

糖尿病モデルマウスを用いた
腎臓アクアポリン2の発現制御の検討

**Investigation of the expression control of
renal aquaporin 2 using diabetes-model mice**

佐竹 正子

【目次】

掲載論文目録	1
略号一覧	2
序論	4
第一章	7
第二章	24
総括	42
謝辞	45
参考文献	46

【掲載論文目録】

本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

Satake M., Ikarashi N., Ichikawa Y., Maniwa A., Toda T., Ito K., Ochiai W., Sugiyama K., The role of renal aquaporin 2 in the alleviation of dehydration associated with diabetic polyuria in KKAY mice, *Life Sci.*, **87**, 475-480 (2010).

(第一章)

Satake M., Ikarashi N., Kagami M., Ogiue N., Toda T., Kobayashi Y., Ochiai W., Sugiyama K., Increases in the expression levels of aquaporin-2 and aquaporin-3 in the renal collecting tubules alleviate dehydration associated with polyuria in diabetes mellitus, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1965-1970 (2010).

(第二章)

【略号一覧】

本論文では、以下の略号を用いた。

AC : adenylate cyclase

AQP : aquaporin

BSA : bovine serum albumin

BUN : blood urea nitrogen

cAMP : adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate

Ccr : creatinine clearance

CM : crude membrane

CRE : cAMP-response element

CREB : CRE-binding protein

DMSO : dimethyl sulfoxide

DNA : deoxyribonucleic acid

ECL : enhanced chemiluminescence system

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

GFR : glomerular filtration rate

GLUT : glucose transporter

Ig : immunoglobulin

IV : intracellular vesicle

Li₂CO₃ : lithium carbonate

NKCC : Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter

PKA : protein kinase A

PM : plasma membrane

PMSF : phenylmethanesulfonyl fluoride
PVDF : polyvinyliden difluoride
PXR : pregnane X receptor
RNA : ribonucleic acid
RT : reverse transcription
S.D. : standard deviation
SDS : sodium dodecyl sulfate
SGLT : sodium/glucose cotransporter
SMIT : sodium *myo*-inositol transporter
STZ : streptozotocin
TauT : taurine transporter
TBS : Tris-buffered saline
Tween 20 : polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
UT : urea transporter

【序論】

近年、新規チャネルとして、アクアポリン (AQP) が発見された。これは水チャネルと呼ばれ、生体内の水の移動に重要な役割を担っていると考えられている。従来、細胞膜における水の輸送は、拡散によって行われると考えられていた。ところが、細胞膜は脂質二重構造であるにも関わらず、赤血球のような高い水透過性を有する細胞膜が存在することから、多くの研究者によって水を選択的に透過させる膜タンパク質である水チャネルの存在が考えられていた¹⁾。1992年、Agreらによって、初めて赤血球膜から水チャネルが発見され²⁾、その直後に、佐々木らによって発見された別の水チャネル³⁾と共に、これらのタンパク質はそれぞれ AQP1 および AQP2 と命名された。その後、研究は進み、AQP の存在は植物から動物に亘る広い範囲で見出されており、ヒトにおいては AQP0 から AQP12 までの 13 種類が様々な臓器に発現・分布していることが明らかになった (Figure 1)⁴⁾。

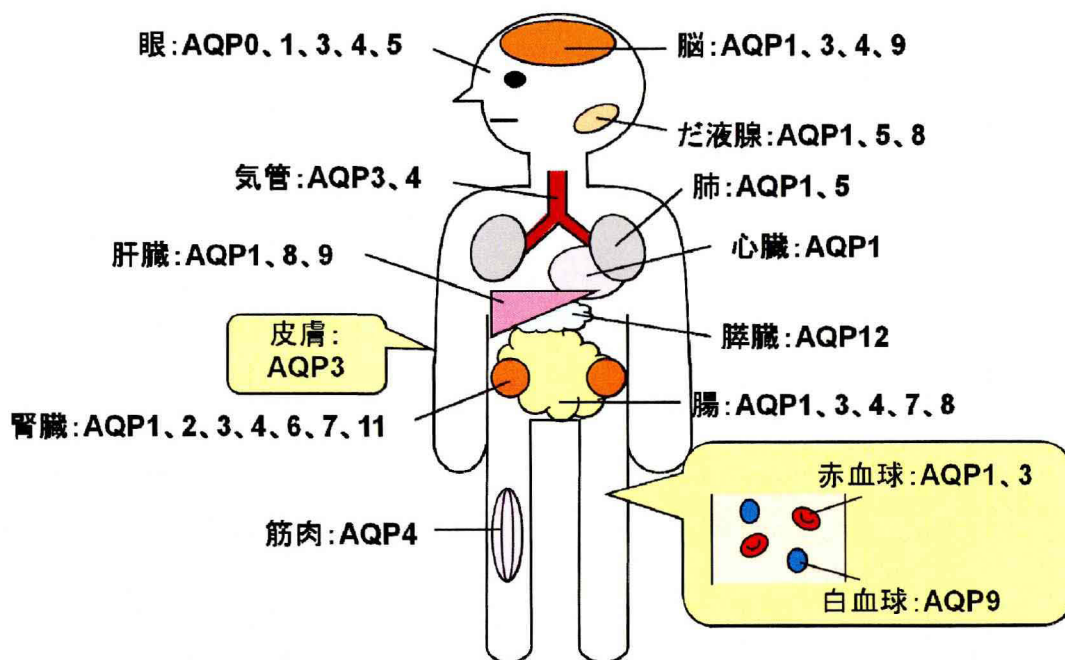


Figure 1 ヒトにおける AQP の発現分布

特に、水の移動が多い腎臓には多数の AQP ファミリーが発現しており、生体の水分量の調節を行っている。中でも集合管では、主細胞の管腔側膜に発現する AQP2 と、側底膜に発現する AQP3 および AQP4 によって、水が管腔側から血管側へと再吸収され、尿が濃縮される (Figure 2)⁵⁾。この集合管における水の再吸収量が尿量を決定すると考えられている。著しい多尿を示す腎性尿崩症において、AQP2 のタンパク質の変異あるいは発現量の減少が認められる^{6, 7)}ことから、AQP2 は集合管における水の再吸収において、最も重要な役割を果たしていると考えられている。

