

45

助成番号 0145

P-糖蛋白質による腎近位尿細管細胞の細胞容積調節とイオン輸送体の同定

助成研究者：武藤重明（自治医科大学腎臓内科）

共同研究者：宮田幸雄（自治医科大学腎臓内科）

*mdr1a*及び*mdr1b*を欠損したマウス(KO)とその野性型マウス(WT)の近位尿細管S2セグメントをcollapseした状態で灌流し、P-糖蛋白質の細胞容積調節における役割を解明した。血管側の浸透圧を300から180 mOsm/kgH₂Oに低下させると、細胞容積はWT、KOいずれも一過性の増加後に調節性容積減少(RVD)を認めた。WT、KOで、2つのP-gpの阻害薬(verapamil、cyclosporin A)存在下で、低浸透圧刺激を加えてもRVDは不変であった。KOにmannitolによる高浸透圧刺激(500 mOsm/kgH₂O)を加えると、細胞容積は一過性の減少後に調節性容積増加(RVI)を認めたが、WTでは細胞容積は減少したままで、RVIは出現しなかった。WTで、2つのP-gpの阻害薬存在下でmannitolによる高浸透圧刺激を加えるとRVIが出現したが、有機カチオン輸送体の阻害薬(tetraethylammonium)存在下でmannitolによる高浸透圧刺激を加えてもRVIは起こらなかった。KOでは、細胞外液Na除去やNa/H交換輸送体(NHE)の特異的阻害薬(ethylisopropylamiloride、EIPA)添加により、mannitolによる高浸透圧刺激で出現したRVIは完全に消失した。WTでは、P-gp阻害薬存在下でmannitolによる高浸透圧刺激を行った時に出現したRVIは、細胞外液Na除去やEIPA添加により完全に消失した。以上より、1)マウス近位尿細管では、P-gpは低浸透圧刺激時に出現するRVDには関与しない、2)P-gp活性非存在下では、mannitolによる高浸透圧刺激でRVIが起こるが、P-gp活性存在下では起こらない、3)高浸透圧刺激で出現するRVIは、血管側膜のNHEを介して起こる、ことが明らかになった。

助成番号 0145

P-糖蛋白質による腎近位尿細管細胞の細胞容積調節とイオン輸送体の同定

助成研究者：武藤重明 (自治医科大学腎臓内科)

共同研究者：宮田幸雄 (自治医科大学腎臓内科)

1. 研究目的

多剤耐性蛋白質であるP-糖蛋白質(P-gp)は、ATPの水解のエネルギーを利用して薬物を能動的に排泄するポンプで、その遺伝子はヒトではMDR1、マウスでは2種類、*mdr1a*及び*mdr1b*、が知られ、腎臓、小腸、などに分布している(1)。腎臓では近位尿細管細胞の管腔側膜に限局して発現がみられる(2-6)が、実際に薬物を排出しているかどうか不明であった。この疑問に対し、我々は、最近*mdr1a*及び*mdr1b*を欠損したマウス(KO)とその野生型マウス(WT)の近位尿細管を単離・灌流し、P-gpの基質で、蛍光を発するrhodamine-123(R-123)を用いて、薬物排泄能を検討し、KOではR-123の排泄が完全に抑制されていること、WTではP-gpの基質であるverapamilやcyclosporin Aを投与するとR-123の排泄が抑制され、KOと全く同様の現象がみられることを明らかにした(7)。また、KOの腎では、投与したdigoxinがWTに比し著明に蓄積することも報告している(7)。一方、P-gpは低浸透圧溶液で膨化した細胞が固有の容積に戻る調節性容積減少(regulatory volume decrease、RVD)の調節因子、RVDの出現に関わっているClチャンネルの調節因子であることがP-gpを過剰発現させた培養癌細胞で報告されている(8-10)。しかし、intactな近位尿細管上皮細胞での報告はない。また、高浸透圧溶液で収縮した細胞が固有の容積に戻る調節性容積増加(regulatory volume increase、RVI)にP-gpが関与しているかどうか不明である。そこで、本研究では、上記2種類のマウスの近位尿細管を用い、血管側膜を低浸透圧または高浸透圧溶液に曝した時の細胞容積調節機序を解析し、P-gpの細胞容積調節における役割を明らかにすることを目的とする。

