

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461259

研究課題名(和文)水電解質輸送調節における腎集合管 間在細胞の役割

研究課題名(英文)A role of kidney intercalated cells type B in regulatory transport of water and electrolytes

研究代表者

河原 克雅 (Kawahara, Katsumasa)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70134525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス腎尿細管におけるCa感受受容体(CaSR)の局在を調べ、その機能解析を行った。CaSRは、ヘンレの太い上行脚(TAL)と皮質集合管のB間在細胞(IC-B)に発現していた。IC-BのCaSRの発現量は、アルカリ負荷で増大し、酸負荷で減少した。無機リン(Pi)制限食(標準食：1%Pi、低Pi食：0.1%Pi、無Pi食：0.02%Pi)による血液・尿pH変化とIC-Bの応答を調べた。低Pi食(1wk)により血液[P]は変化しなかったが、血液[Ca]は有意に上昇し(8.2 mg/dl)、尿はアルカリ化し、代謝性アシドーシスを示した。この間IC-B管腔膜のPendrin発現が有意に増加した。

研究成果の概要(英文)：By using the highly sensitive ISH technique and a double-staining IHC technique, we examined the axial distribution and expression of the calcium-sensing receptor (CaSR) along the nephron in mice treated for 6 days with water containing acid (NH₄Cl) or alkali (NaHCO₃)-containing diets. CaSR was localized in the cortical and medullary thick ascending limb of Henle's loop, macula densa, distal convoluted tubule, and cortical collecting duct (CCD). In the CCD, CaSR was co-localized with an anion exchanger type 4, a marker of the basolateral membrane of type-B intercalated cell (IC-B). CaSR expression levels in IC-B significantly decreased when mice were fed NH₄Cl and increased when animals were given NaHCO₃. Surprisingly, single infusion (ip) of neomycin, an agonist of CaSR, significantly increased urinary Ca excretion without further increasing the hourly urine volume. Moreover, urine pH was never decreased when urinary excretion of Ca was increased in phosphate-deprived mice.

研究分野：腎生理学

キーワード：Ca感受受容体 集合管間在細胞 酸塩基バランス 低リン食

1. 研究開始当初の背景

腎集合管は、糸球体濾液に含まれる有用な水電解質を調節性に再吸収し、過剰な酸 (H^+)・ K^+ を濾液中に分泌し、細胞外液の至適恒常性を維持する重要なセグメントである。集合管細胞の輸送機能は、ホルモン(バソプレシン AVP, 心房性 Na 利尿ペプチド ANP, アルドステロン Aldo) 局所生理活性物質(ATP, 一酸化窒素 NO)、間質液の物理化学組成 ($[Ca^{2+}]$, pH)により個々に調節されている。腎尿細管に発現する Ca 感知受容体 (CaSR) の局在と本来的機能には矛盾する点が多い。

2. 研究の目的

われわれは、皮質集合管に発現する CaSR の局在(極性)・機能解析を足がかりに、酸塩基調節・電解質輸送調節における IC-B の本来的役割を明らかにする。

3. 研究の方法

皮質集合管は、3種類の細胞(主細胞 PC, 酸分泌細胞 IC-A, アルカリ分泌細胞 IC-B)で構成されているが、これらの細胞を特定できる抗体(抗 AQP2 抗体、抗 AQP3 抗体、抗 AE1 抗体、抗 AE4 抗体、抗 CaSR 抗体など)で識別が可能である。さらに、特定細胞に発現する機能分子の mRNA 発現量を評価する技術、マーカー抗体と組み合わせる二重染色技術を活用する。

つぎに、IC-B 細胞の役割を明らかにするため、実験用マウスを代謝ケージに入れ、アシドーシス・アルカローシス・高 Ca 食などで飼育し、血液・尿データを解析する。

