

助成番号 0833

腎尿細管の酸塩基輸送機構と腎尿路結石症における細胞外カルシウム受容体の意義に関する分子および病理生理学的解析

根東 義明¹, 森本 哲司², 熊谷 直憲², Farajov Elnur¹, 菅原 典子²¹東北大学大学院医学系研究科医学情報学分野, ²東北大学小児病態学分野

概要 1. 研究目的 最近、我々の研究グループは、細胞外カルシウム受容体 Casr が細胞内 pH 調節機構に関与し、その機構が新生児期には存在しないことを、マウス腎髄質部ヘンレの太い上行脚で証明した。今回新たな予備研究結果でヘンレの太い上行脚における酸分泌に Casr が直接関与することが強く示唆された。本研究は、この Casr の新しい生理作用としての尿酸酸化機構調節を直接証明し、腎結石症の病態に Casr が関与する可能性の存在を証明しようとするものである。

2. 研究方法 マウス腎より太いヘンレの上行脚 mTALs を微小単離し、倒立顕微鏡上に設置した専用マニピュレータで微小灌流を行い、尿細管内外の溶液組成の変更や Casr 作動薬などの添加による細胞内 pH (pHi) の変化を 2,7-bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein-acetoxymethyl ester (BCECF-AM) を用いて観察することにより、mTALs における酸分泌/塩基再吸収過程の変化を解析する。

3. 研究結果 重炭酸イオン・二酸化炭素系緩衝環境下において、微小単離灌流されたマウス mTALs の細胞内 pHi は、 7.17 ± 0.013 (n = 19) だった。Casr 作動薬である Neomycin は、管腔内に投与しても pHi を変化させなかったが、血液側に投与された場合には、強いアルカリ化を引き起こし、pHi を 7.28 ± 0.015 (n = 19) まで上昇させた。この pHi の上昇は、細胞外 Na⁺ の除去と管腔内への H⁺-ATPase 阻害薬 bafilomycin 1 μmol/l を投与しても阻害されなかったが、管腔側の K⁺ 除去と 3 mmol/l Ba²⁺ の添加により消失した。また、管腔側に 1 mmol/l ouabain と Sch-28080 (H⁺-K⁺-ATPase 阻害薬) を投与した場合にも、強く抑制された。

4. 考察 今回の研究成果から、マウスの mTALs では、血液側に Casr が存在し、管腔側細胞膜上に機能的に存在を今回確認した H⁺-K⁺-ATase (HKa) を促進することによって細胞内 pHi のアルカリ化、すなわち尿の酸性化を引き起こすことが明らかとなった。これまでの研究成果から、この現象は重炭酸イオン緩衝系の存在を必要とし、mTALs で活発に行われている重炭酸イオン再吸収の促進という形でその機能を発揮している可能性が示唆される。

5. 今後の課題 今回の研究では、通常マウスでの微小単離尿細管灌流実験系における研究エフォートが、研究技術の難易度の高さから、当初予想したよりも著しく大きかったために、大変残念ながら Nuf マウスなどのモデルマウスでの解析や、我々の研究グループが本邦で初めて実用化した尿中落下尿細管細胞培養系での解析、症例の十分な集積までの研究成果を得ることができなかった。しかし、尿の酸性化が Casr を介して調節されるという直接的証明を世界に先駆けて行うという成果を得たことは重要であり、この成果に基づいて、今回の研究で残された課題をさらに明らかにするための研究を進めたい。

1. 研究目的

1993 年、Brown らが副甲状腺から Casr をクローニングした¹。その後、腎尿細管全部位に Casr が分布することが

明らかとなったが²、その生理機能の解析は遅れている。

一方、モデルマウスや臨床知見から、Casr の活性過剰型の遺伝子変異や特定 SNP (G2956T, C3031G, A2968G

など)が腎結石症と強い関連を持つことが示唆されている。これらの腎結石症では、必ずしも血清 Ca 値が上昇せず、尿中 Ca 値のみが上昇する場合が多い。尿細管に分布する Casr の機能異常が示唆される所見であり、腎尿細管 Casr の病態生理学的役割の解明は重要な基礎および臨床的課題である。

Casr はほぼすべての尿細管の管腔ないし血液側細胞膜上に分布し、ヘンレの太い上行脚と遠位尿細管における NaCl 再吸収の抑制作用がよく知られると同時に、高カルシウム血症での尿濃縮力低下が臨床的によく知られる。しかし、尿路結石症の発症と腎内 Casr との病態生理学的関係はよく理解されていない。

最近、我々の研究グループは、Casr が細胞内 pH 調節機構に関与し、その機構が新生児期には存在しないことを、マウス腎髄質部ヘンレの太い上行脚において初めて証明した³。その後の研究過程から CO₂/重炭酸イオン存在下では Casr が酸分泌を促進するらしいという驚くべき事実が見え始めた。このことは Casr と尿酸性化機構調節の直接的な関係を強く示唆し、新しい Casr の生理作用の発見ではないかと予想される。

