

助成番号 9924

新生児早期の尿濃縮機構成熟における腎髄質内層各尿細管のNaClおよび尿素輸送系の成熟過程に関する新しい仮説の証明

助成研究者：根東 義明（東北大学大学院医学系研究科 小児病態分野）
 共同研究者：飯沼 一字（東北大学大学院医学系研究科 小児病態分野）
 永野 千代子（東北大学大学院医学系研究科 小児病態分野）
 森本 哲司（東北大学大学院医学系研究科 小児病態分野）
 劉 文（東北大学大学院医学系研究科 小児病態分野）
 今井 正（自治医科大学 薬理学）

一方、ヒトをはじめとする哺乳類の新生児期には、尿を希釈する能力が新生児期初期よりすでに完成しているにもかかわらず、尿の濃縮力は低く、ラットで生後4週間、ヒトでは2ヶ月から1歳によくその濃縮力が成熟固体のレベルに到達する。このために、新生児期の哺乳類は、哺乳が1日以上途絶えた場合には、栄養障害以前に脱水に陥ることになり、これが尿濃縮力の低さといえる。

今回、その原因を探るため、新生児ラット腎髄質部の各尿細管セグメントの機能を、単離尿細管微小灌流法、免疫蛍光抗体染色法、RT-PCR法を用いて解析した。

ヘンレの細い下行脚(DTL)では、出生時に測定した単離尿細管灌流実験での $3H_2O$ 拡散係数(diffusional water permeability, Pdw)は、lipid bilayerと同程度に低く、浸透圧水透過性(hydraulic conductivity, Lp)は、ゼロだった。Lpはその後急速に増加し、生後2週間の時点で、成熟時のレベルに到達した。RT-PCR法で確認した水チャンネルAQP-1の発現は、出生時には見られず、その後急速に発現してきた。

ヘンレの細い上行脚(ATL)では、出生直前より管腔内正で、日齢0では、 13.2 ± 1.6 mV ($n=11$, lumen positive)の V_t が存在し、その後急速に低下し、日齢5でほぼ消失した。RT-PCRによる輸送体mRNAの解析では、日齢1でClC-K1の発現がまったく見られない一方で、成熟ラットには見られないrBSC-1が強く発現し、その後発現量がかなり低下傾向を示し、成熟ラットではわずかな発現にとどまった。

集合尿細管(IMCD)では、管腔内負で、-40から50 mVの大きな V_t が出生前より存在し、日齢1に一過性に増加し、その後日齢10には消失した。日齢1ではPareaはAVPの非存在下では 4×10^{-5} cm/sという低値を示し、AVPによりわずかにその値が上昇したが、いずれも成熟ラットの10分の1以下という著しい低値だった。Pareaは日齢7前後より急激に増加傾向となり、日齢14で成熟ラットのほぼ半分の値に達した。水チャンネルAQP-2は、日齢0よりすでに発現が認められたが、尿素輸送体UT-A1は、出生時発現が見られず、生後2週間で発現が増強していた。

以上のごとく、単離尿細管機能の検討結果から、日齢7に至るまでの新生児ラットでは、腎髄質部への能動的NaCl蓄積機構が一過性に活性化し、尿素を利用した尿濃縮機構がまったく働かず、ヘンレ管では水透過性が上行脚下行脚の両方で低く、成熟ラットとは異なる尿濃縮システムが機能していることが示唆された。

5

助成番号 9924

新生児早期の尿濃縮機構成熟における腎髄質内層各尿細管のNaClおよび尿素輸送系の成熟過程に関する新しい仮説の証明

助成研究者：根東 義明（東北大学大学院医学系研究科 小児病態学分野）
 共同研究者：飯沼 一字（東北大学大学院医学系研究科 小児病態学分野）
 永野 千代子（東北大学大学院医学系研究科 小児病態学分野）
 森本 哲司（東北大学大学院医学系研究科 小児病態学分野）
 劉 文（東北大学大学院医学系研究科 小児病態学分野）
 今井 正（自治医科大学 薬理学）