最後に、培養 MDCK 細胞(イヌ)や Pendrin KO マウスの腎集合管初代培養細胞を使って、細胞間シグナル分子の同定とそれによる細胞機能調節の仕組み、ドーム形成・退縮の細胞機序を明らかにする。われわれは、CaSR-Pendrin 系や Cl⁻主導の高血圧機序を解析するために必要な Pendrin KO マウスを、NIH の許可を得て(下記) S Wall 教授(エモリー大学、アトランタ)経由で入手した。しかし、本 KO マウスでの実験は開始するに至らず(マウスの純化途中)共同研究者の安岡有紀子、野々口博史に引き継ぎされている[NIH (USA)の責任者から KO マウスの譲渡許可証(略): by Claire T. Driscoll, Director, Technology Transfer Office (TTO) National Human Genome Research Institute (NHGRI) (NIH)]。

4. 研究成果

腎尿細管における Ca 感知受容体 (CaSR) の局在を調べ、その機能解析(LSM 下で細胞内 Ca 濃度 $[Ca^{2+}]$; 変化のリアルタイム測定を含む)を行った。本実験結果及び考察を補完するため、当教室で実施した TASK2 KO マウス(近位尿細管性アシドーシスモデル) 5/6 腎摘マウス(障害腎再生モデル)の研究成果を用いた。その成果は、学会発表の抄録を参

照していただきたい。

Tyramide-ISH 法及び免疫組織二重染色法によるネフロン内 CaSR の局在と発現調節

高感度 ISH 法を使って、腎尿細管における CaSR の発現分布と誘導刺激を調べた。その結果、従来言われていた近位尿細管、髄質内層集合管には発現が確認できなかった(Refs.1,2)。我々の結果は、ヘンレループの太い上行脚(TAL)と皮質集合管 IC-B 細胞における発現を示した。この結果は、Schnermann らの結果と合致した(Ref.3)。IC-B 細胞の CaSR の発現量は、アルカリ負荷で増大し、酸負荷で減少した。一方、TAL の CaSR の発現量は、酸・アルカリ負荷の影響を受けなかった。われわれは、「皮質集合管 IC-B の CaSR の発現量が、pH 感受性であること」を世界で初めて明らかにした。

腎組織切片における細胞高の測定:

(1)酸・アルカリ負荷後の血液・尿データ:
血液・尿 pH は NH_4Cl 投与後 1 日目で酸性化(pH 低下)した。血液は、3 日目から 1 週間目にかけて元の pH レベル(正常域)に復したが、この間、尿 pH は酸性レベルを維持した。一方、 NH_4Cl 負荷 1 週間後の血液 pH、血漿 CO_2 濃度は正常域内で、最小限の変化を示した。このことは、外来性の酸負荷に対し、血液 pH を正常域内に維持するため、腎臓は代償的に尿を酸性化した(尿中に負荷された酸を排泄した)ことを意味する。アルカリ負荷は、餌に $NaHCO_3$ を混ぜ込んで行った(自由飲水)。腎臓は尿をアルカリ化し、血液 pH を正常域内に維持した。

(2)酸・アルカリ負荷(1 週間)後の細胞高:
太いヘンレの上行脚(TAL)及び皮質集合管(CCD)、髄質外層集合管(OMCD)の 3 種類の細胞(主細胞:PC, 酸分泌細胞:IC-A, アルカリ分泌細胞:IC-B)の細胞高(細胞容積の指標)を測定した。TAL、PC の細胞高は、酸・アルカリ負荷に対して、有意に変化しなかった。一方、IC-A, IC-B 細胞は、酸/アルカリ負荷に対して、各々有意に大きくなった。このことは、外来性の酸/アルカリ負荷に対し、腎臓は代償的に酸/アルカリを尿中に排泄するため、IC-A 細胞・IC-B 細胞の機能亢進を誘導したことを意味する(→ 従来の研究結果を「機能的細胞高変化」で確認した)。

ネオマイシン(CaSR アゴニスト)投与後の尿中 Ca 濃度・排泄量と尿 pH の変化(投与後 1-3 時間)

ネオマイシン投与後 1 時間で、尿中 Ca 濃度・排泄量が有意に増加し、尿 pH も有意に低下した。尿 pH と尿 $[Ca]$ の時間依存的な関係は、尿 $[Ca]$ の増加が先行し、やや遅れて(1 時間遅れて)尿 pH が低下した。しかし、ネオマイシンによる尿量の増加は無く、PC 細

