

集合管の生理学と水電解質調節の新知見

Regulation of electrolyte and water handling in the collecting duct : update

柴田 茂

Shigeru SHIBATA

はじめに

腎臓では食塩相当量にして1,000 g以上のナトリウムを含む原尿が日々生成され、その99%以上が尿細管で再吸収されている。尿細管では体液量や摂取量の変化に合わせて厳密に食塩再吸収量の調節が行われており、この微細な調節には、特に遠位尿細管から集合管に至る遠位ネフロン of の働きが寄与している。この部位で食塩の再吸収にかかわる分子の代表としては、遠位尿細管細胞に存在するサイアザイド感受性 Na-Cl cotransporter (NCC) と、集合管主細胞に存在する上皮性 Na⁺ チャンネル (epithelial Na⁺ channel : ENaC)

があげられる¹⁾。集合管主細胞には ENaC のほかにもカリウムチャンネル renal outer medullary K channel (ROMK) や水チャンネル aquaporin 2 (AQP2) が発現しており、この部位はカリウムの排泄や尿濃縮にも重要である。集合管には主細胞に隣接して間在細胞 (介在細胞 : intercalated cell) が存在し、頂端膜にプロトンポンプ (H⁺-ATPase) を発現する α 間在細胞と、Cl⁻/HCO₃⁻ 交換輸送体 pendrin (SLC26A4) を発現する β 間在細胞とに分類される (図 1)。

本稿では、2018 年に発表された腎生理ならびに電解質調節に関する数多くの研究のなかから、腎集合管に関連した最新の知見を紹介したい。

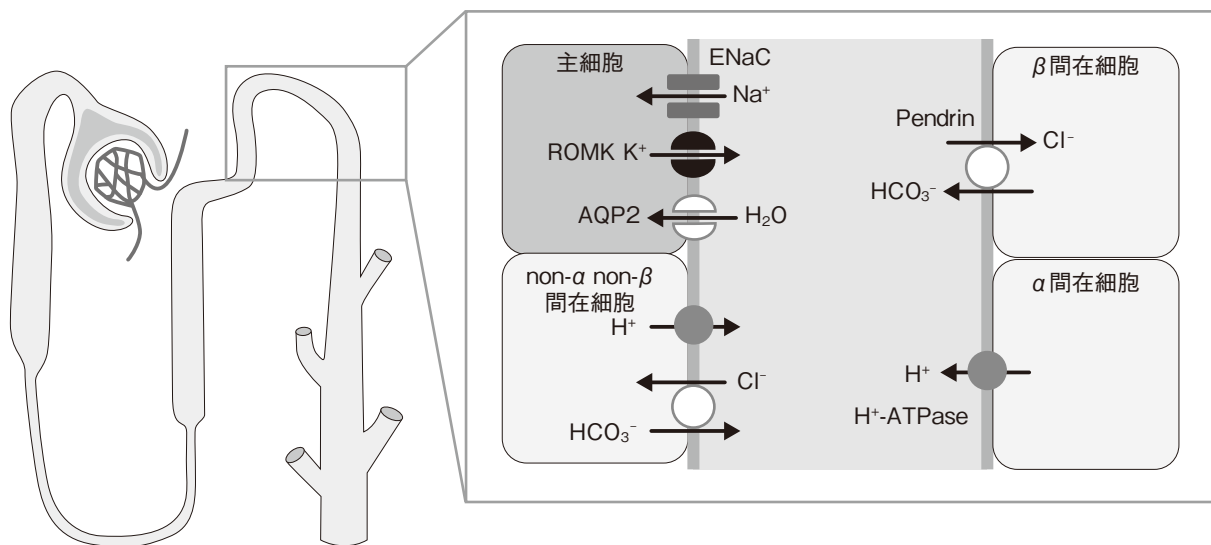


図 1 腎集合管の模式図 (文献 20 より引用, 改変)