2. 研究方法

2.1. 動物

本研究で使用したKO及びWTマウスは、Schinkelら(11)によって記載されたもので、米国Taconic社より購入した。

2.2. 尿細管微小灌流

雄性のKO及びWTマウスより、近位尿細管S2セグメントを単離し、Dellasegら(12)の方法に従ってcollapseした状態で、 HCO_3^- を含む等浸透圧溶液(300 mOsmol)

にて灌流し、血管側を低浸透圧溶液または高浸透圧溶液に置換した。使用した溶液の組成をTable 1に示す。

2.3. 尿細管容積の測定

尿細管容積を30秒毎に400倍で写真撮影した。近位尿細管を円筒とみなすと、その容積は

$$V = \pi(d/2)^2L$$

で表される。ここで、Vは尿細管容積、dは尿細管の外径、Lは尿細管の長さである。低浸透圧および高浸透圧溶液で得られたデータは、等浸透圧溶液の時の尿細管容積を100%として表現した。

2.4. 統計

データは平均値±標準誤差で表し、t検定またはFisher法により、p値が0.05以下を有意とした。

3. 研究結果

3.1. 低浸透圧刺激に対する細胞容積変化

2群のマウス近位尿細管を110 mMのNaClを含む等浸透圧溶液(solution 1, Table 1)で灌流後、50 mMのNaClと120 mMのmannitolを含む等浸透圧溶液(solution 2, Table 1)に10分間曝したが、細胞容積は不変であった。次に、WTで、solution 2の等浸透圧溶液で灌流後、solution 3の低浸透圧溶液(180 mOsmol, Table 1)にすると、細胞容積は133%増加し、その後緩徐に減少し10分後には115%になった。すなわち、RVDが出現した(Fig. 1A)。同様に、KOでも、solution 2の等浸透圧溶液からsolution 3の低浸透圧溶液(Table 1)に変更すると、細胞容積は急激に増加し、129.5%を示し、その後、緩やかに減少し、10分後には111.8%となった(Fig. 1B)。次に、2つのP-gp阻害薬(verapamil, cyclosporin A)存在下で、低浸透圧刺激を加えた時の細胞容積変化を観察した。WT、KO共に、verapamil, cyclosporin A投与前後で細胞容積は不変であった(Fig. 2)。これら阻害薬存在下で、solution 3の低浸透圧溶液を加えると、細胞容積は一過性の増加後、RVDを認めた(Fig. 2)。

3.2. 高浸透圧刺激に対する細胞容積変化

WTで、solution 1(Table 1)の等浸透圧溶液で灌流後、solution 4のmannitolを添加した高浸透圧溶液(500 mOsmol)に変更すると、細胞容積は82.1%に減少したままで、10分間不変であった(Fig. 3A)。一方、KOでは、mannitolによる高浸透圧刺激を加えると、細胞容積は一過性に79.9%に減少後、徐々に増加し10分後には87.7%に達した。すなわち、RVIを認めた(Fig. 3C)。

ureaによる高浸透圧刺激では、mannitolとは全く異なった細胞容積変化を示した。WT、KO共に、solution 1の等浸透圧溶液で灌流後、solution 5のureaによる高浸

透圧溶液(500 mOsmol, Table 1)に変更すると、細胞容積はそれぞれ88.5%、87.0%に一過性に減少後、2.5分以内に前値に戻った(Fig. 3B、3D)。solution 1に戻すと細胞容積はovershoot後速やかに前値に復した。

次に、P-gpの阻害薬前処置後にmannitolによる高浸透圧刺激を加えた時の細胞容積変化を観察した。WTでは、verapamil cyclosporin A前処置後にmannitolによる高浸透圧刺激を加えると、細胞容積は一過性の減少後RVIを認めた(Fig. 4A、4B)。一方、KOでは、verapamilまたはcyclosporin A存在下では、非存在下と同様にRVIが出現した(Fig. 4C、4D)。

WTでは、有機カチオン輸送体の阻害薬であるtetraethylammonium (TEA)存在下で、mannitolによる高浸透圧刺激を加えても、細胞容積は減少したままでRVIは出現しなかった(Fig. 5)。

