

発表番号 53 (0433)

## 腎内カルシウム輸送体と同センサー発現の成熟過程に関する発生的解析

根東 義明 (東北大学医学情報学分野)  
飯沼 一字 (東北大学小児病態学分野)  
西尾 利之 (東北大学小児病態学分野)  
熊谷 直憲 (東北大学小児病態学分野)

尿濃縮機構の成熟過程における機能の変化は新生児期に著しく、質的転換とも呼べる。これに呼応して、カルシウムの再吸収を調節する腎内カルシウム輸送体・センサーの発現も著しい変化を起こす。

これらを検討するため、成熟および新生仔マウスより腎髄質部ヘンレの太い上行脚(以下 mTAL と略)を微小単離灌流し、細胞内 pH(以下 pHi と略)に及ぼすカルシウム受容体(以下 CaSR と略)の作用をカルシウム類似作用薬 Neomycin(以下 NEO と略)を用いて検討した。

NEO は、HEPES 緩衝液中で管腔側から投与しても pHi に影響を与えなかったが、血液側から投与した際には、pHi を1分間で  $7.29 \pm 0.04$  (n=9)から  $7.10 \pm 0.02$  (n=7)へと酸性化した。NEOと同じCaSRの促進薬である

Gentamicin(以下 GENと略)および Gadolinium(以下 Gd と略)も、NEOと同様にそれぞれ0.2 mMおよび30  $\mu$ Mで細胞内酸性化を引き起こした。また、浴液側でのCa濃度の上昇も同様に細胞内酸性化を起こした。このNEOの細胞内酸性化は、全溶液中のNa除去・管腔内あるいは血液側アミロライド(1 mM)、さらには管腔内ブメタニド(0.1 mM)投与で抑制されず、溶液中からのクロライドイオン除去で消失した。NEOによる細胞内酸性化は日齢0ないし1日マウスでは存在せず、日齢7日以降に出現した。

以上の結果から、マウス mTAL では、新生児期以後に血液側細胞膜上にCaSRが発現し、Cl依存性機序により細胞内酸性化をひき起こすことが示唆された



助成番号 0433

## 腎内カルシウム輸送体と同センサー発現の成熟過程に関する発生学的解析

根東 義明 (東北大学医学情報学分野)  
 飯沼 一字 (東北大学小児病態学分野)  
 西尾 利之 (東北大学小児病態学分野)  
 熊谷 直憲 (東北大学小児病態学分野)

## 要 約

尿濃縮機構の成熟過程における機能の変化は新生児期に著しく、質的転換とも呼べる。これに呼応して、カルシウムの再吸収を調節する腎内カルシウム輸送体・センサーの発現も著しい変化を起こす。

これらを検討するため、成熟および新生仔マウスより腎髄質部ヘンレの太い上行脚(以下 mTAL と略)を微小単離灌流し、細胞内 pH(以下 pHi と略)に及ぼすカルシウム受容体(以下 CaSR と略)の作用をカルシウム類似作用薬 Neomycin(以下 NEO と略)を用いて検討した。NEO は、HEPES 緩衝液中で管腔側から投与しても pHi に影響を与えなかったが、血液側から投与した際には、pHi を1分間で  $7.29 \pm 0.04$  (n = 9) から  $7.10 \pm 0.02$  (n = 7) へと酸性化した。NEO と同じ CaSR の促進薬である Gentamicin(以下 GEN と略)および Gadolinium(以下 Gd と略)も、NEO と同様にそれぞれ 0.2 mM および 30  $\mu$ M で細胞内酸性化を引き起こした。また、浴液側での Ca 濃度の上昇も同様に細胞内酸性化を起こした。この NEO の細胞内酸性化は、全溶液中の Na 除去・管腔内あるいは血液側アミロライド(1 mM)、さらには管腔内ブメタニド(0.1 mM) 投与で抑制されず、溶液中からのクロライドイオン除去で消失した。NEO による細胞内酸性化は日齢 0 ないし 1 日マウスでは存在せず、日齢 7 日以降に出現した。

以上の結果から、マウス mTAL では、新生児期以後に血液側細胞膜上に CaSR が発現し、Cl 依存性機序により細胞内酸性化をひきおこすことが示唆された。

## ①研究目的

哺乳類では、出生を契機に、羊水・胎盤を基本とする母体依存から、哺乳・肺呼吸による自立環境へと急激に環境が変化する。さらに出生後、離乳に際しては、水分保持のための尿濃縮機構の発達が重要な生理的課題となる。

系統発生学的に、尿濃縮機構は鳥類と哺乳類のみが保持する機能である。この 2 種のみヘンレのループが存在し、この 2 種のみが恒温動物である点は興味深い。ヘンレループが尿濃縮に欠くことのできない構造であることは、最近の生理学的<sup>[1]</sup>および分子生物学的研究手法<sup>[2,3]</sup>の進歩により明らかとなってきた。