胞（管腔膜）に発現する AQP2 抑制効果に対しては否定的な結果を示した。

無機リン制限食の効果：

(1) 無機リン (Pi) 制限食 (標準 Pi 食: 1%Pi (コントロール) 低 Pi 食: 0.1%Pi、無 Pi 食: 0.02%Pi) 飼育マウスによる血液・尿 pH 変化と皮質集合管の細胞応答を調べた。低 Pi 食 (1 wk) により血液 [P] (mg/dl) は変化しなかったが、血液 [Ca] は有意に上昇した (7.4 → 8.2 mg/dl)。尿中 Pi 排泄量は有意に低下し (3.6 → 2.2 mg/日)、Ca 排泄量は有意に増加した (88.4 → 115 μg/日)。この間、血液 pH に有意な変化は見られなかったが (pH7.37 → 7.36)、尿 pH は有意に中性化した (pH6.34 → 6.94)。次に、無 Pi 食 (1 wk) においても血液 [P] は有意に変化しなかったが、血液 [Ca] は一層上昇した (→ 9.9 mg/dl)。尿中 Pi 排泄量は、痕跡程度に低下し (→ 0.05 mg/日)、Ca 排泄量は著しく増加した (→ 2278 μg/日)。この間、血液 pH は有意に酸性化した (pH7.37 → 7.26)、対称的に、尿 pH は有意にアルカリ化した (pH6.34 → 7.43)。

(2) 皮質集合管の細胞高 (Pi 制限食の第 2 の効果): 皮質集合管 IC-B の細胞高は、Pi 制限に比例して大きくなり、ペンドリン発現 (mRNA の発現量、抗ペンドリン抗体による管腔膜の染色レベル) は同様に増加した。側底膜の AE4 発現は、同様に増加した。一方、IC-A の H⁺ ATPase (mRNA)、炭酸脱水酵素 CA XII (mRNA)、アニオン交換体 AE1 (mRNA, Protein) の発現量は、有意な増加を示さなかった。

低リン食-誘発高 Ca 血症マウスが「アルカリ尿/代謝性アシドーシス」を示す病態生理学的機序を明らかにするため、NIH (USA) の許可を得て S Wall 教授から Pendrin KO マウスを入手したが、現在 KO マウスの純化の途中である。

研究成果の考察: 本研究期間中に、Ca 感知受容体 (CaSR) [Ref. 1: 血中 Ca 濃度を調節する副甲状腺ホルモン (PTH) の分泌を制御する受容体] の腎尿細管における局在と発現量の調節機序を明らかにした。Hebert らの研究グループ (Ref. 1) は、ラット腎尿細管に発現する CaSR を同定し、ISH 法と IHC 法でネフロン内局在 [細かいヘンレループ (TL) を除くほぼ全域] を明らかにした (Ref. 2)。しかし、Schnermann (NIH) らは、単離尿細管技術と RT-PCR 法で、近位尿細管、TL、髓質集合管には発現しないことを示した (Ref. 3)。残念ながら、この実験結果は、CaSR の期待される腎内機能 (腎結石防止) と合致しないため、ほとんど無視されてきた (Refs. 4, 5)。我々の研究成果 (CaSR のネフロン内局在) は、

Schnermann の実験結果が正しかったことを 20 年の時を超えて明らかにした。

次に、CaSR の局在と機能実験から、TAL (側底膜) の CaSR は、糸球体濾液中の Ca 再吸収を抑制し (尿中 Ca 排泄を増加させ) 血中 [Ca] 高値を正常化する役割を持つことを確認した。しかし、尿量を増加させる役割 (AQP2 の阻害効果) を示さず、Hebert らの実験結果 (尿量増加) に合致しなかった。

考察 2

皮質集合管 IC-B (側底膜) に発現する CaSR の役割: CaSR はマウス CCD に発現していたが、OMCD での発現は認められなかった。この発現量 (mRNA, 蛋白) は、酸負荷で抑制され、アルカリ負荷で増加した。CaSR の局在と機能実験結果は、CaSR の発現が、IC-A 細胞ではなく、IC-B 細胞であることを強く支持する。

