

9634 腎臓におけるNa⁺/ミオイノシトール輸送体の発現調節とその意義

助成研究者：山内 淳(大阪大学 医学部)
共同研究者：今井 圓裕(大阪大学 医学部)
守山 敏樹(大阪大学 健康体育部)

ミオイノシトールは腎髄質細胞で同定された主要なオスモライトの一つで、細胞外の高浸透圧刺激に対してナトリウム依存性の輸送体(sodium-dependent myo-inositol transporter: SMIT)により細胞内に蓄積し、細胞内外の浸透圧バランスを保つ働きがある。我々はラット腎において、SMIT mRNAがヘンレの太い上行脚と緻密斑にきわめて強く発現していること、さらにNaCl負荷で著明に誘導されフロセミドにて抑制されることを明らかにした。すなわち、この部位におけるSMITの発現がNaCl再吸収に依存することを示唆すると考えられる。SMITの発現調節機構をさらに明らかにするため、ヘンレ係蹄へのNa負荷量の増加を目的として炭酸脱水素酵素阻害薬を投与し、その影響を検討した。炭酸脱水素酵素阻害薬投与により、髄質外層のSMIT mRNAのシグナルは明らかな増強を認め、逆に髄質内層のシグナルは低下した。すなわち、髄質外層部のヘンレ上行脚においてNaCl流入量に依存してSMITの発現調節が行われていると考えられる。さらに、ミオイノシトールおよびその輸送体の重要性を明らかにするため、ミオイノシトール輸送の阻害による影響を検討した。まず、ミオイノシトールのアナログであるmethylene myo-inositol (MMI)のミオイノシトール輸送に対する影響を培養細胞系で検討した。これにより、MMIがミオイノシトール輸送の競合的阻害薬であること、MMI自体は細胞内にほとんど取り込まれないこと、MMIにより高浸透圧環境下における細胞の発育・成長が障害されることを明らかにした。次に、ラットにMMIを投与しその影響を検討した。MMI 80 mg/kg投与により血清クレアチニン、尿素窒素は急速に上昇し、48時間以内にすべてのラットが死亡した。剖検により髄質外層を中心とする尿細管細胞の壊死を認めた。障害された尿細管細胞は、Tamm-Horsfall protein (THP)抗体による免疫染色で陽性の細胞であることから、主としてヘンレの太い上行脚(TAL)が障害を受けることが明らかとなった。また、生存率、腎機能、組織学的変化をマーカーに、オスモライト投与による効果を検討した。ミオイノシトールの大量投与によりMMIの毒性は完全に抑制され、生存率、腎機能、組織学的変化ともほぼ完全に正常に復した。さらに、TALのオスモライトであるベタインの大量投与により、部分的に改善を認めた。以上のことから、ミオイノシトールはヘンレの太い上行脚においてNaCl輸送に関連して重要な機能を担っていることが示唆された。

9634 腎臓におけるNa⁺/ミオイノシトール輸送体の発現調節とその意義

助成研究者：山内 淳(大阪大学 医学部)
 共同研究者：今井 圓裕(大阪大学 医学部)
 守山 敏樹(大阪大学 健康体育部)

1. 研究目的

ミオイノシトールは腎髄質細胞で同定された主要なオスモライトの一つで、細胞外の高浸透圧刺激に対してナトリウム依存性の輸送体 (sodium-dependent myo-inositol transporter: SMIT) により細胞内に蓄積し、細胞内外の浸透圧バランスを保つ働きがある (1)。ミオイノシトールは他のオスモライトとは異なり、腎髄質外層に最も多く存在し、皮質にも有意に存在することが確認されている。本研究者はSMITのcDNAクローニングをおこな (2)、その発現調節機構の解明と生理的意義につき検討を加えてきた (3)。cDNA配列から想定される分子構造は、12回膜貫通型の蛋白で、Na依存性グルコース輸送体ファミリーに属している。MDCK細胞を用いた実験により、SMITは高浸透圧刺激に反応して主に遺伝子転写レベルで制御を受けていることを明らかにした (4)。また、尿細管細胞だけでなく糸球体メサンギウム細胞でも、高浸透圧刺激に反応してSMIT活性およびmRNAレベルの上昇がおこることを見出した (5)。最近、我々はラット腎においてSMITの発現をin situ hybridizationにより観察し、SMIT mRNAがヘンレの太い上行脚と緻密斑にきわめて強く発現していること、さらにNaCl負荷で著明に誘導されフロセミドにて抑制されることを明らかにした (6)。すなわち、この部位におけるSMITの発現がNaCl再吸収に依存することを示唆すると考えられる。

SMITは浸透圧感受性に調節をうけるが、フロセミドにて発現が抑制されることから管腔側の浸透圧とは関連がないと考えられる。したがって、おそらく基底側または細胞内の浸透圧がシグナルになってSMITの発現を変化させていると推定される。この推論はMDCK細胞の基底側と管腔側の浸透圧を別々に変化させると、SMITが主に基底側の浸透圧依存性に調節されるという実験結果からも支持される (7)。

本研究の第一の目的は、SMITの発現調節機構をさらに明らかにするため、ヘンレ係蹄へのNa負荷量の増加を目的として、近位尿細管に作用する利尿薬である炭酸脱水素酵素阻害薬を投与しその影響をみることである。

このようにSMITの生理学的特徴については次第に明らかになりつつあるが、腎における役割についてはまだ不明な点が多い。本研究の第2の目的は、ミオイノシトールおよびその輸送体の重要性を明らかにするため、ミオイノシトール輸送の阻害による影響を検討することである。SMITの強い発現および誘導を認めたヘンレの太い上行脚と緻密斑細胞では、SMITが生理的に重要な役割を担っている可能性が強いと考えられる。この点を明らかにするために、1) ミオイノシトール