【研究目的】

哺乳類は、その進化の過程においては、両生類や爬虫類から進化し、爬虫類の後の段階において、尿の濃縮機能を獲得した。尿濃縮力をもつ動物は、哺乳類と鳥類だが、ヘンレのループは、これらにのみ存在し、尿の濃縮機構の基本的構成要素と考えられている。しかし、これらの2つの生命体が進化の過程においてどのような流れで分化していったのかは必ずしも明らかでなく、鳥類は獣足類から分かれたとする説や、最近報告されたように獣足類とは異なる進化の過程をたどったとする説まであり、この二つの種に存在するヘンレループが進化化学的に同じものであるのかそうでないのかは、今だ明かとは言えない。これまでの研究からは、組織学的には、ネフロンが3種類あり、ヘンレループ各部位の細胞形態が、鳥類と哺乳類で類似しているため、これら2つの異なる種の濃縮機構が、同じ由来をもつのではとも考えられている。しかし一方、鳥類の腎髄質部尿細管機能の研究結果として、鳥類のヘンレループがその全体に渡って水を通さず[1]、能動的にNaClを再吸収して腎髄質部の浸透圧を上昇させるメカニズムを濃縮の基本としているのに対し[2]、哺乳類ではヘンレループの下行脚と呼ばれる前半部分では、むしろ著しく高い水透過性が存在し[3]、また尿素を用いた尿濃縮のメカニズムが緻密に構築されており、これら2者のヘンレのループは系統発生上、別々に出現したものと考えられてきた。

一方、ヒトをはじめとする哺乳類の新生児期には、尿を希釈する能力が新生児期初期よりすでに完成しているにもかかわらず、尿の濃縮力は低く、ラットで生後4週間、ヒトでは2ヶ月から1歳ようやくその濃縮力が成熟固体のレベルに到達する。このために、新生児期の哺乳類は、哺乳が1日以上途絶えた場合には、栄養障害以前に脱水に陥ることになり、これが尿濃縮力の低さといえる。その原因として、これまでの研究の成果として、1) 新生児期にはヘンレループが短く、尿濃縮が効率よく行えない、2) 抗利尿ホルモンに対する腎尿細管の感受性が低い、3) プロスタグランディンの産生が強く、利尿的に働くなどの点が指摘されて来ている[4]。しかし、これらは必ずしも腎髄質部の機能の変化を直接

的に検討していないため、低い濃縮力の原因を十分に説明しているとはいえない。今回、我々は腎髄質部の尿細管の新生児期の機能を直接検討することにより、尿濃縮力の成熟過程に起こる機能的変化を明らかにすることを試みた。

【研究方法】

上述のような尿濃縮システムの発達過程の検討を行うため、以下の3種類の方法により、検討を行った。

1) 単離尿細管微小灌流法による尿細管機能の検討

胎生・新生児および成熟ラットの腎髄質内層の各尿細管を、実体顕微鏡下に微小単離し、倒立顕微鏡に設置されたチャンバー内で、マニピュレータを用いて管腔を灌流した。管腔内外の溶液組成を変更して経上皮電位を測定したり、管腔内に投与したアイソトープラベルの水・尿素の管腔外への流出を測定することにより、電解質および水・尿素の透過性を測定し、日齢による変化を観察した。

2) 蛍光抗体法を用いたイオン輸送体蛋白の発現の検討

蛍光抗体法を用いて、rBSC-1およびClC-K1イオン輸送体の発現を各日齢のラット腎組織切片において同定した。

3) RT-PCR法による輸送体mRNA発現の検討

尿細管を実体顕微鏡下に微小単離し、単位長さ(1.5 mm)あたりの各輸送体mRNAの発現を、RT-PCR法により解析した。

【研究結果】

腎髄質内層尿細管でのNaCl輸送機構の推移に関する検討

自発的経上皮電位 (V_t) と経上皮NaないしCl拡散電位の測定により、腎髄質内層のヘンレループおよび集合尿細管のNaCl輸送能を検討した。

ヘンレの細い下行脚（以下LDLと略）では、出生前後にわたり、自発的経上皮電位は観察されず、能動的NaCl再吸収の存在は示唆されなかった。

細いヘンレの上行脚（以下ATLと略）では、出生直前より管腔内正で、日齢0では、 13.2 ± 1.6 mV ($n=11$, lumen positive)の V_t が存在していた。ATLの V_t は、その後急速に低下し、日齢5でほぼ消失した。この管腔側正の V_t は、血液側に加えたouabain、管腔側に加えたbumetanideないしはbariumにより強く抑制され、太いヘンレの上行脚同様の能動的NaCl再吸収機序が出生時に出現し、出生直後に一過性に活性化されていることが証明された。

