

## 177. PMCA1 に着目した慢性腎臓病の治療開発

涌井 広道

横浜市立大学 大学院医学研究科 病態制御内科学

Key words : PMCA1, 腎障害, 高血圧

### 緒言

*ATP2B1* は本態性高血圧症に対する網羅的疾患感受性遺伝子解析により、血圧に最も影響を与える遺伝子として報告された<sup>1)</sup>。Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 1 (PMCA1) は *ATP2B1* 遺伝子によってコードされるタンパクであり、腎尿細管で内在性に高発現を認めるが、その病態生理学的意義についてはほとんど分かっていない。本研究では、腎障害モデル動物をもちいて腎 PMCA1 の発現調節を検討し、さらに、腎尿細管特異的 PMCA1 欠損マウスをもちいて、腎における PMCA1 の機能的意義を明らかにした。

### 方法

#### 1. 腎 PMCA1 の発現調節の検討 (実験 1)

腎障害モデルマウスとして、片側尿管結紮 (UUO) マウス、5/6 腎臓摘出 (5/6 Nx) マウス、および慢性持続 Angiotensin II (Ang II) 投与マウスを作製し、腎線維化の亢進、腎機能低下や蛋白尿の増加に伴う、腎での PMCA1 発現調節を対照群と比較検討した。

#### 2. 腎 PMCA1 の機能解析 (実験 2)

Cre-LoxP システムをもちいて遠位尿細管～集合管特異的 PMCA1 欠損マウス (KSP-KO) を作製し、その表現型をコントロールマウスと比較検討した。

### 結果

#### 1. 腎 PMCA1 の発現調節の検討 (実験 1)

UUO 施行 7 日後、腎線維化を認め、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、コラーゲンなどの線維化関連遺伝子発現の増加、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、F4/80 などのマクロファージ関連遺伝子発現の増加を認めた (図 1)。一方、血圧および腎 PMCA1 発現は UUO 群と sham 手術群で差を認めなかった。5/6Nx 施行 4 週間後、クレアチニンクリアランスは有意に低下した (図 2)。一方、血圧および腎 PMCA1 発現は 5/6Nx 群と sham 手術群で差を認めなかった。慢性持続 Ang II 投与 2 週間後、アルブミン尿の増加、血圧上昇とともに腎 PMCA 発現量の有意な増加を認めた (図 3)。

#### 2. 腎 PMCA1 の機能解析 (実験 2)

KSP-KO では、野生型マウスと比較して、腎機能や血圧は同等であるものの、高 Ca 尿症、多尿および尿濃縮力障害を認め、飲水制限下でも同様であった (図 4)。さらに、KSP-KO ではバソプレッシンに対する反応性の低下、plasma membrane での aquaporin-2 (AQP2) 発現レベルが減少していた (図 5)。KSP-KO の血清カルシウム濃度は野生型マウスと同等であり、小腸でのカルシウム輸送蛋白 Transient Receptor Potential Vanilloid 6 (TRPV6) mRNA 発現が増加していた。さらに、KSP-KO の副甲状腺ホルモンは野生型マウスより高値であった。集合管特異的 PMCA1 欠損マウス (AQP2-KO) でも同様の表現型を認め、高 Ca 尿症および尿濃縮力障害の程度は KSP-KO よりも軽微であった。

