

学 位 論 文 要 旨

氏 名 小川 みゆき



論 文 題 目

「Interrelationship between CLC-5-containing vesicle trafficking and sorting of vacuolar H⁺-ATPase and NHE3 in response to NH₄Cl-induced acidosis in mouse kidney」

(塩化アンモニウムによるアシドーシスがマウス腎にもたらす CLC-5 発現細胞内小胞トラフィッキングと V 型 H-ポンプおよび Na-H 交換輸送体 (NHE3) のソーティングに対する相関関係について)

指 導 教 授 承 認 印

坂本尚登



Interrelationship between CLC-5-containing vesicle trafficking and sorting of vacuolar H⁺-ATPase and NHE3 in response to NH₄Cl-induced acidosis in mouse kidney

(塩化アンモニウムによるアシドーシスがマウス腎にもたらす CLC-5 発現細胞内小胞トラフィックと V 型 H⁺-ポンプおよび Na⁺-H 交換輸送体 (NHE3) のソーティングに対する相関関係について)

氏 名 小川みゆき

要旨

【背景】

CLC-5 クロライドチャネル (CLC5) は、4 つの遺伝性腎疾患 (Dent 病、X 染色体劣性遺伝の尿路結石症、X 染色体劣性遺伝の低リン血症性くる病、特発性低分子尿蛋白症) において病因遺伝子と考えられていたが、CLC-5 欠損遺伝子改変マウスの解析により機能的に低分子タンパク尿や高カルシウム尿を生じる病態生理に関わることが確認された。腎臓において、主に近位尿細管細胞 (PT) と集合管 α 型間在細胞 (IC) に発現し、細胞内小胞膜に vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) と共局在する特性を示す。よって、PT ではエンドゾーム小胞内の H⁺ ポンプによる膜電位変化を相殺する陰イオンチャネルとして作用し、酸性化を維持して低分子タンパクのエンドサイトーシスに寄与すると考えられている。一方、IC における生理学的意義については詳細不明である。そこで、① PT と ICT が共に尿酸性化に関わること、② IC では pH に依存して V-ATPase の細胞内局在部位が変化する特性、さらに、③ IC は酸負荷により hensin 蛋白の発現を介して β IC から α IC へ細胞形質の変換が生じる等の知見に着目して、代謝性アシドーシスがもたらす腎尿細管における V-ATPase の細胞内ソーティングを指標にして、CLC5 の細胞内小胞輸送制御に関わる機能連関について検討した。

【方法】

1. 特異的な抗 CLC5 抗体の作成：従来、ラットリンパ節法で作成した C 末に対する抗ペプチドモノクローナル抗体に加えて、N 末の合成ペプチドに対する精製ポリクローナル抗体をウサギで作成した。2. 代謝性アシドーシスマウスの作成プロトコール：8-10 週令の b612:ICR 雄マウスに 0.28M 塩化アンモニウムと 0.5% ショ糖を混和した水溶液を飲水させてアシドーシスマウスを作成した。一方、コントロール群には 0.5% ショ糖液のみを飲水させた。経過中は尿 pH をモニターして、酸負荷に対する代償が生じる負荷開始後 6 日目に腎臓を採取した。3. 腎臓の細胞膜分画の調製：腎臓を皮質と髄質に 2 分してホモジェナイザーで破碎した分画 (H0)、さらに遠心して核と夾雑物を除去した後、その上清を用いて超遠心法にて形質膜分画 (P1) と細胞内小胞膜分画 (P2) を精製してウェスタンブロット (WB) に供した。4. マウス腎の免疫組織染色：PLP 液で灌流固定した腎を 10 μ m で切り出した切片を用いて種々の免疫組織染色を行い、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて細胞内の局在部位を同定した。

【結果】

1) 負荷開始 6 日目、アシドーシスマウスで有意な尿の酸性化を示した。2) 腎の酸排泄に関わる膜輸送体、Na⁺-H⁺ exchanger 3 (NHE3) と V-ATPase の皮質と髄質の蛋白発現量にはアシドーシス前・後で差を認めなかったが、膜分画レベルでは変化を示し、P1 に比し P2 の発現量が増加した。3) これに対して、CLC5 の発現量もアシドーシス前・後で差を示さなかったが、膜分画レベルでは皮質と髄質で共に P2 に相対的に有意な増加を示した。4) 一方、免疫組織学的には、NHE3 は PT

と髄質外層のヘンレ上行脚太い部分 (mTAL) において、アシドーシスにより管腔側膜側に優位な局在の変化を示した。また、V-ATPaseは主に皮質集と髄質の集合管のICにおいて管腔側に優位な局在を示す α 型ICの増加と細胞質内にびまん性に局在するICの増加が示唆された。5) アシドーシスに伴う CLC5の腎臓内局在の変化は、皮質と髄質の集合管のICでは、V-ATPaseの局在変化に一致する特性を示した。

【考察】

1) アシドーシスに呼応して腎臓に生じる代償性の尿酸性化能の増強は、酸の膜輸送体自体の産生量の制御だけでなく細胞内小胞輸送を介する膜輸送体のソーティングの制御により調節されていると考えられる。なお、この細胞内小胞輸送を利用する V-ATPase のソーティングには小胞膜に共局在する CLC5 が機能的に関連していると推察される。2) 近年、慢性腎臓病において代謝性アシドーシスをアルカリ療法で治療すると機能障害の進展が抑制されるとの新たな知見が示された。ただし、治療が奏効する病態生理の詳細については解明されていない。今回、腎尿細管の酸排泄に CLC5 クロライドチャンネルが細胞内小胞のトラフィックを介して関与する可能性が明らかとなった。3) CLC5 の機能障害が腎機能障害の進展に寄与することは、このチャンネルの遺伝子変異を示す Dent 病が進行性の腎機能障害を示す臨床所見にも矛盾しない。CLC5 の機能制御システムの更なる解明は、腎不全の進行を抑制する新たな治療をもたらす可能性がある。

【結論】

CLC5 クロライドチャンネルは、 H^+ -ATPase と NHE3 の細胞内ソーティングに発現する細胞内小胞輸送の制御を介して機能的に関連している。