そこで、今回の研究の中核に尿細管各部位における尿酸性化機構に Casr が直接関与するかどうかについての詳細な検討を置き、Casr が尿酸性化機構の直接的調節系であるという仮説を証明することをその目的とした。

2. 研究方法

本研究の中核となる微小単離尿細管灌流実験系を用いた細胞内 pHi の測定は、以下のごとく遂行した。

水分および飼料を自由摂取とした C57BL/6 マウス(日本 JLC, 浜松)を、50 mg/kg のペントバルビタール腹腔内注射により麻酔し、無痛下にて両側腎を速やかに摘出し、Hepes 緩衝リンゲル液中にて、**図 1** に示すように実体顕微鏡下にて、先端を研磨した forceps によって尿細管の微小単離をおこなった。

今回の研究では、マウス腎髄質外層より太いヘンレの上行脚 mTAL を摘出した。mTAL は、腎髄質部外層と内層の境目を目安として、独特の形状により肉眼的に容易に区別できることから、実体顕微鏡下で特に着色などの操作は加えずに単離を行った。尿細管セグメントの確認については、それまでの多くの研究プロジェクトにおいてすでに経上皮電位が陽性であることなどの特異的性質を確認することにより繰り返し繰り返し行われており、本実験系においてこれらを再度確認する必要性はなかった。

単離された尿細管フラグメントは、専用の transfer pipetten によって、倒立顕微鏡上に設置された溶液チャンバーに移され、**図 2** に模式的に示されたような微小単離尿細管灌流装置にて、その管腔および外液側をリンゲル液にて灌流した⁴。**図 2** の下段には、実際に用いられた尿細管灌流用の二重化 glass pipettes の顕微鏡写真である。