のアナログである methylene *myo*-inositol (MMI) のミオイノシトール輸送に対する影響について培養細胞を用いて検討する、2) さらに *in vivo* においてミオイノシトール輸送の競合的阻害薬をラットに投与し、その影響を検討する。

2. 研究方法

1) SMIT発現調節機構の検討

炭酸脱水素酵素阻害薬である acetazolamide 6mg/100g体重を投与し、近位尿細管でのNa再吸収を阻害することによりヘンレ係蹄への負荷を増加させたときの影響を観察する。投与後経時的に屠殺し、SMITの発現をNorthern blotおよび *in situ* hybridizationにより観察した。

Northern blotはラットSMIT cDNAを³²Pラベルして用いた。

In situ hybridizationはラットSMIT cDNAから³⁵SラベルしたcRNAを合成し、プローブとして用いた。

2) ミオイノシトール競合阻害薬の影響

(a) *in vitro* study

ミオイノシトールのアナログである methylene *myo*-inositol (MMI) のミオイノシトール輸送に対する阻害作用を明らかにするため、腎尿細管細胞由来の培養細胞であるMDCK細胞を用いて検討した。高浸透圧培地 (500 mosm / kg) は正常浸透圧培地に200 mosm / kgのラフィノースを添加して作成した。

種々の濃度のMMI存在下でミオイノシトール輸送をNa⁺存在下、および非存在下にて [³H] ミオイノシトールの取り込み速度を測定し、その差からNa⁺依存性ミオイノシトール輸送を求めた。

コントロールとして測定したベタイン輸送体 (betain/gamma-amino-isobutyric acid transporter) 活性を [³H] gamma-amino-isobutyric acid (GABA) の取り込み速度で、システムA中性アミノ酸輸送体活性を methyl amino isobutyric acid (MeAIB) の取り込み速度で測定した。

MMI存在下、非存在下での細胞内ミオイノシトール濃度をHPLC法 (8)にて測定し、MMIが細胞のミオイノシトール蓄積に与える影響を検討した。

MDCK細胞の高浸透圧下における発育・成長が、MMIにより影響をうけるかどうかを colony-forming efficiency により検定した。

(b) *in vivo* study

Preliminaryの実験にて、MMIを50mg/kg投与すると軽度、80mg/kgで中等度、100mg/kgで高度の髄質外層を中心とするマ尿細管壊死がみられたことから、50mg/kgまたは80mg/kg投与にて以下の実験をおこなった。

MMI 80mg/kg投与後の生存率を観察するとともに、経時的にラットを屠殺し、血清クレアチニン、尿素窒素を測定して腎機能に与える影響を検討した。

MMI投与により早期に障害を受ける部位を同定するために、投与12時間後に腎を灌流固定し、組織学的な検討をおこなった。障害を受けた尿細管細胞の同定の

ために、ヘンレの太い上行脚に特異的に存在することが確認されている Tamm-Horsfall protein (THP) に対する抗体で免疫染色をおこなった。

さらにMMI投与による尿細管障害がNaCl負荷により影響を受けるかどうかを検討するため、MMI 50mg/kg投与と同時に 3M NaClを 0.5ml/100g体重腹腔内投与し、組織学的および免疫組織学的検討をおこなった。

MMI投与による尿細管障害がミオイノシトールの投与により抑制されるかどうかをみるために、MMI 80mg/kg投与と同時に 800mg/100g体重のミオイノシトールを投与し、組織学的および免疫組織学的検討をおこなった。同様に、ヘンレの太い上行脚のもう一つのオスモライトであるベタイン投与による影響も検討した。

3. 研究結果

1) SMIT発現調節機構の検討

acetazolamide 6mg/100g体重を投与後経時的にラットを屠殺し、腎を摘出後RNAを抽出し、SMIT cDNAをプローブとしてNorthern blotをおこなった。SMIT mRNAはacetazolamideにより軽度の上昇傾向を示すものの有意な変化を認めなかった。

Fig. 1 Effects of acetazolamide on SMIT mRNA

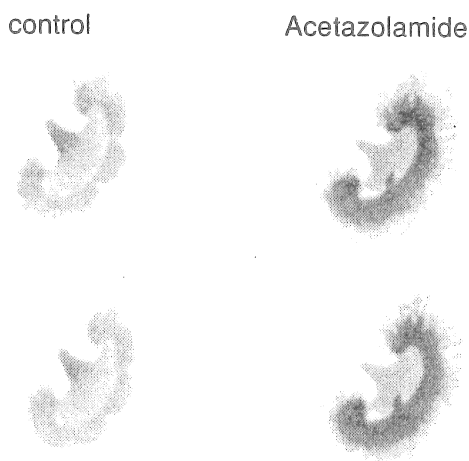


Fig. 1 はラットを灌流固定後SMIT cRNAプローブによりin situ hybridizationをおこした結果である。髄質外層のSMIT mRNAのシグナルは明らかな増強を認め、逆に髄質内層のシグナルは低下した。Northern blotの結果はこれらが相殺しあったため有意な変化が見られなかったものと推定される。

