

内容の要旨

【目的】

腎尿細管における電解質の再吸収・分泌には様々なイオン輸送体が関与している。Na⁺/Ca²⁺交換輸送体(NCX)は3個のNa⁺と1個のCa²⁺を交換するイオン輸送体である。腎臓にはNCX1とNCX2の2種の分子種が発現しているが、それらの機能的役割についてはCa²⁺再吸収への関与が推定されているものの、その実験的証拠は未だ明確に示されていない。そこで、本研究では、特異的NCX阻害薬およびNCX1、NCX2の両遺伝子欠損マウスを用いて、尿生成および電解質排泄におけるNCX分子種の役割について解析した。

【方法】

C57BL/6JマウスにNCX阻害薬(YM-244769、SEA0400、KB-R7943)を経口投与した後、24時間尿を採取し、尿生成および電解質排泄に対する影響を調べた。また、野生型マウス(WT)、NCX1ヘテロ欠損マウス(N1-KO)、NCX2ヘテロ欠損マウス(N2-KO)、ダブルヘテロ欠損マウス(D-KO)の血中電解質濃度、尿量および尿中電解質排泄量を比較するとともに、これらマウスに対するNCX阻害薬の影響を検討した。さらに、WNK4^{D561A/+}ノックインマウス(Na⁺-Cl⁻共輸送体機能亢進モデル)に対するNCX阻害薬の影響をtrichlormethiazide(TCM)と比較した。

【結果】

免疫組織染色法により、NCX1およびNCX2は遠位尿細管、特に遠位曲尿細管および結合尿細管の基底膜側細胞膜に局在することを確認した。3種のNCX阻害薬は用量依存的に尿量および電解質排泄量(Na⁺、K⁺、Cl⁻)を増加させた。YM-244769(1 mg/kg)のNa⁺利尿効果はTCM(10, 30 mg/kg)のNa⁺利尿効果にほぼ匹敵した。また、高用量ではCa²⁺排泄量(尿中Ca²⁺/Cr比)も有意に増加させた。このCa²⁺排泄効果は、特にNCX2選択性の高いNCX阻害薬(YM-244769、KB-R7943)で強く認められる傾向があった。NCX遺伝子欠損マウスの腎機能比較において、N2-KOおよびD-KOはWTに比べて尿量および電解質排泄が亢進していた。一方、N1-KOでは軽度な腎機能亢進が観察されたが、WTに比べて有意ではなかった。さらに、N1-KOではYM-244769のNa⁺利尿効果がWTとほぼ同等に観察されたが、N2-KOおよびD-KOでは同効果は消失していた。また、WNK4^{D561A/+}ノックインマウスでは、TCMのNa⁺利尿効果が観察されたが、YM-244769のNa⁺利尿効果は消失していた。一方、YM-244769のCa²⁺排泄促進はWTと同様に認められた。

【結論】

特異的阻害薬や遺伝子欠損によりNCX2を機能抑制すると、Na⁺利尿効果およびCa²⁺排泄促進が

引き起こされた。NCX1 の機能抑制によっても同効果が軽度に観察されたが、NCX2 の機能抑制においてより顕著であった。従って、NCX2 は尿生成および電解質排泄において NCX1 と異なる機能的役割を有するものと考えられた。また、NCX 阻害薬の Na⁺利尿効果および Ca²⁺排泄促進には一部乖離が認められたことから、両作用機序は異なることが推定された。Ca²⁺排泄促進は NCX を介する遠位尿細管の Ca²⁺再吸収の直接的抑制と考えられるが、Na⁺利尿効果は他の Na⁺再吸収機構への間接的抑制の可能性が推察される。以上の研究により、尿生成および電解質排泄における NCX2 の機能的重要性が明らかとなった。NCX2 は腎臓領域の新しい創薬標的になることが期待される。

審査の結果の要旨

本論文は、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体(NCX)阻害薬および NCX 遺伝子欠損マウスを用いて、尿生成および電解質排泄における NCX 分子種の機能的役割を解析した研究である。NCX1 および NCX2 は遠位尿細管、特に遠位曲尿細管と結合尿細管の基底膜側細胞膜に局在していた。特異的阻害薬や遺伝子欠損による NCX2 の機能抑制は Na^+ 利尿および Ca^{2+} 排泄促進を引き起こした。同様の効果は NCX1 の機能抑制でも軽度に観察されたが、NCX2 の機能抑制においてより顕著であった。これらの結果は、尿生成および電解質排泄における NCX2 の機能的な重要性を示している。NCX2 は腎臓領域の新しい創薬標的になることが期待される。