集合尿細管（以下IMCDと略）では、管腔内負で、-40から50 mVの大きな V_t が出生前より存在し、日齢1に一過性に増加し、その後日齢10には消失した。この電位は、管腔側のamilorideで完全に抑制され、皮質部集合尿細管に本来みられる能動的NaCl再吸収機序と同じNa再吸収機構が存在すると考えられた。

次に受動的NaCl透過性を検討するため、経上皮NaないしCl濃度勾配をつけた際の受動的

拡散によるNa拡散電位（VdNa）ないしCl拡散電位（VdCl）を測定した。

LDLでは、VdNaおよびVdClは、出生時それぞれ約-10 mVおよび+10 mVで、日齢とともに徐々に低下した。

ATLでは、VdNaは出生時より変化なく、一方でVdClは出生後より徐々に増加傾向を示した。そこで、ClC-K1 Cl channel活性の変化を評価するため、NaClの濃度差により生じた拡散電位（VdNaCl）のうち、ClC-K1抑制剤NPPB感受性コンポーネント（Vd-NPPB）の変化を観察したところ、出生時ゼロであった Δ Vd-NPPBは、日齢と共に増加し、生後14日にほぼ成熟ラットの値に近づいた。

集合尿細管では、出生前後にVdNaおよびVdClの著しい変化は観察されず、その電位も低く、成熟ラットとほぼ同レベルだった。

以上の電気生理学的検討から、新生児ラット腎髄質では、出生時、一過性にヘンレの細い上行脚および集合尿細管において、能動的NaCl再吸収機序が発現・促進され、速やかに消失することが明らかとなった。また、ヘンレの細い下行脚では、受動的NaCl輸送機構が促進されていることも明らかとなった。これらの機序は、本来成熟ラットには存在しない、質的に異なった輸送システムであり、新生児期の腎髄質のイオン輸送系が、成熟ラットとは質的に異なることを示している。

腎髄質内層尿細管での水輸送機構の推移に関する検討

次に、各尿細管セグメントにおける水透過性に関する検討を、単離尿細管灌流法での $^3\text{H-H}_2\text{O}$ の透過性（Pdw）の測定により、行った。ヘンレループにおける水透過性は図3aのごとく、ATLでは、日齢1以降成熟ラットに至るまで、水透過性Pdwはほぼ脂質二重層レベルの低値を示し、ATLでは、出生後常に水透過性がないことが確認された。一方、LDLでは、日齢0ではPdwはATLよりも低く、事実上水透過性が見られなかった。LDLの水透過性は、成熟ラットではPdwでは測定限界を超えるほど高い。そこで、より正確にLDLの水透過性を測定するため、血液側の浸透圧を100mOsm/kg上昇させた際の水透過性を、水浸透圧透過性（Posm）として測定した。その結果、Posmは日齢1では、成熟ラットの1割以下で、その後徐々に上昇し、日齢7前後に成熟ラットのレベルに近づくことが明らかとなった。

IMCDでは、 10^{-9} M AVP存在下ないしは非存在下での水透過性Pdwの推移を検討した。Pdwは、AVP非存在下では、日齢7まではATLやLDL同様に脂質二重層程度の透過性を示し、生後2週間で増加傾向を示し、成熟ラットでは他の報告でも見られる高値を示した。Pdwは、AVPにより日齢1ですでに増加を認め、日齢14で反応性が大幅に増加して、ほぼ成熟ラットのレベルに達した。