2) ミオイノシトール競合阻害薬の影響

(a) in vitro study

5 mMのMMIによりミオイノシトール輸送活性は著明に抑制された (Fig. 2)。

一方、コントロールとして測定したベタイン輸送活性 (GABA)、システムA中性アミノ酸輸送活性 (MeAIB) には有意な変化を与えなかった。

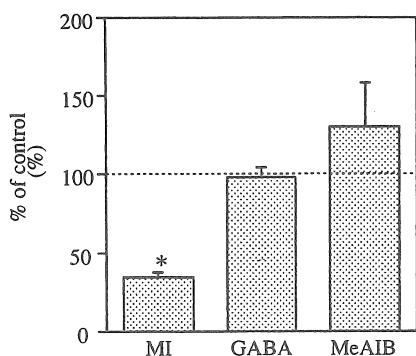


Fig. 2 Effects of MMI on uptake of myo-inositol (MI), γ -amino-n-butyric acid (GABA) or 2-(methylamino)-isobutyric acid (MeAIB). Na^+ -dependent transport of MI, GABA and MeAIB were measured in MDCK cells in isotonic medium. Results in the presence of 5 mM of MMI are expressed as the percentage of the uptake without MMI. Each bar is mean of 3 independent experiments; error lines are SD.

次に、種々の濃度のMMI存在下にミオイノシトール輸送活性を測定してkinetics studyをおこなった。Fig. 3はEdie-Hofsteeプロットを示す。MMI存在下に K_m (Michaelis constant) は明らかに上昇したが、 V_{max} (maximal velocity) は有意な変化を示さなかった。DixonプロットによりMMIのミオイノシトール輸送に対する K_i (inhibition constant) は1.6 mMで、競合阻害のパターンを示すことが明らかとなった。

MMIがミオイノシトールの蓄積に及ぼす影響を検討するために、MMI存在下、非存在下におけるミオイノシトールの細胞内濃度をHPLC法にて測定した。Fig. 4は正常浸透圧および高浸透圧下で培養したMDCK細胞のミオイノシトール含量を示す。5 mMのMMIによりミオイノシトールの蓄積は著明に抑制された。しかし、MMIは全く検出されないことから、MMI自体はSMITにより取り込まれないと考えられた。

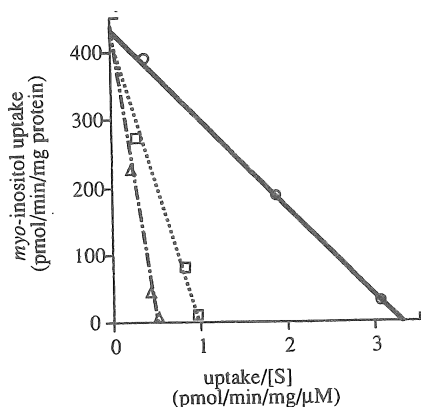


Fig. 3 Edie-Hofstee plot of myo-inositol uptake into MDCK cells. Na^+ -dependent myo-inositol uptake was measured 24 h after medium osmolality was increased in the presence of 0, 1 or 5 mM of MMI. O Uptake in the absence of MMI ($K_m = 130 \mu\text{M}$, $V_{max} = 431 \text{ pmol/min/mg protein}$). □ Uptake in the presence of 1 mM MMI ($K_m = 428 \mu\text{M}$, $V_{max} = 421 \text{ pmol/min/mg protein}$). Δ Uptake in the presence of 5 mM MMI ($K_m = 861 \mu\text{M}$, $V_{max} = 437 \text{ pmol/min/mg protein}$).

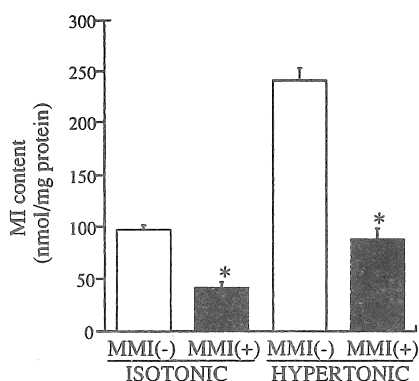


Fig. 4 Effects of MMI on myo-inositol content under isotonic and hypertonic conditions. When MDCK cells were grown to confluence, some were switched to hypertonic (500 mosm/kg) medium with or without 5 mM of MMI. At the same time, half of the isotonic cells were changed to the medium with 5 mM of MMI. Each bar is mean of 3 independent experiments; error lines are SD. * $p < 0.01$ versus uptake in the absence of MMI.

MMIが高浸透圧環境下の細胞の生存や発育に影響を与えるかどうかを検討するために、colony-forming efficiencyを測定して検討した。これは、MDCK細胞を10 cm dish当たり200細胞seedし、24時間正常浸透圧下で培養後高浸透圧培地に交換し、1週間後にできたコロニーの数をトルイジンブルーで染色して数えることにより、種々の条件が細胞の成長、発育に与える影響を見る方法である。なお、培養メディウム中には約40mMのミオイノシトールと約18mMのベタインが存在する。

MMIは100 μ Mで有意にcolony-forming efficiencyを低下させ、500 μ M存在下では全くコロニーがみられなかった。すなわち、高浸透圧培養下での細胞の発育にミオイノシトールが必須であることが示唆された。このようなMMIの毒性は3倍量のミオイノシトールを加えることにより完全に抑制された。すなわち、MMIによる高浸透圧下の細胞に対する毒性はミオイノシトールの欠乏によるものであり、非特異的な毒性ではないことが明らかとなった。また、MDCK細胞のもう一つのオスモライトであるベタインの添加により、MMIの毒性が部分的に抑制された。これらのことからMMI投与による細胞毒性は主にオスモライト不足のために高浸透圧環境に適応できないことが原因と考えられた。

Table 1. Effects of inhibition of myo-inositol transport on colony-forming efficiency of MDCK cells in a hypertonic environment