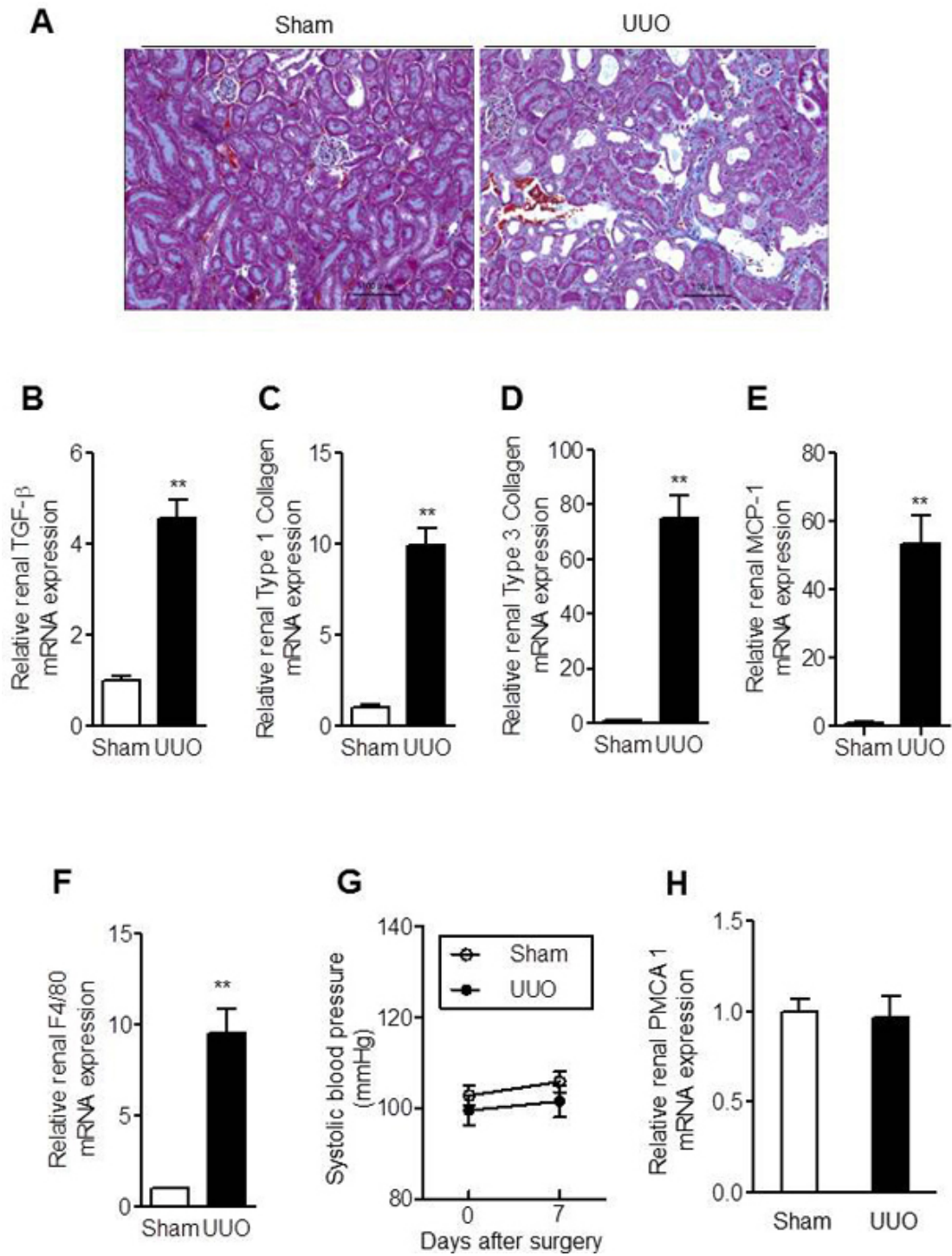


図1. UUOモデルによる腎線維化、血圧、および腎PMCA1発現

(A) UUOによる腎線維化の亢進(マッソントリクローム染色、Scale bar: 100  $\mu$ m)。UUOによる線維化関連遺伝子(B, C, D)、マクロファージ関連遺伝子(E, F)の発現増加(\*\* $P < 0.01$  vs sham手術, unpaired  $t$ -test)。(G) UUOにより血圧は不変。(H) UUOにより腎PMCA1発現は不変。

