

9535 新生児ラット腎尿細管のNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>チャネルの発現とその誘導

助成研究者：河原 克雅（北里大学 医学部）

共同研究者：福田康一郎（千葉大学）

## 1. 研究目的

新生児期の腎臓は形態的・機能的に未発達である。しかし、自分自身の生命を維持するために、腎臓は、生後直ちに、体液の量・電解質組成・浸透圧・pH等の物理化学的組成を正常範囲にコントロールしなければならない。さらに、体の成長に合わせ尿細管のイオン輸送能を発達させなければ、個体の成長を維持し得なくなり、ひいては生命の存在も危うくなる。

我々は、新生児ラット腎尿濃縮能の発達および尿細管におけるKチャネルの発現・分化のメカニズムを生理学的、免疫組織学的手法を使って解明を試みた。腎近位尿細管は、日齢に従った形態学的成熟を示し、Kチャネルが分化型近位尿細管においてのみ発現した。

## 2. 研究結果

2.1 母乳飼育ラットの尿濃縮力の発達：同腹ラット新生児の尿濃縮力の発達を調べた。母親ラットから離れた直後の尿浸透圧は、4, 7, 10日齢共に、約280 mOsm/kgH<sub>2</sub>Oであった。最大尿浸透圧は、順に、700, 850, 850 mOsm/kgH<sub>2</sub>Oであった。尿浸透圧中に占める尿素の割合（最大値）は、順に、50%、65%、70%であった。

2.2.1 母乳飼育ラットの尿中へのカリウム分泌能の発達：最大時間K分泌能は、4.5 μEq/hr(7日齢), 7.5 μEq/hr(10日齢), 18 μEq/hr(14日齢)であった。高K負荷ラットの6時間K排泄量（対負荷量）は、順に、75%、74%、92%であった。低K負荷群の場合、6時間K排泄量（対負荷量）は、順に、81%、145%、203%であった。腎K排出量は、K負荷に対して直線的に増加し飽和しなかった。「K負荷-K排出関係」は、7、10日齢で同じ傾きを示し、14日齢で、明らかに増加した。

2.2.2 免疫組織化学：Kチャネル(uK<sub>ATP</sub>-1)の抗体を使用し、新生児ラット腎におけるKチャネルの発現を調べた。H-E染色で同定された未分化型近位尿細管には、uK<sub>ATP</sub>-1の発現はなく、分化型近位尿細管にのみ発現していた。集合管全域（CCD, OMCD, IMCD）において、uK<sub>ATP</sub>-1は発現していたが、糸球体や細いヘンレのループ部には、発現を示す蛍光は観察されなかった。

2.2.3 ウェスタンブロット法：新生児ラット腎（皮質と髄質外層部）におけるuK<sub>ATP</sub>-1の蛋白の発現量を調べた。実験全期間中（7-15日齢）に発現を認めた。uK<sub>ATP</sub>-1の蛋白の発現量は、新生児期の方が8週齢ラットの発現量より多かった。本研究結果を総合すると、新生児期の腎は、浸透圧・電解質バランスをコントロールする能力が備わっていること、近位尿細管の形態学的分化と、機能分化（uK<sub>ATP</sub>-1の発現）が、対応していることを明らかにした。



## 9535 新生児ラット腎尿細管の $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ チャネルの発現とその誘導

助成研究者：河原 克雅 (北里大学 医学部)

共同研究者：福田康一郎 (千葉大学)

### 1. 研究目的

新生児期の腎臓は形態的・機能的に未発達である。しかし、自分自身の生命を維持するために、腎臓は、生後直ちに、体液の量・電解質組成・浸透圧・pH等の物理化学的組成を正常範囲にコントロールしなければならない。さらに、体の成長に合わせ尿細管のイオン輸送能を発達させなければ、個体の成長を維持し得なくなり、ひいては生命の存在も危うくなる。新生児ラットの血中アルドステロン値が、成熟ラットより高く、3週齢を境に低下し大人の正常値に近づくことが知られている。このことは、アルドステロン等の体液因子が、新生児期腎尿細管の未熟なイオン輸送能を活性化し、尿細管イオンチャネルを初めとして、様々な輸送体の発現・分化を促すためと推測される。

我々は、新生児ラット腎尿濃縮能の発達および尿細管におけるKチャネルの発現・分化のメカニズムを生理学的、免疫組織学的手法を使って解明を試みた。腎近位尿細管は、日齢に従った形態学的成熟を示し、これに応じるようにKチャネルが分化型近位尿細管においてのみ発現した。