ヘンレの細い上行脚(以下 tAL と略)の細胞膜に存在するクロールチャンネル CLC-K1 は、従来の研究成果から、腎髄質内層の高い NaCl 濃度を維持する上で重要な役割を果たすと考えられている<sup>[4-8]</sup>。CLC-K1 ノックアウトマウスは腎性尿崩症を引き起こすことが知られている<sup>[3]</sup>。また、近位尿細管やヘンレの下行脚の水チャンネル AQP-1 のノックアウトも腎性尿崩症が引き起こす<sup>[2]</sup>。

哺乳類の新生児期は、尿の希釈レベルが新生児期初期にはすでに成熟個体並みであるにもかかわらず、尿の

濃縮レベルが低く、ラットで生後 4 週間、ヒトでは 2 ヶ月から 1 歳にようやく成熟個体のレベルに到達する<sup>[9,10]</sup>。哺乳類が長く途絶えた場合には、成熟した個体よりも早く脱水に陥る<sup>[11]</sup>。これまでの研究の成果から、1) 新生児期はヘンレループが短い、2) 抗利尿ホルモン感受性が低い<sup>[12,13]</sup>、3) プロスタグランディンの産生が強いなどが指摘されて来た。また、ラットで浅在ネフロンへのンレループが出生時には腎皮質内に留まり、尿濃縮力の未熟性の一因と考えられた<sup>[11]</sup>。

1996 年に Kim らが大変興味深い知見を明らかにした<sup>[14]</sup>。ヘンレの細い上行脚が新生児ラットでは太い上行脚の形態をとり、その後速やかにアポトーシスによって細い上行脚へと形態変化するという観察結果で、ヒト新生児腎でも 1920 年代に示唆されていたが<sup>[15]</sup>、その後詳細に検討されていなかった。1890 年に解析された腎髄質部の所見では、腎髄質内層が新生児期には存在しないと表現されていた<sup>[16]</sup>。我々は、Kim ら<sup>[14]</sup>の新知見である新生児ラットの細いヘンレの上行脚の形態変化に強い関心を持ち、新生児ラットの腎髄質部尿細管の水・電解質輸送特性を、分子生物学的・形態学および生理学的手法のすべてを用いて解析した。

その結果、単に腎髄質部の機能が量的に低いということではなく、それ以上に質的にその機能構成が異なっていることを見出した。この「新生児型」の髄質部尿細管の機能構成は、あるいは「鳥類型」とも呼べるほど成熟時とは異なるもので、具体的には、(1)ヘンレープ全体に渡って水透過性が存在しない、(2)ヘンレの上行脚全体に渡って、クローリイオンの能動輸送が存在する、(3)ヘンレの上行脚には、成熟時に見られる高度な受動的クローリイオン透過性が存在しない、(4)髄質部集合尿細管には、能動的かつ起電的なアミロライド感受性ナトリウム再吸収能が存在する、(5)髄質部集合尿細管では、抗利尿ホルモンの存在の有無にかかわらず、尿素を利用した水の再吸収能が見られない、などがその特徴として挙げられた。

実は、これらの観察結果は、すべて鳥類の腎臓に共通する特徴と同じであり、結果的に、新生児では腎髄質部にNaClのみを貯留させて高浸透圧環境を構築する尿濃縮機構が存在し、尿素を用いた哺乳類独特の尿濃縮機構が出現していないという事実を示唆するものだった。

カルシウム代謝は尿濃縮機構に深く関与する。実際に、高カルシウム血症では、カルシウム受容体 CaSR を介して、とくにヘンレの太い上行脚での NaCl 再吸収機構の抑制が起こるため、尿濃縮の抑制による多尿が出現することは周知の事実である。最近研究代表者は、尿濃縮機構質的転換過程と極めて深い関係にある新生児期の腎内カルシウム輸送に注目した。体液の Ca 調節が副甲状腺の CaSR を介することは周知の事実だが、副甲状腺によるカルシウム代謝調節とは別に、腎尿細管各部位には CaSR が存在し、カルシウム輸送の調節を行っている。不思議なことに、CaSR は近位尿細管と集合管では管腔側に、ヘンレの太い上行脚では血液側に、部位によって異なる分布を示す。これら尿細管に発現する CaSR が尿濃縮と深くかかわることは、高カルシウム血症における多尿の発生からも指摘されており<sup>[17]</sup>、大変興味深い。

