謝

研究課題名（英文）Regulation of renal calcium transporter expressions and phosphate metabolism

研究代表者

谷田部 緑（YATABE MIDORI）

福島県立医科大学 医学部 薬理学講座 助教

研究者番号：30510325

研究成果の概要（和文）：食塩摂取による尿中へのカルシウム排泄の増加は、骨粗しょう症や尿路結石に関与する。食塩負荷ラットで、遠位尿細管のカルシウム再吸収分子は増加し、カルシウムを最も多く再吸収する近位尿細管でそれを促進する claudin 2 蛋白は減少した。食塩を摂取では claudin 2 が減少し、尿へカルシウムが喪失する可能性がある。また、腎で  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換輸送体(NCX1)は遠位尿細管と血管平滑筋にあるが、ラット腎に NCX1 阻害薬を作用させると、カルシウム動態は不変で、血清リンが低下し、尿蛋白および糸球体径が減少した。腎 NCX1 のリンや尿蛋白、糸球体内圧への関与が示唆され、腎臓病で重要となる。

研究成果の概要（英文）：Dietary NaCl intake increases the excretion of calcium into urine, which may lead to osteoporosis and urinary tract stone formation. In dietary NaCl-loaded rats, we have found that the expression of calcium reabsorbing molecules on the distal tubule increases while the protein expression of a molecule that enhances calcium reabsorption in the proximal tubule, claudin 2, is decreased. NaCl ingestion may lead to calcium loss in part via reduced expression of claudin 2. In the kidney,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger 1 (NCX1) is mainly expressed in the distal tubule and the vascular smooth muscle. In vivo renal cortical administration of NCX1 inhibitor in rats lead to a decrease in serum phosphate without altering calcium dynamics, and it also decreased urinary protein and glomerular size. These observations suggest a role of renal NCX1 in phosphate metabolism and control of urinary protein and intraglomerular pressure, which are important aspects of chronic kidney disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：医歯薬学

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：高血圧学、カルシウム・リン代謝

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

食塩を摂取すると、尿中へのカルシウムの排泄が増加することが知られている。この現象は、骨粗しょう症や尿路結石に關与する可能性が示唆されている。しかし、食塩による尿中へのカルシウム喪失機序の詳細は明らかではない。特に、食塩の慢性負荷における腎尿細管カルシウム輸送体への影響は報告されていなかった。また、遠位尿細管に発現するカルシウム輸送分子の一つに、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体タイプ1 (NCX1)がある。NCX1は基底膜側に発現し、通常尿から再吸収されたカルシウムの血管側への移動を担うと考えられている。しかし、腎臓における NCX1 の機能を生体内でみた報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、食塩負荷による腎のカルシウム輸送分子の発現調節について明らかにすること、および腎臓で接合管および血管平滑筋に多く発現する NCX1 の糸球体内圧やカルシウム・リン調節における役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) 食塩負荷による腎のカルシウム輸送分子の発現調節

慢性食塩負荷の影響を調べるため、正常ラット (Wistar-Kyoto rats, WKY) に通常食 (0.3% NaCl) または高食塩食 (8% NaCl) を8週間与えた。その間、定期的に代謝ケージを用いて24時間尿を採取し、尿中電解質等の変化を追跡した。実験終了時に大動脈より採血後、腎組織を採取し、real-time RT-PCRによる各種カルシウム輸送分子 mRNA の定量、western blotting および組織免疫学的検討を行った。

2) 腎における NCX1 の役割

NCX1 の特異的阻害薬、SEA0400 (SEA) を用いて、生体内での腎 NCX1 の機能を調べた。SEA または溶媒は、浸透圧ポンプを用いて腎皮質に持続注入し、作用を腎に限局させることを試みた。麻酔下で WKY の右腎を摘出し、左腎皮質に浸透圧ポンプのカテーテルを挿入して固定、腹腔内にポンプを植込み、閉腹、7日間経過を観察した。テールカフ法による血圧測定や24時間尿での電解質測定を行い、実験終了時には大動脈より採血後、腎組織を採取して、NCX1 の定量的 PCR や腎小体サイズを含