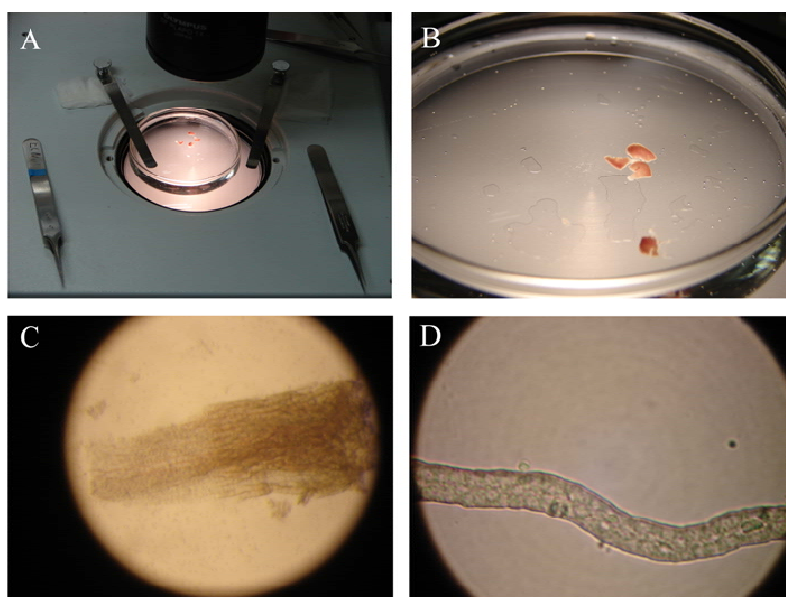


図 1. マウス腎よりの mTAL 微小単離の実際

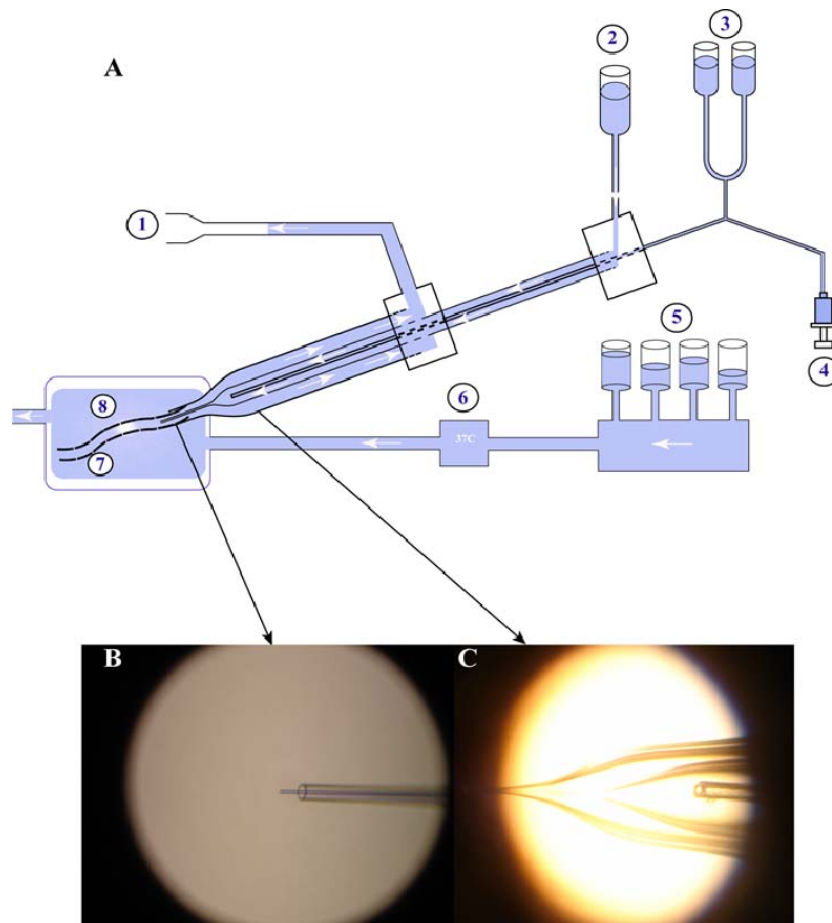


図2. 尿細管微小単離灌流法の概要

内側の pipette は内径 5 から 10 μm 、外側の pipette は内径約 20 μm で、内側 pipette が尿細管管腔内に挿入され、尿細管全体は外側の pipette に吸引固定されて実験系が完成する形となっている。

表1には、今回の研究に用いた各種の溶液の組成を示した。これらの溶液の組成を尿細管内外において変更することにより、周囲の Na^+ や K^+ の組成を変更することとした。

次に、尿細管細胞内の pH (pHi) の測定のため、細胞内への pH 感受性蛍光色素の導入を行った。mTAL セグメントは、倒立顕微鏡上のチャンバーに移された後、2 μl の 1 mmol/l の濃度の 2,7-bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxy fluoresceine-acetoxymethylester すなわち BCECF-AM (Molecular Probe, Eugene OR, USA) を溶解したリンゲル液に約 30 分間暴露され、細胞内に BCECF が酸として trap されるように実験準備がなされた。Incubate された mTAL 内の BCECF の蛍光は 490 nm および 440 nm の励

起光に対して起こる 530 nm での蛍光の強度比と比例するという原理によって、Aquacosmos System (Hamamatsu Photonics 社, 浜松) を用いてコンピュータの画像イメージ解析により導き出された。図3には、実際に微小灌流された尿細管と、その後 BCECF を細胞内に導入後に顕微蛍光測光装置から画像として映し出された尿細管の写真を提示した。

細胞内に導入された BCECF による pHi 絶対値へのキャリブレーションは、20 NaCl、118 KCl、2.0 KH_2PO_4 、1.5 CaCl_2 、1.0 MgCl_2 、10 HEPES、5.5 glucose、5.0 l-alanine (すべて mmol/l) を含むリンゲル液中で行われ、溶液中の pH を細胞内外で同一化するために 7 $\mu\text{mol/l}$ の nigericin で細胞膜を H^+ 透過性とした上で、溶液の pH を NaOH で調整することにより行われた。

実験に使用されたその他すべての試薬は reagent grade で、和光純薬(大阪)より調達された。本研究では、すべての統計値で表現されたデータは平均値±標準誤差であ

表 1. 微小単離尿管灌流実験系に用いた灌流液組成一覧

	HEPES-buffered	CO ₂ /HCO ₃ ⁻ -buffered			
		Standard	Na ⁺ -free	K ⁺ -free	Cl ⁻ -free
Hepes	10	0	0	0	0
CaCl ₂	1.5	1.5	1.5	1.5	0
Ca gluconate	0	0	0	0	5
NaCl	135	115	0	117	0
Na acetate	1	1	0	1	1
Na gluconate	0	0	0	0	115
D-glucose	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
L-alanine	5	5	5	5	5
KCl	3	3	3	0	0
K gluconate	0	0	0	0	3
MgCl ₂	1	1	1	1	0
Mg gluconate	0	0	0	0	1
KH ₂ PO ₄	2	2	2	0	2
NaH ₂ PO ₄	0	0	0	2	0
NaHCO ₃	0	25	0	25	25
Choline Cl	0	0	140	0	0
Choline HCO ₃	0	0	25	0	0

単位 mmol/l. 灌流液は 95% O₂ - 5% CO₂ ガスにて飽和され、pH はすべて 7.4 (37°C)

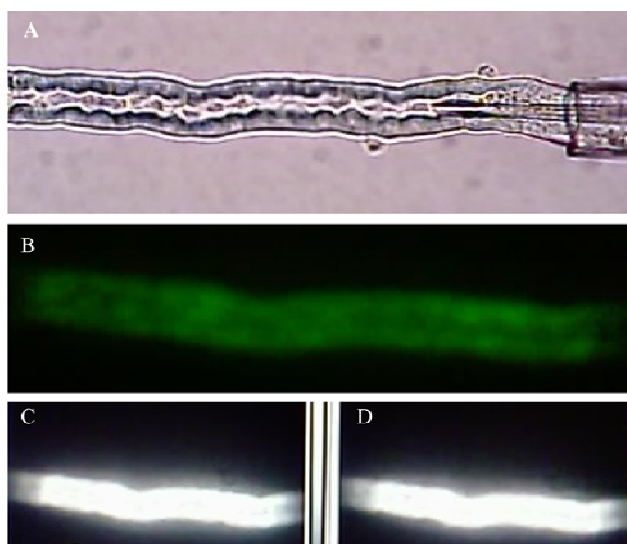


図 3. mTAL の微小灌流と BCECF の蛍光測光による pH_i 測定の実際

り、変化の有意性は Student's unpaired t-test で検証された。P 値が 0.05 未満である場合を有意性ありと判断した。すべて、の研究は、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会ガイドラインにしたがって認可の下に行われた。