最近の我々の研究成果からは、腎内 CaSR が副甲状腺の Ca 代謝調節の及ばない尿細管腔と髄質部でカルシウム濃度調節を行い、腎内での Ca 結晶化の阻止を目的として尿濃縮機構を2次的に調節しているという新たな仮説を立て得る。この視点からは、新生児期低カルシウム血症・痙攣や低出生体重児の腎結石症などのカルシウムの代謝異常が、副甲状腺機能の異常以上に、腎内 CaSR の発達と尿濃縮機構の質的転換過程の両面から再検討されなければならないことになる。

今回、我々は一連の研究の成果として、CaSR が mTAL において血液側から細胞内アルカリ化を引き起こ

すという新たな知見を得た。この細胞内アルカリ化について、詳細な検討を進める中で、その現象が血液側細胞膜における Cl 輸送と密接なかわりを持ち、かつ新生児期に急速に発達するという特徴を持った機能であることを明らかにした。

## ②研究方法

### 1. マウスからの腎の摘出と微小単離用切片の作成

水分および飼料に自由アクセスとしたマウス(C57/BL)より頸椎捻転後に開腹し、両側腎を摘出後、4℃に冷却した HEPES 緩衝リンゲル液中に移した。摘出した腎は、ピンセットを用いて、腎髄質および皮質を含む扇状の組織切片に切り出し、実体顕微鏡上に設置されたペトリ皿の上に移し、透過視野および暗視野において尿細管が詳細に観察できる条件を設定した。実体顕微鏡下に、2本のピンセットを用いて皮質部近位曲尿細管および髄質外層ヘンレの太い上行脚を単離した。

単離した尿細管は、トランスファーピペットを用いて、倒立顕微鏡(Olympus, IX-71)のステージ上に設置した灌流型の浴液槽(チャンバー)に移した。チャンバーは常に灌流される溶液を事前に 37℃に加温することにより、恒温実験条件を設定し、生理的な温度環境を構築した。

### 2. 尿細管の微小単離灌流

単離した尿細管は、ナリング製微小単離尿細管灌流装置(ナリング、東京)により、管腔内に灌流用微小ガラス管を挿入して、管腔内灌流も行った。このことにより、尿細管の管腔側および血液側に含まれる溶液の成分を選択的に変更し、引き起こされる尿細管機能の変化を確認できるようにした。

### 3. 細胞内イオン活性の測定

細胞内イオン活性の測定には、顕微蛍光測光装置(AQUACOSMOS、浜松フォトリクス、浜松市)を用いた。細胞内 pH(以下 pHi と略)の測定には BCECF-AM を用い、チャンバーに投与して細胞内に取り込ませ、細胞内エステラーゼの作用による加水分解で、蛍光活性を持った BCECF としてそれぞれのイオン活性測定に供した。

## ③研究結果

### 1. 微小単離灌流 mTAL における pHi のキャリブレーション

尿細管における pHi を実測するため、Hepes 緩衝リンゲル液において、mTAL の周囲の溶液中の K 濃度を Na との置換により 100 mM とし、nigericin を溶液中に投与した上で、溶液中の pH を酸性領域からアルカリ性領域まで変化させて、細胞内外の pH が等しい条件での細胞内

BCECF の蛍光測光を行うことにより、BCECF による pHi 測定結果のキャリブレーションを行った。測定結果の具体的データ例を図 1 に示す。図 2 のごとく、Hepes 緩衝リソゲル液の pH を変化させることにより、BCECF の蛍光測光値(蛍光強度比)が直線的に変化し、BCECF によって pHi が正確に測定されることが示された。

**2. CaSR 刺激薬 neomycin(以下 NEO と略)、gentamicin(以下 GEN と略)、gadolinium(以下 Gd と略)の pHi に及ぼす作用の検討**

つぎに、pHi に及ぼす CaSR 刺激薬 calcimimetics の作用を、複数の刺激薬について検討した。図 3 に示すごとく、0.2 mM NEO(図 3b)、0.2 mM GEN(図 3c)および

30  $\mu$ M Gd(図 3d)のいずれもが、血液側から加えられた際には pHi を酸性化することが示された。また、血液側から加えられた高濃度 Ca イオン(4.5 mM)も同様に細胞内酸性化を引き起こすことが示された(図 3e)。0.2 mM NEO は、管腔内に投与した際には pHi を変化させず、CaSR 刺激による pHi の変化は血液側に限られることが示された。

一方、管腔側に投与した NEO(図 3a)を始めとする各 CaSR 刺激薬は、いずれも pHi を変化させず、以上のことからこれらの CaSR 刺激薬の作用が CaSR に対する特異的な反応であることが強く示唆された。