### 2. 研究方法

2.1 新生児ラット尿の採取：0-14日齢ラット(Wistar)の下腹部(陰部)を綿棒で刺激し排尿させ、非侵襲的に外尿道口からピペットで吸引した。

2.2 尿組成の分析：尿量、電解質、浸透圧、尿素濃度を測定した。尿量は、採尿した尿の比重を1と仮定し、尿重量を容積に換算した(350 mM NaCl溶液の比重は、約1.01であった)。尿中電解質( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ )組成は、電極法(富士ドライケム800V、富士メディカルシステム)で測定した。尿浸透圧は、凝固点降下法により測定した(オズモメーターOR型、フィスケ)。尿素は、ウレアーゼ・インドフェノール法(尿素窒素B-テストワコー、和光純薬)で発色させ、分光光度計(Ubest-35型、日本分光)にて測定した。

2.3 腎組織標本：4、7、10、14日齢ラット腎をホルマリン固定し、5  $\mu\text{m}$  切片のスライスを作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行なった。

2.4 免疫組織化学： $\beta$ 細胞由来Kチャネル( $\text{uK}_{\text{ATP}}-1$ )の抗体を使用し、新生児ラット腎におけるKチャネルの発現・尿細管内局在性を調べた。

### 3. 研究結果

3.1 母乳飼育ラットの尿濃縮力の発達： 同じ母親ラットから生まれた8匹の新生児ラットの尿濃縮力の発達を調べた。4、7、10日齢の昼(12時)に母親から離し、無風、恒温(30-31℃)環境に放置し、4、7、10、12時間後に採尿した。尿量、電解質(Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>)組成、浸透圧、尿素濃度を測定した。

3.1.1 脱水期間中(10-12時間)の体重減少： 体重は、各日齢ともゆるやかに減少した。10時間後の体重減少は、順に、4.2%、3.6%、4.8%(4、7、10日齢)であった。脱水実験終了後、直ちに母親に戻した。実験期間(4-14日齢)中の体重増加は直線的で、脱水実験を行わなかった同腹のラットの発育と等しかった。平均体重は、10、14、20、28g(4、7、10、14日齢)であった。

3.1.2 尿浸透圧： 母親ラットから離れた直後の尿浸透圧は、4、7、10日齢共に、約280 mOsm/kgH<sub>2</sub>Oであった。単位時間尿量は、実験期間中あまり変動しなかった(図1)。尿浸透圧は、脱水実験の開始から7時間値まで増加したが、以後増加しなかった。最大尿浸透圧は、順に、700、850、850 mOsm/kgH<sub>2</sub>Oであった(図2)。

3.1.3 最大尿濃縮力と尿素濃度： 尿浸透圧中に占める尿素の割合(最大値)は、順に、50%、65%、70%であった(4、7、10日齢)。4、7日齢ラットの最終尿(10、12時間値)の尿素濃度は、やや低下した(40%、55%)。

3.2 母乳飼育ラットの尿中へのカリウム分泌能の発達： 母乳飼育新生児ラット(7、10、14日齢)を2群に分け、KCl添加糖溶液(5%グルコース+ 0.1M KCl or 0.5M KCl溶液)を経口投与した。2-3時間毎に排尿させ、尿組成の経時変化を分析した。5%グルコースは、KClの苦みを消すためと、KCl溶液の浸透圧調整のために使用した。

3.2.1 低K負荷群、高K負荷群共に、負荷後2-3時間尿において、時間K排泄は最大値を示した。このことは、経口投与されたKは速やかに腸管から吸収され、(おそらく血中K濃度をやや上昇させ)、腎から尿中に分泌されることを示唆する。最大時間分泌能は、4.5 μEq/hr(7日齢)、7.5 μEq/hr(10日齢)、18 μEq/hr(14日齢)であった(図3)。高K負荷群の場合、最初の6時間でのK排泄量(対負荷量)は、順に、75%、74%、92%であった。低K負荷群の場合、最初の6時間でのK排泄量(対負荷量)は、順に、81%、145%、203%であった。いずれの場合も、日齢の進行に伴い腎のK排泄能の発達を示した。低K負荷群における、負荷以上のK排泄(Kの過剰排出機構)の解明には、さらなる検討を要する。