腎髄質内層尿細管での尿素輸送機構の推移に関する検討

さらに、ほ乳類にとってもっとも重要な尿濃縮上の基質である尿素の透過性Pureaの推移

を検討した。

ATLでは、日齢1でPureaは成熟ラットの3分の1で、その後徐々に増加して行った。DTLでは、やはりPureaは日齢1で 12×10^{-5} cm/s前後を推移した。

IMCDでは、日齢1ではPureaはAVPの非存在下では 4×10^{-5} cm/sという低値を示し、AVPによりわずかにその値が上昇したが、いずれも成熟ラットの10分の1以下という著しい低値だった。Pureaは日齢7前後より急激に増加傾向となり、日齢14で成熟ラットのほぼ半分の値に達した。

ここで、さらにIMCDが尿素を利用した尿濃縮機構を完成させているかどうかを明らかにするため、Imaiらの報告に従い、IMCDによる管腔内外のNaClと尿素の相互置換によるVolume Flux (Jv) を、日齢1と成熟ラットにおいて、AVPの存在下と非存在下で検討した。図5に示したように、成熟ラットでは、AVPの存在下で、Jvが強く促進されて、NaClと尿素の透過性のバランスが尿濃縮上重要な役割を果たしているが、日齢1では、Jvはいずれの条件下でも促進されず、尿素が尿濃縮にまったく寄与していないことが明らかとなった。

以上のごとく、単離尿細管機能の検討結果から、日齢7に至るまでの新生児ラットでは、腎髄質部への能動的NaCl蓄積機構が一過性に活性化し、尿素を利用した尿濃縮機構がまったく働かず、ヘンレーループでは水透過性が上行脚下行脚の両者で低く、成熟ラットとは異なる尿濃縮システムが機能していることが示唆された。

ヘンレーループでの輸送体蛋白発現の推移に関する検討

ヘンレーループの中でも、上行脚では、新生児ラットで細い上行脚ATLが当初太い上行脚の形態をとり、さらに変化することが示されている。そこで、太いヘンレの上行脚の管腔側細胞膜に発現しNaClの能動的再吸収をつかさどるrBSC-1と、細いヘンレの上行脚の細胞膜に発現し、受動的NaCl蓄積をつかさどるClC-K1輸送体を、それぞれ特異的ポリクローナル抗体で染色し、成熟ラットと比較した。

新生児ラットでは、腎髄質乳頭部から外層にわたって、rBSC-1がヘンレの上行脚の管腔側細胞膜に特異的に染色され、一方ClC-K1の染色は見られなかった。しかし、成熟ラットでは、rBSC-1は、特異的に髄質外層の上行脚管腔側細胞膜に、ClC-K1はATLの細胞膜のみに特異的に染色され、これら二つの輸送体の分布が、腎髄質乳頭部では、新生児と成熟ラットで逆転していることが明らかとなった。

輸送体遺伝子情報発現の推移に関する検討

さらに詳細に、各尿細管における水電解質輸送システムの成熟過程を明らかにするために、ヘンレの細い下行脚では、成熟ラットで特異的に発現している水チャンネルAQP-1のmRNA、ヘンレの上行脚では、やはり成熟ラットで特異的に細い上行脚に発現するClチャ

ンネルCIC-K1と太い上行脚に発現するNa-K-2Cl共輸送体rBSC-1のmRNA、さらに髄質部集合尿細管に発現し、AVPによりその活性が促進される水チャンネルAPQ-2および尿素輸送体UT-1のmRNAを、単離尿細管のRT-PCR法により半定量を行った。この結果、まずヘンレの細い下行脚では、日齢1ではAQP-1の発現が極めて弱く、日齢を追って急激に増加し、生後2週間では、ほぼ単位長の尿細管あたりの発現量が成熟ラットのレベルに達することが示された。一方、上行脚では日齢1では、CIC-K1の発現がまったく見られない一方で、成熟ラットには見られないrBSC-1が強く発現し、その後発現量がかなり低下傾向を示し、成熟ラットではわずかな発現にとどまった。CIC-K1では、日齢を追って発現が増加し、生後2週前後までには成熟ラットと同程度の発現があると考えられた。