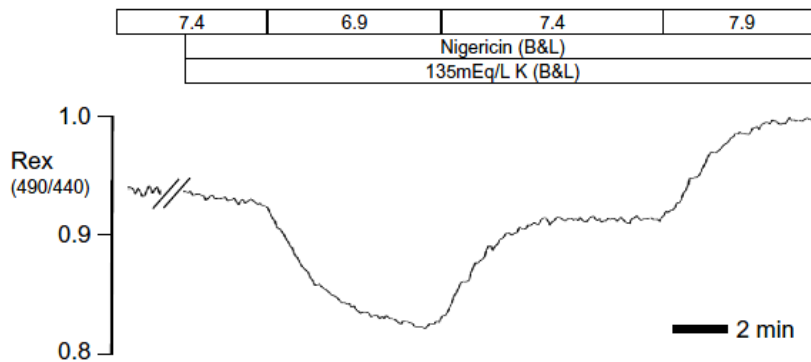


図 1 腎髄質外層ヘンレの太い上行脚における Nigericin 血液側存在下での細胞内 pH キャリブレーション

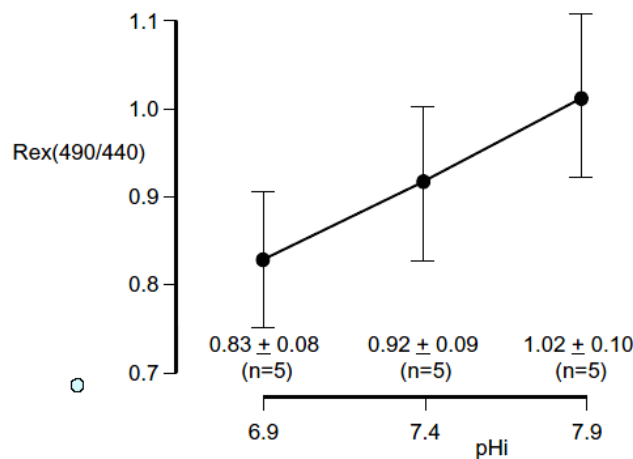


図 2 mTAL 細胞内における BCECF 蛍光比と pH の相関

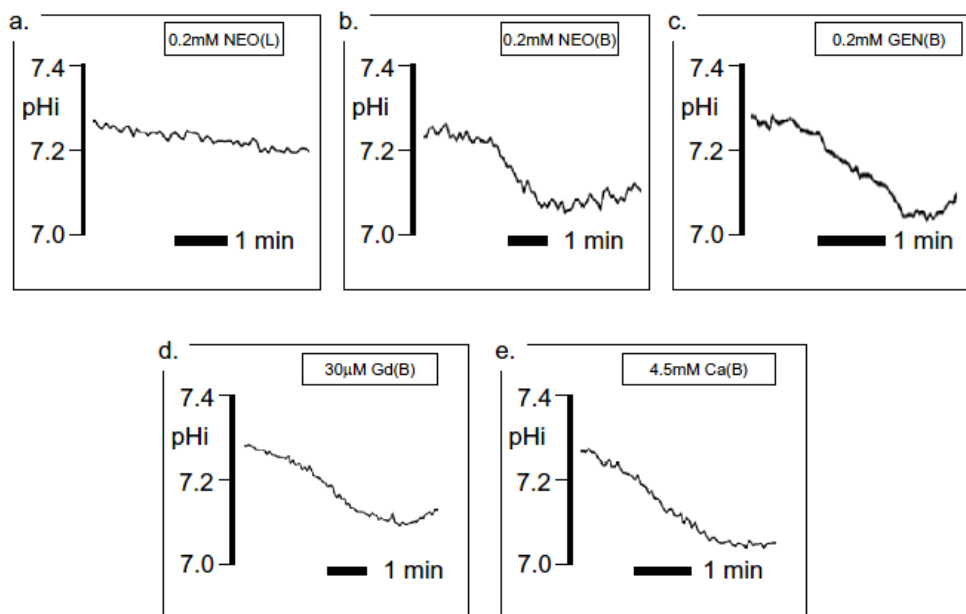


図3 細胞内 pH に及ぼす CaSR 刺激薬 calcimimetics の作用

### 3. NEOの細胞内酸性化作用に対するNa輸送の影響に関する検討

CaSR 刺激薬として、NEO の細胞内酸性化機序を詳細に検討するため、溶液中のイオン置換実験により、各種細胞膜上輸送体への細胞内酸性化現象の依存性を検討することとした。まず、細胞内外の Na に対する依存性を検討するため、全溶液の Na イオンを N-methylglucamin (NMDG) によって置換し、その際に NEO 依存性細胞内酸性化がどのように変化するかを検討した。図 4 のごとく、細胞内酸性化は、Na をすべて除去した状況においても存在することから、Na に依存しない機序によることが示された。