考察 3: マウスを低リン食で飼育し、血中 [Ca] 濃度上昇に应答する血液・尿 pH を調べた。本実験に使用したマウスでは、短期間 (1 週間) 食事の Pi を制限しても血中 Pi 濃度は変化しないことを確認した。このことは、栄養障害、薬物中毒、大手術、感染 (sepsis など) などに起因する「低 Pi 血症患者の代謝性アシドーシス (アルカリ尿)」と鑑別および比較するために重要である。一方、血液 [Ca] 高値は、「消化管の Ca 吸収亢進」や「代償性のリン補給のための骨吸収促進」のためと思われる。したがって、血液 [Ca] 高値と尿中への Ca 排泄増加は、腎臓の Ca 代謝機能とその調節系が正常に機能している事を示唆する。興味深いことに、血液・尿の pH 変化は、尿 pH のアルカリ化 (中性化) が先行し (低 Pi 食では、血液 pH は正常域内)、無 Pi 食飼育で初めて、血液 [Ca] 上昇に起因すると思われる「尿のアルカリ化と血液の酸性化」を示した。低リン食飼育マウスの「不適切な酸塩基バランス異常 (IC-B 細胞における潜在的 CaSR 機能の不適切な顕在化)」の病態生理学的機序については、共同研究者の安岡が引き続き実験を行っている。

考察 4: 皮質集合管 IC-B の細胞高とペンドリン発現: IC-B の機能発現の指標 (細胞高と管腔膜のペンドリン発現) は、血液 [Ca] 変化に正比例し、血液 pH と逆比例した。このことは、ある種の条件下においては、IC-B 細胞が血液 pH による調節に従わず、血液 [Ca] 変化によって制御されることを示唆する。我々は、低リン食飼育マウスの病態生理学的機序の本態は、「IC-B 細胞 (側底膜) に発現する CaSR が、血液 [Ca] 変化による液性シグナルを優先させたことに起因する」と考えるが、さらなる検討が必要である。

文献:

Ref. 1. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC. Cloning

and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*. 1993; 366: 575-80.

Ref.2. Riccardi D, Park J, Lee WS, Gamba G, Brown EM, Hebert SC. Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor.

Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92:131-5.

Ref.3. Yang T, Hassan S, Huang YG, Smart AM, Briggs JP, Schnernmann JB. Expression of PTHrP, PTH/PTHrP receptor, and Ca^{2+} -sensing receptor mRNAs along the rat nephron. *Am J Physiol*. 1997; 272: F751-8.

Ref. 4. Renkema KY, Velic A, Dijkman HB, Verkaart S, van der Kemp AW, Nowik M, Timmermans K, Doucet A, Wagner CA, Bindels RJ, Hoenderop JG. The calcium-sensing receptor promotes urinary acidification to prevent nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20: 1705-13.

Ref. 5. Alfadda TI, Saleh AM, Houillier P, Geibel JP. Calcium-sensing receptor 20 years later. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014; 307: C221-31.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Yasuoka Y, Sato Y, Healy JM, Nonoguchi H, Kawahara K. pH-sensitive expression of calcium sensing receptor (CaSR) in type-B intercalated cells of the cortical collecting ducts (CCD) in mouse kidney. *Clin Exp Nephrol* 19, 771-782 (2015). 査読有. DOI: 10.1007/s10157-014-1063-1

[学会発表](計15件)

河原克雅. 低リン食飼育マウスにおける逆流の酸塩基イオンバランス. 第50回日本痛風・核酸代謝学会総会 2017年2月17日 京王プラザホテル(東京都)

河原克雅, 安岡有紀子, 大嶋友美. 低リン食飼育マウスの高Ca血症と代謝性アシドーシスの病態生理学. 第20回日本病態栄養学会年次学術集会 2017年1月15日 国立京都国際会館(京都市)

大嶋友美, 福田英一, 安岡有紀子, 野々口博史, 河原克雅. 血漿[Ca]高値による腎集合管の水・イオン輸送と酸・アルカリ分泌調節. 第27回バゾプレシン研究会 2017年1月7日 TKP 有楽町会議室(東京都)