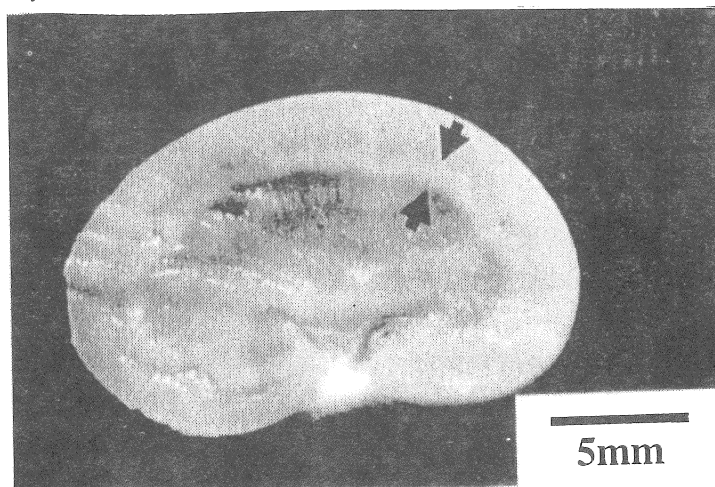
| MMI, μ M | Myo-inositol, μ M | Betaine, μ M | Colony-Forming Efficiency, % |
|--------------|-----------------------|------------------|------------------------------|
| 0 | ~40 | ~18 | 100 \pm 5 |
| 10 | ~40 | ~18 | 95 \pm 11 |
| 50 | ~40 | ~18 | 100 \pm 7 |
| 100 | ~40 | ~18 | 51 \pm 6* |
| 500 | ~40 | ~18 | 0* |
| 0 | 300 | ~18 | 109 \pm 3 |
| 100 | 300 | ~18 | 111 \pm 6 |
| 500 | 1,500 | ~18 | 92 \pm 2 |
| 0 | ~40 | 300 | 107 \pm 13 |
| 100 | ~40 | 300 | 117 \pm 13 |
| 500 | ~40 | 300 | 22 \pm 5* |

Growth medium contains ~40 μ M myo-inositol and ~18 μ M betaine. Myo-inositol or betaine was added to the medium at the concentration as indicated. Colonies were allowed to grow for 1 wk without feeding. The number of colonies with a diameter larger than 1 mm were counted. Results are expressed as the percentage of the colony-forming efficiency without addition of MMI and osmolytes. * $P < 0.01$ vs. the value without addition of MMI and osmolytes.

(b) in vivo study

MMI 80 mg/kg投与により48時間以内にすべてのラットが死亡した。死亡時のラット腎の断面をFig. 5に示す。マクロの観察により、髄質外層付近に白い帯状の壊死層がリング状にみられた。

Fig. 5 Longitudinal section of whole kidney after MMI injection. The rats received 80 mg/kg of MMI died within 48 hours. When the animals died, the kidneys were removed and bisected longitudinally. There were clearly demarked rings in the juxtamedullary region (arrow).



MMI投与により障害を浮ける部位を同定するために、投与後早期(12時間後)にラットを屠殺し、腎を灌流固定後切片をヘマトキシリン・エオジンにて染色した(Fig. 6)。髄質外層の尿細管に高度の変性・壊死がみられ、皮質の尿細管にも障害を認めるが糸球体はほぼ正常であり、髄質内層にもほとんど異常を認めなかった。

SMITの局在から推察すると、主として障害を受けた尿細管はヘンレの太い上行脚(TAL)か髄質集合管と考えられる。ネフロン部位の同定のために、TALに特異的に発現し、しばしばTALのマーカーとして利用されるTamm-Horsfall protein (THP)の抗体を用いて免疫染色をおこなった(Fig. 7)。MMI 50 mg/kg投与により、髄質外層において主としてTHP陽性の尿細管細胞が障害され、THPの染色性が低下することがわかった。さらに、高張NaClの投与により尿細管障害は著明に増悪し、THPの染色性が低下するとともに尿細管壊死が認められた。

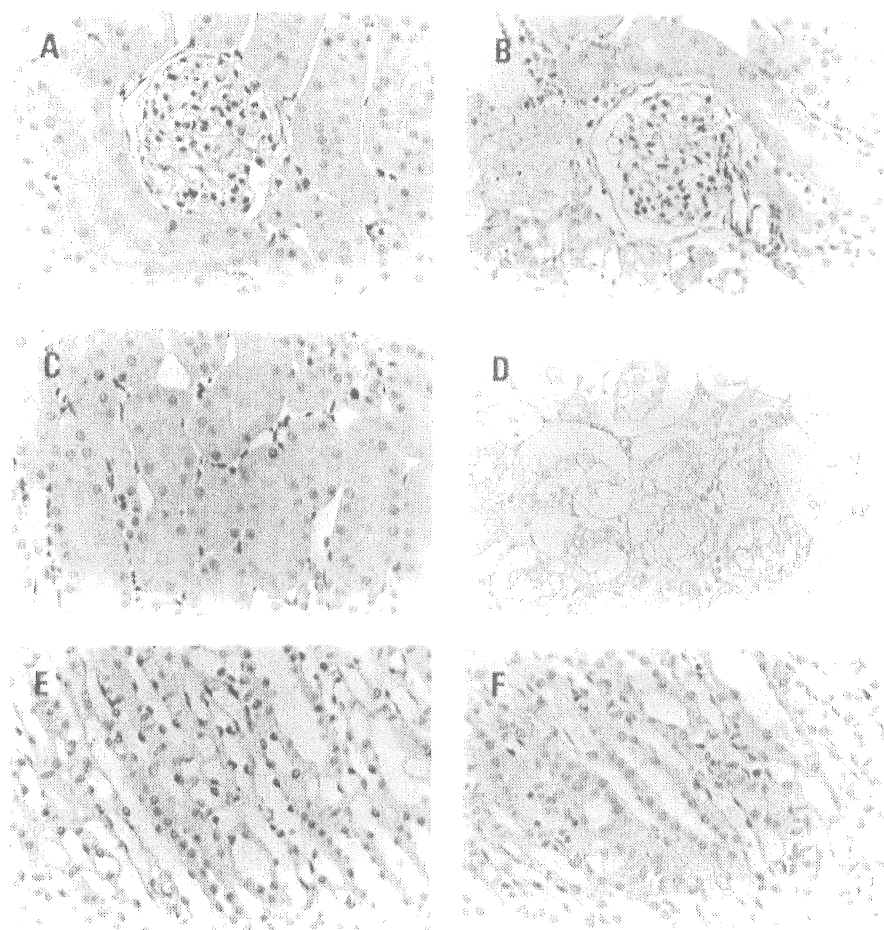
in vitroの実験では、MMIの細胞障害はミオイノシトールの投与により完全に抑制され、ベタインの投与により部分的に抑制された。in vivoでも同様にオスモライト投与によりMMIの毒性が中和されるかどうかを、生存率、腎機能、組織学的変化から検討した。MMI 80 mg/kg投与により48時間以内にすべてのラットが死亡したが、800 mg/kgのミオイノシトール投与により少なくとも72時間後まですべてのラットが生存した(Fig. 8)。同量のベタイン投与により明らかに生存率