む組織学的検討を行った。

4. 研究成果

1) 食塩負荷による腎のカルシウム輸送分子の発現調節

WKY に対する高食塩食の負荷により、カルシウムの fractional excretion は6倍となり、排泄量が著明に増加した (図1, 2)。

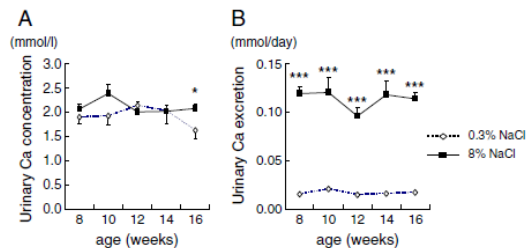


図1) 尿中カルシウム濃度および一日排泄量

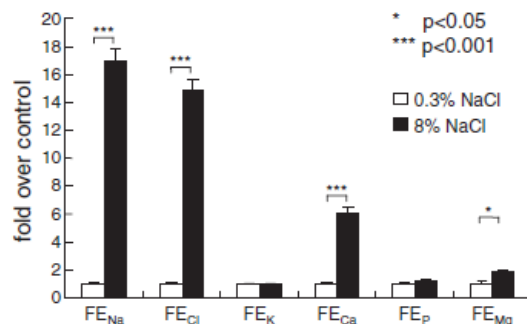


図2) カルシウムを含む各種電解質の排泄率

そこで、近位尿細管において、カルシウムの paracellular transport による再吸収を促進する分子、claudin 2 の発現を調べた。食塩負荷群では、腎皮質の claudin 2 蛋白が通常食群に比べ、約20%減少した (図3)。この傾向は、免疫組織染色による検討でも同様であった。

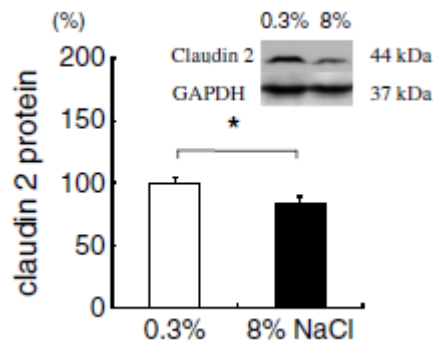


図3) 腎皮質 claudin 2 蛋白定量

一方、ヘンレの太い上向脚でカルシウムおよ

びマグネシウムの paracellular transport に関わる分子、claudin 16 および claudin 19 の発現は、食塩負荷による影響を認めなかった。

次に、遠位尿細管および接合管でカルシウム再吸収に関わる分子の発現を調べた。管腔側でカルシウムの細胞流入経路となるカルシウムチャンネル、TRPV5 の発現は高食塩群で約 1.5 倍に増加した。細胞内でのカルシウム輸送を担う calbindin-D28k の発現も同様に増加、基底膜側でカルシウムの細胞外への輸送を担うと考えられる NCX1 の発現も mRNA レベルで 20%、蛋白レベルで 26%増加した(図 4)。

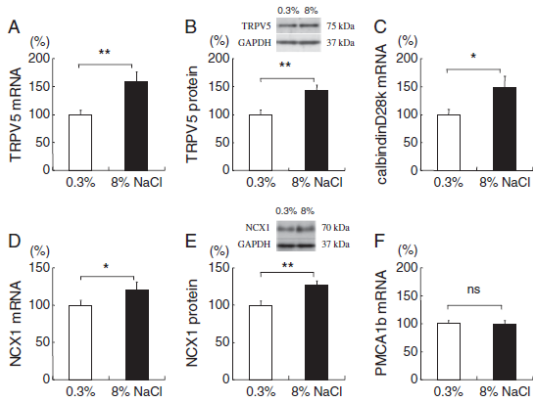


図 4) 腎皮質における遠位尿細管カルシウム輸送分子の発現

これらより、食塩負荷による尿中へのカルシウム喪失の機序の一つとして、食塩負荷時の claudin 2 減少の影響が初めて示唆された。食塩負荷により claudin 2 が減少すれば、近位尿細管でのカルシウム再吸収が减弱し、下流の尿細管へ到達するカルシウムが増加すると考えられる。遠位尿細管におけるカルシウム再吸収関連分子の発現増加は、それを代償する機構の可能性があるが、遠位尿細管でのカルシウム再吸収増加による寄与は小さく、食塩負荷により結果的には尿中へのカルシウム喪失がおこる可能性がある。

また、遠位尿細管カルシウム輸送関連分子の調節には、活性型ビタミンDなど、内分泌因子の関与が知られている。しかし、我々の検討では、高食塩群で血中活性型ビタミンD濃度は有意に低下しており、食塩負荷による遠位尿細管カルシウム輸送分子の増加には、ビタミンD以外の因子の関与が疑われた。

## 2) 腎における NCX1 の役割

NCX1 は、腎臓の遠位尿細管、接合管の基底膜側に多く発現しており、カルシウムの再吸収経路と考えられている。しかし、WKY の腎皮質に NCX1 阻害薬、SEA の持続注入を行い、

in vivo で観察したところ、血中および尿中のカルシウムには SEA 群と対照群で明らかな差を認めなかった。SEA 投与により、NCX1 の upregulation が生じてカルシウムへの作用が見られない可能性を考慮し、NCX1 の mRNA 発現量を比較したが、両群において有意な差は見られなかった。

それに対して、血清リン濃度は、SEA 群で対照群より約 8%低値であった(P<0.05)。しかし、尿中へのリン排泄量は 2 群間で有意差を認めなかった。血中、尿中のナトリウム、カリウムやマグネシウムの値にも有意な差は認めなかった。