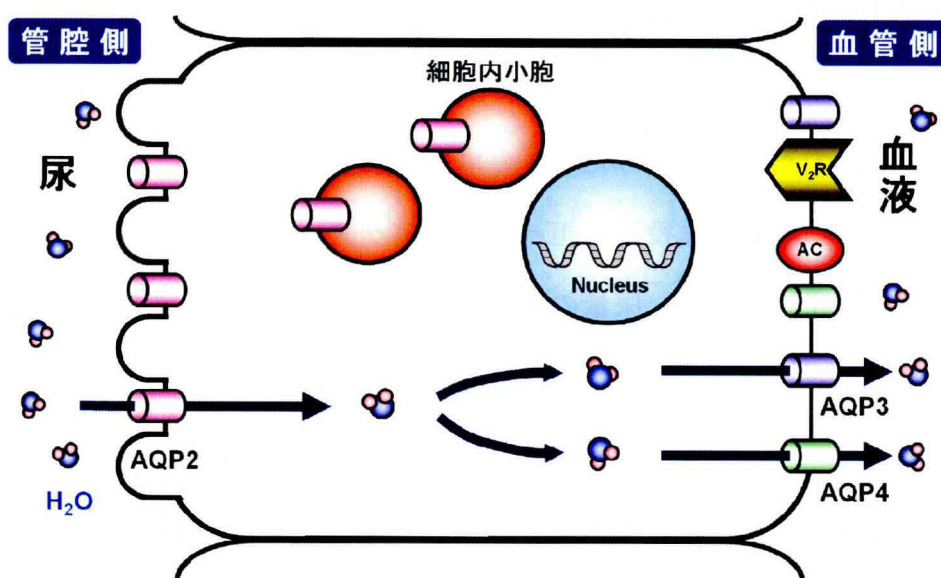


Figure 2 腎臓集合管主細胞における AQP を介した水の移動

薬物は多くの場合、生体にとって異物であるため、生体に投与された薬物は適当な時間後には体外に排泄されることが望ましい。薬物の主たる排泄経路の一つに、腎排泄がある。薬物の腎排泄は糸球体濾過、尿細管分泌、尿細管および集合管における再吸収という一連の物質移動の総和としてあらわれる。このうち、薬物の再吸収は尿細管および集合管管腔内からの水の再吸収によって、管腔から血中へ向かう薬物の濃度勾配が形成され、これが駆動力となって進行する。したがって、薬物の脂溶性や分子

サイズが再吸収の支配因子となる。一方、再吸収に影響を及ぼす生体側の因子としては、尿流速（尿量）や原尿の pH がある。一般に、尿流速が速いほど、管腔側の薬物濃度と血管側の薬物濃度差が減少するため、再吸収量は低下することが知られている。糖尿病に伴う多尿時、利尿薬服用時、薬物の副作用により多尿が生じた場合などには、再吸収が減少するため、薬物の体内動態が変動することは知られている⁸⁾が、尿細管および集合管における水の移動に関する詳細なメカニズムが不明なため、明らかに尿量に変化が見られる場合を除き、薬物の体内動態に及ぼす再吸収の影響は注視されてこなかった。しかしながら、ジゴキシンなどのように再吸収の影響を受ける薬物で、かつ、有効血中濃度域が狭い薬物は、水の再吸収に影響を及ぼす諸因子を明確にする必要がある。そこで本研究では、尿細管および集合管における水の移動に関するメカニズムを明らかにすることを試みた。メカニズム解明に際しては、尿細管および集合管において水の移動に重要な役割を担っているアクアポリン (AQP) に着目し、多尿を呈する病態を研究材料とし、尿量の変動と AQP の発現変動との関係を以下の手順で検討した。

1. 2 型糖尿病モデル KKAy マウスを用いて、尿量の変動と AQP の発現変動の関連性を明確にした。
2. 腎臓の AQP の発現量を特異的に低下させる炭酸リチウム (Li_2CO_3) を用いて、尿量の変動における AQP の意義を明確にした。

【第一章】

2 型糖尿病の病態の進行に伴う腎臓 AQP の発現量と尿量の関係

1. 緒言

糖尿病はその成因により 1 型および 2 型に分類される。糖尿病患者の人口は現在、生活習慣と社会環境の変化に伴い、増加の一途をたどっている。特に 2 型糖尿病の患者数は多く、2025 年には世界中で 3 億人以上に達するであろうと推定されている⁹⁾。糖尿病において、高血糖状態が持続すると、原尿中のグルコース量が増加する。原尿中のグルコースは近位尿細管において、グルコーストランスポーター (glucose transporter; GLUT) を介して能動的に再吸収される。したがって、グルコース濃度が高いと、近位尿細管においてグルコーストランスポーターが飽和するため、グルコースが再吸収されきれずに、高濃度のグルコースを含む原尿が尿細管および集合管を経て、尿として排泄されることになる。このような場合、原尿の浸透圧が高くなるため、尿細管および集合管における水の再吸収が減少し、多尿となる¹⁰⁾。

本章では、糖尿病での多尿時における AQP2 の発現量と尿量の関係を検討することにより、腎臓における水の移動に関する AQP2 の機能を明確にした。

まず、糖尿病の進行と腎臓における AQP2 発現量との関係について調べた。次に、AQP2 の発現量と尿量との関係を明確にする目的で、KKAy マウスにインスリンを投与し、多尿を改善させた際の腎臓 AQP2 の発現変化について検討した。

2. 方法

試薬

2-mercaptoethanol、bromophenol blue、copper (II) sulfate pentahydrate、dimethyl sulfoxide (DMSO)、Folin & ciocalteu's phenol reagent、polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20)、sodium dodecyl sulfate (SDS)、2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris) は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。Anti-rat aquaporin 2 antibody は Alomone Labs, Ltd. (Jerusalem, Israel) から購入した。Anti-rabbit antibody coupled to horseradish peroxidase、bovine serum albumin (BSA)、ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)、leupeptin trifluoroacetate salt および phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) は、Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA) から購入した。Enhanced chemiluminescence system (ECL) plus western blotting detection reagents は、GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK) から購入した。Skim milk powder は Snow Brand Milk Products Co. Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。RNeasy Mini kit は、Qiagen Inc. (Valencia, CA, USA) から購入した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit は、Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) から購入した。iQ SYBR Green Supermix および RNase-free water は、Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) から購入した。Tris EDTA Buffer Solution (TE buffer; pH 8.0) は、ナカライテスク株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。各種プライマーは Invitrogen (Tokyo, Japan) より購入した。ヒューマリン[®]N 注 U-100 は日本イーライリリー株式会社 (Hyogo, Japan) から購入した。その他の試薬は市販されている物の内、最もグレードの高い物を購入した。

動物

雄性 C57BL/6J マウスおよび雄性 KKAY マウスをいずれも 4 週齢で CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan) より購入した。マウスは 1 ケージ 1 匹とし、5、9、12、18、24 週齢で実験に供した。動物は温度 24 ± 1 °C、湿度 55 ± 5 %の施設において飼育し、明暗条件は 8:00 点燈、20:00 消灯の条件下で飼育した。なお、摂餌飼料 MF (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) および飲水は自由摂取とした。それぞれのマウスについて経時的に体重、摂水量および 24 時間尿量を測定した。24 時間尿量の測定は、代謝ケージ (Natsume Seisakusho Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 11:00~翌日 11:00 の間に行った。5、9、12、18、24 週齢の C57BL/6J マウスおよび KKAY マウスを ethyl ether 麻酔下、EDTA・2Na 処理注射筒を用いて腹部大動脈から全血液を採取した。また、腎臓および脳を摘出し、ドライアイスおよび液体窒素を用いて瞬時冷凍し、 -80°C で保存した。