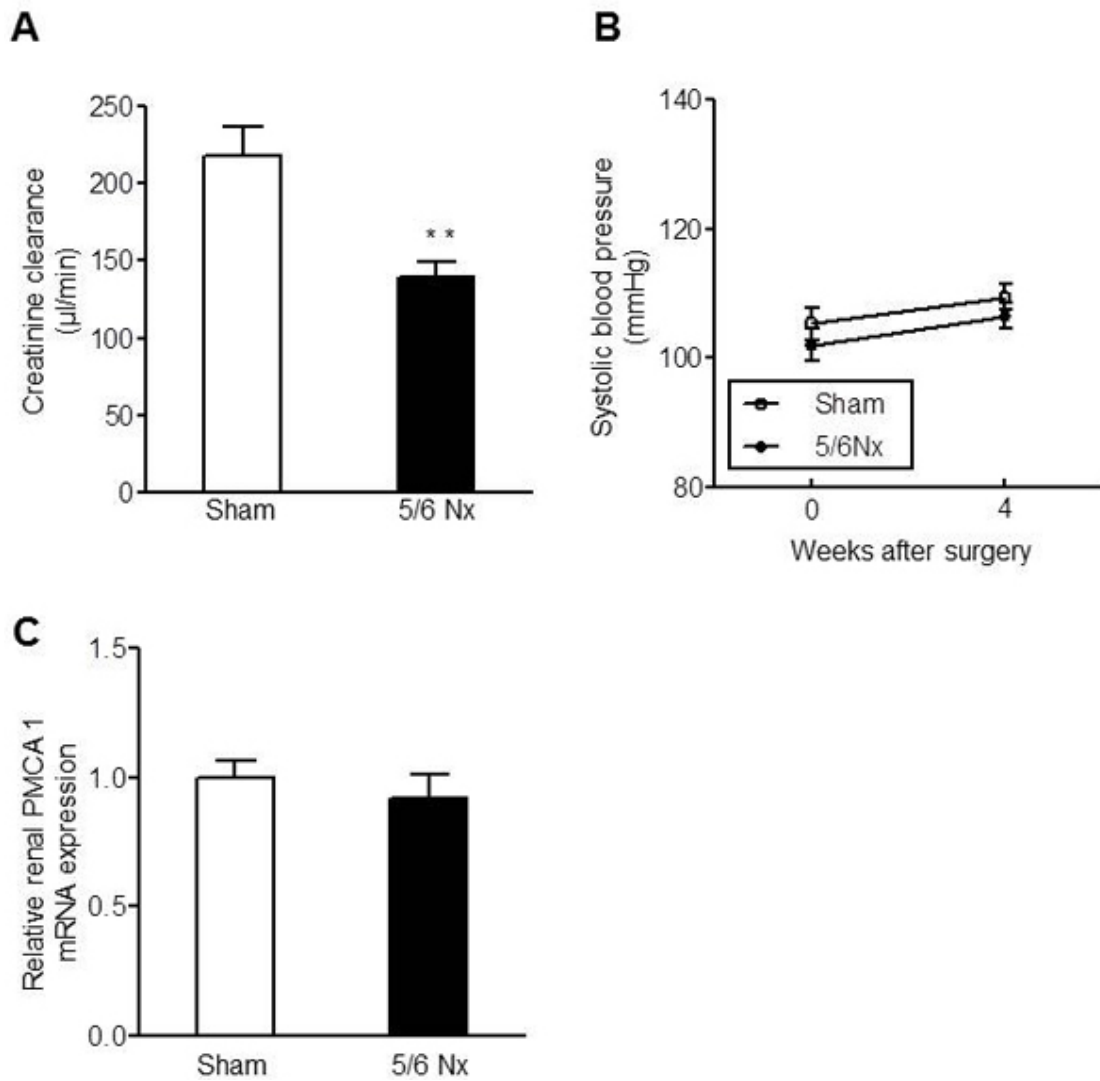


図2. 5/6Nxモデルによる腎機能の低下、血圧、および腎PMCA1発現  
 (A) 5/6Nxにより腎機能クレアチニンクリアランスは低下する (\*\* $P < 0.01$  vs sham手術、unpaired  $t$ -test)。(B) 5/6Nxにより血圧は不変。(C) 5/6Nxにより腎PMCA1発現は不変。