3. 研究結果

(1) HCO₃⁻/CO₂ 緩衝系の存在が Casr の作用に及ぼす影響に関する検討

本研究計画の最も重要な柱となったのは、これまでの我々の研究では見出せなかった Casr による経上皮酸塩基輸送に対する作用が、HCO₃⁻/CO₂ 緩衝系の存在下でのみ観察できるという驚くべき事実だった。

図 4 は、代表的な HCO₃⁻/CO₂ 緩衝系の Casr による細胞内 pH への作用の逆転を示す mTAL での pH_i の変化を経時的に示した実験結果である。mTAL において管腔内に引き続いて血液側の HCO₃⁻/CO₂ 緩衝系を除去すると、pH_i は約 7.1 から 7.4 へと急激な上昇を起こして新たな恒

常状態を形成する。この条件化において Casr の刺激薬 calcimimetics である neomycin (Neo) を 0.2 mmol/l 血液側に投与すると、軽微ながらも pHi は低下する。この現象は、すでに以前の我々の研究結果から知られ、その変化が Cl⁻ の存在に依存することが証明されている。しかし、その後 HCO₃⁻/CO₂ 緩衝系を溶液中にもどすと、pHi は実験開始時のごとく急速に低下して新たな恒常状態を形成する。そして、その状態で再度 Neo を血液側に投与すると、驚く

べきことに pHi は低下するのではなく、明らかな強い上昇すなわち細胞内アルカリ化を起こすことが明らかとなった。

(2) HCO₃⁻/CO₂ 緩衝系存在下での Ca²⁺ と calcimimetics Neo の pHi への効果

これらの新しい実験結果を踏まえて、血液側 Ca²⁺ や Neo の pHi への作用を、図 5 のごとく検討した。パネル A のように、血液側の Ca²⁺ を上昇させると、急激な pHi の上昇が見出された。同じ現象はパネル B および C のごとく血