集合管構成細胞間の transition

昨今の分子生物学的手法の飛躍的進歩により1細胞由来の transcriptome 解析を行うことが可能となり、細胞の多様性を理解するための手法として用いられている。Park らはマウスの腎臓を用いて1細胞由来 RNA シークエンス (single-cell RNA sequencing : scRNA-seq) を行い、その成果を Science 誌に報告した²⁾。この解析では、合計で 58,000 もの細胞から1細胞 RNA データを取得し、transcriptome profile を用いて細胞を分類したところ、腎臓には合計で21の細胞群が存在することが判明した。同定された細胞の大部分は糸球体上皮細胞、内皮細胞、近位尿細管細胞、マクロファージなど、既知の細胞の特徴と一致した一方で、これまで報告されたことのない特徴を有する細胞群も3種類存在していた。また、さまざまな遺伝性腎関連疾患について

表現型と細胞の種類との関連を解析したところ、遺伝性血圧異常と遠位ネフロンとの関連、尿細管性アシドーシスと間在細胞との関連などが認められ、scRNA-seq が疾患のドライバーとなる細胞群の特定に有用であることが確認された。

Park らは次に、新しく同定された3種類の細胞の一つに着目して詳細な解析を行った。興味深いことに、この細胞は ENaC, AQP2, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β HSD2) などの主細胞マーカーに加えて、pendrin や H⁺-ATPase などの間在細胞マーカー分子を高発現しており、主細胞と間在細胞の両方の性質を有していることが明らかとなった(図 2a)。このことから、集合管構成細胞には可塑性があり、新しく同定された細胞群は間在細胞と主細胞との間を移行する細胞(“transitional cell”)である可能性が提唱された(図 2b)³⁾。

上記を証明するため、Park らは genetic lineage tracing

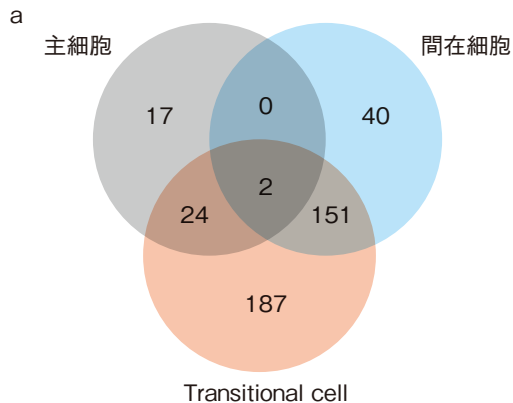
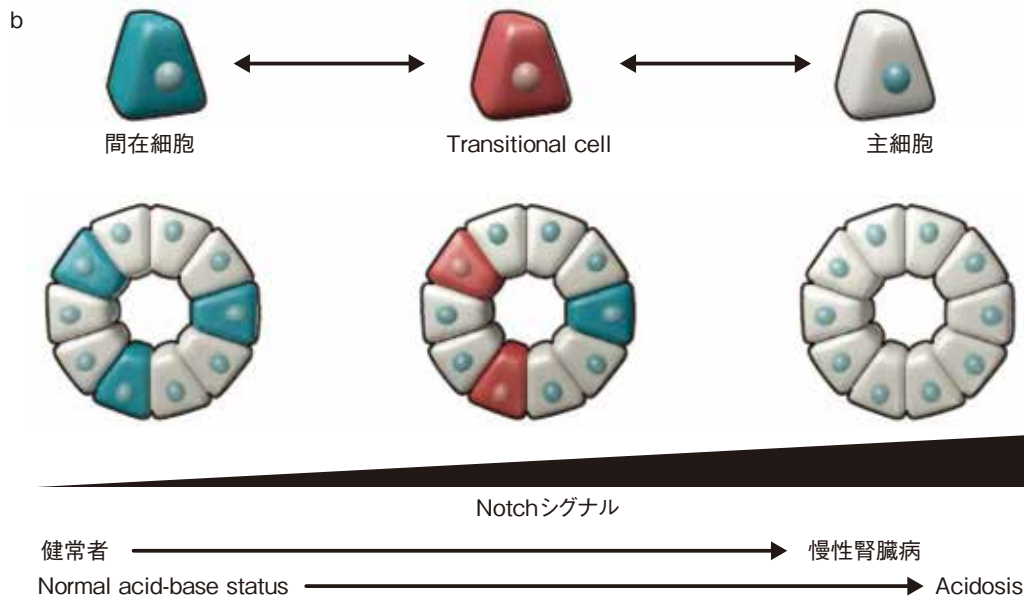