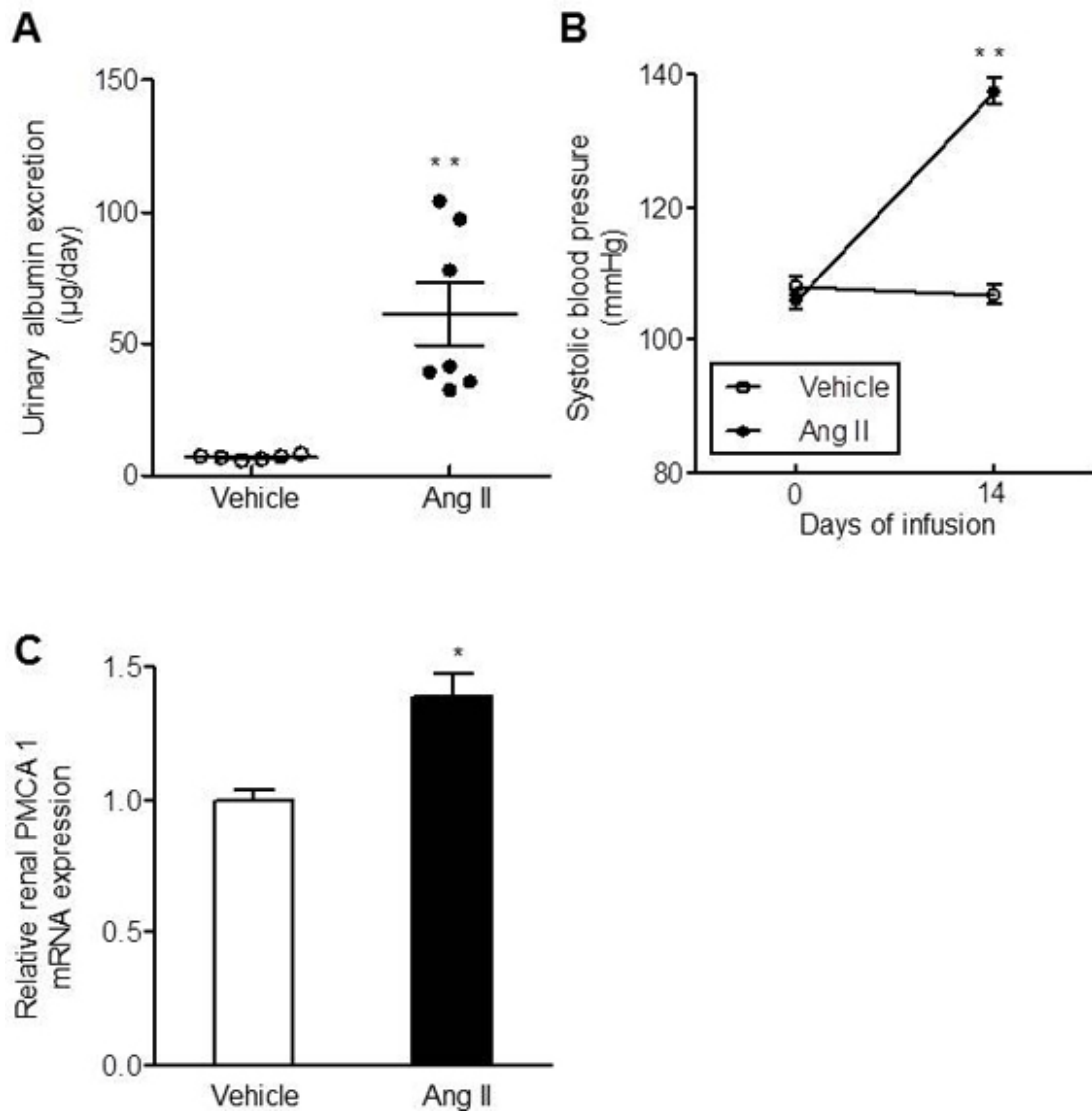


図3. Angiotensin II 投与モデルにおけるアルブミン尿、血圧、および腎 PMCA1 発現  
 (A) Angiotensin II 投与によりアルブミン尿は増加 (\*\* $P < 0.01$  vs vehicle、unpaired  $t$ -test)。 (B) Angiotensin II 投与により血圧は上昇 (\*\* $P < 0.01$  vs vehicle、unpaired  $t$ -test)。 (C) Angiotensin II 投与により腎 PMCA1 発現は増加 (\* $P < 0.05$  vs vehicle、unpaired  $t$ -test)。