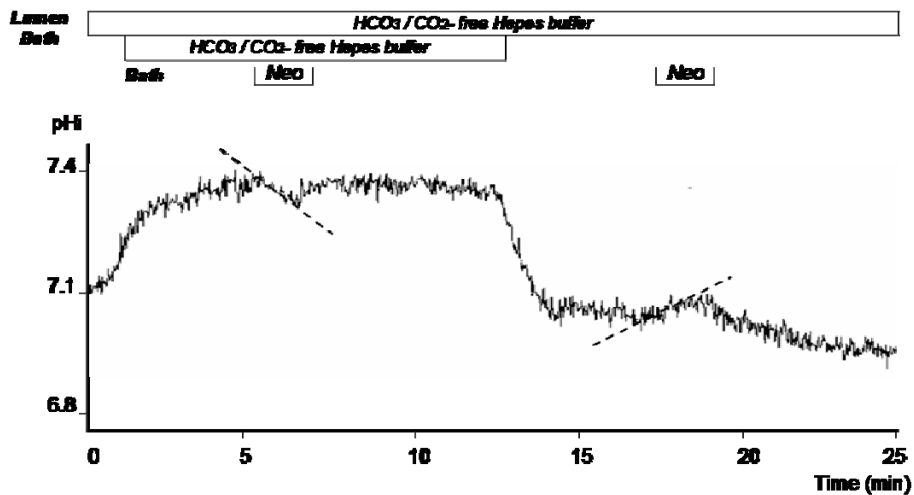


図 4. HCO₃⁻/CO₂ 緩衝系の存在が Neomycin の pHi に及ぼす影響

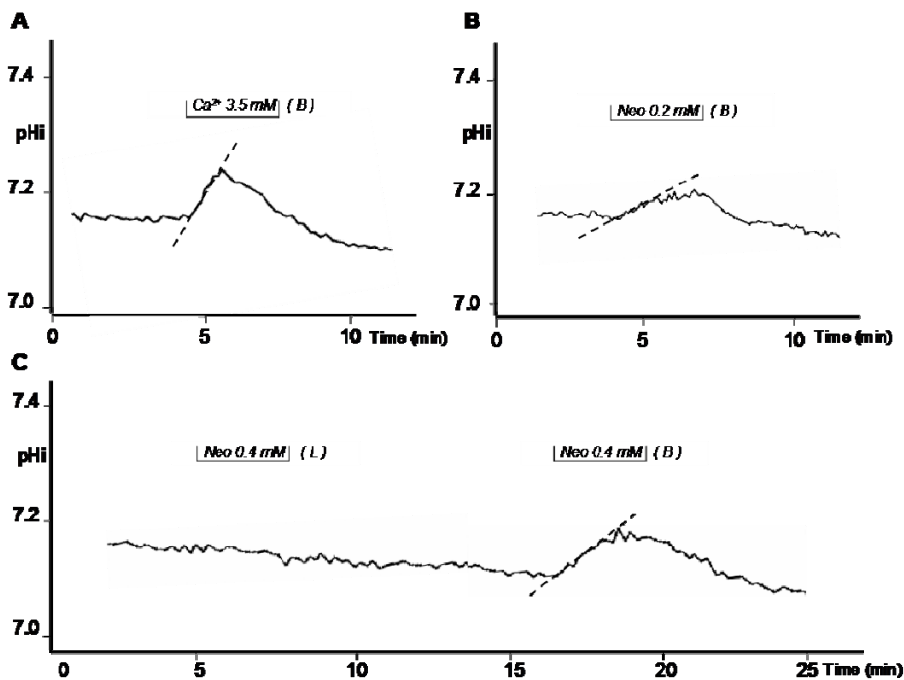


図 5. 細胞外 Ca²⁺ および Neomycin の mTAL における pHi に対する作用

液側に加えた Neo でも観察されたが、管腔側に Neo を加えた際には、パネル C のごとく pHi の変化は見られなかった。以上のことから、 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 緩衝系存在下では、mTAL 血液側細胞膜上に存在する Casr 刺激が強い細胞内アルカリ化を起こすことが明らかとなった。

(3) 管腔側細胞膜上の尿酸性化機構と Casr による pHi 上昇の関係に関する解析

Casr による細胞内アルカリ化がどのような機序で引き起こされるのかを検証するため、管腔側細胞膜上に存在することが考えられる各種の酸分泌機構の関わりを詳細に検討することは、Casr が mTAL において尿酸性化と直接的な関係を持つかどうかを明らかにする上で重要である。以前に観察された $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 緩衝系非存在下での細胞内酸性化については、様々な検討の結果、経上皮酸塩基輸送と直結するものではなく、むしろ細胞内における pH 調節機構への作用であることが示唆されていたが、もし今回の細胞内アルカリ化が異なる性質を示すとすれば大変重要な知見といえる。

図 6 のパネル A では、管腔側細胞膜上に存在すると考えられる NHE3 輸送体 (Na/H 交換輸送体) や H^+ -ATPase (H^+ ポンプ) を介して Casr が管腔への酸分泌を促進した結果として細胞内アルカリ化を引き起こしているのかどうかを明らかにするため、細胞外 Na^+ をすべて除去すると同時に、bafilomycin を管腔内に投与することによって両者

の作用を停止させ、その上で Neo が細胞内アルカリ化を起こすことができるかを検証した。パネル A の結果から明らかのごとく、これらの実験条件下でも Neo は同程度の強いアルカリ化を引き起こすことが明らかとなり、このことから NHE3 や H^+ -ATPase は Casr の作用に関与していないことが示された。

一方、存在が考えられる H^+/K^+ ATPase のアルカリ化への関与を検討するため、管腔内の K^+ を除去し、管腔側細胞膜上の K^+ チャネル ROMK からの K^+ の管腔への供給を停止させるために Ba^{2+} を管腔に投与した場合に細胞内アルカリ化がどのように変化するかをパネル B に示すように検討した。その結果は図のごとく、Casr によるアルカリ化がほぼ完全に消失し、観察された Casr による細胞内アルカリ化が管腔側の K^+ を必要とする過程であり、Casr が管腔側細胞膜上の H^+/K^+ ATPase を促進することにより、 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 緩衝系に依存する酸分泌機構、すなわち重炭酸再吸収の促進を行っている可能性が強く示唆された。

(4) 管腔内 Sch-28080 あるいは ouabain 投与による Neo の pHi 上昇効果への抑制

Casr が管腔側細胞膜上の H^+/K^+ ATPase を促進する可能性が示されたことから、 H^+/K^+ ATPase を直接抑制した場合に Neo による pHi 上昇が抑えられるかどうかを検証するため、図 7 および図 8 のごとく、mTAL 管腔側に H^+/K^+ ATPase 阻害薬として知られる Sch-28080 あるいは ouabain