次に、高浸透圧刺激時に出現するRVIに関与しているイオン輸送体を同定するため、細胞外液のNa除去、Na/H交換輸送体(NHE)の特異的阻害薬のethylisopropylamiloride(EIPA)添加による細胞容積変化を観察した。WTでは、verapamil、cyclosporin A存在下でmannitolによる高浸透圧刺激を加えた時に出現したRVIは、細胞外液Na除去(Fig. 6A、6B)やEIPA添加(Fig. 7A、7B)により完全に消失した。KOでも、細胞外液Na除去(Fig. 8)、EIPA添加(Fig. 10)により、mannitolによる高浸透圧刺激で出現したRVIは完全に抑制された。

4. 考察

4.1. 低浸透圧刺激に対する細胞容積変化

今回の我々の研究では、WT近位尿細管に低浸透圧刺激を加えると、細胞容積の一過性の増加後にRVDが出現することが観察された。同様の所見は、正常なウサギ近位曲尿細管(13、14)、近位直尿細管(12、15、16)でも報告されている。Valverdeら(10)は、*mdr1a*を導入したChinese hamster ovary cellでは、低浸透圧刺激でRVDが出現するが、P-gpを発現していない細胞ではRVDが起らないことを報告している。Romanら(9)も、P-gpを発現しているHTC-Rhematoma cellではRVDが出現し、これはP-gpの阻害薬であるverapamilの投与によって抑制されることを報告している。これらの報告より、我々はKOでは低浸透圧刺激でRVDが起らないことを予測したが、結果はこの予測とは大きく異なり、WTと同様にRVDが出現した。従って、マウス近位尿細管ではP-gpが低浸透圧刺激時に出現するRVDには関与していないことが判明した。

4.2. 高浸透圧刺激に対する細胞容積変化

WTの近位尿細管では、mannitolによる高浸透圧刺激をしてもRVIは出現しなかった。同様の所見は、正常ウサギ近位曲尿細管(13)、近位直尿細管(15)でも報告されている。一方、KOの近位尿細管では、mannitolによる高浸透圧刺激でRVIが出現した。さらに、WTではP-gpの阻害薬存在下でmannitolによる高浸透圧刺激を加えると

RVIが出現するが、TEA存在下ではRVIが起こらなかった。以上より、P-gp活性をP-gp阻害薬により急性に抑制した場合、P-gp活性をmdr1a、mdr1b遺伝子の欠損により抑制した場合、いずれもmannitolによる高浸透圧刺激でRVIが出現することが明らかとなった。

管腔内をcollapseした状態で実験を施行しているため、管腔側膜ではなく、血管側膜のイオン輸送体がRVIに関与していることが予想された。実際に、細胞外液Na除去やEIPA添加により、RVIが完全に消失したことより、血管側膜のNHEがRVIに寄与していることが判明した。

mannitolとは対照的に、ureaによる高浸透圧刺激に対する細胞容積変化は全く異なっていた。WT、KO共に、一過性の細胞容積の減少後、速やかに元の容積に戻った。Urea存在下での細胞容積変化はsimple diffusionの結果であり、細胞容積調節によるものではないことが考えられた。また、ureaによる高浸透圧刺激に対する細胞容積変化はp-gpとは無関係であることも明らかになった。

5. 今後の課題

血管側膜のNHEがmannitolによる高浸透圧刺激で本当に活性化されるのか、今後検討したいと考えている。また、NHEの細胞内シグナリングの機序としてprotein kinase Cの活性化が他の細胞で想定されており、この点についても検討予定である。

6. 文献

- 1) Gottesman M, and Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by multidrug transporter. *Ann Rev Biochem* 62: 385-427, 1993.
- 2) Ernest S, and Bello-Reuss E. Expression and function of P-glycoprotein in a mouse kidney cell line. *Am J Physiol* 269 : C323-333, 1995.
- 3) Ernest S, Rajaraman S, Megyesi J, and Bello-Reuss E. Expression of MDR1 (multidrug resistance) gene and its protein in normal human kidney. *Nephron* 77: 284-789, 1997.
- 4) Horio M, Pastan I, Gottesman MM, and Handler JS. Transepithelial transport of vinblastin by kidney-derived cell lines. Application of a new kinetic model to estimate in situ K_m of the pump. *Biochim Biophys Acta*. 1027: 116-122, 1990.
- 5) Saeki T, Ueda K, Tanigawa Y, Hori R, and Komano T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem* 268: 6077-6080, 1993.
- 6) Tanigawa Y, Okamura N, Hirai M, Yasuhara M, Ueda K, Kioka N, Komano T, and Hori R. Transport of digoxin by human p-glycoprotein expressed in a porcine kidney cell line (LLC-PK₁). *J Pharmacol Exp Ther* 263: 840-845, 1992.
- 7) Tsuruoka S, Sugimoto K, Fujimura A, Imai M, Asano Y, and Muto S. P-glycoprotein-mediated drug secretion in mouse proximal tubule perfused in vitro. *J Am Soc Nephrol* 12: 177-181, 2001.
- 8) Altenberg GA, Vanoye CG, Han ES, Deitmer JW, and Reuss L. Relationships between

rhodamine 123 transport, cell volume, and ion-channel function of P-glycoprotein. *J Biol Chem* 269: 7145-7149, 1994.