本動物実験は、実験動物の適正な使用および管理について定められた星薬科大学薬学部実験動物ガイドラインに準じて、同大学動物実験施設で行われた。

インスリン投与方法

11 週齢の KKAY マウスにインスリン 40 IU/kg (4 mL/kg) を 1 日 2 回 (8:00 および 20:00) 7 日間、皮下投与し、インスリン投与群とした。一方、同量の生理食塩水を投与した群を control 群とした。インスリン投与開始 4 日目に摂水量および尿量を代謝ケージを用いて測定し、投与 8 日目に採血および腎臓、脳の摘出を行った。

各種血液検査値の測定

採取した血液は、遠心分離 ($1,000 \times g$ for 15 min at 4°C) により血漿を分離し、assay

まで -80°C で保存した。血漿中グルコース濃度および blood urea nitrogen (BUN) は、Glucose C II-Test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) および BUN B-Test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を用いて測定した。血漿中インスリン濃度は、Mouse Insulin ELISA Kit (Shibayagi, Gunma, Japan) を用いて測定した。

腎臓の分画方法

腎臓の分画は Marples らの方法¹¹⁾を改良して行った。瞬時冷凍した腎臓から、氷上で髓質内層を分離し、これを dissecting buffer (0.3 M sucrose, 25 mM imidazole, 1 mM EDTA, 8.5 μM leupeptin, 1 μM PMSF; pH 7.2) を用いて、氷上でホモジナイズ (1,250 rpm、5 stroke、HOM、As One Corp., Osaka, Japan) した。各ホモジネートを遠心分離 (4,000 \times g for 15 min at 4°C) し、得られた上清 (上清 A) から crude membrane (CM) 画分、plasma membrane (PM) 画分および intracellular vesicle (IV) 画分を調製した。上清 A を遠心分離 (200,000 \times g for 60 min at 4°C) した後、上清を除去し、沈殿に dissecting buffer を加え、超音波分散機 (UH-50, SMT Co., Ltd, Tokyo, Japan) により分散させた。この溶液を、細胞全体の膜を含む crude membrane 画分とした。また、上清 A を遠心分離 (17,000 \times g for 30 min at 4°C) した後の上清 (上清 B) を分取した。沈殿に dissecting buffer を加え超音波分散機により分散させ、これを plasma membrane を豊富に含む PM 画分とした。さらに、上清 B を遠心分離 (200,000 \times g for 60 min at 4°C) し、上清を除去した。沈殿に dissecting buffer を加え超音波分散機により分散させ、これを intracellular vesicle を豊富に含む IV 画分とした。

電気泳動およびウエスタンブロッティング法

タンパク質濃度の測定には、Lowry 法¹²⁾を用いた。標準品には BSA を用いた。

電気泳動は、Laemmli 法¹³⁾に基づいて行った。それぞれの画分を loading buffer (84 mM Tris, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue, 4.6% SDS, 10% 2-mercaptoethanol; pH 6.3) に加え 5 分間煮沸し、12.5% ポリアクリルアミドゲルに 4 µg/lane をアプライした。電気泳動後、分離されたタンパク質はセミドライブロッティング装置 (ATTO Corp., Tokyo, Japan) を用いて、PVDF メンブレンに転写した。1.0% skim milk powder で 1 時間ブロッッキングを行った後、anti-rat aquaporin 2 antibody (1 : 1,000) と 1 時間反応させた。メンブレンを TBS-Tween (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20; pH 7.6) を用いて洗浄後、anti-rabbit antibody coupled to horseradish peroxidase (1 : 5,000) と 1 時間反応させた。メンブレンを洗浄後、ECL plus western blotting detection reagents と反応させ、ルミノイメーリアナライザー LAS-3000mini (FUJIFILM, Tokyo, Japan) で露光し、検出されたバンドを解析した。

組織からの RNA の抽出

脳から分離した視床下部から RNeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出した。RNA 抽出方法は、RNeasy Mini Kit 付属のプロトコールに従って行った。得られた溶液を TE buffer を用いて 25 倍希釈し、分光光度計 (U-2800, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) にて 260 nm および 280 nm の吸光度を測定することで純度の確認および RNA 濃度 (µg/mL) の算出を行った。

Real-time RT-PCR

RNA 1 μg から High capacity cDNA synthesis kit を用いて cDNA を合成した。これを TE buffer にて 20 倍希釈し、cDNA TE buffer 溶液とした。プライマーを作成し real-time PCR を行い各遺伝子の発現を検出した。すなわち、PCR Plates の各 well へ iQ SYBR Green Supermix 25 μL 、目的遺伝子の Forward primer (5 pmol/ μL) 3 μL 、Reverse primer (5 pmol/ μL) 3 μL 、cDNA TE buffer 溶液 4 μL 、RNase Free Water 15 μL を加えた。温度条件は denaturation temperature として 95°C で 15 秒、annealing temperature として 56°C で 30 秒、elongation temperature として 72°C で 30 秒とした。増幅過程の蛍光強度を My iQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) によりモニタリングした。プライマーは以下の配列のものを使った。vasopressin: forward; 5'-gccaggatgctcaacactacg-3', reverse; 5'-tctcagctccatgtcagagatg-3'、18S rRNA: forward; 5'-gtctgtgatgcccttagatg-3', reverse; 5'-agcttatgacccgcacttac-3'。18S rRNA をハウスキーパー遺伝子に用い、vasopressin mRNA と 18S rRNA mRNA の発現強度の比を算出した。

統計学的有意差検定

実験値は平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm S.D.) として表示した。統計学的有意差検定には、Dunnett 法あるいは student's *t*-test を用いた。

3. 結果

KKAy マウスの加齢に伴う病態の変化

糖尿病を発症しない正常マウスとして C57BL/6J マウスを用いた。C57BL/6J マウスにおいては、加齢に伴い体重が有意に増加し、24 週齢では 5 週齢に比べ 1.8 倍となった。また、KKAy マウスにおいても加齢に伴い体重は大きく増加し、24 週齢では 5 週齢に比べ 2.1 倍となった (Figure 3A)。

C57BL/6J マウスにおいては、加齢に伴う摂水量の変化は見られなかった。これに対し、KKAy マウスにおける摂水量は、12 週齢では 5 週齢に比べ 2.4 倍有意に増加していた (Figure 3B)。C57BL/6J マウスにおいては、加齢に伴う 24 時間尿量の変化は見られなかったのに対し、12 週齢の KKAy マウスにおける 24 時間尿量は、5 週齢に比べ 8.8 倍有意に増加した (Figure 3C)。