図2 集合管を構成する新しい細胞群

- a: 主細胞, 間在細胞, 新規同定細胞(transitional cell)におけるマーカー分子の発現。Transitional cell は主細胞と間在細胞の両者の特徴を有する。(文献2より引用, 改変)
- b: 主細胞と間在細胞の相互移行のモデル。Notchシグナルの活性化により細胞間移行が惹起される。(文献3より引用, 改変)



(マーカー遺伝子の発現を用いて半永久的に細胞をラベルし, origin を同定する方法)と免疫染色法を用いた検討を行い, マウス組織標本にて transitional cell の特徴を有する細胞が認められることを示した²⁾。また, この transition を誘導する仕組みとして Notch シグナルに着目し, inducible に活性型 Notch1 (intracellular cleaved form of Notch 1 : ICN1) を発現するマウスを用いて解析を行ったところ, このマウスでは通常の主細胞・間在細胞のパターンが障害され, AQP2 を発現する主細胞の数が増加した一方で, ATP6V1B1 を発現する間在細胞の数が減少することを明らかにした。さらに, CKD モデルにおいても同様の変化が認められることを報告し, 主細胞と間在細胞の population の変化に Notch シグナルが関与すること, そして CKD では Notch シグナルの異常により集合管の細胞構成に異常をきたす可能性を示している。

間在細胞に可塑性があることは以前から知られており, 同分野の研究で有名な Al-Awqati らは, 一連の解析にて β 間在細胞が α 間在細胞へと形質転換するメカニズムを明らかにしている^{4~6)}。また, 集合管には頂端膜に H^+ -ATPase と Cl^-/HCO_3^- 輸送体を共発現する細胞 (non- α , non- β 間在細胞) も存在していることから, 間在細胞が柔軟な性質を有することが裏付けられている。Park らの今回の論文により, 間在細胞同士の形質転換のみならず, 間在細胞から主細胞へと移行しうる可能性が示され, 間在細胞の可塑性が再び大きな注目を集めている。今回同定された細胞群が生理的にどのような意味を持つかなど, 今後の更なる研究の進展が期待される。

主細胞における AQP2 の制御機構と先天性腎性尿崩症の治療への応用

主細胞に発現する AQP2 は集合管での水再吸収を司り, その作用はバゾプレシン V_2 受容体 (以下, V_2 受容体) によって誘導される。G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) である V_2 受容体は, Gs 蛋白質の活性化によりアデニル酸シクラーゼ/サイクリック AMP (cAMP)/protein kinase A (PKA) 系を介して AQP2 をリン酸化することで, 細胞膜への trafficking を促す。先天性腎性尿崩症は本邦に数百人程度存在すると推定され, 大部分の患者では V_2 受容体の遺伝子異常に伴って AQP2 の活性化が障害される。

PKA の細胞内分布と活性化にはアンカー蛋白質である A-kinase anchoring proteins (AKAP) が関与しているが, Ando らは AKAP と PKA の制御ユニット (PKA RII) の相互作用を抑制する Ht31⁷⁾ の作用を検討し, このペプチドがマウス

集合管培養細胞にて PKA の活性を上昇させることを見出した⁸⁾。また, Ht31 は AQP2 のリン酸化と細胞膜への移行も促進させ, AQP2 の活性化薬として有用であることが示唆された。