9) Roman RM, Wang Y, Lidofsky SD, Feranchak AP, Lomri N, Scharschmidt BF, and Fitz JG. Hepatocellular ATP-binding cassette protein expression enhances ATP release and autocrine regulation of cell volume. *J Biol. Chem* 272: 21970-21976, 1997.

10) Valverde MA, Bond TD, Hardy SP, Taylor JC, Higgins CF, Altamirano J, and Alvarez-Leefmans FJ. The multidrug resistance P-glycoprotein modulates cell regulatory volume decrease. *EMBO J* 15: 4460-4468, 1996.

11) Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CAAM, van Deemter L, Smit JJM, van der Valk M, Voordouw AC, Spit H, van Tellingen O, Zijlamans JMJM, Fibbe WE, and Borst P. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 15: 4028-4033, 1997.

12) Dellasega M, and Grantham JJ. Regulation of renal tubule cell volume in hypotonic media. *Am J Physiol* 224: 1288-1294, 1973.

13) Gagnon J, Ouimet D, Nguyen H, Laprade R, Le Grimellec C, Carriere S, and Cardinal J. Cell volume regulation in the proximal convoluted tubule. *Am J Physiol* 243: F408-F415, 1982.

14) Macri P, Breton S, Beck JS, Cardinal J, and Laprade R. Basolateral K^+ , Cl^- , and HCO_3^- conductances and cell volume regulation in rabbit PCT. *Am J Physiol* 264: F365-F376, 1993.

15) Lohr JW and Grantham JJ. Isovolumetric regulation of isolated S2 proximal tubules in anisosmotic media. *J Clin Invest* 78: 1165-1172, 1986.

16) Welling PA and O'Neil RG. Cell swelling activates basolateral membrane Cl and K conductances in rabbit proximal tubule. *Am J Physiol* 258: F951-F962, 1990.

Table 1. Composition of solutions

	Solution						
	1	2	3	4	5	6	7
NaCl	110	50	50	110	110		
Mannitol		120		200			200
Urea					200		
mosmol/kgH ₂ O	300	300	180	500	500	300	500

Concentration is in mM. Solutions 1-5 contained in addition (in mM) 5 KCl, 25 NaHCO₃, 10 Na-acetate, 0.8 Na₂HPO₄, 0.2 NaH₂PO₄, 1.8 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 8.3 glucose, and 5 L-alanine. Solutions 6 and 7 contained in addition (in mM) 3 KCl, 0.8 K₂HPO₄, 0.2 KH₂PO₄, 1.8 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 122 choline-Cl, 25 choline-HCO₃, 8.3 glucose, and 5 L-alanine. All solutions were equilibrated with 5% CO₂-95% O₂.

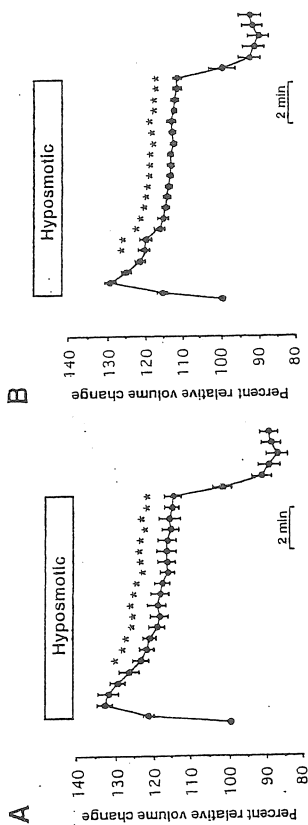


Fig. 1. Effects of hyposmotic solution on cell volume in isolated nonperfused proximal tubule S2 segments from wild-type (WT; A) and knockout (KO; B) mice. Both groups of tubules were initially bathed in solution 2 and were then treated with solution 3 for 10 min. Values are means \pm SE of 6 tubules from WT and KO mice and are expressed as a percentage relative to the control isosmotic tubule cell volume treated with solution 2. * $P < 0.05$ vs. maximum cell volume increase.