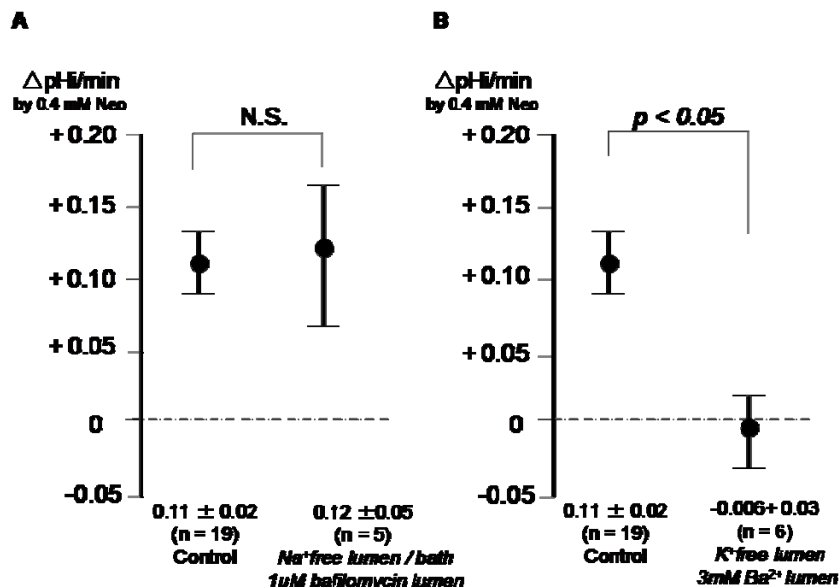


図 6. 管腔内での[Na⁺ 除去+bafilomycin]あるいは[K⁺ 除去+Ba²⁺]による Neomycin の pHi 上昇作用への効果

を投与し、これらの存在下でのNeoのpHiに対する作用を検討した。これらの図の代表的データで示されたように、いずれの阻害薬もそれ自身がpHiを緩徐に低下させるとともにNeoによるpHiの上昇を強く抑制することが示された。

これらの実験系からより直接的に、mTALの血液側細胞膜上に存在するCasrは、管腔側細胞膜上に存在する H^+/K^+ ATPaseを選択的に促進することにより、おそらくは重炭酸イオン再吸収の促進につながる管腔側への酸分泌を促進することが強く示唆された。

以上の結果を表2にまとめ、統計的な解析を行った。表の結果から明らかなように、CasrであるNeoは、NHEなどの Na^+ 依存性細胞内アルカリ化機構や H^+ ATPaseによる細胞内アルカリ化によって今回観察された現象を起こし

ているのではなく、管腔内 K^+ の存在を必要とする H^+/K^+ ATPaseを促進することによってその作用を発現していることが明確に示された。

4. 考察

今回の研究成果は、これまでCasrが尿細管に分布している場合に、その生理作用が主にCa再吸収自体の調整やそれに関連したNaCl再吸収過程の調節と考えられていたことに対して、Casrが尿の酸性化機構自体を直接促進するというこれまでには考えられていなかった新しい機能を、分子生理学的手法を用いて直接証明したことにあ