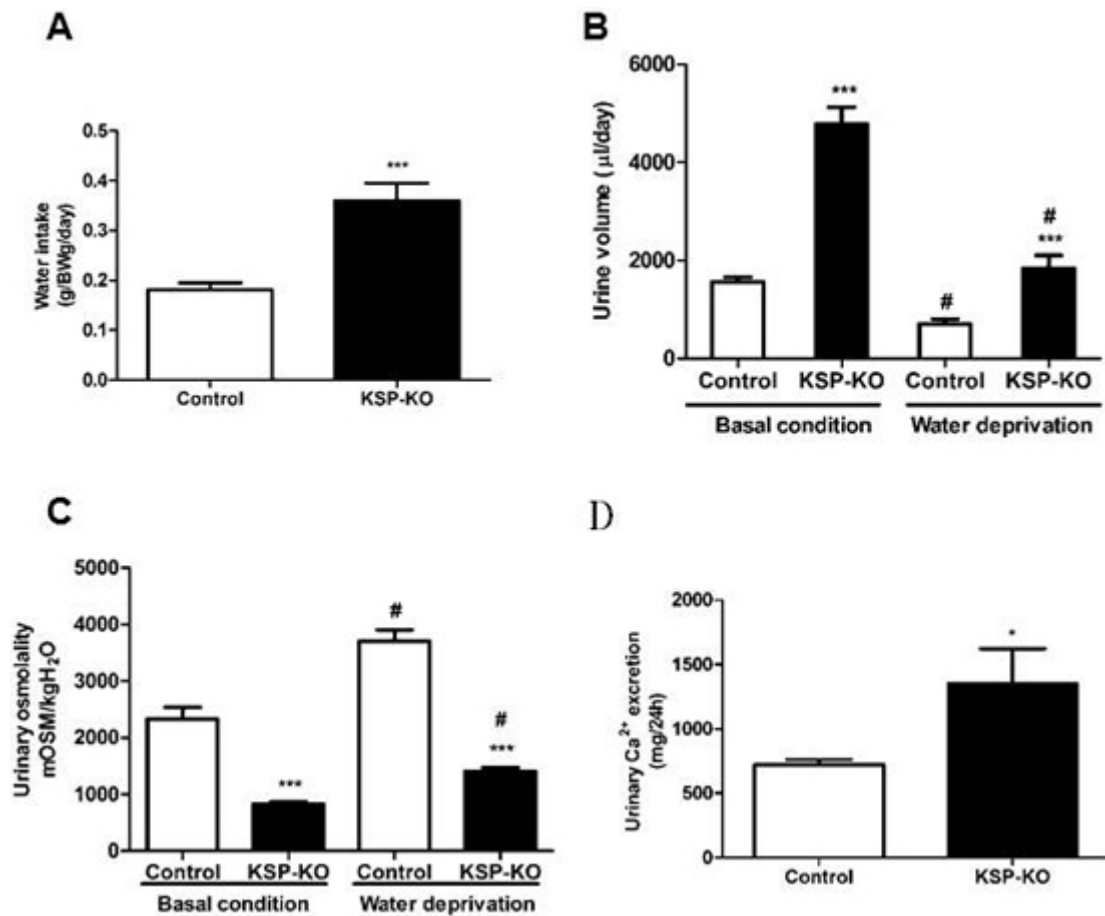


図4. KSP-KO による尿濃縮力障害、高カルシウム尿症

(A) KSP-KO では多飲を認める (\*\* $P < 0.001$  vs Control, unpaired  $t$ -test)。 (B) KSP-KO では多尿を認める (\*\* $P < 0.001$  vs Control, # $P < 0.01$  vs Basal condition, 2-factorial ANOVA) (C) KSP-KO では尿浸透圧の低下を認める (\*\* $P < 0.001$  vs Control, # $P < 0.01$  vs Basal condition, 2-factorial ANOVA)。 (D) KSP-KO では尿中カルシウム濃度が増加 (\* $P < 0.05$  vs Control, unpaired  $t$ -test)。