河原克雅, 大嶋友美, 福田英一, 安岡有紀子. 腎集合管B型-間在細胞の非生理的なアルカリ分泌. 平成28年度生理学

研究所研究会「上皮膜輸送調節蛋白の異常と病態生理学の融合」2016年11月24日 生理学研究所(岡崎市)

Yasuoka Y, Oshima T, Sato Y, Ohtsuka M, Kimura M, Nonoguchi H, Kawahara K. Decreased renal threshold for urinary excretion of ammonia underlies proximal renal tubular acidosis in TASK2 K channel-deficient mice. アメリカ腎臓学会 2016年11月19日 シカゴ(アメリカ)

Kawahara K. Acid-base imbalance due to inappropriate stimulation of Pendrin. International Conference: The kidney in genetic and rare disease 2016年10月27日 ナポリ(イタリア)
安岡有紀子, 大嶋友美, 佐藤雄一, 野々口博史, 河原克雅. 低Pi食飼育マウスの代謝性アシドーシス-アルカリ尿の病態生理機序. 第59回日本腎臓学会学術総会 2016年6月19日 パシフィコ横浜(横浜市)

Yasuoka Y, Oshima T, Sato Y, Nonoguchi H, Kawahara K. Metabolic acidosis with alkaluria in phosphate-deprived mice: a role of pendrin in kidney type B intercalated cells. 第93回日本生理学会大会 2016年3月23日 札幌コンベンションセンター(札幌市)

Yasuoka Y, Oshima T, Sato Y, Nonoguchi H, Kawahara K. Phosphate depletion-induced metabolic acidosis and alkali urine may be caused by inappropriate stimulation of apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (Pendrin) in mouse kidney type B intercalated cells (IC-B). アメリカ腎臓学会 2015年11月6日 サンディエゴ(アメリカ)

安岡有紀子, 大嶋友美, 佐藤雄一, 野々口博史, 河原克雅. 経口Ca塩-高Ca尿による腎集合管の水・酸塩基輸送応答. 第45回日本腎臓学会東部学術大会 2015年10月2日 東京ミッドタウン(東京都)

安岡有紀子, 大嶋友美, 河原克雅. 低リン食マウスの高Ca血症が誘発するアルカリ尿と代謝性アシドーシスの分子機構. 平成27年度生理学研究所研究会「粘膜免疫学と膜輸送生理学の融合」 2015年9月15日 生理学研究所(岡崎市)

Yasuoka Y, Sato Y, Nonoguchi H, Kawahara K. Role of calcium sensing receptor (CaSR) in type-B intercalated cell of mouse kidney collecting duct during acid/base and Ca salts-loading. 第92回日本生理学会大会 2015年3月21日 神戸国際会議場(神戸市)

Yasuoka Y, Sato Y, Nonoguchi H, Kawahara K. Hypercalcemia in mice with high CaP diet co-operatively stimulated renal alpha and beta intercalated cells (IC-A and -B) via basolateral Ca-sensing receptor in IC-B. アメリカ腎臓学会 2014 年 11 月 14 日 フィラデルフィア (アメリカ)
河原克雅、安岡有紀子、佐藤雄一、野々口博史. 腎尿細管 Ca 感受性受容体 (CaSR) の役割. 第 44 回日本腎臓学会 東部学術大会 2014 年 10 月 24 日 ベルサール新宿グランド (東京都)
福田英一、石井大輔、岩村正嗣、安岡有紀子、野々口博史、河原克雅. 5/6 腎摘マウスの血液・尿データと腎機能評価. 第 44 回日本腎臓学会 東部学術大会 2014 年 10 月 24 日 ベルサール新宿グランド (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 克雅 (KAWAHARA, Katsumasa)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：7 0 1 3 4 5 2 5

(2) 研究分担者

安岡 有紀子 (YASUOKA, Yukiko)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：5 0 3 4 8 5 0 4

福田 英一 (FUKUDA, Hidekazu)
北里大学・医学部・助教
研究者番号：2 0 4 3 3 7 1 6

石井 大輔 (ISHII, Daisuke)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：1 0 3 2 7 4 1 3

野々口 博史 (NONOGUCHI, Hiroshi)
北里大学・北里大学メディカルセンター
・部長
研究者番号：3 0 2 1 8 3 4 1