る。今回の研究では、大変興味深いことに、その作用がある特定の H^+ ポンプに対する促進作用として見出され、さ

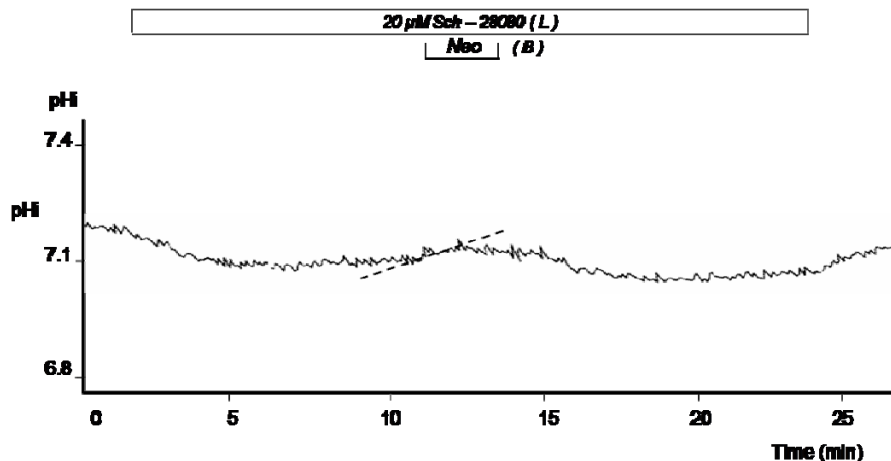


図7. 管腔内 Sch-28080 投与による Neo の pHi 上昇効果への抑制

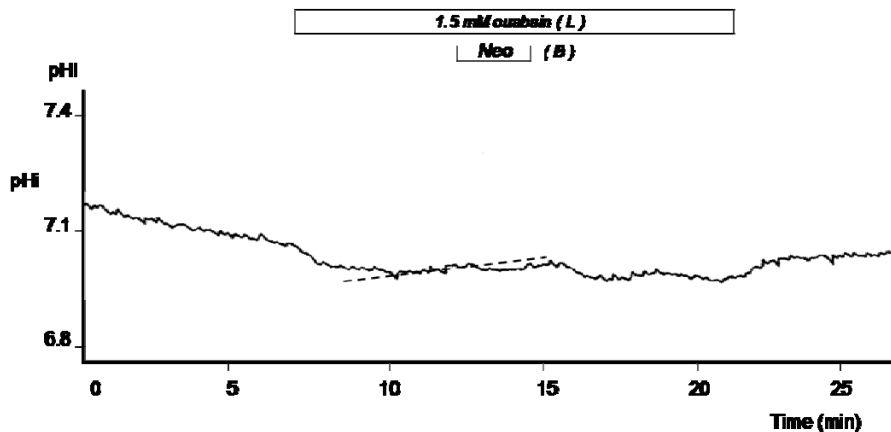


図8. 管腔内 ouabain 投与による Neo の pHi 上昇効果への抑制

表 2. mTALs における Neo の pH_i に対する効果の解析結果

Solutions	n	Initial pH _i	0.4 mM Neo-induced pH _i	ΔpH _i /min
A) Control bath	19	7.17 ± 0.01	7.28 ± 0.02	0.11 ± 0.03
B) Ambient Na ⁺ -free + lumen Baf	5	6.96 ± 0.04	7.08 ± 0.07	0.12 ± 0.04
C) Lumen K ⁺ -free + lumen Ba ²⁺	6	7.05 ± 0.02	7.04 ± 0.03	-0.01 ± 0.03*
D) Lumen Sch-28080	6	7.07 ± 0.02	7.08 ± 0.01	0.01 ± 0.02*
E) Lumen Ouabain	4	7.06 ± 0.04	7.09 ± 0.03	0.02 ± 0.03*

A) Control basolateral HCO₃⁻/CO₂-bufferB) Ambient Na⁺-free HCO₃⁻/CO₂-buffer and 1 μmol/l bafilomycin added to the lumenC) Luminal K⁺-free HCO₃⁻-buffer with 3 mM/l Ba²⁺

D) Luminal 20 μmol/l Sch-28080

E) Luminal 1.5 mmol/l ouabain

Values are means ± SE; n, number of perfused tubules; pH_i, intracellular pH. *P < 0.05 vs control ΔpH_i/min.

らに重炭酸緩衝系の存在を必要とする特異的なプロセスであることも明らかとなった。mTAL は、近位尿細管で再吸収されなかった重炭酸の多くを再吸収する重要な酸塩基輸送セグメントとして知られている⁵。その輸送過程は、アルドステロン、vasopressin、growth factor、有機酸や摂取 Na 量などで変化することが知られている⁶⁻⁸。Ahn らは、1996 年に mTAL にわずかながら colonic H⁺-K⁺-ATPase (HKAc) が存在することを mRNA の検討を通じて証明した⁹。これまでラット腎でも、その ouabain や Sch-28080 感受性および K⁺ 依存性を通じて、3 種類の K⁺-ATPase の存在が示唆されている¹⁰⁻¹²。I 型は、主に皮質部集合管に分布し Sch-28080 のみに感受性、II 型は近位尿細管およびヘンレの太い上行脚に、そして III 型は K⁺ 欠乏時の皮質部集合管にそれぞれ存在が示唆されている。今回証明された Casr 依存性 H⁺-K⁺-ATPase が実際にどの K⁺-ATPase に当たるのかを証明するためには、それぞれの H⁺-K⁺-ATPase のノックアウトモデルなどを利用した解析を最終的に行うことが必要であり、本研究結果から短絡的にどの H⁺-K⁺-ATPase かを明確化することは避けなければならないが、その Sch-28080 や ouabain 感受性からは、II 型の可能性や HKAc の可能性を前提とした研究の展開が必要と考えられる。

ではなぜ、Casr が尿の酸性化/重炭酸イオン再吸収の促進を行うのかという生理的意義については、現時点で

は明確な答えはない。しかし、最も考えられる生理的作用は、尿細管におけるイオン化 Ca²⁺ の溶解度の増強、すなわち尿の酸性化により腎内における結石の形成を抑制するという考え方がもっとも理解しやすい仮説として提示できるであろう。これまで、尿濃縮機構の抑制がなぜ高 Ca 血症で引き起こされるのかということについても、必ずしも明快な答えが得られているわけではないが、今回の成果は、尿の濃縮力抑制も酸性化の促進も、いずれもがイオン化 Ca の尿中の溶解量を上げるために有用な生理的変化であることを考えたとき、実は Casr は緻密に腎内における結石形成抑制のための監視役として、きわめて重要な役割を果たしているのではないかと推論することは決して不合理ではないものといえよう。

5. 今後の課題

今回の研究では、当初本格的に検証を進める予定であった (1) Nuf ラットやマウスの実験モデルを使った Randall's plaque と Casr の関連に関する解析、(2) 尿中落下尿細管細胞培養系を用いた腎結石症症例からの尿細管上皮での Casr の発現異常と機能異常についての検討、(3) 腎結石症の症例集積による臨床像と遺伝子異常の相関解析という 3 点の研究課題が、今回報告した研究の実際の困難性に大きく阻まれ、必ずしも研究全体として十分に展開を終わらせることができていない。