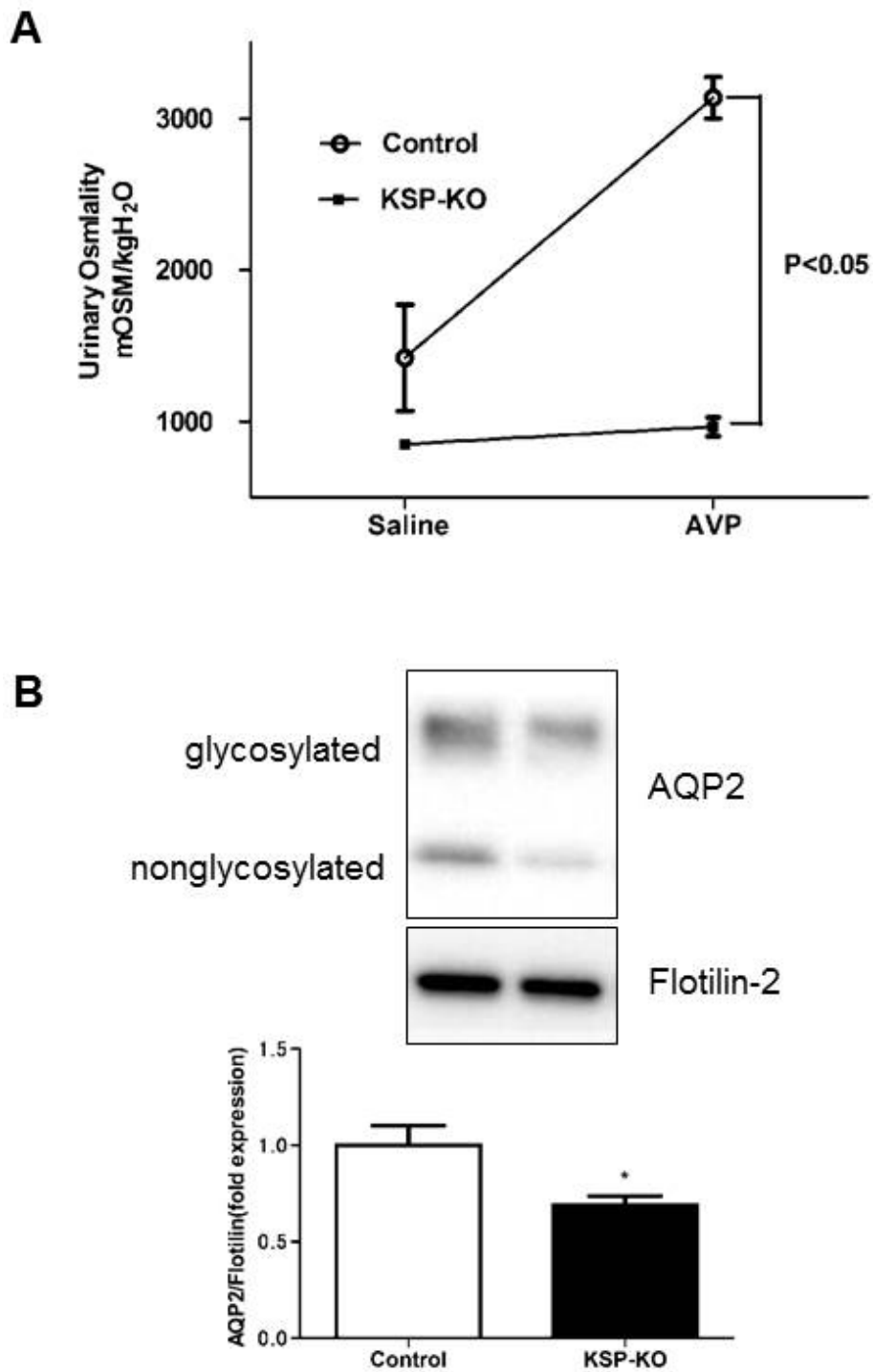


図5. KSP-KO のバソプレッシンへの反応性低下および apical membrane での AQP2 発現低下 (A) KSP-KO ではバソプレッシン (AVP) による尿浸透圧の上昇が抑制される. (B) KSP-KO における apical membrane での AQP2 の発現抑制 (\* $P < 0.05$  vs Control, unpaired  $t$ -test).

## 考 察

本研究において、我々は生体において3つの腎障害モデルにおける、腎 PMCA1 の発現調節を明らかにした。UUO は腎線維化を誘導し、5/6 腎摘は腎機能の低下およびアルブミン尿の増加を惹起し、慢性 AngII 投与はアルブミン尿