さらに、Na 依存性の重炭酸イオン再吸収や pHi 調節機構として重要な管腔側の Na/H 交換輸送体の関与についても、より直接的な検討を行うため、管腔側に高濃度 amiloride (1 mM) を投与し、NEO 依存性細胞内酸性化の変化を観察したが、図 5 のごとく、その現象は amiloride 投与後も見られることが示された。以上のことから、CaSR 依存性の細胞内酸性化機序には Na イオン輸送が関与しないことが明らかとなった。

### 4. NEOの細胞内酸性化作用に対するCl輸送の影響に関する検討

次に、Cl イオン輸送が NEO 依存性細胞内アルカリ化に関与するかどうかを検討するため、溶液中の Cl イオンを gluconate によって置換した際の NEO 依存性細胞内酸

性化の変化を検討した。図 6 に示すように、周囲の溶液中より Cl を除去した際には、細胞内の NEO 依存性酸性化現象が消失することが示され、NEO 依存性酸性化に Cl 輸送が深く関与する可能性が示された。

さらに、Na-K-2Cl 共輸送体抑制薬として知られる bumetanide 0.1 mM を管腔側に投与したところ、図 7 のごとく、NEO 依存性酸性化は消失しなかった。

### 5. NEOの細胞内酸性化作用の年齢依存性に関する検討

上述の結果のごとく明らかとなってきた CaSR 依存性細胞内酸性化が年齢依存性をもつかどうかを明らかにするため、図 8 のごとく、新生仔マウスにおいて、pHi に与える NEO の作用を検討したところ、日齢 0 (図 8a) の mTAL では、NEO の細胞内酸性化作用は見られず、日齢 7 でも常には出現せず (図 8b)、生後 4 週でようやく恒常的にその作用が観察された (図 8c)。

以上の結果から、カルシウム受容体は、腎髄質部ヘンレの太い上行脚において、クロール依存性の細胞内酸性化作用を有し、その作用は出生後急速に発達するものであることが強く示唆された。

尿濃縮機構におけるこれまでの我々の研究成果からは、新生仔より尿濃縮機構が質的転換により急速に発達する。この過程に平行するように、同時期に CaSR の生理的機能が出現してくる過程が今回の結果から示されたことは、大変興味深い。