【考察】

最近新生児期の尿濃縮機構が質的に成熟哺乳類と異なっているのではないかと示唆される事実が、ラット腎において30年ぶりに見直された。それは、腎髄質内層に存在する細いヘンレの上行脚が、新生児初期に太い上行脚の形態をとり、apoptosisとtransformationにより細いヘンレの上行脚に変化するという現象である[5]。これが、機能上どのような変化を意味するのかは、現時点で明らかではない。そこで、われわれはこの点を詳細に検討するため、新生児期のラットの尿細管機能を、イオン輸送体蛋白の形態学的解析、メッセージ発現の解析、および各単離尿細管の直接的機能解析を行った。

その結果、新生児初期に、水透過性を持たず能動的にNaClの再吸収を行い、尿素依存性の尿濃縮を行わない腎髄質部水・イオン輸送機構が中心となる一定の期間が存在し、その基本的機能は、鳥類の腎髄質部におけるヘンレループの基本的尿濃縮機構に類似することを見出した。すなわち、哺乳類では、出生直後に一過性に鳥類型のヘンレループが発現し、速やかに哺乳類本来の尿濃縮機構に質的機能転換を行って成熟型に移行すると考えられた。この結果は、新生児期になぜ尿濃縮力が選択的に未熟であるのかに関する重要な示唆であると同時に、哺乳類のヘンレループの発生過程を系統発生的に類推した場合にも、興味深いものといえる。

鳥類と哺乳類を比較してみると、多くの類似性が存在している。

両者は、唯一の恒温動物であり、陸棲であるために水分の不感蒸泄が大きい。この2種の動物のみが尿濃縮力とヘンレループをもつ。また、ともに後腎を成熟腎として利用し、皮質と髄質を持ち、ネフロン構造は3種類に分かれている。鳥類においては髄質近傍のネフロンだけがヘンレループを持ち、哺乳類ではやはり3種類に分かれ、すべてのネフロンにループが存在するものの、同じく髄質近傍のネフロンに選択的に長いヘンレのループが存在している[6]。

これらのことから、哺乳類の尿濃縮機構は、爬虫類から鳥類にいたるまで見られる尿酸の排泄による排泄水分量の節約の次に鳥類で出現したNaCl蓄積型の尿濃縮システムの上に

形成され、尿素を利用した濃縮システムがより効率の高い水分代謝機構だったために、尿素から尿酸への代謝過程が不都合なものとして退化し、現在の尿素依存型の濃縮システムへと転換を遂げたのかもしれない。

これまで哺乳類と鳥類では、ヘンレールの出現をめぐる、両者が別々に生まれたものではないかとの議論がなされてきた[2, 7]。その背景には、鳥類の哺乳類と根本的に異なるヘンレールの性質があった。それは、哺乳類のヘンレールの前半が著しく水透過性が高く、水の再吸収によって尿を濃縮しながら減少させ、後半では集合尿管に向かって水をまったく透過させずにNaClだけを受動的そして能動的に再吸収して、腎髄質の浸透圧勾配を維持しているのに対し、鳥類では、ヘンレールが全体にわたってまったく水を通さないという尿濃縮上、決定的とも考えられる違いが存在したからである。今回の我々の観察は、こうした中で、新生児期に、鳥類型のヘンレールが出現し、それがどのように哺乳類形に変わりうるかということを示唆しており、興味深い。

新生児期における鳥類型の腎髄質の存在は、系統発生的に当てはめると、羊水という水中環境から、哺乳類と言う陸上環境に移行したという意味で、鳥類がヘンレールの出現により尿濃縮力を初めて獲得した時期に相当するのではないかと推論させられてしまう。

結論付けることは到底出来ないが、鳥類におけるヘンレールの形成の後に哺乳類型のヘンレールが生まれたと考えるのは不自然ではないように思われる。このことは、鳥類と哺乳類の系統発生的距離が、必ずしも遠いとは限らない可能性を示唆しているかも知れないが、結論を出すことは現時点では不可能である。