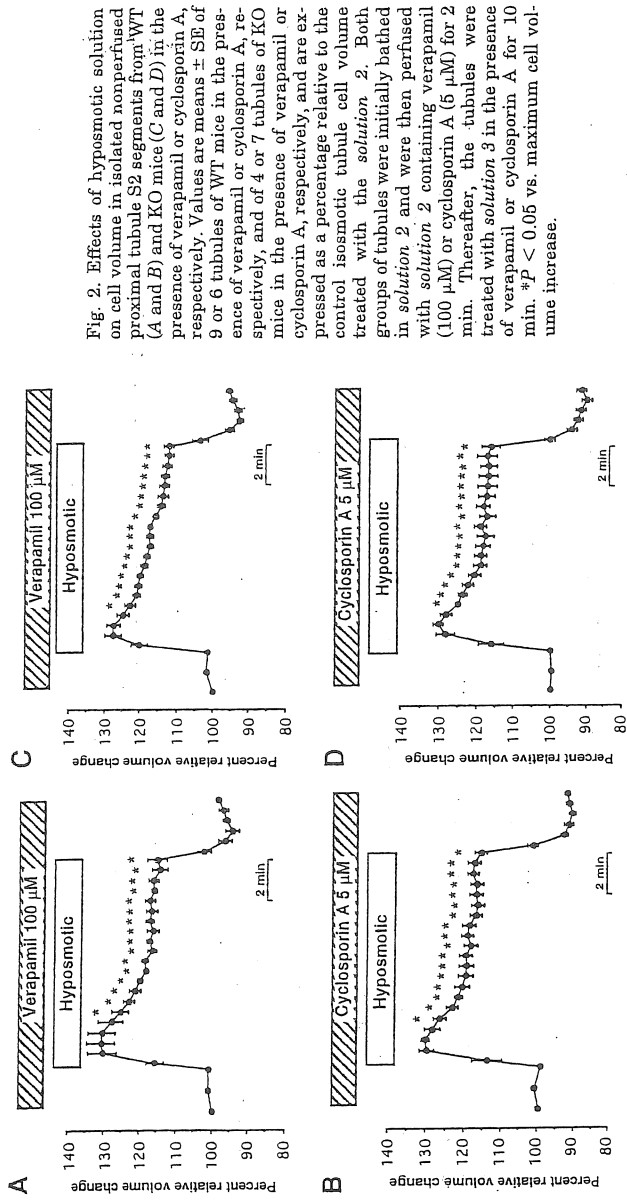


Fig. 2. Effects of hyposmotic solution on cell volume in isolated nonperfused proximal tubule S2 segments from WT (A and B) and KO mice (C and D) in the presence of verapamil or cyclosporin A, respectively. Values are means \pm SE of 9 or 6 tubules of WT mice in the presence of verapamil or cyclosporin A, respectively, and of 4 or 7 tubules of KO mice in the presence of verapamil or cyclosporin A, respectively, and are expressed as a percentage relative to the control isosmotic tubule cell volume treated with the solution 2. Both groups of tubules were initially bathed in solution 2 and were then perfused with solution 2 containing verapamil (100 μM) or cyclosporin A (5 μM) for 2 min. Thereafter, the tubules were treated with solution 3 in the presence of verapamil or cyclosporin A for 10 min. * $P < 0.05$ vs. maximum cell volume increase.