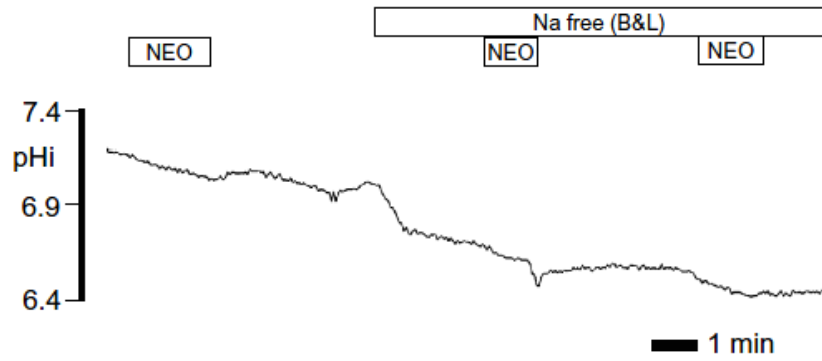


図4 NEO依存性細胞内酸性化に与えるNa除去の影響の検討

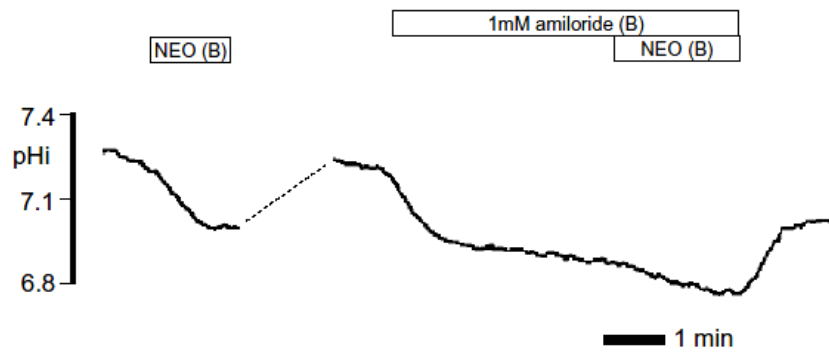


図5 NEO依存性細胞内酸性化に与える血液側amilorideの影響の検討

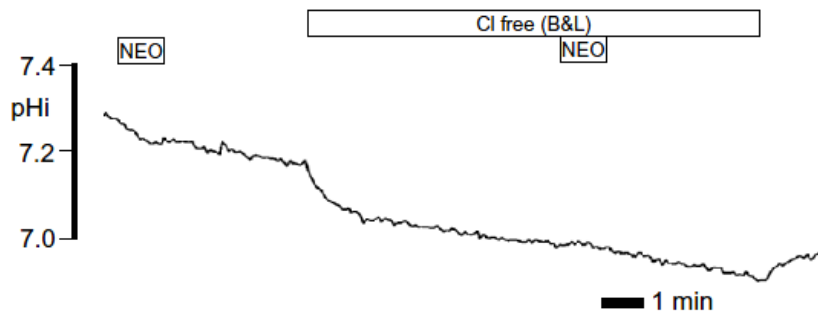


図6 血液側NEO依存性細胞内酸性化に与えるCl除去の影響の検討

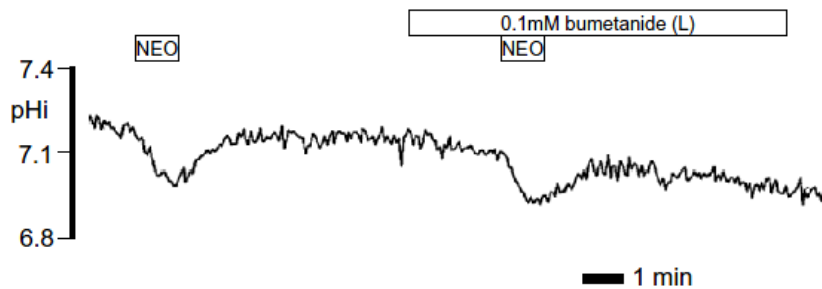


図7 NEO依存性細胞内酸性化に与える管腔側bumetanideの影響の検討

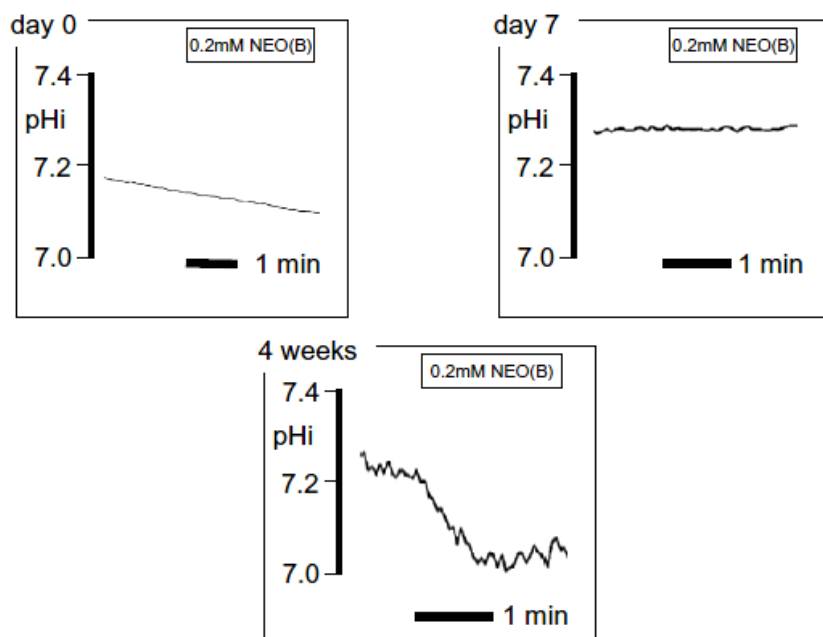


図8 日齢ごとの CaSR 依存性細胞内酸性化

#### ④考察

カルシウム受容体は、血清 Ca の平衡状態を維持するために重要な役割を果たすことは周知のことであり、血中イオン化カルシウム濃度を感知して、副甲状腺ホルモンの分泌を微細に調節するという生理的意義をもつ。カルシウム受容体は、一方で全身のさまざまな臓器において生理的役割を持つことが近年知られてきた<sup>[18]</sup>。腎では、尿細管の管腔側や血液側の細胞膜上に広く分布して、水・電解質輸送を調節していることが明らかとなり、小腸・胎盤・脳・骨などでも何らかの役割を担うことが知られつつある。

#### 1. 腎ヘンレの太い上行脚におけるイオン輸送機構と CaSR の発現

今回の研究では、とりわけ尿濃縮機構の発達過程に呼応して新生児期に著しい機能の転換を起こす腎髄質部ヘンレの上行脚に焦点を絞り、その機能変化とカルシウム受容体の発現について、どのような関連があるのかを詳細に検討した。その成果として、カルシウム受容体の機能を促進する neomycin、gentamicin や Gd、そして細胞外 Ca が、いずれも血液側から pHi を酸性化させることを突き止めた。これらの pHi の変化が、尿細管細胞周囲からの Cl イオンの除去 (gluconate との置換) によって抑制され、Na/H 交換輸送体・Na チャンネルなどの阻害薬である amiloride では抑制されなかったことは、CaSR による細胞内酸性化が Na 依存性ではなく、Cl 依存性の pHi 調節機構に対して作用していることを示唆している。しか