3.2.2 K負荷-K排出関係： 負荷K量を体重で補正し、腎からの総K排出量との関

係を各日齢毎に調べた。K排出量は、K負荷に対して直線的に増加し、飽和しなかった。「K負荷-K排出関係」は、7、10日齢で同じ傾きを示し、14日齢で、明らかに増加した。このことは、Kイオンの時間分泌能が、14日齢に著しく増加したことに一致する(図3)。

3.3 腎組織標本：7、10、15日齢ラット腎をホルマリン固定し、5  $\mu\text{m}$  厚さのスライス標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行なった。7、10日齢ラット腎皮質は、未分化な近位尿細管（尿細管細胞質の未発達）と分化した近位尿細管が混在していた。未分化型近位尿細管は、皮質浅層部に高頻度に存在した。15日齢ラット腎近位尿細管は、皮質部全域において分化型に発達していた。

3.4 免疫組織化学： $\beta$ 細胞で最初にクローニングされ、全身に発現しているKチャンネル( $\text{uK}_{\text{ATP}}-1$ )の抗体を使用し、新生児ラット腎におけるKチャンネルの発現を調べた。腎スライスを、2%ホルマリンで短時間(60分)固定し、腎尿細管における $\text{uK}_{\text{ATP}}-1$ の発現および分布を調べた。H-E染色で同定された未分化型近位尿細管には、 $\text{uK}_{\text{ATP}}-1$ の発現はなく、分化型近位尿細管にのみ発現していた。集合管全域(CCD, OMCD, IMCD)において、 $\text{uK}_{\text{ATP}}-1$ は発現していたが、糸球体や細いヘンレのループ部には、発現を示す蛍光は観察されなかった。

3.5 ウェスタンブロット法：新生児ラット腎（皮質と髓質外層部）における $\text{uK}_{\text{ATP}}-1$ の蛋白の発現量を調べた。実験全期間中(7-15日齢)に発現を認めた。 $\text{uK}_{\text{ATP}}-1$ の蛋白の発現量は、新生児期の方が8週齢ラットの発現量より多かった。

#### 4. 考察

4.1 母乳飼育新生児ラットの平均体重は、実験期間中、直線的に増加した(10、14、20 g (4、7、10日齢))。最大尿濃縮能は、順に、700、850、850  $\text{mOsm/kgH}_2\text{O}$ に増加した。この数値は、8時間脱水による尿濃縮力を調べた、Edwards et al. (1982)の結果に合致する。浸透圧に占める尿素の割合は、50-70%と高く(4-10日齢)、Edwards et al. (1982)の結果(25-50%、4-21日齢)を上回った。尿濃縮中の血漿浸透圧を290 $\text{mOsm/kgH}_2\text{O}$ と仮定すると、自由水再吸収の最大値は、順に、40、35、56  $\mu\text{l/min/kg}$ であった(図4)。10日齢ラット(平均体重28 g)の場合、単位時間当たりの自由水再吸収は、1.18  $\mu\text{l/min}$ で、12時間の総計は、850  $\mu\text{l}$ となる。この数値は、この間の体重減少-総尿量(約900mg)を説明することができるので、脱水刺激12時間後においても、血漿浸透圧増加は、ほとんどないと思われる。腎集合管腔膜における水透過性を調節している抗利尿ホルモンの $V_2$ 受容体は、生後2日目において腎集合管に発現していることを蛍光ラベルした $V_2$ 受容体抗体(Nonoguchi et al., 1996)で証明した。

自由水再吸収 ( $T^c_{H_2O}$ ) ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )の算出には、下記の計算式を使用した。

$$T^c_{H_2O} = V (U_{\text{osm}} - P_{\text{osm}}) / P_{\text{osm}}$$

脱水刺激後の尿濃縮反応(高張尿生成)は、予想以上に早く、4時間後に有意に増加した。このことは、血漿浸透圧をモニターしている浸透圧受容体と抗利尿ホルモン(ADH)の放出および、腎集合管におけるADH受容体とその細胞内情報伝達系と管腔膜水チャネルが、既に完成していることを示唆する。最大尿濃縮能が、成熟ラットに比べ低い数値を示したのは、腎髓質構造の未発達(Henle's loopの長さが短い)によると思われる。