は向上した。

腎機能に与える影響を検討するため、上記3群のラットを早期(8、12、24時間後)に屠殺し、血清クレアチニンおよび尿素窒素を測定した。表2に示すごとく、投与後12時間で血清クレアチニンおよび尿素窒素は有意に上昇し、24時間後にはそれぞれ 3.07 ± 0.06 、 109 ± 4.6 まで上昇した。この上昇は大量のミオイノシトール投与により完全に抑制され、ベタイン投与により部分的に抑制された。

これら3群の投与後12時間のTHPによる免疫組織像をFig. 9に示す。MMI 80 mg/kg投与により、髄質外層のTHP陽性細胞を中心に高度の細胞障害を認め、THPの染色性は顕著に低下したが、ミオイノシトール投与により著明に改善し、ベタイン投与にても明らかな改善を認めた。

Fig. 6 Hematoxylin and eosin staining of the kidneys from the control rat (A, C, E) and the rat received 80 mg/kg of MMI (B, D, F). A and B; cortex with glomerulus. X 400. C and D; outer medulla. X 400. E and F; inner medulla. X 400.



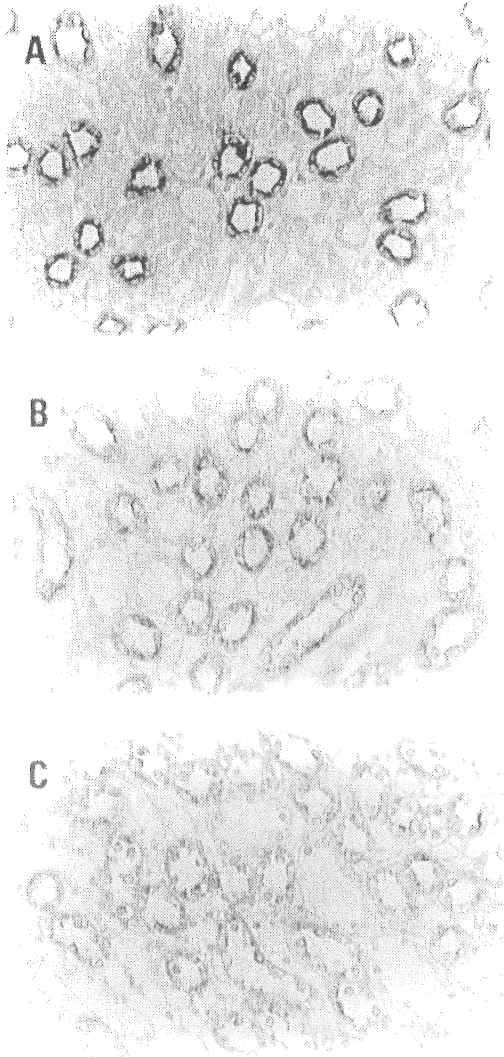


Fig. 7 Immunohistochemical staining of THP in the outer medulla from the control rat (A) and the rat received 60 mg/kg of MMI (B). Intraperitoneal injection of 0.5 ml of 3 M NaCl per 100 g body weight was performed simultaneously with injection of 60 mg/kg of MMI (C).

