

様式(10)

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 栄 第 262 号	氏名	藤 井 公
審査委員	主査 竹谷 豊 副査 酒井 徹 副査 中尾 玲子		
題目	Analysis of opossum kidney NaPi-IIc sodium-dependent phosphate transporter to understand Pi handling in human kidney (ヒト腎臓におけるリン代謝機構を理解するためのオポッサム腎NaPi-IIc (Na ⁺ 依存性Piトランスポーター)の解析)		
著者	Toru Fujii · Yuji Shiozaki · Hiroko Segawa · Shiori Nishiguchi · Ai Hanazaki · Miwa Noguchi · Ruri Kirino · Sumire Sasaki · Kazuya Tanifuji · Megumi Koike · Mizuki Yokoyama · Yuki Arima · Ichiro Kaneko · Sawako Tatsumi · Mikiko Ito · Ken-ichi Miyamoto		
要旨	<p>平成 30 年 10 月 Clinical and Experimental Nephrology に受理済</p> <p>腎臓は無機リン(Pi)代謝の重要な臓器であり、Pi再吸収能の調節には近位尿細管に発現するII型Na依存性PiトランスポーターNaPi-IIaとNaPi-IIcが大きく寄与している。これまでにげっ歯類における腎臓でのPi再吸収機序については詳細に解明されているものの、ヒト腎臓におけるPi再吸収機序の詳細は明らかにされていない。高カルシウム尿症を伴う遺伝性低リン血症(HHRH)はNaPi-IIc遺伝子異常に起因する疾患であり、すでに多くの遺伝子変異が報告されているが、その発症機序に関しては不明な点が多い。本研究は、有袋類であるキタオポッサムの腎臓から単離されたopossum kidney (OK)細胞を用いて、近位尿細管におけるNaPi-IIcとNaPi-IIaの相互関係を調べることで、HHRH発症の分子機構について調べた。</p> <p>OK細胞のNaPi-IIc(oNaPi-IIc)のクローニングを行ったところ、oNaPi-IIcは622のアミノ酸で構成されており、ヒトNaPi-IIcと約70%の相同性を示した。クローニングにより得られたアミノ酸情報をもとに認識部位の異なる3種類の抗体を作製し、oNaPi-IIc特異的な検出に用いた。OK細胞にoNaPi-IIc siRNAを処理してoNaPi-IIc発現を減少させると、内因性NaPi-IIa(oNaPi-IIa)の顕著な発現抑制が見られた。さらに、oNaPi-IIc siRNA処理により発現低下が見られた分子を調べると、Na⁺/H⁺ exchanger 3やNa⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1など、Na⁺輸送に関連する分子が確認された。次に、OK細胞におけるDome形成能について、oNaPi-IIc siRNAの効果を調べた。その結果、oNaPi-IIc siRNA処理後によりDome形成数の著しい減少が確認された。一方、oNaPi-IIa siRNA処理ではDome形成数に差は認められなかった。また、ヒトの腎臓を用いてNaPi-IIaおよびNaPi-IIcが共に発現していることを確認した。以上の結果より、OK細胞においてNaPi-IIcの欠損はNaPi-IIaの発現を抑制し、Na⁺依存性のPi輸送を著しく低下させることを明らかにした。有袋類の腎臓におけるNaPi-IIcとNaPi-IIaの相互関係と同じ機序がヒトでも存在すると仮定すれば、NaPi-IIcの機能異常がNaPi-IIaの発現抑制を惹起させ、NaPi-IIaの補完機能が低下している事がHHRHの原因と予想された。</p> <p>本研究は、ヒトにおける腎近位尿細管リン再吸収機構の分子機構を検討したものであり、リンの栄養代謝に重要な知見を与えることより、博士(栄養学)の授与に値すると判定した。</p>		