4.2 新生児(初期)ラットの腎近位尿細管(H-E染色標本)の形態学的発達を光学顕微鏡を使用して、Kチャネル( $uK_{\text{ATP}}-1$ )蛋白の発現量および局在性をウエスタンブロット法と免疫組織化学的方法で調べた。稲垣ら(1995)によりクローニングされた $uK_{\text{ATP}}-1$ は、膵 $\beta$ 細胞等において、スルフォニルウレア受容体と協力してKイオンを輸送し、膜電位を保持すると考えられている。腎尿細管のようなNa輸送上皮組織においては、 $uK_{\text{ATP}}-1$ は、側底膜Na-KATPaseと連動し、細胞内に汲入れられたKイオンの排出路としての役割を担うことが期待される。新生児ラット腎の尿細管内 $uK_{\text{ATP}}-1$ の発現が、近位尿細管、皮質、髓質外層および髓質内層集合管に見られ、糸球体、細いヘンレのループでみられなかったことは、成熟ラット腎尿細管内局在性と一致し(Anzai, N. et al., 1996)、 $uK_{\text{ATP}}-1$ とNa輸送機能との関連を強く示唆する。さらに、未熟型近位尿細管(4-7日齢ラット腎皮質浅層部)において、 $uK_{\text{ATP}}-1$ の発現はなかった。このことは、糸球体濾液の再吸収能(電解質輸送機能)の発達に、 $uK_{\text{ATP}}-1$ の発現が必要であることを示唆する。さらに、腎皮質、髓質外層部の $uK_{\text{ATP}}-1$ の発現レベルは、新生児ラットの方が8週齢ラットより高かった。このことは、 $uK_{\text{ATP}}-1$ がすべての発達期において必要であるということと、新生児期にその必要性が高いことを示唆する。腎皮質集合管のK輸送は、4週齢から能動的に分泌することが知られている(Satlin, 1994)。

## 5. 今後の課題

本研究では、新生児ラット腎における尿濃縮力の発達と近位尿細管における $uK_{\text{ATP}}-1$ の発現を、生理学的、形態学的、免疫組織学的、ウエスタンブロット法で調べた。今後の課題として、以下の4項目が考えられる。

- 1)  $uK_{\text{ATP}}-1$ の腎尿細管内の局在性(管腔膜、側底膜)を明らかにすること。
- 2) Na輸送機能を調節するホルモンの $uK_{\text{ATP}}-1$ に対する発現調節を調べる。
- 3)  $uK_{\text{ATP}}-1$ の機能発現(Kチャネルとしての機能)に必要な細胞内・膜内因子を解明する。
- 4)  $uK_{\text{ATP}}-1$ の孔部、イオン選択性、活性を制御する分子構造を明らかにする。

## 6. 文献

- 1) Edwards, B.R., Mendel, D.B., LaRochelle, F.T., Jr., Stern, P., and Valtin, H. (1982): Postnatal development of urinary concentrating ability in rats: Changes in renal anatomy and neurohypophysial hormone. In: *The kidney during Development. Morphology and Function*, edited by A. Spitzer, pp233-239, Masson, New York.
- 2) Nonoguchi, H., Owada, A., Kobayashi, N., Takayama, M., Terada, Y., Koike, J., Ujiie K., Marumo, F., Sakai, T., and Tomita, K. (1996) Immunohistochemical localization of V2 vasopressin receptor along the nephron and functional role of luminal V2 receptor in terminal inner medullary collecting ducts. *J. Clin. Invest.* 96: 1768-1778.
- 3) Inagaki, N., Tsuura, Y., Namba, N., Masuda, K., Gono, T., Horie, M., Seino, Y., Mizuta, M., and Seino, S. (1995) Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J. Biol. Chem.* 270: 5691-94.
- 4) Anzai, N., Kawahara, K., Kobayashi, N., Sakai, T., Komatsu, Y., Inagaki, N., Seino, S. (1996) Localization of the inward rectifier subunit  $uK_{ATP-1}$  (Kir6.1) in adult rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.*
- 5) Satlin, L.M. (1994) Postnatal maturation of potassium transport in rabbit cortical collecting duct. *Am. J. Physiol.* 266: F57-F65.