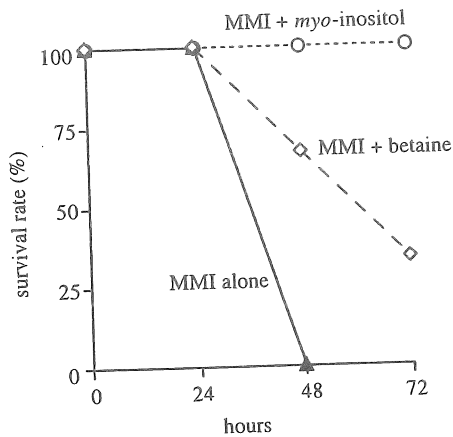


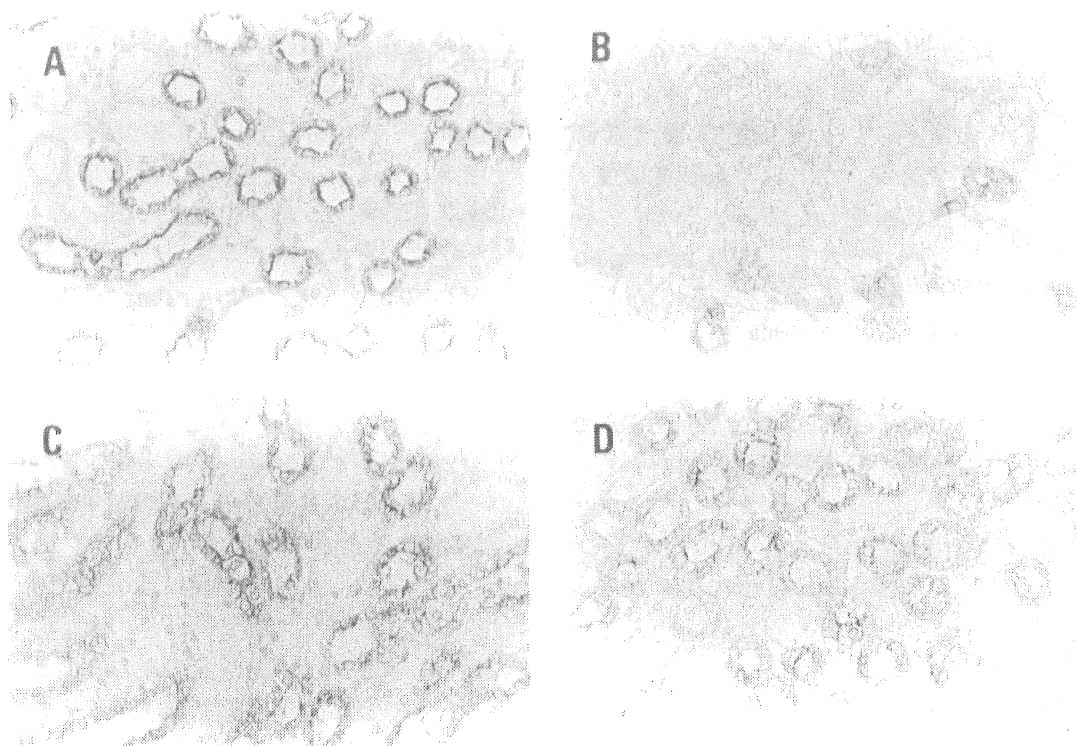
Fig. 8 Intraperitoneal injection of 80 mg/kg of MMI was performed to 9 rats. Three rats received 800 mg/kg of myo-inositol (MMI + myo-inositol) simultaneously with MMI and other three rats were given the same amount of betaine (MMI + betaine). The rest of the rats did not receive the osmolytes (MMI only). The rats injected MMI alone died within 48 hours. Myo-inositol supplementation completely rescued the rats and betaine increased the survival rate.

Table 1. Serum creatinine and urea nitrogen following administration of 2-O,C-methylene-*myo*-inositol (MMI).

| Time after injection | (n) | creatinine | urea nitrogen |
|----------------------|-----|---------------------------|--------------------------|
| 0 h | (3) | 0.13 ± 0.06 | 12.2 ± 0.9 |
| 8 h | (3) | 0.23 ± 0.23 | 10.3 ± 4.1 |
| 12 h | (3) | 1.43 ± 0.35 ^a | 59.4 ± 3.9 ^a |
| 12 h + MI | (3) | 0.13 ± 0.06 ^c | 12.0 ± 2.3 ^c |
| 12 h + Bet | (3) | 0.57 ± 0.15 ^{bc} | 26.2 ± 6.6 ^{ac} |
| 24 h | (3) | 3.07 ± 0.06 ^a | 109.0 ± 4.6 ^a |
| 24 h + MI | (3) | 0.20 ± 0.10 ^d | 10.5 ± 3.5 ^d |
| 24 h + Bet | (3) | 2.17 ± 0.68 ^{ae} | 93.0 ± 9.5 ^{ae} |

Intraperitoneal injection of 80 mg/kg of MMI was performed to male Wistar rats. After 8, 12 or 24 h, blood samples were taken and the rats were sacrificed. Some rats received *myo*-inositol (+ MI) or betaine (+ Bet) administration simultaneously with MMI injection and sacrificed after 12 or 24 h. ^a $p < 0.001$ and ^b $p < 0.05$ vs. 0 h, and ^c $p < 0.001$ vs. 12 h. ^d $p < 0.001$ and ^e $p < 0.01$ vs. 24 h.

Fig. 9 Immunohistochemical staining of THP in the outer medulla from the control rat (A) and the rat with injection of 80 mg/kg of MMI (B). To see the effects of osmolyte supplementation, 800 mg/kg *myo*-inositol (C) or betaine (D) was administered simultaneously with injection of 80 mg/kg of MMI.



4. 考察

今回の検討により、1) 炭酸脱水素酵素阻害薬であるacetazolamideにより随質外層のSMITの発現が増強することから、この部位へのNaCl負荷量に依存してSMITが誘導されること、2) ミオイノシトールのアナログであるMMIがミオイノシトール輸送の競合的阻害薬であること、3) MMIによりミオイノシトール輸送を阻害すると、高浸透圧環境下における細胞の発育・成長が阻害されること、4) 生体内へのMMI投与により、ヘンレの太い上行脚 (TAL) を中心とする尿細管細胞の障害が引き起こされること、が明らかとなった。