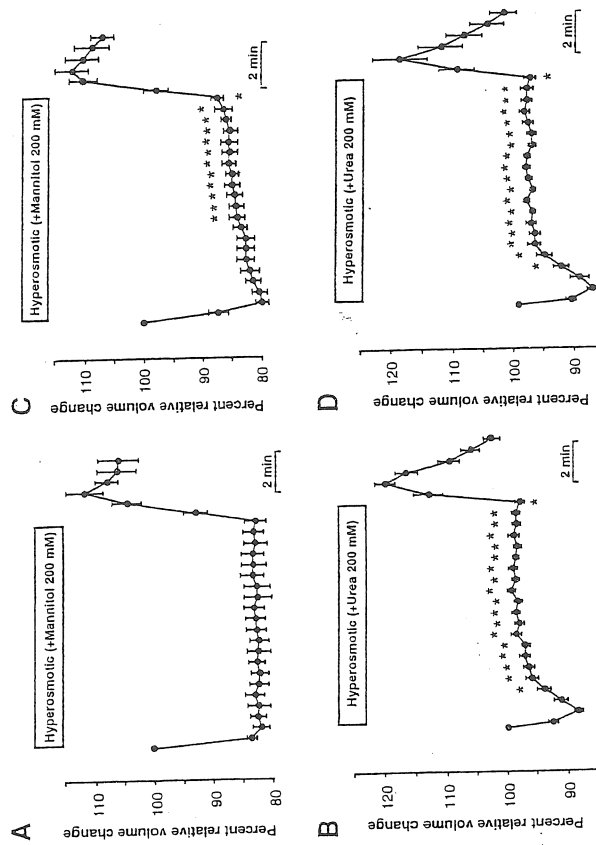


Fig. 3. Effects of hyperosmotic solution on cell volume in isolated nonperfused proximal tubule S2 segments from WT and KO mice. Both groups of tubules were initially bathed in the solution 1 and were then treated with solution 4 or 5 for 10 min. Values are means \pm SE of 6 or 8 tubules from the WT mice in the presence of mannitol (A) or urea (B), respectively, and 6 or 7 tubules from the KO mice in the presence of mannitol (C) or urea (D), respectively, and are expressed as a percentage relative to the control isosmotic tubule cell volume treated with solution 1. * $P < 0.05$ vs. maximum cell volume decrease.

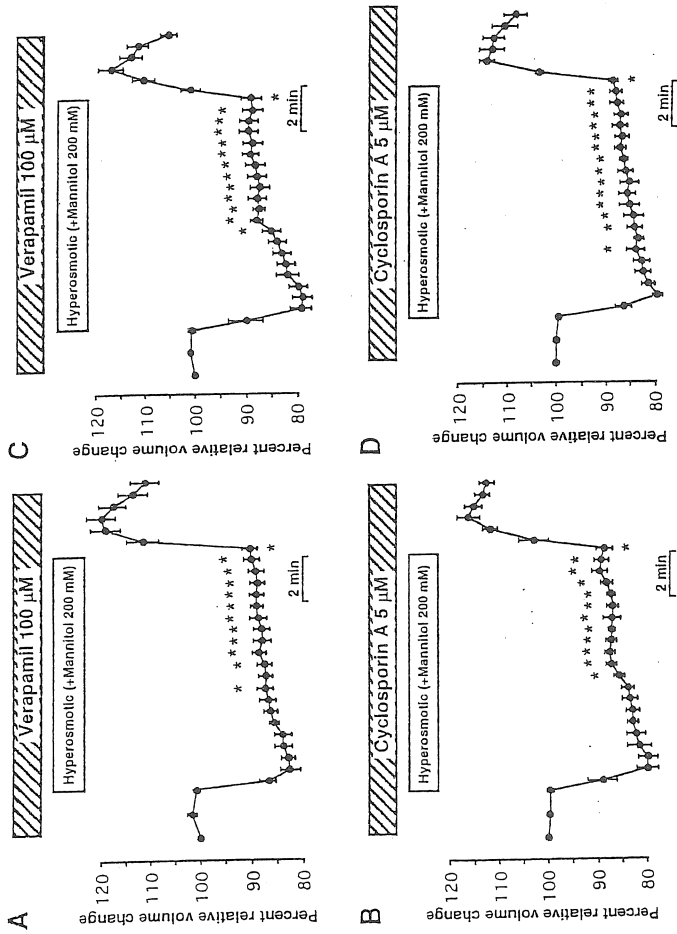


Fig. 4. Effects of hyperosmotic solution with mannitol on cell volume in isolated nonperfused proximal tubule S2 segments from the WT and KO mice in the presence of verapamil or cyclosporin A. Values are means \pm SE of 7 or 4 tubules of WT mice in the presence of verapamil (A) or cyclosporin A (B), respectively, and of 6 tubules of KO mice in the presence of verapamil (C) or cyclosporin A (D) and are expressed as a percentage relative to the control isosmotic tubule cell volume treated with the solution 1. Both groups of tubules were initially bathed in solution 1 and were then perfused with solution 1 containing verapamil (100 μ M) or cyclosporin A (5 μ M) for 2 min. Thereafter, the tubules were treated with solution 4 in the presence of verapamil or cyclosporin A for 10 min. * P < 0.05 vs. maximum cell volume decrease.

