

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目:

**Mechanism of ion transport
in human renal proximal tubular cells**
(ヒト腎近位尿細管細胞におけるイオン輸送機構の解析)

東京大学大学院医学系研究科

医学博士課程

内科学専攻

平成 11 年 4 月 1 日入学

原 千晶

【目的】

腎近位尿細管細胞は糸球体で濾過された重炭酸の 80%以上を再吸収しており、酸・塩基平衡の恒常性を保つことのみならず体液量及び血圧調節にも重要な影響を与えている。この部位の再吸収過程の本体は重炭酸と共役した能動的 Na 輸送であり、管腔側膜の Na^+/H^+ 交換輸送体 (NHE3) 及び基底側膜の $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ 共輸送体 (NBC1) が中心的な役割を担っている。現在までにヒトでは少なくとも三つの NBC1

variants が存在することが報告されている。すなわち腎臓型輸送体 (kidney type, kNBC1)、膵臓型輸送体 (pancreatic type, pNBC1) 及び心臓型輸送体 (heart type, hNBC1) である。kNBC1 と pNBC1 は N 末端のアミノ酸配列が一部異なるだけで(腎臓型の初めの 41 個アミノ酸が膵臓型では 85 個アミノ酸で置換されている)、pNBC1 は hNBC1 とアミノ酸レベルでは同一であり、5'-untranslated region のみが異なる。これらの NBC1 variants が alternative splicing により単一遺伝子 (SLC4A4) に由来していることが既に報告されている。

近位尿細管の Na 輸送に関与する輸送体のうち、まず NHE3 の重要性については、NHE3 の近位尿細管管腔側膜への局在及び NHE3 欠損マウスが高度の脱水と軽度な近位尿細管性アシドーシスを呈することなどから支持される。一方、NBC1 の重要性については、近位尿細管基底側膜への局在及び最近我々のグループが報告したように NBC1 の変異により、帯状角膜変性症、白内障、緑内障を伴う近位尿細管性アシドーシス (pRTA) が生じることなどから支持される。

腎近位尿細管における輸送体機構を詳細に検討するために、従来から哺乳類の腎近位尿細管由来の培養細胞株 (OK 細胞や LLC-PK1 細胞) が用いられてきた。実際にこれらの研究を通して、NHE3 輸送特性やホルモンによる調節機構が明らかにされてきた。しかし、NBC1 を発現している細胞株での検討はごくわずかしかされていなかった。また、ヒト由来の腎近位尿細管細胞の培養は困難で、実験に適した細胞株は得られていなかったが、近年 Racusen らによりヒト腎近位尿細管由来の培養細胞 (HKC-8 細胞) の樹立が報告された (J Lab Clin Med 129 (1997): 318-329.)。本研究の目的は、ヒト由来の HKC-8 細胞の輸送体活性を解析し、その輸送特性を明らかにすることである。さらに、どの NBC1 variants が近位尿細管重炭酸再吸収に重要であるかを決定するために、HKC-8 細胞及びヒト正常腎において、NBC1 variants の発現を比較検討することにした。

【方法】

1. HKC-8 細胞の輸送体活性については、pH 感受性蛍光色素 BCECF を用いた細胞内 pH (pHi) 測定法により解析した。
2. HKC-8 細胞における NBC1 variants の mRNA 発現を RT-PCR 法にて解析した。
3. HKC-8 細胞及びヒト腎臓における NBC1 variants の蛋白発現を Western Blot 法にて解析した。

【結果】

HKC-8 細胞の $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 非存在下における酸負荷からの pHi の回復は細胞外 Na^+ に依存しており、この輸送体活性を抑制するためには、高濃度 amiloride (3mM/L) を要した。一方、 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 存在下における酸負荷からの pHi の回復も細胞外 Na^+ に依存しているが、これは 3mM/L amiloride によっても完全には抑制されず、DIDS (0.3mM/L) を加えることにより完全に抑制された。また、この DIDS 感受性の pHi 回復反応は細胞外 Cl^- の除去により影響を受けないが、細胞内電位の脱分極により増強された。一方、 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 存在下における Cl^- 除去は pHi を上昇させ、この反応は溶液の Na^+ 除去により影響を受けないが、DIDS により阻害された。これらの結果より HKC-8 細胞には NHE (特に AML 低感受性の NHE3)、起電性の NBC1 および Na 非依存性 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger が存在することが強く示唆された。

一方、NBC1 variants に特異的領域に対するプライマーを用いた RT-PCR 法では kNBC1 と pNBC1 mRNAs の発現を認めた。また、NBC1 variants に特異的な抗体を用いた Western Bolt 法により kNBC1 と pNBC1 蛋白の発現を確認した。これに対して、腎癌患者から入手した正常ヒト腎臓における Western Bolt 法では kNBC1 蛋白の発現のみを検出した。

【総括】

HKC-8 細胞には NHE、NBC および $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger 活性が発現していることを確認した。このうち、NHE については、AML に対する感受性から NHE1 に加え NHE3 の存在が示唆された。また、NBC については、起電性及び Cl 非依存性から NBC1 の存在が支持された。さらに、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger については Na 非依存性の anion 交換輸送体 (Anion Exchanger: AE) の存在が示唆され、これらの性質から総合的に判断すると、この HKC-8 細胞は腎近位尿細管細胞の輸送特性を備えていると判断された。NBC1 variants については、腎臓型 (kNBC) と膵臓型 (pNBC) 輸送体の発現をメッセージレベル及び蛋白レベルで確認した。ヒト腎臓における Northern Blot 法を用いた過去の解析では、kNBC1 mRNA に加えて pNBC1 mRNA 発現も確認されていた (J Biol Chem 273(1998): 17689-17695.)。しかし、今回ヒト腎臓における Western Blot 法による解析では kNBC1 蛋白の発現のみが確認され、pNBC1 蛋白の発現については認めなかった。

以上より、HKC-8 細胞はその輸送特性からヒト腎近位尿細管の輸送機構を解析する上で極めて有用な細胞株であると考えられた。しかし、pNBC1 の発現に関しては *in vivo* と比べると upregulation を受けていることが示唆された。

これらの結果の一部は以下の通り報告した。

Hara C, Satoh H, Usui T, Kunimi M, Noiri E, Tsukamoto K, Taniguchi S, Uwatoko S, Goto A, Racusen L, Inatomi J, Endou H, Fujita T and Seki G.

Intracellular pH regulatory mechanism in a human renal proximal cell line (HKC-8): evidence for Na^+/H^+ exchanger, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger and $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter.

Pflügers Arch-Eur J Physiol 440: 713-720, 2000.