の増加をもたらした。一方、腎 PMCA1 発現量は、UUO および 5/6 腎摘によって変化しなかったものの、慢性 AngII 投与によって有意に増加した。血圧に着目すると、UUO と 5/6 腎摘は血圧に影響を与えなかったが、慢性 AngII 投与は血圧上昇をもたらした。すなわち、血圧に影響を及ぼさない腎障害モデルでは腎 PMCA1 発現レベルは変化しないが、血圧上昇を伴う腎障害モデルでは、腎 PMCA1 発現レベルが変化した。この結果は、最も強力な高血圧感受性遺伝子として報告された PMCA1 について、腎での発現レベルの変化が、高血圧関連腎障害の発症・進展に関与している可能性を示唆している。

PMCA1 は細胞内から細胞外にカルシウムを放出するチャネルである。我々は以前に、血管平滑筋特異的 PMCA1 欠損マウスをもちいて、血管平滑筋における PMCA1 の欠損が、血管作動薬による細胞内カルシウム濃度の上昇反応を増強させ、血管収縮力の増強とともに高血圧をもたらすことを明らかにした<sup>2)</sup>。一般に、AngII 刺激は様々な細胞において細胞基質内のカルシウム濃度を上昇させることが知られている。腎尿細管においては、Ang II は細胞膜の AT1 受容体に結合して、細胞内カルシウム濃度を上昇させ、ナトリウム再吸収を促進させる。したがって、本研究でみられた慢性 Ang II 投与時における腎 PMCA1 発現量の増加は、AngII を介した細胞内カルシウム濃度上昇およびナトリウム再吸収に対して拮抗的に働いている可能性がある。今後、腎特異的 PMCA1 発現制御モデルをもちいて、Ang II 刺激による腎障害および血圧上昇に対する PMCA1 の機能的な役割を明らかにしていく予定である。

KSP-KO での検討結果から、遠位尿細管、集合管における PMCA1 は、生体において尿中 Ca 調節・尿濃縮力調節に重要な役割を担うことが明らかにされた。腎集合管においてカルシウム感受受容体は、主細胞および介在細胞に存在する<sup>3)</sup>。カルシウム感受受容体の活性化は、AQP2 発現、バソプレッシンによる AQP2 の apical membrane へのトラフィッキングを抑制し、水の再吸収を抑制し、尿浸透圧を低下させる。AQP2-KO の結果からも、集合管における PMCA1 発現の減少が、尿細管管腔でカルシウム感受受容体を活性化させること、高カルシウム尿症のみならず、多尿・尿濃縮力障害をきたす機序が示唆された。一方、KSP-KO の血清カルシウム濃度は野生型マウスと同等であった。KSP-KO では野生型マウスに比べて、副甲状腺ホルモンの増加および小腸における TRPV6 mRNA 発現増強を認め、腎性カルシウム喪失に対して代償的に働いている可能性が示唆された。

特発性高カルシウム尿症は一般人の 5~10% にみられ、疾患感受性遺伝子として TRPV5/6 や ADCY10 が知られている<sup>4)</sup>。本研究によって、遠位尿細管~集合管での PMCA1 欠損が高カルシウム尿症および尿濃縮力障害をもたらすことが明らかにされ、*ATP2B1* も高カルシウム尿症にかかわる重要な遺伝子であることが示唆された。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、横浜市立大学大学院医学研究科の藤田恵美、角田剛一郎、大澤正人、小林竜、大友優太、平和伸仁、田村功一である。本研究をご支援いただいた上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* 478: 103-9, 2011. doi:10.1038/nature10405. PMID: 21909115
- 2) Kobayashi Y, Hirawa N, Tabara Y, Muraoka H, Fujita M, Miyazaki N, Fujiwara A, Ichikawa Y, Yamamoto Y, Ichihara N, Saka S, Wakui H, Yoshida S, Yatsu K, Toya Y, Yasuda G, Kohara K, Kita Y, Takei K, Goshima Y, Ishikawa Y, Ueshima H, Miki T, Umemura S. Mice lacking hypertension candidate gene *ATP2B1* in vascular smooth muscle cells show significant blood pressure elevation. *Hypertension* 59: 854-60, 2012. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.165068. PMID: 22311909
- 3) Tfelt-Hansen J, Brown EM: The calcium-sensing receptor in normal physiology and pathophysiology: a review. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 42:35-70, 2005. PMID: 15697170
- 4) Monico CG, Milliner DS: Genetic determinants of urolithiasis. *Nature reviews Nephrology* 8: 151-162, 2012. doi:10.1038/nrneph.2011.211. PMID: 22183508