

腎糸球体血行動態調節におけるクロライドチャンネルの役割

学位論文内容の要旨

カルシウム依存性のクロライドチャンネル (CIC) は、血管収縮性リガンドの作用を媒介・調節していると考えられている。腎臓においても、血管やメサングウム細胞を用いた *in vitro* の実験によりアンギオテンシン II (AII) などの収縮作用が Ca^{2+} 依存性 CIC 開口抑制薬や細胞外 Cl^- 濃度にてその作用が調整されることより、平滑筋細胞収縮過程には Cl^- の流入が深く関与していることが推察される。また、腎血行動態は腎固有の血行動態調節機構である尿細管糸球体フィードバック (Tubuloglomerular feed back; TGF) により調節を受けている。TGF の作動は密斑部に到達する Cl^- 濃度とそれにより引き起こされる間質での Cl^- 濃度の変動により調節されることなどから、TGF における CIC の関与が示唆されているが、直接検証した報告は未だない。

本実験は Ca^{2+} 依存性 CIC 阻害薬である R(+)-methyldiazepam indanyloxy acetic acid 94 (IAA-94) を用いて、*in vivo* における同チャンネルの腎血行動態における作用を検証するとともに、*in vivo* 微小穿刺法により TGF の作動における同チャンネルの意義を明らかにする目的で行われた。

雄性 Sprague-Dawley Rat を用い、右大腿動脈に挿入したカテーテルから平均血圧 (MAP) をモニターし、プラスチックカップ内に腎臓を固定した。

まず、IAA-94 による CIC 阻害作用を腎に限局するために、腎間質への直接注入法にて腎血行動態評価を行なった。腎表面から金属針をほぼ皮髄境界部に挿入、固定し薬液の投与経路とした。対照液として 0.9% 生理食塩液の注入を行い、基礎値とした後、AII 単独投与群 ($10^{-7}\text{M} \sim 10^{-5}\text{M}$) と AII と IAA-94 ($300 \mu\text{M}$) の併用投与群の 2 つの群にわけ薬液の投与を行なった。腎血行動態の評価は、薬液注入を受ける腎の血流 (RBF) と灌流圧 (RPP) から求めた腎血管抵抗 (RVR) によった。

その結果、MAP は AII の単独投与群 で対照液と比較して、容量依存的に有意な上昇を認めた。しかし、IAA-94 と AII の併用投与群は、対照液と比較して有意な変化は示さなかった。RBF は、AII の単独投与においては、対照液と比較し有意な低下を示し、腎血管抵抗値 (RVR) は、有意な上昇を示した。しかし、IAA-94 の併用投与では、いずれも有意差は認めなかった。

さらに、腎糸球体での微小血行動態評価のため、マイクロバンクチャー法により糸球体内圧を表す指標とされている近位尿細管閉塞内圧 (P_{u}) を測定した。尿細管の完全閉塞部位より下流を、人工尿細管液 (ATF) で微量注入ポンプを用いてさまざまな流速 (0

～40nl/min) で灌流し、その時の P_{sf} の変化をもって TGF の作動とした。該当するネフロン^①の輸出細動脈終末部 (welling point) を腎表面より穿刺し、そこから薬液を注入することで、より選択的にネフロン近傍の間質へ薬液を注入した。灌流液は、対照として 0.9%NaCl 溶液を、薬液として IAA-94 (300 μ M) または AII (10^{-7} M) と、両薬剤をそれぞれの濃度を含む混合溶液とした。

AII 単独溶液による灌流において、 P_{sf} の変化、すなわち TGF 作動は対照液の灌流時と比較し有意な増強を認めた。しかし、AII と IAA-94 併用溶液によりネフロン周囲を灌流した場合は、TGF 作動は対照溶液と比較して差はなかった。また、IAA-94 単独溶液によりネフロン周囲を灌流した場合も、TGF 作動は対照溶液と比較して差は認められなかった。

以上の結果より、AII による腎血管抵抗の上昇はほぼ完全に IAA-94 の混合投与により抑制された。これは、AII の血管収縮作用が CIC 阻害により減弱したことを示唆する。こうした観察結果は、単離腎による腎血管へのこれまでのいくつかの報告と一致し、in vivo での作用が実証された。

AII による TGF の亢進が IAA-94 の同時投与により減弱したことから、AII による TGF 作動亢進は、少なくともその一部には CIC を介した脱分極過程の修飾が関与する可能性が示唆された。しかし、IAA-94 単独投与では TGF に影響を及ぼさないことより、IAA-94 感受性 CIC 自体は定常での TGF 作動機序自体への関与は小さいものと考えられた。これ等の結果を総合すると、CIC の TGF 作動における役割は、TGF の最終効果部位である輸入細動脈の収縮過程または、糸球体外メサンギウム細胞の情報伝達過程における脱分極を調節することでその作動調節に関与すると考えることができた。

本研究により CIC が腎においても血管作動性物質の収縮に関与することが明らかとなった。こうした機序の異常が腎血管抵抗の上昇をもたらし、高血圧の発症原因となる可能性も示唆されている。このような点も含め、CIC は腎血行動態調節において重要な役割を持つことが本研究により示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 菅 野 盛 夫