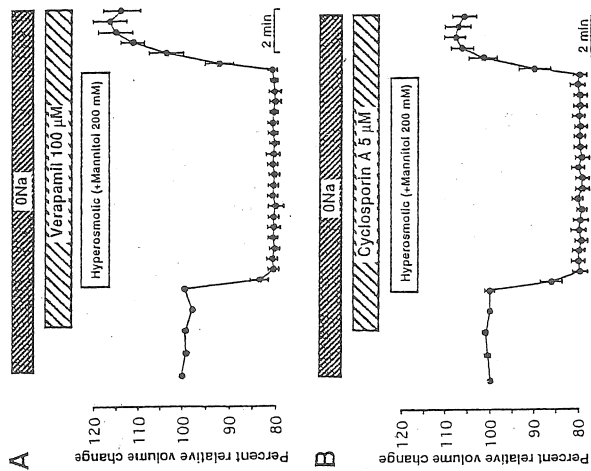


Fig. 6. Effects of hyperosmotic mannitol solution containing verapamil (A) or cyclosporin A (B) in the absence of peritubular Na^+ on cell volume in isolated nonperfused proximal tubule S2 segments from WT mice. Values are means \pm SE of 5 tubules from WT mice in the presence of verapamil or cyclosporin A and are expressed as a percentage relative to the control, isosmotic tubule cell volume treated with the solution 1. The tubules were initially bathed in solution 1 and were then perfused with solution 6 for 2 min. Thereafter, the tubules were treated with solution 6 containing verapamil (100 μM) or cyclosporin A (5 μM) for 2 min and were finally exposed to solution 7 including verapamil or cyclosporin A for 10 min.

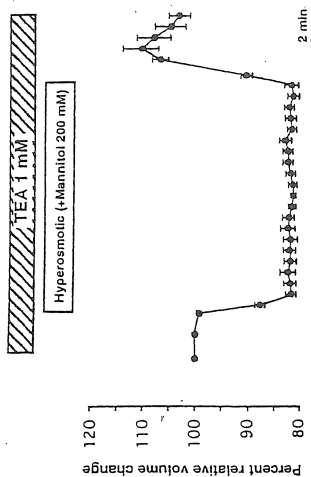


Fig. 5. Effects of hyperosmotic solution with mannitol on cell volume in isolated nonperfused proximal tubule S2 segments from WT mice in the presence of tetraethylammonium (TEA). Values are means \pm SE of 5 tubules and are expressed as a percentage relative to the control isosmotic tubule cell volume treated with solution 1. The tubules were initially bathed in solution 1 and were then perfused with solution 1 containing TEA (1 mM) for 2 min. Thereafter, the tubules were treated with solution 4 in the presence of TEA for 10 min.

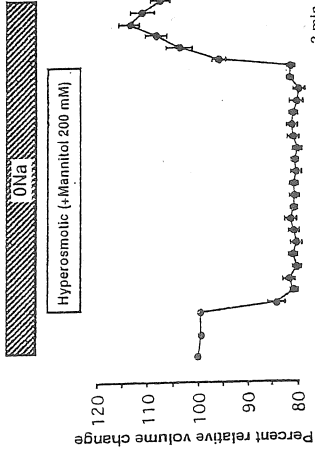


Fig. 8. Effects of hyperosmotic solution with mannitol in the absence of peritubular Na^+ on cell volume in isolated nonperfused proximal tubule S2 segments from KO mice. The tubules were initially bathed in solution 1 and were then perfused with solution 6 for 2 min. Thereafter, the tubules were treated with solution 7 for 10 min. Values are means \pm SE of 6 tubules from KO mice and are expressed as a percentage relative to the control isosmotic tubule cell volume treated with solution 1.

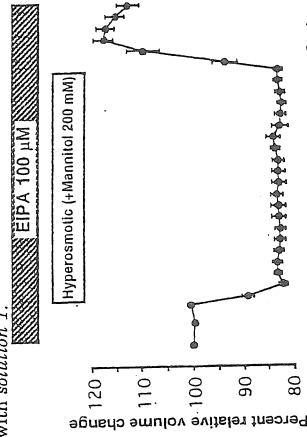


Fig. 9. Effects of hyperosmotic solution with mannitol in the presence of peritubular EIPA on cell volume in isolated nonperfused proximal tubule S2 segments from KO mice. The tubules were initially bathed in solution 1 and were then perfused with solution 1 containing EIPA (100 μM) for 2 min. Thereafter, the tubules were treated with solution 4 including EIPA for 10 min. Values are means \pm SE of 6 tubules from KO mice and are expressed as a percentage relative to the control isosmotic tubule cell volume treated with solution 1.