C57BL/6J マウスにおいては、加齢に伴う飽食時血糖値および血漿中インスリン濃度の大きな変化は見られなかった。一方、KKAy マウスにおける飽食時血糖値は、12 週齢では 5 週齢に比べ有意に高く、重篤な糖尿病を呈していた (Figure 3D)。また、KKAy マウスの血漿中インスリン濃度は、加齢に伴い増加し (Figure 3E)、12 週齢においては 5 週齢に比べ有意に高値を示していた。

糖尿病下では病態の進行に伴い腎障害を起こすことが知られている¹⁴⁾ので、腎機能の指標として BUN を測定した。その結果、C57BL/6J マウスおよび KKAy マウスともに、加齢に伴う BUN の変化は認められなかった (Figure 3F)。

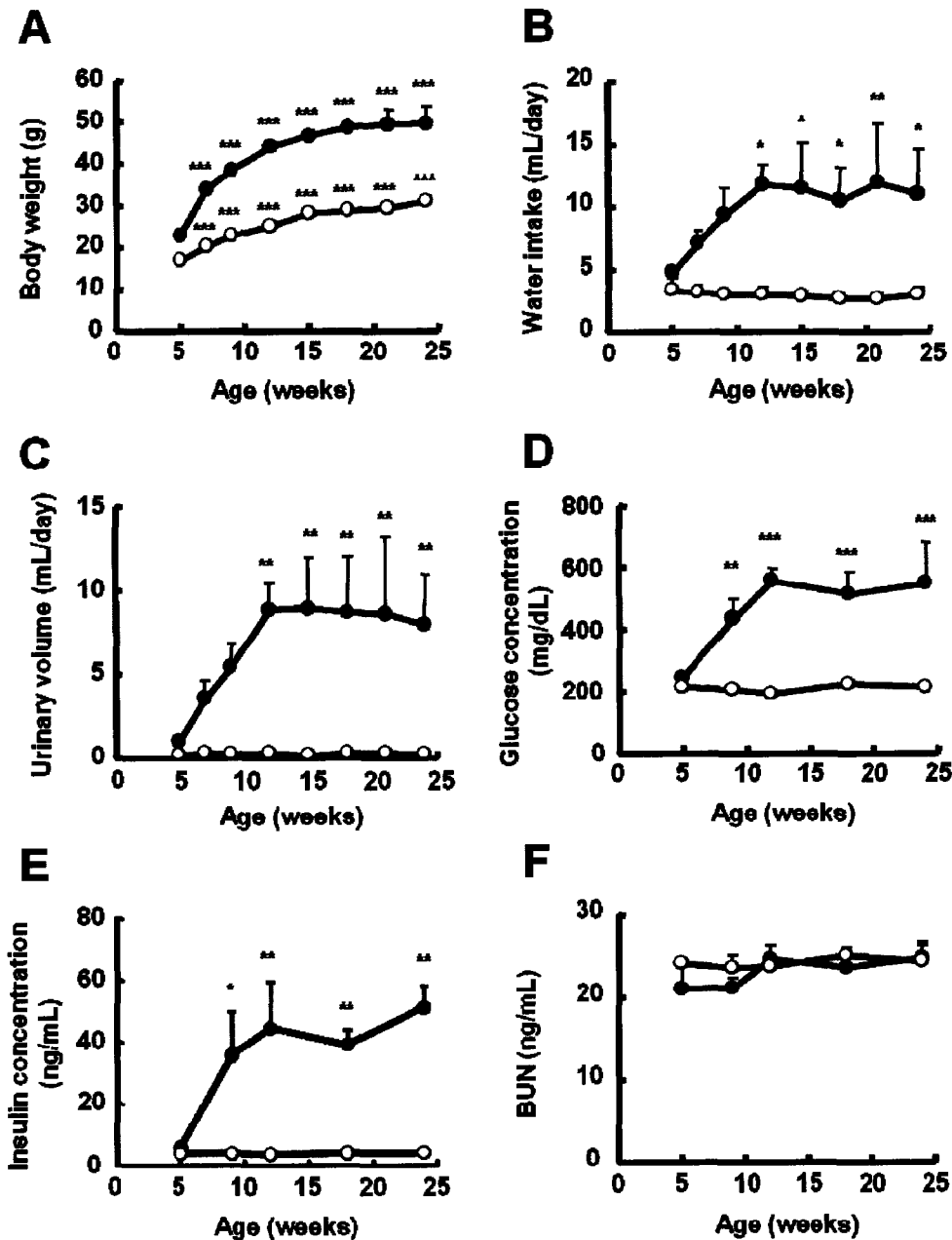


Figure 3 Changes with aging in body weight (A), water intake (B), urinary volume (C), plasma glucose concentration (D), plasma insulin concentration (E), and BUN (F) in C57BL/6J mice (O) and KKAY mice (●)

C57BL/6J mice and KKAY mice at the ages of between 5 and 24 weeks were bred, and changes in body weight, water intake and urinary volume were measured. Blood samples were taken to determine the plasma glucose concentration, plasma insulin concentration, and BUN. Data are expressed as mean±S.D. of six mice per group. Dunnett's test: * $p < 0.05$ vs. 5 weeks; ** $p < 0.01$ vs. 5 weeks; *** $p < 0.001$ vs. 5 weeks.

KKAy マウスの病態の進行に伴う腎臓 AQP2 の発現変化

AQP2 は 29 kDa 付近と 40–50 kDa 付近にバンドが検出された。前者は糖鎖が結合していない AQP2 であり、後者は糖鎖が結合した AQP2 であると考えられている^{15, 16)}。糖鎖の結合が AQP2 の安定性や細胞内輸送に関与することが解明されている^{15, 16)} が、水の透過性は糖鎖の有無に依存しないことがわかっている¹⁷⁾。本研究では、これらのバンドの総和を用いて AQP2 発現量を解析した。

腎臓髄質内層 CM 画分における AQP2 のタンパク質発現量は、C57BL/6J マウスにおいては、加齢に伴い有意に減少した。一方、KKAy マウスにおいては加齢に伴い有意に増加した。多尿が認められた 12 週齢における KKAy マウスの AQP2 のタンパク質発現量は、5 週齢に比べて約 2.5 倍増加した (Figure 4A)。C57BL/6J マウスにおける腎臓髄質内層の PM 画分および IV 画分における AQP2 のタンパク質発現量の比は、加齢に伴い減少する傾向が見られた。これに対して、KKAy マウスにおいては、その比は加齢に伴い有意に増加した (Figure 4B)。