副 査 教 授 小 柳 知 彦

学 位 論 文 題 名

腎糸球体血行動態調節におけるクロライドチャンネルの役割

本論文は腎糸球体血行動態において特にアンギオテンシンII (AII) の作用調節におけるクロライドチャンネルの役割について述べたものである。

その背景として、カルシウム依存性のクロライドチャンネル (ClC) は、血管収縮性リガンドの作用を媒介・調節していると考えられている。腎臓においても、血管やメサンギウム細胞を用いたin vitro の実験によりAIIなどの収縮作用が Ca^{2+} 依存性ClC開口抑制薬や細胞外 Cl^- 濃度にてその作用が調整されることより、細胞収縮過程には Cl^- の流入が深く関与していることが推察されている。また、腎血行動態は腎固有の血行動態調節機構である尿細管糸球体フィードバック (Tubuloglomerular feed back; TGF) により調節を受けている。TGFの作動は密斑部に到達する Cl^- 濃度とそれにより引き起こされる間質での Cl^- 濃度の変動により調節されることなどから、TGFにおけるClCの関与が示唆されているが、直接検証した報告は未だない。

本実験は Ca^{2+} 依存性ClC阻害薬であるR(+)-methyldiazepam indanyloxy acetic acid 94 (IAA-94) を用い、in vivoにおけるClCの腎血行動態における作用を検証するとともに、in vivo 微小穿刺法でTGF作動におけるClCの意義を明らかにする目的で行われた。

まず、IAA-94によるClC阻害作用を腎に局限するために、腎間質への直接注入法にて腎血行動態評価を行なった。腎表面から金属針をほぼ皮髄境界部に挿入し薬液の投与経路とした。対照液として生理食塩液の注入を行い、AII単独投与群 ($10^{-7}\text{M} \sim 10^{-5}\text{M}$) とAIIとIAA-94 ($300 \mu\text{M}$) の併用投与群の2つの群にわけ薬液の投与を行なった。腎血行動態の評価は、腎血流 (RBF) と灌流圧 (MAP) から求めた腎血管抵抗 (RVR) によった。

その結果、MAPはAIIの単独投与群で対照液と比較して有意な上昇を認めた。しかし、IAA-94とAIIの併用投与群は、対照液と比較して有意な変化は示さなかった。RBFは、AIIの単独投与においては、対照液と比較し有意な低下を示し、RVRは、有意な上昇を示した。しかし、IAA-94の併用投与では、いずれも有意差は認めなかった。よって、AIIによる腎血管抵抗の上昇はほぼ完全にIAA-94の混合投与により抑制された。

さらに、腎糸球体での微小血行動態評価のため、in vivo ネフロン微小穿刺法により糸球体内圧を表す指標とされている近位尿細管閉塞内圧 (P_{sf}) を測定した。尿細管の完全

閉塞部位より下流を、人工尿細管液で様々な流速（0～40nl/min）で灌流し、その時の P_{sf} の変化をもってTGF作動とした。該当するネフロン（輸出細動脈終末部（welling point）を腎表面より穿刺し、そこから薬液を注入することで、選択的にネフロン近傍の間質へ薬液を注入した。灌流液は、対照として生理食塩溶液を、薬液としてIAA-94（300 μ M）またはAII（ 10^{-7} M）と、両薬剤をそれぞれの濃度を含む混合溶液とした。

AII単独溶液による灌流において、 P_{sf} の変化、すなわちTGF作動は対照液の灌流時と比較し有意な増強を認めた。しかし、AIIとIAA-94併用溶液によりネフロン周囲を灌流した場合は、TGF作動は対照溶液と比較して有意差は認めなかった。また、IAA-94単独溶液により灌流した場合も、TGF作動は対照溶液と比較して有意差は認められなかった。

AIIによるTGFの亢進がIAA-94の同時投与により減弱したことから、AIIによるTGF作動亢進は、少なくともその一部にはCICを介した脱分極過程の修飾が関与する可能性が示唆された。しかし、IAA-94単独投与ではTGFに影響を及ぼさないことより、IAA-94感受性CIC自体は定常でのTGF作動機序自体への関与は小さいものと考えられた。これ等の結果を総合すると、CICのTGF作動における役割は、TGFの最終効果部位である輸入細動脈の収縮過程または、糸球体外メサンギウム細胞の情報伝達過程における脱分極を調節することでその作動調節に関与すると考えることができた。

本研究によりCICが腎においても血管作動性物質の収縮に関与することが明らかとなった。こうした機序の異常が腎血管抵抗の上昇をもたらし、高血圧の発症原因となる可能性も示唆されている。このような点も含め、CICは腎血行動態調節において重要な役割を持つことが本研究により示された。

以上の論文要旨の発表に対して主査及び副査より糸球体硬化に対するCICの役割やCIC阻害薬としてIAA94を選択した理由と濃度設定について、さらに今後の研究の方向性と臨床応用についてなど多岐にわたる質疑や指摘があった。それに対しCIC、腎微小循環に関する各分野での報告ならびに発表以外の実験結果を引用し、未施行の実験および応用例に関して推察される事象を明瞭に回答した。

この論文は北海道医学雑誌で高く評価され、今後腎微小循環、特にTGF機構の解明へ寄与することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。