TALにおいては、用量依存性に水の移動を伴わないNaの再吸収が行われており、この部位へのNa負荷量が増加するとその再吸収量が増加し、細胞の基底膜側の浸透圧が上昇し、それに反応してSMITが誘導されてミオイノシトールを細胞内に取り込み、細胞内外の浸透圧バランスを保つと考えられる。これは、NaCl負荷にて発現が増強し、フロセミドにて抑制される(8)ことから、基底側または細胞内の浸透圧がシグナルになってSMITの発現を変化させている、と推定した我々の仮説をさらに裏づけるものである。一方、acetazolamide投与により随質内層のSMITのシグナルはむしろ低下傾向を示したが、これは本薬による利尿作用を反映しているものと考えられる。

培養細胞における実験により、MMIがミオイノシトール輸送の競合的阻害薬であることを明らかにした。オスモライト蓄積の阻害薬としてはソルビトール合成酵素であるアルドース還元酵素の阻害薬がすでに知られており、colony-forming efficiency に関して、集合管細胞由来の培養細胞を用いて同様の発表がなされている(9)。今回我々が用いたMDCK細胞では、ミオイノシトールとベタインが主要なオスモライトであり(10)、ヘンレ上行脚と類似したパターンを示すものと思われる。

ミオイノシトール輸送に対するMMIのKi値は、ミオイノシトールのKm値の約10倍であり、それほど親和性は強くないと考えられる。そこで疑問となるのが、生体内に投与したMMIがミオイノシトール輸送を阻害するだけの濃度になっているかどうかである。MMI 100 mg/kg投与した際に、それが速やかに吸収され、細胞外液に均等に分布したとすると、約2.5 mMになり、十分Ki値(1.6 mM)を超える濃度に達することがわかる。

このような高濃度のMMIは、他の細胞や臓器に影響を及ぼさないのであろうか。腎においてSMITは集合管にも強く発現しているが、その障害はほとんど認められなかった。集合管細胞はミオイノシトール以外にソルビトール、グリセロフォスフォルルコリン、ベタイン、タウリンといった種々のオスモライトを蓄積する機構を備えており(1)、一つのオスモライトが不足するときには他のオスモライトがそれを補うように増加する(11)ことから、ミオイノシトール不足による影響を受けにくいと考えられる。一方、TALにおいては、ミオイノシトールとベタインが主要なオスモライトであり、特に皮質部のTALではミオイノシトールのみであると考えられる(12)ことから、ミオイノシトール欠乏による影響を強く受けるも

のと推定される。

SMITは腎のみならず脳や内耳、眼などにも発現を認め、NaCl負荷による誘導を確認している(13-16)。MMI投与後にこれらの臓器を観察したが、特に変化を認めなかった。これらの臓器におけるSMITの発現は、腎尿細管における発現と比較して非常に弱く、通常の状態におけるミオイノシトールの必要性はそれほど高くないものと考えられる。

5. 今後の課題

SMITは細胞外浸透圧により遺伝子の転写レベルで調節されていることが明らかにされているが、浸透圧の変化を細胞がいかに感知し、シグナルを核に伝え、遺伝子の転写を亢進させるかについてはほとんど解明されていない。浸透圧変化による細胞骨格の立体構造変化、細胞容積変動による細胞内の電解質濃度（イオン強度）、細胞膜イオン透過性変化、などがシグナルとして想定されている。細胞内のシグナル伝達機構として、MAPキナーゼファミリーが注目され、我々も一部発表した(17)。さらにSMIT遺伝子がクローニングされ(18)、遺伝子発現の制御領域の解析が進みつつある。このように、SMITの発現調節機構につき、細胞レベルでの解析を進める必要があると考えられる。

in vivoにおいて、NaCl負荷量の重要性が明らかとなったが、他の溶質、たとえばグルコースやアミノ酸、マニトールなどによる影響を観察する必要があると思われる。

ミオイノシトールはヘンレの太い上行脚においてNaCl輸送に関連して重要な機能を担っていると考えられる。この部位は腎虚血やある種の薬剤で主に障害される部位である。ミオイノシトールとその輸送体がこれらの病態に直接あるいは間接的に関与している可能性が考えられる。腎虚血モデルやアンフォテリシン投与による影響を観察することで、ミオイノシトールの病態生理的意義が明らかになると考えられる。