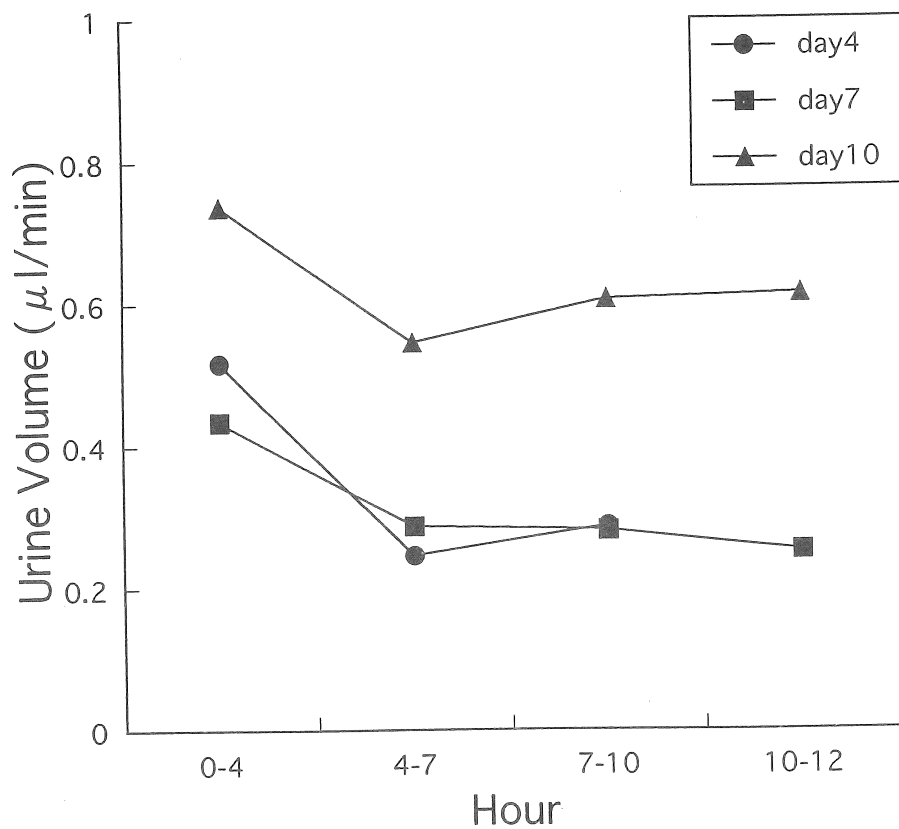


Figure 1 Time dependent changes of urine volume during dehydration. Urine flow rate was almost constant at each group.



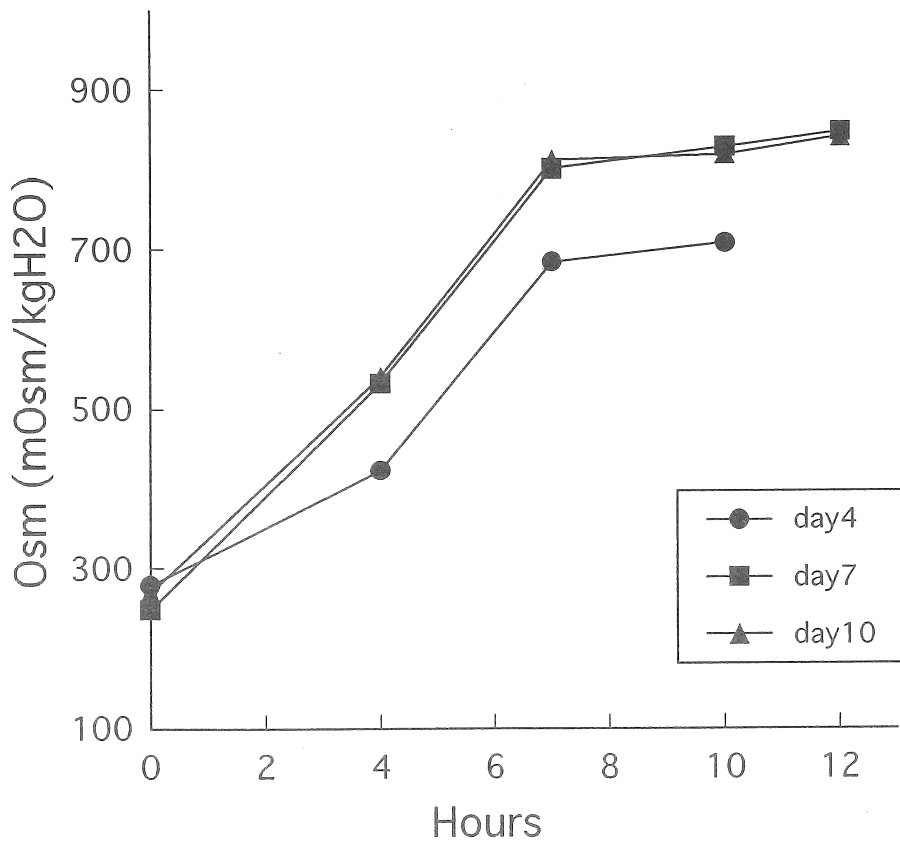


Figure 2 Time dependent changes of urinary osmolality during dehydration. The maximum osmolality was 700, 850, and 850 mOsm/kgH<sub>2</sub>O in 4, 7, and 10 days neonatal rats, respectively.