次に, 同様の作用を有する低分子化合物 3-3'-diamino-4,4'-dihydroxydiphenylmethane (FMP-API-1) の AQP2 に対する効果を検討し, この化合物にも Ht31 と同様, 強力な AQP2 活性化作用があることが示された。さらに, FMP-API-1 をリード化合物とする誘導体を作製し, *in vivo* での効果を検証した。興味深いことに, これらの低分子化合物をマウス腎性尿崩症モデルに投与したところ尿濃縮力の向上が認められ, また集合管主細胞において, バゾプレシン非依存的に AQP2 のリン酸化が誘導されることが判明した。本研究から, AKAP の作用を抑制する化合物 (FMP-API-1 およびその誘導体) が V_2 受容体遺伝子異常を有する腎性尿崩症の新規治療薬として有望である可能性が明らかとなった。

間在細胞における pendrin の制御機構

間在細胞に発現する Cl^-/HCO_3^- 交換輸送体 pendrin (SLC26A4) は Pendred 症候群の責任遺伝子で, 腎臓においてはアルカリ排泄を担う分子として同定されていたが⁹⁾, その後 pendrin のノックアウトマウス (*Pds*^{-/-}) を用いた検討で Cl^- イオンの再吸収を介して血圧調節に関与することが明らかとなっている^{10,11)}。ヒトにおいても Pendred 症候群の患者はサイアザイドに対して非常に感受性が高いこと¹²⁾, また SLC26A4 の変異が血圧低下と関連すること¹³⁾などが報告されている。

本稿の最後に, pendrin の制御に関する最近の知見を紹介したい。ユビキチンリガーゼ Nedd4-2 は主細胞において, ENaC の細胞内在化と分解を司っていることが知られているが, 間在細胞における役割については十分に明らかとなっていなかった。Nanami らは間在細胞に選択的な Nedd4-2 のノックアウトマウスを作製し, このモデルで集合管における Cl^-/HCO_3^- 交換輸送活性の増加と, 頂端膜 pendrin 発現の増加が認められることを明らかにした¹⁴⁾。Nedd4-2 がいかなるメカニズムで pendrin を制御するのかについては未解明の部分が残されているが, この研究から, Nedd4-2 が間在細胞においても電解質輸送を制御していることが示された。アルドステロンの受容体である mineralocorticoid receptor (MR) は主細胞に加えて間在細胞にも豊富に存在し¹⁵⁾, pendrin などの膜輸送体の機能を制御しているが^{11,16,17)}, このような MR の作用が Nedd4-2 によって媒介

されている可能性も考えられる。

間在細胞における MR の制御機構については、以前、われわれはリガンド結合領域のリン酸化が重要であることを報告したが¹⁷⁾、リン酸化を担う分子の本体は明らかとなっていなかった。そこでキナーゼ同定のためのスクリーニングアッセイ系を確立し、約 200 の分子を対象に網羅的解析を行ったところ、Unc51-like kinase (ULK) が MR のリン酸化作用を有することが判明した¹⁸⁾。更なる詳細な検討にて、アンジオテンシン II が mammalian target of rapamycin (mTOR) を介して ULK を抑制することで MR の脱リン酸化を引き起こす経路が明らかとなった。実際に、*in vivo* においてアンジオテンシン II による pendrin の誘導は mTOR の阻害薬である AZD8055 により完全に抑制され、mTOR が pendrin の上流シグナルとして作用することが確認されている。なお、血管系においてはアンジオテンシン II が epithelial growth factor receptor (EGFR) の transactivation を介して mTOR を活性化することが知られており¹⁹⁾、間在細胞においても同様の経路が関与する可能性がある。