6. 文献

1. Garcia-Perez A, Burg MB: Renal medullary organic osmolytes. *Physiol Rev.* 71:1081-1115, 1991.
2. Kwon HM, Yamauchi A, Uchida S, Preston AS, Garcia-Perez A, Burg MB, Handler JS: Cloning of the cDNA for a Na⁺/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. *J Biol Chem.* 267:6297-6301, 1992.
3. Yamauchi A, Nakanishi T, Takamitsu Y, Sugita M, Imai E, Noguchi T, Fujiwara Y, Kamada T, Ueda N: In vivo osmoregulation of Na/myo-inositol cotransporter mRNA in rat kidney medulla. *J Am Soc Nephrol.* 5:62-67, 1994.
4. Yamauchi A, Uchida S, Preston AS, Kwon HM, Handler JS: Hypertonicity stimulates transcription of gene for Na⁺-myo-inositol cotransporter in MDCK cells. *Am J Physiol.* 264:F20-F23, 1993.
5. Miyai A, Yamauchi A, Nakanishi T, Sugita M, Takamitsu Y, Yokoyama K, Itoh T, Andou A, Kamada T, Ueda N, Fujiwara Y: Na⁺/myo-inositol cotransport is regulated by tonicity in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int.* 47:473-480, 1995.
6. Yamauchi A, Miyai A, Shimada S, Minami Y, Tohyama M, Imai E, Kamada T, Ueda N: Localization and rapid regulation of Na⁺/myo-inositol cotransporter in rat kidney. *J Clin Invest.* 96:1195-1201, 1995.
7. Yamauchi A, Sugiura T, Itoh T, Miyai A, Horio M, Imai A, Kamada T: Na⁺/myo-inositol transport is regulated by basolateral tonicity in Madin-Darby canine kidney cells. *J Clin Invest.* 97:263-267, 1996.
8. Nakanishi T, Uyama O, Nakahama H, Takamitsu Y, Sugita M: Determinants of relative amounts of medullary organic osmolytes: effects of NaCl and urea differ. *Am J Physiol.* 264:F472-F479, 1993.
9. Yancey PH, Burg MB, Bagnasco SM: Effects of NaCl, glucose, and aldose reductase inhibitors on cloning efficiency of renal medullary cells. *Am J Physiol.* 258:C156-C163, 1990.
10. Nakanishi T, Balaban RS, Burg MB: Survey of osmolytes in renal cell lines. *Am J Physiol.* 255:C181-C191, 1988.
11. Moriyama T, Garcia PA, Olson AD, Burg MB: Intracellular betaine substitutes for sorbitol in protecting renal medullary cells from hypertonicity. *Am J Physiol.* 259:F847-F858, 1991.
12. Miyai A, Yamauchi A, Moriyama T, Kaneko T, Takenaka M, Sugiura T, Kitamura H, Ando A, Shimada S, Tohyama M, Imai A, Kamada T: Expression of betaine transporter: its unique localization and rapid regulation in rat kidney. *Kidney Int.* 50:819-827, 1996.
13. Inoue K, Shimada S, Minami Y, Morimura H, Miyai A, Yamauchi A, Tohyama M: Cellular localization of Na⁺/myo-inositol cotransporter mRNA in the rat brain. *Mol Neuroscience.* 7:1195-1198, 1996.

14. Minami Y, Shimada S, Inoue K, Morimura H, Miyai A, Yamauchi A, Matsunaga T, Tohyama M: Expression of Na⁺/myo-inositol cotransporter mRNA in the inner ear of the rat. *Mol Brain Res.* 35:319-324, 1996.
15. Minami Y, Inoue K, Shimada S, Morimura H, Miyai A, Yamauchi A, Matsunaga T, Tohyama M: The rapid and transient up-regulation of Na⁺/myo-inositol cotransporter transcription in the brain of acute hypernatremic rats. *Mol Brain Res.* 40:64-70, 1996.
16. Morimura H, Shimada S, Otori Y, Yamauchi A, Minami Y, Inoue K, Miyai A, Ishimoto I, Tano Y, Tohyama M: Expression of Na⁺/myo-inositol cotransporter mRNA in normal and hypertonic stress rat eyes. *Mol Brain Res.* 35:333-338, 1996.
17. Itoh T, Yamauchi A, Miyai A, Yokoyama K, Kamada T, Ueda N, Fujiwara Y: Mitogen-activated protein (MAP) kinase and its activator are regulated by hypertonic stress in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *J Clin Invest.* 93:2387-2392, 1994.
18. Berry GT, Mallee JJ, Kwon HM, Rim JS, Mulla WR, Muenke M, Spinner NB: The human osmoregulatory Na⁺/myo-inositol cotransporter gene (SLC5A3): molecular cloning and localization to chromosome 21. *Genomics.* 25:507-513, 1995.

Regulation and an important role of Na⁺/*myo*-inositol cotransporter in the kidney

Atsushi Yamauchi
Enyu Imai
Toshiki Moriyama.

First Department of Medicine
Osaka University School of Medicine

Summary

Myo-inositol, a major compatible osmolyte in renal medulla, is accumulated in several kinds of cells under hypertonic conditions via Na⁺/*myo*-inositol cotransporter (SMIT). We have recently shown that SMIT mRNA in the thick ascending limb of Henle (TAL) was rapidly upregulated by NaCl loading and was downregulated by furosemide, suggesting that the expression is proportional to NaCl transport (J Clin Invest 96: 1195, 1995). To confirm this notion, we examined the effects of administration of acetazolamide, which inhibits NaCl reabsorption in proximal tubule, in rats. In situ hybridization for SMIT revealed that acetazolamide apparently induced SMIT mRNA in the outer medulla of the kidney as expected. We next examined the effects of inhibition of *myo*-inositol transport using an analogue of *myo*-inositol, 2-*O*, *C*-methylene-*myo*-inositol (MMI). We first characterized the inhibitory effect of MMI on *myo*-inositol transport in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. The Na⁺-dependent component of [³H] *myo*-inositol uptake was inhibited by MMI in a concentration-dependent manner. We found decreased affinity for *myo*-inositol in the presence of MMI whereas the V_{max} of the transporter did not change. Thus, MMI behaves as a competitive inhibitor of *myo*-inositol transport with a relatively high K_i value (1.6 mM). *Myo*-inositol content in hypertonic MDCK cells was markedly reduced in the presence of 5 mM MMI, but MMI itself did not accumulate in these cells. We next examined the *in vivo* effects of MMI administration on rat kidney. Intraperitoneal injection of MMI (60~80 mg/kg) caused tubular degeneration and necrosis predominantly in the outer medulla. Serum creatinine and urea nitrogen elevated significantly 16 hours after MMI administration. Immuno-histological study for Tamm-Horsfall protein (THP) revealed that degenerated tubular cells were THP-positive, indicating that they were the TAL cells. NaCl loading apparently deteriorated the tubular injury. Administration of *myo*-inositol prevented the toxic effect of MMI. Furthermore, high dose of betaine, another osmolyte in the TAL cells, partially prevented the adverse effect of MMI. We conclude that *myo*-inositol play a crucial role in the TAL regarding osmoregulation of the cells.