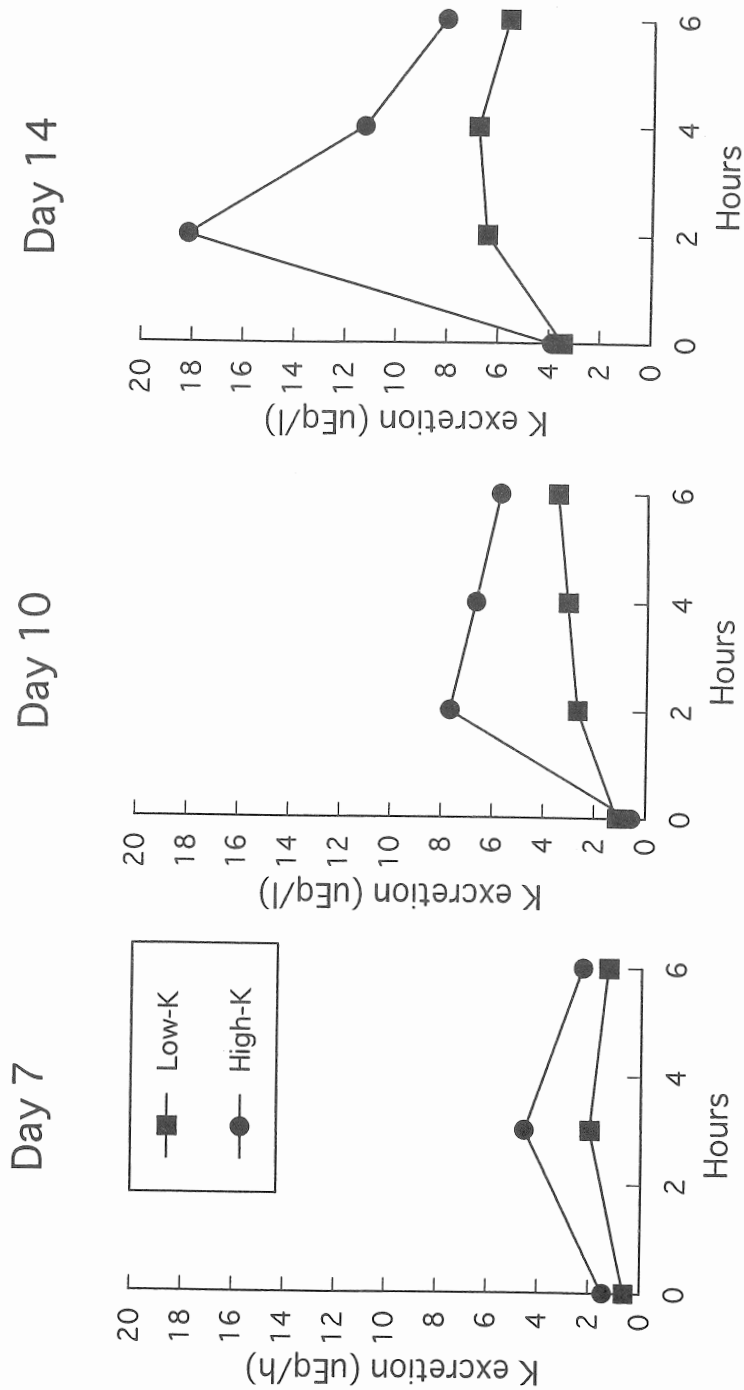


Figure 3 Developmental changes of potassium (K) excretion rate in K loaded rats. Low-K and High-K indicate that 0.5 and 2.5  $\mu$ Eq/B.W. potassium-loading for each rat, respectively.