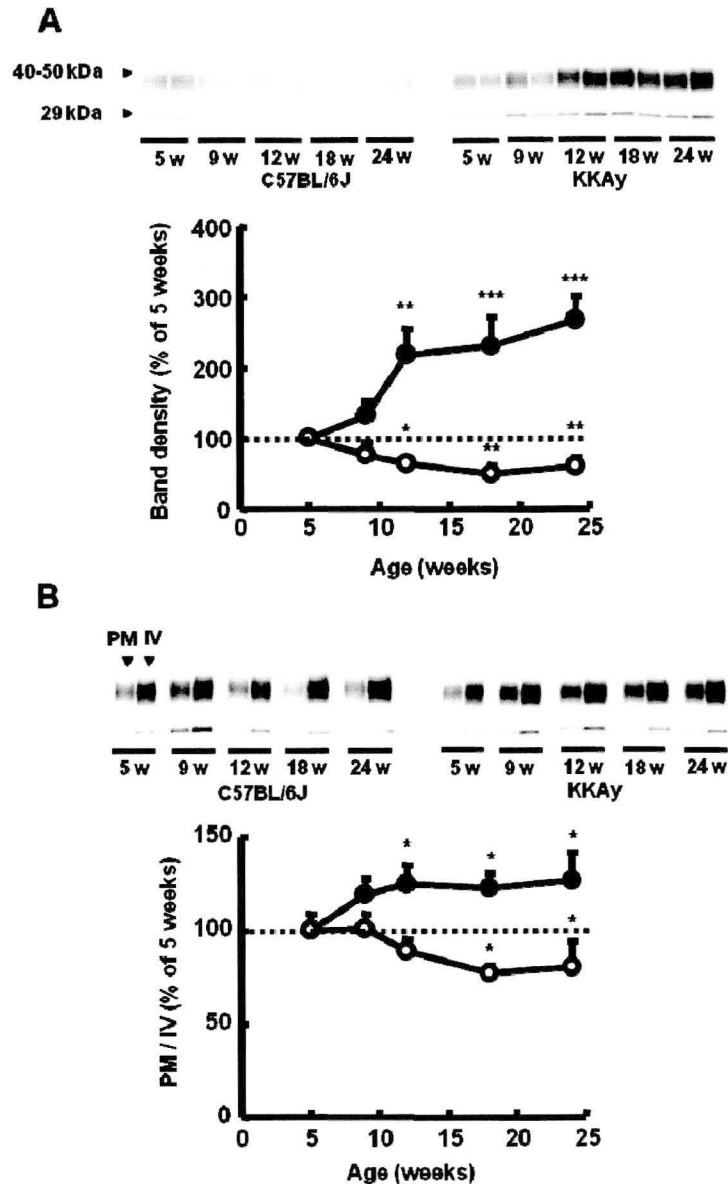


Figure 4 Change with aging in inner medullary AQP2 protein expression in C57BL/6J mice (○) and KKAY mice (●)

From the renal inner medulla of C57BL/6J mice and KKAY mice at the ages of between 5 and 24 weeks, the crude membrane fraction was prepared, and the AQP2 expression levels in the fractions were determined using western blotting (A). The plasma membrane (PM) fraction or intracellular vesicle (IV) fraction from the renal inner medulla was also prepared, and the AQP2 expression levels were determined using Western blotting. The ratio of AQP2 protein expression in the PM fraction to that in the IV fraction was calculated (B). Data are presented using the mean for 5-week-old mice of each strain as 100%.

Data are the mean±S.D. of six mice per group. Dunnett's test: * $p < 0.05$ vs. 5 weeks; ** $p < 0.01$ vs. 5 weeks; *** $p < 0.001$ vs. 5 weeks.

KKAy マウスの病態の進行に伴う視床下部 vasopressin の発現変化

C57BL/6J マウスの視床下部における vasopressin の mRNA 発現量において、加齢に伴う変化は見られなかった。一方、KKAy マウスにおいては 12 週齢まで増加し、その後も高値を示した。12 週齢における vasopressin の mRNA 発現量は、5 週齢に比べ約 2 倍有意に増加した (Figure 5)。

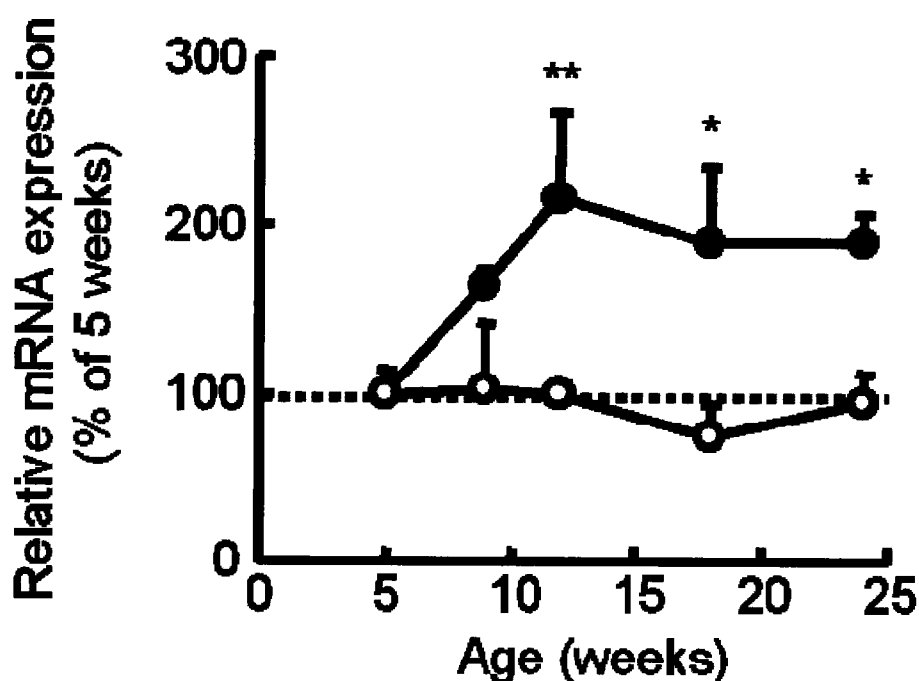


Figure 5 Change with aging in hypothalamic vasopressin expression in C57BL/6J mice (○) and KKAy mice (●)

The hypothalamus was removed from C57BL/6J mice and KKAy mice at the ages of between 5 and 24 weeks, and the hypothalamic vasopressin mRNA expression was measured by real-time RT-PCR assay. As a housekeeping gene, 18S rRNA was used. Data are presented using the mean for 5-week-old mice of each strain as 100%. Data are the mean±S.D. of six mice per group. Dunnett's test: * $p < 0.05$ vs. 5 weeks; ** $p < 0.01$ vs. 5 weeks.