論文内容要旨

報告番号	甲 栄 第 262 号	氏名	藤井 公
題 目	Analysis of opossum kidney NaPi-IIc sodium-dependent phosphate transporter to understand Pi handling in human kidney (ヒト腎臓におけるリン代謝機構を理解するためのオポッサム腎NaPi-IIc (Na ⁺ 依存性Piトランスポーター)の解析)		
<p>生体内における無機リン(Pi)の恒常性の破綻は慢性腎臓病をはじめ、二次性副甲状腺機能亢進症、骨・血管障害に関与している。Pi代謝は腎臓が重要な役割を担っており、Pi再吸収能の調節には近位尿細管に発現するII型Na⁺依存性PiトランスポーターNaPi-IIaとNaPi-IIcが大きく寄与している。これまでにげっ歯類における腎臓でのPi再吸収機序については詳細に解明されているものの、ヒト腎臓におけるPi再吸収機序の詳細は明らかにされていない。高カルシウム尿症を伴う遺伝性低リン血症(HHRH)はNaPi-IIc遺伝子異常に起因する疾患であり、すでに多くの遺伝子変異が報告されている。一方、NaPi-IIc KOマウスにおいては、顕著なPi代謝異常を呈さない。この理由は、NaPi-IIa機能がPi代謝を補完していると考えられている。一方で、ヒトではNaPi-IIc機能の異常のみでHHRHを発症する。これらの原因は、同じ哺乳類でもマウスとヒトにおけるPi代謝の違いに起因すると予想されている。哺乳類には、マウスやヒトなどが含まれる真獣類に加えて、カンガルーやオポッサムなどが含まれる有袋類が存在する。本研究では、キタオポッサムの腎臓から単離された opossum kidney (OK)細胞を用いて、近位尿細管におけるNaPi-IIcとNaPi-IIaの相互関係を調べることで、HHRH発症の分子機構について調べた。</p> <p>OK細胞のNaPi-IIc(oNaPi-IIc)のクローニングを行ったところ、oNaPi-IIcは622のアミノ酸で構成されており、ヒトNaPi-IIcと約70%の相同性を示した。クローニングにより得られたアミノ酸情報をもとに認識部位の異なる3種類の抗体を作製し、oNaPi-IIc特異的な検出に用いた。OK細胞にoNaPi-IIcを過剰発現させ、その局在について検討を行ったところ、細胞膜(微絨毛)でその局在を確認した。またoNaPi-IIcをアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、その機能を評価したところ、ヒトやマウスと同様にNa⁺依存性のPi輸送特性を示した。次にOK細胞にoNaPi-IIc siRNAを処理してoNaPi-IIc発現を減少させると、内因性NaPi-IIa(oNaPi-IIa)の顕著な発現抑制が見られた。さらに、oNaPi-IIc siRNA処理により発現低下が見られた分子を調べると、Na⁺/H⁺ exchanger 3やNa⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1など、Na⁺輸送に関連する分子が確認された。</p> <p>腎近位尿細管上皮細胞において、Na⁺輸送能の増加は細胞分化に伴うDome形成に関与することが知られている。そこでOK細胞におけるDome形成能について、oNaPi-IIc siRNAの効果を調べた。その結果、oNaPi-IIc siRNA処理後によりDome形成数の著しい減少が確認された。一方、oNaPi-IIa siRNA処理ではDome形成数に差は認められなかった。また、II型Na⁺依存性Piトランスポーター特異的な阻害剤であるPFA(phosphonoformic acid)を添加した群ではDome形成数に影響を及ぼさなかった。また、ヒトの腎臓を用いてNaPi-IIaおよびNaPi-IIcが共に発現していることを確認した。</p> <p>以上、OK細胞においてNaPi-IIcの欠損はNaPi-IIaの発現を抑制し、Na⁺依存性のPi輸送を著しく低下させることを明らかにした。有袋類の腎臓におけるNaPi-IIcとNaPi-IIaの相互関係と同じ機序がヒトでも存在すると仮定すれば、NaPi-IIcの機能異常がNaPi-IIaの発現抑制を惹起させ、NaPi-IIaの補完機能が低下している事がHHRHの原因と予想された。よって、OK細胞でのNaPi-IIcのさらなる解析がヒト腎におけるPi代謝機構を理解するための有用な手段となりうる可能性があることが本研究によって示された。</p>			