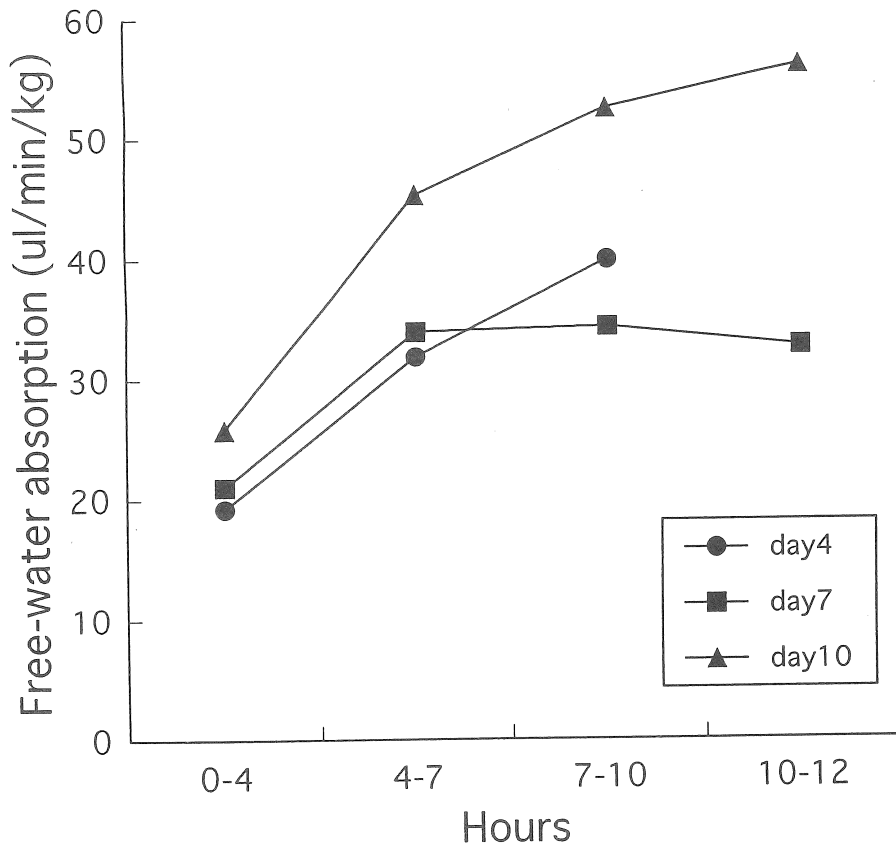


Figure 4 Changes of free-water reabsorption (FW) during dehydration. The maximum of FW was significantly larger in 10 day rats than in 4 and 7 day rats.

## Expression of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels in neonatal rat kidney tubules.

Katsumasa Kawahara and Yasuichiro Fukuda

Departments of Physiology, Kitasato University School of Medicine  
and  
Chiba University School of Medicine

### Summary

In neonatal Wistar rats, development of the formation of concentrated urine and the excretion of potassium (K<sup>+</sup>) in the kidney was investigated. Urine was collected every 2-3 hours from the external urethral orifice with micro pipette. Neonates from the same mother were kept without administration one by one in an environment of constant humidity and temperature (30-31 °C). In rats of 4-10 days of age, 10-12 h dehydration results in decrease of urine volume per hour (U.V.) and increase in urinary osmolality. U.V. decreased during the first 4 hours and saturated. On the other hand, urinary osmolality increased during the first 7 hours and saturated. The maximum osmolality was 700, 850, and 850 mOsm/kgH<sub>2</sub>O on 4, 7, and 10 days of age, respectively. In dehydrated rats contribution of urea to the formation of concentrated urine increased during the development: the maximum of urea contribution was 50%, 65%, and 70% on 4, 7, and 10 days of age, respectively. The maximum of free-water absorption was, in sequence, 40, 35, 56 μl/min/kg. These values are in agreement with the loss of body weight - the total U.V. which may equal to the loss of pure water during dehydration. We found that the kidney could control the body fluid osmolality even in the early neonates. In the second series of experiments, the eight neonates were divided into the two groups: low and high potassium administration. In both groups, K<sup>+</sup> excretion showed the maximum at 3 hours after the K<sup>+</sup> intake. The ratio of the total K<sup>+</sup> excretion of the initial 6 hours and the K<sup>+</sup> administration increased during development: 75%, 74%, and 92% for the high K<sup>+</sup>-intake group and 81%, 145%, and 203% for the low K<sup>+</sup>-intake group on 7, 10, and 14 days of age, respectively. In summary, the kidney controls osmolality and K<sup>+</sup> concentration of the body fluid even in the early neonates.