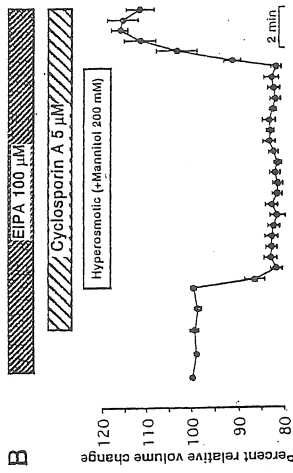
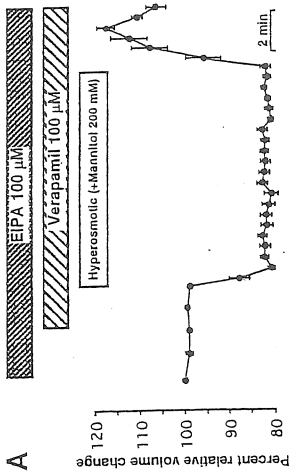


Fig. 7. Effects of hyperosmotic mannitol solution containing verapamil or cyclosporin A in the presence of peritubular ethylisopropylamide (EIPA) on cell volume in isolated nonperfused proximal tubule S2 segments from WT mice. Values are means \pm SE of 4 or 5 tubules from WT mice in the presence of verapamil (A) or cyclosporin A (B), respectively, and are expressed as a percentage relative to the control isosmotic tubule cell volume treated with solution 1. The tubules were initially bathed in solution 1 and were then perfused with solution 1 containing EIPA (100 μM) for 2 min. Thereafter, the tubules were treated with solution 1 containing EIPA and verapamil (100 μM) or cyclosporin A (5 μM) for 2 min, and were finally exposed to solution 4 including EIPA and verapamil (100 μM) or cyclosporin A for 10 min.

Cell volume regulation by P-glycoprotein in mouse proximal tubule

Shigeaki Muto, Yukio Miyata

Department of Nephrology, Jichi Medical School

Summary

The role of P-glycoprotein (P-gp) in cell volume regulation was examined in isolated nonperfused proximal tubule S2 segments from wild-type (WT) mice and those in which both *mdr1a* and *mdr1b* genes were knocked out (KO). When the osmolality of the bathing solution was rapidly decreased from 300 to 180 mOsm/kgH₂O, the tubules from both WT and KO mice exhibited regulatory volume decrease (RVD) by a similar magnitude after the initial cell swelling. The peritubular addition of two P-gp inhibitors (verapamil, cyclosporin A) to either group of the tubules had no effect on RVD. When the tubules from the WT mice were rapidly exposed to a hyperosmotic solution (500 mOsm/kgH₂O) including 200 mM mannitol, they abruptly shrank to 82.1% of their control volume but remained in a shrunken state during the experimental period, indicating a lack of regulatory volume increase (RVI). The addition of the two P-gp inhibitors, but not the inhibitor of the renal organic cation transport system, to the tubules from the WT mice resulted in RVI. Surprisingly, when the tubules from the KO mice were exposed to the hyperosmotic solution, they abruptly shrank to 79.9% of their control volume, and then gradually swelled to 97.7% of their control volume, showing RVI. However, exposure of the tubules from the WT mice to the hyperosmotic solution in the presence of the two P-gp inhibitors had no effect on RVI. When the tubules of the WT mice were exposed to the hyperosmotic solution including either of the two P-gp inhibitors, in the absence of peritubular Na or in the presence of peritubular ethylisopropylamiloride (EIPA, the specific inhibitor of Na/H exchanger), they did not exhibit RVI. In the tubules of the KO mice, both removing peritubular Na and adding peritubular EIPA inhibited RVI induced by the hyperosmotic solution. We conclude that 1) in mouse proximal tubule, P-gp modulates RVI during hyperosmotic stress, but not RVD during hyposmotic stress and 2) basolateral Na/H exchange partly contributes to the P-gp-induced modulation of RVI under hyperosmotic stress.