今後、これらの残された課題に改めて本格的に取り組むことによって、本研究課題である結石症の病態との関係に関する新しい発見へと展開していくことをさらに志したい。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、実験助手として大きな貢献をいただいた佐藤直子さんと佐藤和佳子さんに対し、深く感謝いたします。

文 献

1. Brown, E.M. *et al.* Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366, 575-80 (1993).
2. Riccardi, D. *et al.* Localization of the extracellular Ca²⁺/polyvalent cation-sensing protein in rat kidney. *Am J Physiol* 274, F611-22 (1998).
3. Aslanova, U.F. *et al.* Chloride-dependent intracellular pH regulation via extracellular calcium-sensing receptor in the medullary thick ascending limb of the mouse kidney. *Tohoku J Exp Med* 210, 291-300 (2006).
4. Burg, M., Grantham, J., Abramow, M. & Orloff, J. Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. *Am J Physiol* 210, 1293-8 (1966).
5. Good, D.W. The thick ascending limb as a site of renal bicarbonate reabsorption. *Semin Nephrol* 13, 225-35 (1993).
6. Capasso, G., Unwin, R., Agulian, S. & Giebisch, G. Bicarbonate transport along the loop of Henle. I. Microperfusion studies of load and inhibitor sensitivity. *J Clin Invest* 88, 430-7 (1991).
7. Good, D.W. Bicarbonate absorption by the thick ascending limb of Henle's loop. *Semin Nephrol* 10, 132-8 (1990).
8. Watts, B.A., 3rd & Good, D.W. An apical K(+)-dependent HCO₃⁻ transport pathway opposes transepithelial HCO₃⁻ absorption in rat medullary thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F57-63 (2004).
9. Ahn, K.Y., Park, K.Y., Kim, K.K. & Kone, B.C. Chronic hypokalemia enhances expression of the H(+)-K(+)-ATPase alpha 2-subunit gene in renal medulla. *Am J Physiol* 271, F314-21 (1996).
10. Buffin-Meyer, B. *et al.* K depletion modifies the properties of Sch-28080-sensitive K-ATPase in rat collecting duct. *Am J Physiol* 272, F124-31 (1997).
11. Silver, R.B. & Soleimani, M. H⁺-K⁺-ATPases: regulation and role in pathophysiological states. *Am J Physiol* 276, F799-811 (1999).
12. Younes-Ibrahim, M. *et al.* Inhibition of Na, K-ATPase by an endotoxin extracted from *Leptospira interrogans*: a possible mechanism for the physiopathology of leptospirosis. *C R Acad Sci III* 318, 619-25 (1995).

No. 0833

Molecular and Pathophysiological Analyses of Extracellular Calcium-Sensing Receptor in Renal Tubular Acid-Base Transport and Urinary Tract Calcinosi

Yoshiaki Kondo¹, Tetsuji Morimoto², Naonori Kumagai², Farajov Elnur¹, Noriko Sugawara²

¹Tohoku University Graduate School of Medicine Department of Medical Informatics,

²Tohoku University School of Medicine Department of Pediatrics

Summary

Among the roles and mechanisms of the calcium-sensing receptor (Casr)-mediated phenomena, little is known about the contribution of the Casr to acid-base metabolism in kidneys. Hypercalcemia has been known to induce urine acid secretion. Recent findings strongly suggest that Casr is indeed involved in acid-base metabolism in kidneys.

To test directly whether Casr is involved in medullary thick ascending limbs of Henle's loop (mTALs), on of the major segments for bicarbonate reabsorption, the effects of a potent calcimimetics neomycin (Neo) on pHi were analyzed in the *invitro* miropperfused mouse mTALs.

The mTALs were incubated with 2,7-bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluoresceine-acetoxymethylester (BCECF-AM) in HCO₃/CO₂-buffered solution. The baseline pHi in the mTALs was 7.17 ± 0.013 (n = 19). Neo added to basolateral solution caused a significant intracellular alkalinization (pHi -7.28 ± 0.015, n = 19), whereas Neo added to the lumen did not change pHi. The effects of a neomycin (Neo) on pHi were analyzed 1) in ambient Na⁺ free solution with 1 μmol/l bafilomycin adding to the lumen. 2) in K⁺-free solution with apical 3 mmol/l Ba²⁺; with luminal applications 1.5 mmol/l ouabain and 20 μmol/l sch-28080. The effect of Neo on pHi was inhibited either by luminal K⁺ removal or by application of a specific H⁺-K⁺-ATase (HKa) inhibitor Sch-28080 and 1 mmol/l ouabain to the lumen. Ambient Na⁺ removal with addition of 1 μmol/l bafilomycin to lumen did not affect the effect of Neo on pHi.

Our results strongly suggest that H⁺-K⁺-ATase is expressed in the apical membrane of the mouse mTALs, and is activated by stimulation of the Casr in the basolateral membrane. These results imply the possibility of pathogenesis of nephrocalcinosis due to disturbance of acid secretion/base reabsorption via H⁺-K⁺-ATase in the mTALs.