収縮期および拡張期の体血圧は、ともに投与 1 週間後には SEA 群において対象群よりも高値となった(図 5)。NCX1 阻害薬は食塩感受性高血圧モデルに対する全身投与で降圧作用を有したという既報がある。しかし、腎内投与での血圧に対する知見は新規のものである。

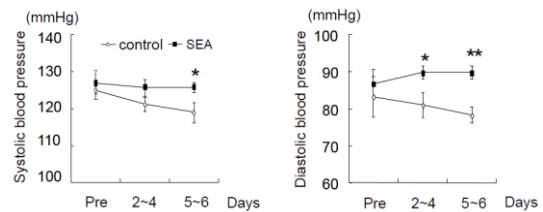


図 5) WKY への SEA 腎内投与時の血圧変化

そこで、血圧に関連する因子について調べた。交感神経活性の指標となる尿中カテコラミンや心拍数には 2 群間で有意な差を認めなかった。レニン・アンジオテンシン系では、血中レニン活性には差がなかったものの、血漿アルドステロン濃度は、SEA 群において対照群の約 1.6 倍と、有意に高値であった(図 6)。

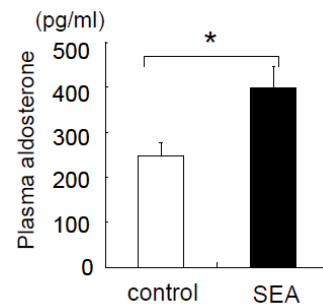


図 6) SEA 腎内投与時の血漿アルドステロン濃度

本実験系においては、薬物投与前に片腎を摘出しているため、糸球体にはある程度の hyperfiltration 負荷がかかっていると考

られる。Hyperfiltration は、蛋白尿や糸球体肥大の引き金となる。しかし、NCX1 阻害薬、SEA を腎内持続投与した群では、対照群と比較し、尿蛋白が約 16%、腎小体面積が約 8%減少した(図 7 各 P<0.05)。

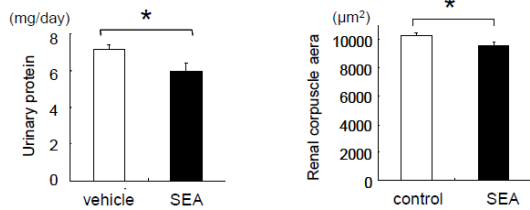


図 7) SEA 腎内投与時の尿蛋白、腎小体面積

まとめとしては、ラット腎皮質に NCX1 の特異的阻害薬、SEA0400 を持続投与すると、血清リンの低下、尿蛋白の減少および糸球体サイズの減少が見られた。慢性腎臓病のような腎疾患では、高リン血症や尿蛋白の増加が予後の悪化と関連する。腎 NCX1 の機能は、このような系の調節に関与する可能性があり、重要と考えられる。

また、腎内に SEA を投与すると、血漿アルドステロンの上昇および体血圧の上昇が見られた。これらは、尿蛋白減少と相反する知見である。しかし、本実験系では血漿レニン活性やクレアチンクリアランスに両群で差がなかったものの、もし SEA により糸球体内圧が低下するとすれば、アルドステロン・体血圧の上昇および尿蛋白の減少は、腎小体面積の減少と合わせて一元的に説明が可能である。腎臓において NCX1 は輸入・輸出細胞管や、糸球体内圧を調節する接合管-糸球体フィードバック機構に重要な接合管に多く発現しており、今後、その役割についてさらなる検討が有用と考えられる。

その上、接合管はリンの調節因子、klotho が分泌される部位でもある。接合管の NCX1 が klotho 分泌に影響を与える可能性についても、現在検討中である。

## 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 1 件)

Midori Sasaki Yatabe, Junichi Yatabe, Kozue Takano, Yuta Murakami, Rina Sakuta, Sadahiko Abe, Hironobu Sanada, Junko Kimura, Tsuyoshi Watanabe. Effects of a high-sodium diet on renal tubule Ca<sup>2+</sup> transporter and claudin expression in Wistar-Kyoto rats. BMC Nephrology, 査読有, 2012, 13:160.

doi:10.1186/1471-2369-13-160

<http://www.biomedcentral.com/1471-2369/>

[学会発表] (計 1 件)

Midori Sasaki Yatabe, Junichi Yatabe, Hironobu Sanada, Junko Kimura, Tsuyoshi Watanabe. Renal Sodium/Calcium Exchanger 1 Inhibitor Treatment Attenuates Proteinuria and Reduces Serum Phosphate Concentration in Uninephrectomized Wistar-Kyoto Rats. World Congress of Nephrology 2011.

[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

谷田部 緑 (YATABE MIDORI)

福島県立医科大学 医学部 薬理学講座 助教

研究者番号: 30510325

### (2) 研究分担者 該当なし

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者 該当なし

( )

研究者番号: