

学位論文題名

ADPTATION OF RABBIT CORTICAL COLLECTING
DUCT TO IN VITRO ACID INCUBATION

(ウサギ皮質集合管の in vitro acid incubation に対する適応)

学位論文内容の要旨

腎臓はアシドーシスに反応して、近位尿細管と集合管での酸の排泄を増加する。集合管は腎臓における酸・塩基平衡の最終調節部位である。皮質集合管 cortical collecting duct (以下CCDと略す)の上皮細胞は間在細胞と主細胞の2種類に大別される。

間在細胞は、 H^+ / HCO_3^- の経上皮輸送に関わる細胞で、ウサギのCCD上皮細胞の35%以下であり、ミトコンドリアと炭酸脱水酵素が豊富で、細胞内pHはアルカリ側にある点で主細胞とは異なる。間在細胞は α と β の2種類に細分類される。 α 間在細胞は H^+ 分泌細胞すなわち HCO_3^- 吸収細胞で、管腔側膜には H^+ -ATPaseを基底側膜には Cl^- / HCO_3^- 交換系を有している。一方、 β 間在細胞は HCO_3^- 分泌細胞で、管腔側膜に Cl^- / HCO_3^- 交換系を、基底側膜には H^+ -ATPaseを有している点で α 間在細胞と区別される。ウサギのCCDにおいては β 間在細胞は α 間在細胞よりも多い。組織化学的には β 間在細胞では管腔側膜にpeanut agglutinin (PNA)が結合し、 α 間在細胞では、管腔側膜のendocytosisをおこし、acidic cytoplasmic vesiclesを形成するのが特徴である。

CCDにおける HCO_3^- 経上皮輸送は動物の酸・塩基平衡の状態で変化しうるということが報告されている。ウサギから単離され、in vitroで微小灌流されたCCDは通常の状態では HCO_3^- を分泌するが、in vivoで酸負荷され代謝性アシドーシスになったウサギから単離されたCCDは HCO_3^- を吸収、すなわち H^+ を分泌する。Schwartzらは、酸負荷されたウサギのCCDでは間在細胞の総数に変化は認められないが、管腔側膜のendocytosisを示す α 間在細胞の比率が増加し、PNAが結合する β 間在細胞の比率が減少することを明らかにした。これらの知見から一部の β 間在細胞の機能的極性が逆転し、 α 間在細胞の表現型を示す可能性が考えられた。

しかし、その後 Satlin と Schwartz は *in vitro* の系で、ウサギから単離された CCD を灌流しながら 3 時間 pH6.9 で培養することで、間在細胞の機能的極性が逆転するかどうかを細胞レベルで調べた。この研究から、CCD が *in vitro* で代謝性アシドーシスの状態にされると、net の HCO_3^- の分泌が減少すること、さらに電顕上で、 β 間在細胞が $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換系を含む管腔側膜の PNA 結合部位の endocytosis を引き起こし、 HCO_3^- を分泌する β 間在細胞の remodeling が起こることが示された。すなわち、 β 間在細胞が α 間在細胞へ単純に転換しないことが示唆された。

そこで我々は、さらに詳細な生理学的検討を行うために、*in vitro* の代謝性アシドーシスのモデルにおいて、つぎの点を明らかにしようと試みた。

- (1) CCD の適応反応が起るのに必要な酸性刺激の時間。
- (2) この適応反応において、DNA 転写、蛋白合成、細胞骨格機能がどのように関与しているのか。
- (3) *in vitro* での酸性刺激が HCO_3^- 分泌と吸収の両方の変化を引き起こすのかどうか。

はじめに、ウサギから単離された CCD を微小灌流しながら pH6.8 (HCO_3^- 6mM) で、それぞれ 1、2、3 時間培養し、基底膜側の Cl^- を除去することで刺激された HCO_3^- 分泌の変化をみると、2 時間以内では有意差が認められず、3 時間ではじめて 54% の有意な減少 (-13.9 ± 3.3 から -6.4 ± 1.4 pmol/min.mm² \rightarrow n=5, $p < 0.05$) が認められた。次に、酸負荷の時間を短縮し、pH6.8 (HCO_3^- 6mM), 1 時間 + pH7.4 (HCO_3^- 25mM), 2 時間で培養された CCD でも pH6.8 で 3 時間培養された場合と同様に 41% の有意な HCO_3^- 分泌の減少 (-17.0 ± 2.4 から -10.0 ± 1.9 pmol/min.mm² \rightarrow n=9, $p < 0.001$) が認められた。

しかし、同様の培養で管腔側の Cl^- を除去することで刺激された HCO_3^- の吸収は変化しなかった ($+5.1 \pm 0.5$ から $+4.4 \pm 0.4$ pmol/min.mm² \rightarrow n=4, $p = \text{NS}$)。