KKAy マウスへのインスリン投与による病態の変化

KKAy マウスにインスリンを投与しても、体重の変化は見られなかった (Figure 6A)。

KKAy マウスの摂水量は、インスリンの投与により、control 群の約 48%まで有意に減少した (Figure 6B)。また、KKAy マウスの尿量については、インスリンの投与により control 群の約 29%まで有意に減少した (Figure 6C)。

KKAy マウスの血糖値はインスリンの投与により有意に低下した (Figure 6D)。一方、血漿中インスリン濃度は、インスリン投与により著しく増加した (Figure 6E)。

インスリンの投与による BUN の変化は見られなかった (Figure 6F)。

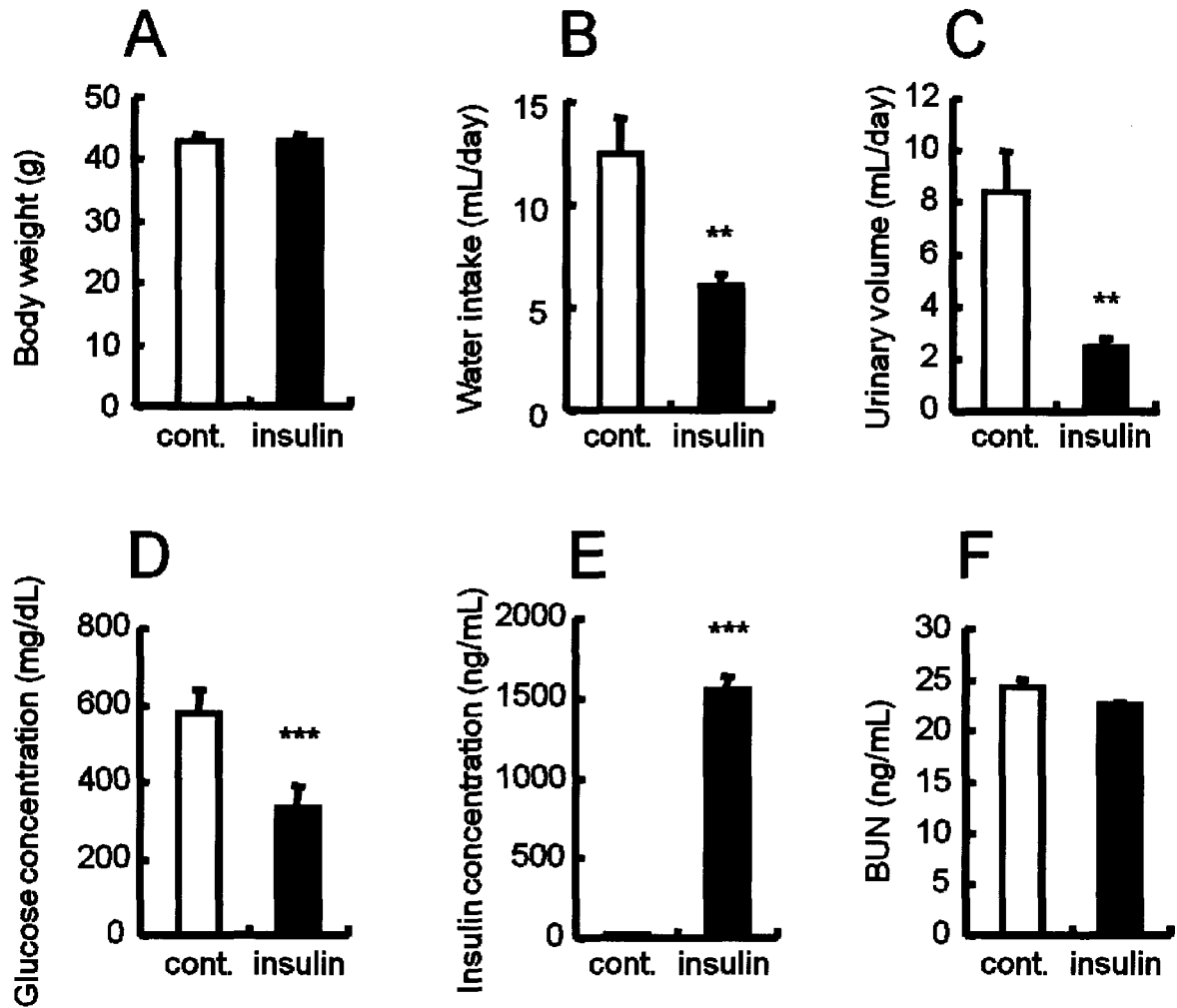


Figure 6 Changes after insulin treatment in body weight (A), water intake (B), urinary volume (C), plasma glucose concentration (D), plasma insulin concentration (E), and BUN (F)

Insulin (40 IU/kg) or physiological saline was subcutaneously administered to 11-week-old KKAY mice twice a day for 7 consecutive days. After insulin treatment was completed, body weight, plasma glucose concentration, plasma insulin concentration, and BUN were measured. Water intake and urinary volume were measured on the fourth day of treatment. Data are the mean±S.D. of five mice per group. Student's *t*-test: ** $p < 0.01$ vs. control; *** $p < 0.001$ vs. control.

KKAy マウスのインスリン投与に伴う腎臓AQP2および視床下部 vasopressin の発現変化

KKAy マウスへのインスリンの投与により、腎臓髄質内層における AQP2 のタンパク質発現量が control 群の 55%まで有意に減少した (Figure 7A)。

PM 画分と IV 画分における AQP2 のタンパク質発現量の比は、KKAy マウスへのインスリンの投与により control 群の 52%まで有意に減少した (Figure 7B)。

視床下部における vasopressin の mRNA 発現量は、KKAy マウスへのインスリンの投与により control 群の 60%まで有意に減少した (Figure 7C)。