1. 斬新さ

これまで NCX2 の腎機能における役割は全く不明であった。本研究では NCX2 が遠位尿細管の基底膜側細胞膜に局在し、尿生成や Na^+ 、 Ca^{2+} などの電解質排泄に重要な役割を果たしていることを初めて明らかにした。

2. 重要性

腎尿細管における電解質の再吸収・分泌には様々なイオン輸送体が関与している。本研究は、尿生成および電解質排泄における NCX 分子種、特に NCX2 の機能的役割の位置付けを明確にした点で腎臓生理学的に重要である。さらに、将来の治療応用として、NCX2 は腎臓領域の新しい創薬標的になることが期待される。

3. 研究方法の正確性

本研究では、特異的 NCX 阻害薬と NCX 遺伝子欠損マウスの 2 種の研究ツールを用いて、尿生成および電解質排泄における NCX 分子種の機能的役割を解析した。遺伝子欠損は長期的・慢性的な機能抑制を引き起こすが、阻害薬処置は短期的・急性的な機能抑制を誘導することができる。本研究では、これら両手法を併用することにより、標的 NCX 分子種の機能的役割を多角的にかつ精度良く解析している。

4. 表現の明瞭性

本研究で得られたデータは写真や図表として視覚的に解り易く表示しており、また、研究目的、実験方法、実験結果、考察は簡潔かつ明確に記載されている。

5. 主な質疑応答

Q : 尿細管の基底膜側では PMCA と NCX が存在し、PMCA も重要な役割をしていると考えられるが、PMCA と NCX の関係は評価しなかったか？

A : 今回の実験では PMCA の機能は評価していない。NCX1、NCX2、PMCA の機能が相互に影響し合っている可能性はあるので、今後、培養腎上皮細胞を用いた実験系でそれらの Ca^{2+} 輸送活性

を評価する予定である。

Q : Ca²⁺再吸収に対して PTH や vitamin D などのホルモン分泌は影響していないのか？

A : ホルモン濃度は測定していないが、その測定は必要である。しかし、血中の Ca²⁺濃度は有意な変化がないので、ホルモン分泌の影響は少ないと考える。

Q : ENaC などの Na⁺チャネル阻害薬の評価は行っていないか？

A : トリアムテレンなどの ENaC 阻害薬の検討は今後行ってみたい。さらに、NCC ノックアウトマウスと NCX ノックアウトマウスの交配実験も有用かもしれない。

Q : NCX1 と NCX2 は同じ尿細管部位に発現しているが、その機能の違いをどう説明するか。またイオン親和性の違いはないのか？

A : 機能的差異の詳細はいまだ不明な点が多いが、輸送イオンに対する親和性はほぼ同等であるとの報告がある。

Q : NCX1 と NCX2 の機能抑制により尿量の劇的な違いがあるが、分子機序はどうなっているか？

A : 現象として観察した結果は劇的だが、その分子機序についてはわからない。今後、分子機序については培養腎上皮細胞を用いた実験系で評価していく予定である。

Q : NCX1 と NCX2 のノックアウトマウスにおいて、有意ではないが血中 Ca²⁺濃度の低下傾向が認められる。血中 Ca²⁺濃度の低下を補完する代償機構が存在するのか？

A : 消化管からの再吸収・排泄で代償されている可能性がある。

Q : WNK4 変異体ノックインマウスでは尿量が野生型や NCX ヘテロマウスと比べて多い傾向がある。NCC 障害で利尿が起こることを考えると NCC の機能亢進で尿量が増えるのはなぜか？

A : NCC の局在する遠位尿細管の上流や下流で何らかの電解質輸送に関する間接的な影響が起こった結果と考える。

Q : 高食塩負荷モデルやビスホスホネート処置実験は検討したか？

A : 高食塩負荷モデルは現在進行中であり、ビスホスホネートやカルシトニン処置実験も今後の検討項目となっている。

Q : Na⁺利尿の認められる群では飲水量の違いはないのか？

A : 飲水量は測定している。飲水量と尿量は相関するが、各群で実験条件の違いはない。

Q : ノックアウトマウスは慢性の機能抑制であるのに対し、阻害薬投与群は急性の機能抑制である。阻害薬投与では血中浸透圧が変化しないか？

A：血液・尿の浸透圧を測定したが、有意な変化はなかった。

本論文は、尿生成および電解質排泄における NCX2 の機能的な重要性を実験的に証明した意義深い研究である。内容の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明瞭性及び質疑応答の結果を踏まえ、審査員で討議の結果、本論文は学位に値すると評価された。