し、これまで知られる管腔側の Na-K-2Cl 共輸送体の抑制が、pHi の低下を抑制しなかった事実は、本研究において見られた NEO による細胞内酸性化が、これまでには知られていない新しい CaSR 刺激作用に基づくものであることを強く示唆している。

#### 2. 尿濃縮機構の質的転換と CaSR の発達

これまでの我々の研究成果で、新生児期に起こる尿の濃縮過程が「質的転換」と呼べる極めてダイナミックな過程であると明らかになった。抗利尿ホルモン反応性の低さ<sup>[13]</sup>や腎乳頭部の小ささ、ヘンレループの短さなどをさらに包含する概念として、腎乳頭部が尿素蓄積型の尿濃縮システムを持たずに NaCl 単独蓄積型のシステムで尿濃縮を行っている場合に予測される変化として解釈されるものとなってきた。腎乳頭部に当初存在する髄質外層と同様の尿細管機能が新生児後期には消失し、本来の腎髄質内層由来の CLC-K1 や UT-A1<sup>[19]</sup>などの各種輸送体の発現に置き換えられる事実は「質的転換」と呼ぶべきものであろう。

今回の研究では、こうした質的転換過程の一部と CaSR の発達の関係に焦点を絞り研究を遂行した。このため、いまだ質的転換に至る前のヘンレの細い上行脚 (形態的には太い上行脚に酷似) で質的転換前後の CaSR の発現がどのように進むかなどの研究課題については、検討し得なかった。今後さらに検討範囲を広げ、ヘンレの太い上行脚だけでなく、集合管でもどのような変化が引き起こされているのか、詳細な研究を展開した



い。

### 3. 尿濃縮機構とともに、カルシウム代謝についても系統発生的に捕らえる

鳥類は哺乳類同様に後腎由来で、macula densa や集合管 intercalated cells の存在など、微細にわたって両者の成熟腎に類似性がある。組織学的にも、ネフロンがおよそ3種類に大別でき、ヘンレループにおける各部位の細胞の形態が、鳥類と哺乳類において比較的類似している<sup>[20, 21]</sup>。カルシウムセンサーについても、哺乳類だけではなく、鳥類(ニワトリ)でもその存在が報告され<sup>[22]</sup>、腎尿細管についても存在が確認されている。いまだ、その詳細については必ずしも十分な検討がなされているわけではないが、こうした点から類推する範囲において、やはり新生児期の NaCl 単独貯留型の尿濃縮機構が完成している時期にも、あるいは何らかの形で細胞外Caを感受し再吸収を抑制する機構が働いているのかもしれない。ただ、現時点で鳥類のヘンレループにおける CaSR の存在を明確に証明する検討結果はなく、今後さらにこうした研究が進むことにより、尿濃縮機構と細胞外カルシウム感受調節機構の意義が系統発生的な立場からも鮮明になってくるものと考えられる。

### ⑤今後の課題

本研究は、CaSR の新しい生理的作用として、細胞内の酸性化が引き起こされることを見出し、その作用にはクロールイオン輸送が深く関与し、新生児期以降に急速に発達して出現してくることを明らかにした。

今回は、実験系の単純化による結果解析の正確性を重視し、重炭酸イオン輸送系が関与しない環境での CaSR による pHi への影響を検討し、実験結果を得た。一方、重炭酸イオン輸送の存在下では pHi が CaSR の活性化によって逆に上昇することがこの間の予備実験から明らかとなりつつある。このことは、CaSR が重炭酸イオン輸送系に対しても調節作用をもつことを強く示唆しており、今後さらに重炭酸イオン輸送系の存在下での CaSR の作用についての詳細な検討を進めることにより、CaSR による pHi 調節機構の全体像がより詳細に明らかとなっていくものと期待される。

### 文献等

1. Sands JM, Kokko JP: Current concepts of the countercurrent multiplication system. *Kidney Int Suppl* 57: S93-99, 1996
2. Ma T, Yang B, Gillespie A, *et al.*: Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking