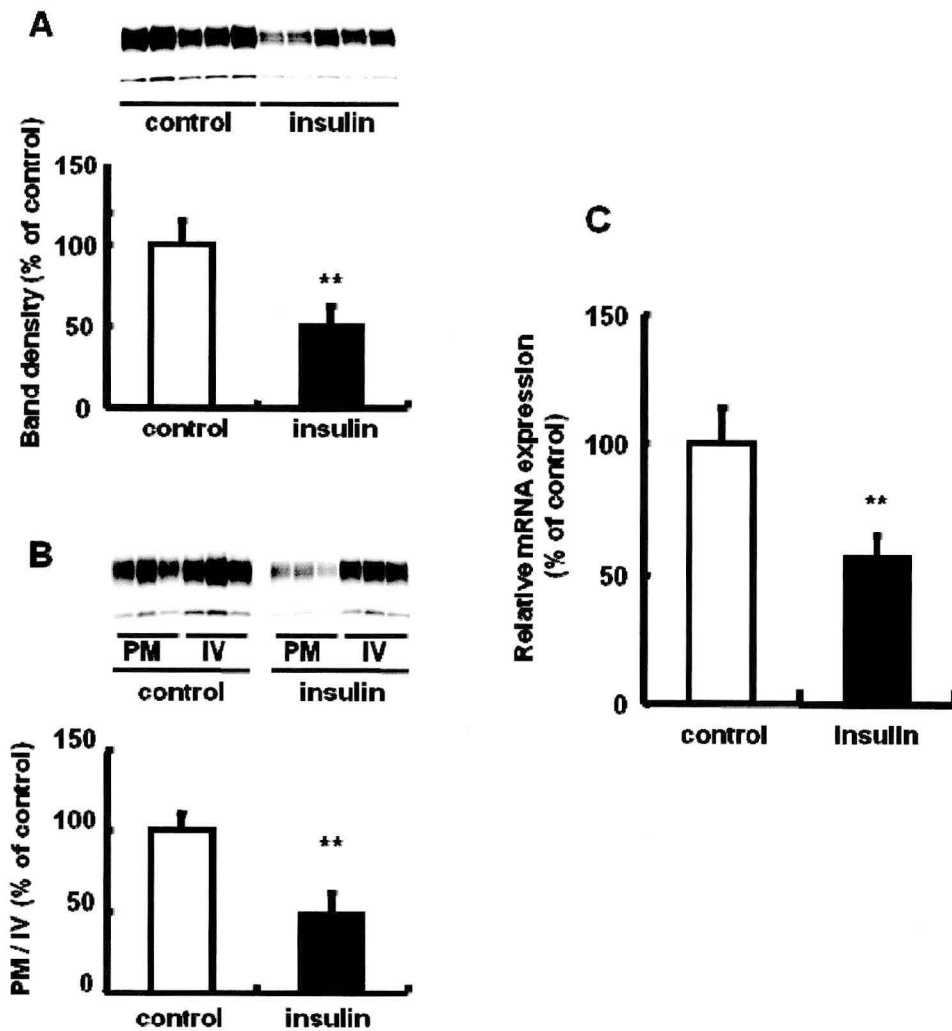


Figure 7 Changes in the expression level of AQP2 in the renal inner medulla and the hypothalamic vasopressin mRNA expression level after insulin treatment

Insulin (40 IU/kg) or physiological saline was subcutaneously administered to 11-week-old KKAY mice twice a day for 7 consecutive days. After insulin treatment was completed, the crude membrane fraction was prepared from the renal inner medulla of the mice, and AQP2 expression levels in the fractions were determined using western blotting (A). The plasma membrane (PM) fraction or intracellular vesicle (IV) fraction from the renal inner medulla was also prepared, and the AQP2 expression levels were determined using Western blotting. The ratio of the AQP2 protein expression in the PM fraction to that in the IV fraction was calculated (B). The hypothalamus of the brain was removed, and the vasopressin mRNA expression was measured by real-time RT-PCR assay. As a housekeeping gene, 18S rRNA was used (C). Data are presented using the mean for 5-week-old mice of each strain as 100%. Student's *t* test: ** $p < 0.01$ vs. control.

4. 考察

本研究で用いた KK_{Ay} マウスは、西村らによって KK マウスと Ay マウス (C57BL/6J·Ay マウス) を掛け合わせることににより作成された¹⁸⁾。KK_{Ay} マウスは早期から重度な肥満・高血糖を発症し、インスリン抵抗性を示すことより、2型糖尿病モデルとして繁用されている^{19, 20)}。

腎臓における AQP2 のタンパク質発現量および細胞内小胞から管腔側膜への移行は、加齢によって減少することが報告されている^{21, 22)}。本研究での C57BL/6J マウスにおける結果は、これらの報告と一致した (Figure 4)。一方、KK_{Ay} マウスでは加齢に伴う AQP2 発現量および管腔側膜への移行の減少が認められず、逆に両者とも増加した (Figure 4)。このことより、KK_{Ay} マウスにおける AQP2 の発現変化は、いずれも糖尿病の病態の進行によるものであると考えられる。

集合管主細胞における AQP2 の発現は、視床下部で合成された vasopressin によって制御されている²³⁾。腎臓集合管主細胞の側底膜に発現する V₂ 受容体に vasopressin が結合することで、AQP2 の転写が促進する。また、V₂ 受容体の活性化によって、細胞内小胞に存在する AQP2 は、管腔側膜へと移行し水チャネルとして働く^{3, 24)}。脳内における vasopressin の mRNA 発現量と血漿中 vasopressin 濃度はほぼ相関することが知られている²⁵⁾。糖尿病患者において vasopressin の分泌量が増加することが知られている^{26, 27)}。脳内における vasopressin の mRNA 発現量は、C57BL/6J マウスにおいては加齢に伴う変化は見られなかったのに対し、KK_{Ay} マウスにおいては糖尿病の進行に伴い増加した (Figure 5A)。以上のことから、2型糖尿病モデル KK_{Ay} マウスでは、多尿時において、尿量を減少させるために vasopressin の分泌量の発現量が増加し、それに伴い腎臓 AQP2 発現量が増加することが示唆された。

これまで、腎臓集合管主細胞を用いた *in vitro* 試験において、インスリンが AQP2 の発現量を増加させることが報告されている²⁸⁾。11 週齢の KK_{Ay} マウスにインスリ

ンを投与したところ、尿量の減少、血漿中インスリン濃度の上昇、視床下部における vasopressin の mRNA 発現量の減少、腎臓における AQP2 のタンパク質発現量の減少、AQP2 の膜移行の減少が見られた (Figure 6 and 7)。これらのことより、尿量が増加すると、それに伴って vasopressin を変化させ、その標的臓器である腎臓において、AQP2 の発現量を変化させることにより、尿量を調整している可能性が示唆された。

AQP による水の移動速度は、細胞内外の浸透圧差よりもむしろ、細胞表面の AQP の発現量に依存することが知られている^{29, 30)}。腎臓での浸透圧は管腔側よりも血管側の方が常に高いため、腎臓の AQP は管腔側から血管側へと水を再吸収方向へと移動する⁵⁾。現在までに、抗利尿作用を示すミネラルコルチコイドの受容体欠損動物が多尿を示し、その際に二次的に腎臓における AQP2 発現量が増加することが報告されている³⁰⁾。また、多尿症状を示す STZ 誘発 1 型糖尿病モデルラットでは、腎臓における AQP2 の発現量が増加することは知られている³²⁻³⁴⁾。本研究により、AQP2 が尿量をコントロールしているホルモンである vasopressin の腎臓における機能分子であることが 2 型糖尿病モデルマウスにおいても確認された。