pendrin の新たな役割としてカリウム調節作用も注目されている。Pendred 症候群は稀な遺伝性疾患であるためにまとまった報告は少ないが、基礎的検討ならびにいくつかの症例報告から、カリウム欠乏に対する腎性の代償機転に pendrin が関与している可能性が示唆されている²⁰⁾。最近の報告においても、高血圧と高カリウム血症を呈する偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAII : Gordon 症候群) のモデルマウスにおいて、pendrin を欠損させることで高カリウム血症が改善することが示されており²¹⁾、pendrin がカリウム代謝にもかかわることが裏付けられている。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 2001 ; 104 : 545-556.
2. Park J, Shrestha R, Qiu C, et al. Single-cell transcriptomics of the mouse kidney reveals potential cellular targets of kidney disease. *Science* 2018 ; 360 : 758-763.
3. Humphreys BD. Mapping kidney cellular complexity. *Science* 2018 ; 360 : 709-710.
4. Schwartz GJ, Barasch J, Al-Awqati Q. Plasticity of functional epithelial polarity. *Nature* 1985 ; 318 : 368-371.
5. Gao X, Eladari D, Leviel F, et al. Deletion of hensen/DMBT1 blocks conversion of beta- to alpha-intercalated cells and induces distal renal tubular acidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 21872-21877.
6. Schwartz GJ, Gao X, Tsuruoka S, et al. SDF1 induction by acidosis from principal cells regulates intercalated cell subtype distribution. *J Clin Invest* 2015 ; 125 : 4365-4374.
7. Vijayaraghavan S, Goueli SA, Davey MP, et al. Protein kinase A-anchoring inhibitor peptides arrest mammalian sperm motility. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 4747-4752.
8. Ando F, Mori S, Yui N, et al. AKAPs-PKA disruptors increase AQP2 activity independently of vasopressin in a model of nephrogenic diabetes insipidus. *Nat Commun* 2018 ; 9 : 1411.
9. Royaux IE, Wall SM, Karniski LP, et al. Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 4221-4226.
10. Soleimani M, Barone S, Xu J, et al. Double knockout of pendrin and Na-Cl cotransporter (NCC) causes severe salt wasting, volume depletion, and renal failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 13368-13373.
11. Hirohama D, Ayuzawa N, Ueda K, et al. Aldosterone is essential for angiotensin II-induced upregulation of pendrin. *J Am Soc Nephrol* 2018 ; 29 : 57-68.
12. Pela I, Bigozzi M, Bianchi B. Profound hypokalemia and hypochloremic metabolic alkalosis during thiazide therapy in a child with Pendred syndrome. *Clin Nephrol* 2008 ; 69 : 450-453.
13. Kim BG, Yoo TH, Yoo JE, et al. Resistance to hypertension and high Cl(-) excretion in humans with SLC26A4 mutations. *Clin Genet* 2017 ; 91 : 448-452.
14. Nanami M, Pham TD, Kim YH, et al. The role of intercalated cell Nedd4-2 in BP regulation, ion transport, and transporter expression. *J Am Soc Nephrol* 2018 ; 29 : 1706-1719.
15. Izumi Y, Hori K, Nakayama Y, et al. Aldosterone requires vasopressin V1a receptors on intercalated cells to mediate acid-base homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 2011 ; 22 : 673-680.
16. Verlander JW, Hassell KA, Royaux IE, et al. Deoxycorticosterone upregulates PDS (Slc26a4) in mouse kidney : role of pendrin in mineralocorticoid-induced hypertension. *Hypertension* 2003 ; 42 : 356-362.
17. Shibata S, Rinehart J, Zhang J, et al. Mineralocorticoid receptor phosphorylation regulates ligand binding and renal response to volume depletion and hyperkalemia. *Cell Metab* 2013 ; 18 : 660-671.
18. Shibata S, Ishizawa K, Wang Q, et al. ULK1 phosphorylates and regulates mineralocorticoid receptor. *Cell Rep* 2018 ; 24 : 569-576.
19. Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, et al. Angiotensin II signal transduction : an update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2018 ; 98 : 1627-1738.
20. Shibata S. 30 YEARS OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR : Mineralocorticoid receptor and NaCl transport mechanisms in the renal distal nephron. *J Endocrinol* 2017 ; 234 : T35-T47.
21. Lopez-Cayuqueo KI, Chavez-Canales M, Pillot A, et al. A mouse model of pseudohypoaldosteronism type II reveals a novel mechanism of renal tubular acidosis. *Kidney Int* 2018 ; 94 : 514-523.