aquaporin-1 water channels. *J Biol Chem* 273: 4296-4299, 1998

3. Matsumura Y, Uchida S, Kondo Y, *et al.*: Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel [see comments]. *Nat Genet* 21: 95-98, 1999
4. Imai M, Kokko JP: Mechanism of sodium and chloride transport in the thin ascending limb of Henle. *J Clin Invest* 58: 1054-1060, 1976
5. Kondo Y, Abe K, Igarashi Y, *et al.*: Direct evidence for the absence of active Na<sup>+</sup> reabsorption in hamster ascending thin limb of Henle's loop. *J Clin Invest* 91: 5-11, 1993
6. Kondo Y, Kudo K, Igarashi Y, *et al.*: Functions of ascending thin limb of Henle's loop with special emphasis on mechanism of NaCl transport. *Tohoku J Exp Med* 166: 75-84, 1992
7. Uchida S, Sasaki S, Furukawa T, *et al.*: Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla [published erratum appears in *J Biol Chem* 1994 Jul 22; 269(29):19192]. *J Biol Chem* 268: 3821-3824, 1993
8. Uchida S, Sasaki S, Nitta K, *et al.*: Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, ClC-K1. *J Clin Invest* 95: 104-113, 1995
9. Anzai N, Kawahara K: Renal compensation for body water loss during dehydration in neonatal rats. *Jpn J Physiol* 48: 181-187, 1998
10. Baum MA, Ruddy MK, Hosselet CA, *et al.*: The perinatal expression of aquaporin-2 and aquaporin-3 in developing kidney. *Pediatr Res* 43: 783-790, 1998
11. Edwards BR, Mendel DB, LaRochelle FT, Jr., *et al.*: Postnatal development of urinary concentrating ability in rats: changes in renal anatomy and neurohypophysial hormones, in *The Kidney During Development: Morphology and Function*, edited by Spitzer A, New York, Masson, 1981, pp 233-240
12. Bonilla-Felix M, Vehaskari VM, Hamm LL: Water transport in the immature rabbit collecting duct. *Pediatr Nephrol* 13: 103-107, 1999
13. Horster MF, Zink H: Functional differentiation of the medullary collecting tubule: influence of vasopressin. *Kidney Int* 22: 360-365, 1982

14. Kim J, Lee GS, Tisher CC, *et al.*: 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
15. Peter K: Untersuchungen über Bau und Entwicklung der Niere. *Fischer Jena* 2: 522-647, 1927
16. Hamburger O: Über die Entwicklung der Säugetierniere. *Arch. Anat. Physiol. Suppl.*: 15-51, 1890
17. Hebert SC: Calcium and salinity sensing by the thick ascending limb: a journey from mammals to fish and back again. *Kidney Int Suppl.*:S28-33, 2004
18. Goodman WG: Calcium-sensing receptors. *Semin Nephrol* 24: 17-24, 2004
19. Sands JM: The medullary collecting duct urea transporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 8:499-504, 1999
20. Goldstein DL, Braun EJ: Structure and concentrating ability in the avian kidney. *Am J Physiol* 256: R501-509, 1989
21. Morild I, Bohle A, Christensen JA: Structure of the avian kidney. *Anat Rec* 212: 33-40, 1985
22. Diaz R, Hurwitz S, Chattopadhyay N, *et al.*: Cloning, expression, and tissue localization of the calcium-sensing receptor in chicken (*Gallus domesticus*). *Am J Physiol* 273:R1008-1016, 1997

#### 謝 辞

本研究にあたり、研究成果への批評や研究の方向性について、多くの適切なご指導をいただいた自治医科大学名誉教授 今井正先生に深謝申し上げます。また、研究アシスタントとして大変ご協力をいただいた佐藤直子さんに感謝申し上げます。

0433

## Ontogenetic analyses of calcium transport system and calcium-sensing receptors in developing kidneys

Yoshiaki Kondo, Tohoku University

### Summary

Urine-concentrating ability is known to develop tremendously in the neonatal period. The nature of the development has recently been elucidated to be a qualitative change in its manner. In accordance with the achievement of urine-concentrating ability in the neonatal period, calcium transport system and calcium-sensing receptors in the kidneys show large changes in their properties, although their nature has not been clarified well.

To elucidate the nature of calcium metabolism in the neonatal kidneys, we focused our attention on calcium transport in the medullary thick ascending limb (mTAL) of Henle's loop, in which NaCl and calcium transport play important roles in urine-concentrating ability. The mTAL was microperfused *in vitro* in neonatal and adult mice kidneys. Intracellular pH (pHi) of the mTAL cells was measured by using microfluorescent dye BCECF. Neomycin (NEO), a calcimimetic agent for calcium-sensing receptor (CaSR), at a dose of 200  $\mu$ M was applied to the mTAL cells. NEO acidified pHi from  $7.29 \pm 0.04$  (n=9) to  $7.25 \pm 0.06$  (n=7) in a minute when bathed in Hepes-buffered isotonic Ringer solution. Intracellular acidification was blocked by ambient Cl removal, whereas ambient Na removal or amiloride at 1mM in the basolateral solution did not affect the intracellular acidification by NEO. Bumetanide at 0.1 mM in the lumen did not affect NEO-induced acidification of the mTAL cells.

In the neonatal period, NEO did not decrease pHi on day 0 or day 1, whereas its acidifying effect emerged after day 7.

These results suggest that CaSR merge after the neonatal period and exerts Cl-dependent acidification, the role of which is still to be elucidated.