【今後の課題】

今回観察された腎髄質部尿管の新生児期における質的転換過程が果たして、新生児期に特異的なものであるのか、あるいは種によって異なる現象を見ているのかは、いまだ定かでない。また、こうした総合的な質的転換を引き起こす因子は何なのかという点については、今回の研究成果はまったく答えていない。今後、こうした点に関する詳細な研究が必要と考えられた。また、系統発生的な研究に関しては、今後の分子生物学的なアプローチに期待するところが大変大きいといえる。

【文献】

1. Miwa T, Nishimura H: Diluting segment in avian kidney. II. Water and chloride transport. *Am J Physiol* 250:R341-R347, 1986
2. Nishimura H, Imai M, Ogawa M: Diluting segment in avian kidney. I. Characterization of transepithelial voltages. *Am J Physiol* 250:R333-R340, 1986
3. Imai M, Yoshitomi K: Heterogeneity of the descending thin limb of Henle's loop. *Kidney Int* 38:687-694, 1990
4. Baum MA, Ruddy MK, Hosselet CA, Harris HW: The perinatal expression of aquaporin-2 and aquaporin-3 in developing kidney. *Pediatr Res* 43:783-790, 1998
5. Kim J, Lee GS, Tisher CC, Madsen KM: Role of apoptosis in development of the ascending thin limb of the loop of Henle in rat kidney. *Am J Physiol* 271:F831-F845, 1996
6. Morild I, Bohle A, Christensen JA: Structure of the avian kidney. *Anat Rec* 212:33-40, 1985
7. Nishimura H, Koseki C, Patel TB: Water transport in collecting ducts of Japanese quail. *Am J Physiol* 271:R1535-R1543, 1996

Analysis on the process of maturation in the urine-concentrating mechanism in early-neonatal rat kidneys

Yoshiaki Kondo, Kazuie Inuma, Chiyoko N. Inoue, Tetsuji Morimoto, Wen Liu, Masashi Imai

Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine

Department of Pharmacology, Jichi Medical College

Summary

To answer to why the urine-concentrating ability is immature and diluting ability is mature in the neonate, we investigated the function and the expression of the ion transporters in the inner medullary tubules of early-neonatal rat kidneys. The renal tubules including the ascending thin limb (ATL), descending thin limb (DTL) and collecting duct (IMCD) were microdissected from fetal, neonatal and adult rat kidneys, and microperfused in vitro and transepithelial voltages (V_t), ionic diffusional potentials (V_d) of NaCl, diffusional water permeabilities, hydraulic conductivities, and urea permeabilities were measured.

On one day before birth, the V_t s of the ATLs were zero. On the day of birth, the average V_t s were 13.2 ± 1.6 mV ($n=11$, lumen positive). The lumen-positive V_t decreased gradually and became zero on day 5. On the day of birth, V_t was inhibited by 10^{-4} M ouabain in the bath from 7.5 ± 1.7 to 4.1 ± 1.8 mV ($n=6$, $p<0.01$). V_t was also inhibited by 10^{-4} M bumetanide or 1mM Ba^{++} added to the luminal solution. To characterize the V_d , the effects of 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate (NPPB) were examined. The V_d s evoked by 100 mM NaCl gradient across the ATL were genative at birth and were reversed on day 5. On day 0, NPPB did not decrease the V_d s induced by 100mM NaCl gradient across the ATLs. The magnitude of the effect of NPPB on the V_d s were greater depending on days after birth. On day 0, mRNAs for both rBSC-1 and ClC-K1 were detected in the ATL, while the message for rBSC-1 was not present in the adult ATL. Immunofluorescent studies using the polyclonal antibodies to both transporters revealed that the ATLs on day0 express only rBSC-1 in the luminal membrane, while the adult ATLs only express that ClC-K1 in both cell membranes.

The LDLs were impermeable to water at birth, and became permeable thereafter. The IMCDs were almost impermeable to water and urea in the absence of vasopressin at birth. The sensitivity to vasopressin of water and urea permeability became obvious after day 14.

These results indicate that neonatal inner medulla forms qualitatively different organization of the tubular function, which may lead to the low ability to concentrating urine in early-neonatal period.