可逆的蛋白合成阻害剤であるアニソマイシン $10 \mu\text{M}$ を全培養時間に付加すると HCO_3^- 分泌の減少はみられなくなる (-12.9 ± 1.2 から -15.1 ± 1.6 pmol/min.mm² \rightarrow n=5, $p = \text{NS}$)。また、同様に pH6.8, 1 時間の培養のみにアニソマイシンを付加しても HCO_3^- 分泌の減少はみられない (-15.5 ± 1.3 から -21.1 ± 3.0 pmol/min.mm² \rightarrow n=6, $p = \text{NS}$)。しかし、アニソマイシンを pH7.4, 2 時間の培養のみに付加した場合は HCO_3^- 分泌の減少 (-16.6 ± 3.0 から -9.9 ± 2.8 pmol/min.mm² \rightarrow n=6, $p < 0.05$) は認められる。

DNA転写阻害剤アクチノマイシンD $4\mu\text{M}$ を pH 6.8 での培養中に付加すると、 HCO_3^- 分泌の変化は認められなかった (-10.4 ± 1.3 から -12.0 ± 1.6 pmol/min.mm \times n=5, p=NS)。

endocytosis に関わるアクチンフィラメントの阻害剤であるサイトカラシンD $0.2\mu\text{M}$ を全培養時間 (-17.7 ± 2.8 から -19.1 ± 2.9 pmol/min.mm \times n=5, p=NS) 及び pH7.4, 2時間の培養のみに付加した場合 (-13.1 ± 4.9 から -14.3 ± 3.2 pmol/min.mm \times n=5, p=NS)には HCO_3^- 分泌の変化は認められなかった。

以上の結果から、

- (1) CCDによる HCO_3^- 分泌は pH6.8の in vitro 培養によって減少する。この適応反応は pH6.8で培養した場合1時間以内に始まるが、有意な変化がみられるまでにさらに2時間以上の時間が必要となる。
- (2) HCO_3^- 分泌の減少には酸性刺激中の de novo蛋白合成と酸性刺激後のマイクロフィラメントが正常に機能することが必要である。
- (3) この代謝性アシドーシスのモデルにおいては HCO_3^- 分泌の減少は HCO_3^- 吸収の増加を伴わないことから、 β 間在細胞から α 間在細胞への機能的極性の逆転は認められないことが、今回の生理学的検討からも明らかにされた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三
副 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 阿 部 和 厚

ADAPTATION OF RABBIT CORTICAL COLLECTING DUCT TO IN VITRO ACID INCUBATION

(ウサギ皮質集合管の *in vitro* acid incubation に対する適応)

腎臓はアシドーシスに反応して、近位尿細管と集合管での酸の排泄を増加する。集合管は腎臓における酸・塩基平衡の最終調節部位である。皮質集合管 cortical collecting duct (以下CCDと略す)の上皮細胞は間在細胞と主細胞の2種類に大別される。間在細胞は α と β の2種類に細分類され、 α 間在細胞は H^+ 分泌細胞すなわち HCO_3^- 吸収細胞であり、また β 間在細胞は HCO_3^- 分泌細胞で、管腔側膜に Cl^-/HCO_3^- 交換系を有している点で α 間在細胞と区別される。このようなCCDにおける HCO_3^- 経上皮輸送は動物の酸・塩基平衡の状態に変化しうるということが報告されている。SatlinとSchwartzは*in vitro*の系で酸負荷された動物の間在細胞の機能的極性が逆転するかどうかを細胞レベルで調べ、 β 間在細胞が α 間在細胞へ単純に転換しないことを示唆した。そこで八十嶋氏はさらに詳細な生理学的検討を行うために、*in vitro*の代謝性アシドーシスのモデルにおいてCCDの適応反応を検討し、次の3つの所見を得た。すなわち(1) CCDによる HCO_3^- 分泌はpH6.8の*in vitro*培養によって減少する。この適応反応はpH6.8で培養した場合1時間以内に始まるが、有意な変化がみられるまでにさらに2時間以上の時間が必要となる。

(2) HCO_3^- 分泌の減少には酸性刺激中のde novo蛋白合成と酸性刺激後のマイクロフィラメントが正常に機能することが必要である。

(3) この代謝性アシドーシスのモデルにおいては HCO_3^- 分泌の減少は HCO_3^- 吸収の増加を伴わないことから、 β 間在細胞から α 間在細胞への機能的極性の逆転は認められない。以上の結果は、CCDの適応反応において、DNA転写、蛋白合成、細胞骨格機能がどのように関与するのか、また酸性刺激が HCO_3^- 分泌と吸収の両方の変化を引き起こすのか否か、といった従来からの課題について新たな知見を提供するものであり、学位に十分値する論文であると判断された。尚、八十嶋氏の報告に関し、副査の小池、阿部さらに生理の本間教授からいくつかの質問が出されたが、同氏はこれらにたいしても、明解な論旨で答えを供し、その点でもこの研究の価値が認定された。