【第二章】

炭酸リチウム投与時の AQP の発現量と尿量の関係

1. 緒言

近年、STZ 誘発 1 型糖尿病モデル動物において多尿が生じた際に、腎臓の AQP2 の発現量が増加することが報告された³²⁻³⁴。また、第一章において、2 型糖尿病モデル KKAy マウスを用い、2 型糖尿病の病態の進行に伴い尿量および vasopressin 分泌量が増加し、それと同時に腎臓の AQP2 の発現量が増加することがわかった。しかし、AQP2 が vasopressin の機能分子であるかどうかは明確になっていない。加えて、糖尿病時における腎臓 AQP2 の発現増加は多尿時における脱水症状を回避するための補償機構であろうと考えられている³²⁻³⁴が、その生理的役割は依然不明である。

最近、炭酸リチウム (Li_2CO_3) をマウスに投与することにより、尿崩症モデルが作成できることが報告された^{35, 36}。体内に吸収された Li_2CO_3 は、ほぼ 100% が未変化体として糸球体より濾過される。リチウムは、集合管に多く発現しているナトリウムチャンネルにより集合管主細胞内に取り込まれる³⁷。取り込まれたリチウムは、adenylate cyclase (AC) の活性を抑制することで cAMP を減少させ、AQP2 および AQP3 の転写および膜移行の両経路を阻害する^{35, 36, 38}。

そこで本章では、この Li_2CO_3 を使用して、尿の浸透圧を変えずに AQP2 の発現量のみを減少させた実験系を構築し、この実験系における尿量と AQP2 の発現量を調べることにより、問題解決を図った。具体的には、STZ 誘発 1 型糖尿病モデルマウスに対して、 Li_2CO_3 を投与することにより、目的の実験系を作製し、尿量と腎臓 AQP の発現量との関係を比較検討した。

2. 方法

試薬

2-mercaptoethanol、bromophenol blue、DMSO、Folin & ciocalteu's phenol reagent、Tween 20、SDS および Tris は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。Anti-rat AQP1 antibody、Anti-rat AQP2 antibody、Anti-rat AQP3 antibody および Anti-rat AQP4 antibody は Alomone Labs, Ltd. (Jerusalem, Israel) から購入した。Streptozotocin、anti-rabbit antibody coupled to horseradish peroxidase、BSA、EDTA、leupeptin trifluoroacetate salt および PMSF は、Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA) から購入した。ECL plus western blotting detection reagents は、GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK) から購入した。Skim milk powder は Snow Brand Milk Products Co. Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。RNeasy mini kit は、Qiagen Inc. (Valencia, CA, USA) から購入した。High capacity cDNA reverse transcription kit は、Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) から購入した。iQ SYBR green supermix および RNase-free water は、Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) から購入した。TE buffer は、ナカライテスク株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。各種プライマーは Invitrogen (Tokyo, Japan) より購入した。その他の試薬は市販されている物の内、最もグレードの高い物を購入した。

STZ モデルマウスの作製

6 週齢雄性 ICR マウスを Sankyo Labo Service (Tokyo, Japan) より購入した。動物は温度 24 ± 1 °C、湿度 55 ± 5 % の施設において飼育し、明暗条件は 8:00 点燈、20:00 消灯の条件下で飼育した。本動物実験は、実験動物の適正な使用および管理について定められた星薬科大学薬学部実験動物ガイドラインに準じて、同大学動物実験施設で

行われた。

12 時間絶食後、STZ 投与群には STZ-クエン酸緩衝液 (pH 4.5) を尾静脈内投与した (150 mg/kg)。投与 2 週間後に眼底採血を行い、血糖値が 500 mg/dL 以上のマウスを実験に用いた。コントロール群にはクエン酸緩衝液を尾静脈内投与した。

Li₂CO₃ 投与方法

Normal マウスおよび STZ マウスに粉末飼料 (MF, オリエンタル酵母株式会社)、Li₂CO₃ 0.1%あるいは 0.2%含有粉末飼料を 10 日間自由摂取させた。投与 7 日目に摂水量および 24 時間尿量を測定した。24 時間尿量の測定は、代謝ケージを用いて 11:00 ~翌日 11:00 の間に行った。投与終了後、ジエチルエーテル麻酔下で、腹部大静脈よりヘパリンを用いて採血を行った。腎臓を摘出し、液体窒素を用いて瞬時冷凍し、-80°Cで保存した。

血糖値、血漿中および尿中クレアチニン濃度の測定

採取した血液は、遠心分離 (1,000×g for 15 min at 4°C) により血漿を分離し、assay まで-80°Cで保存した。尿は、遠心分離 (1,000×g for 15 min at 4°C) し、上清を用いた。血漿中グルコース濃度および尿中グルコース濃度は Glucose CII-Test Wako を用いて測定した。血漿中クレアチニン濃度および尿中クレアチニン濃度は Creatinine assay kit (BioVision, Inc., Mountain View, CA, USA) を用いて測定した。glomerular filtration rate (GFR) の指標として、クレアチニークリアランス (Ccr) を以下の式を用いて算出した³⁹⁾。

$$Ccr = (Cu / Cp) \times V$$

Cu : 尿中クレアチニン濃度, Cp : 血漿中クレアチニン濃度, V : 尿量

組織からの RNA の抽出

腎臓髄質外層から RNeasy mini kit を用いて RNA を抽出した。RNA 抽出方法は、RNeasy mini kit 付属のプロトコールに従って行った。得られた溶液を TE buffer を用いて 25 倍希釈し、分光光度計にて 260 nm および 280 nm の吸光度を測定することで純度の確認および RNA 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) の算出を行った。

Real-time RT-PCR

RNA 1 μg から High capacity cDNA synthesis kit を用いて cDNA を合成した。これを TE buffer にて 20 倍希釈し、cDNA TE buffer 溶液とした。プライマーを作成し real-time PCR を行い各遺伝子の発現を検出した。すなわち、PCR Plates の各 well へ iQ SYBR Green Supermix 25 μL 、目的遺伝子の Forward primer (5 pmol/ μL) 3 μL 、Reverse primer (5 pmol/ μL) 3 μL 、cDNA TE buffer 溶液 4 μL 、RNase Free Water 15 μL を加えた。温度条件は denaturation temperature として 95°C で 15 秒、annealing temperature として 56°C で 30 秒、elongation temperature として 72°C で 30 秒とした。増幅過程の蛍光強度を My iQTM Single Color Real-Time PCR Detection System によりモニタリングした。使用したプライマーを Table 2 に示す。18S rRNA をハウスキーピング遺伝子に用い、18S rRNA mRNA の発現強度の比を算出した。

Table 2 Primer sequences of mouse mRNA

Target	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
SMIT	AGGAGTCCTTGGGTGGAAC	ACTGCAACAAGGCCTCCAG
TauT	GTTCTGGGAGCGCAACGT	ACCGAACACCCTTCCAGATG
NKCC2	GTCTCGGTGTGATTATCATCGG	ATCCGTTTGTGGCGATAGCAG
UT-A1	AAGGAGATGTCTGACAGCAACA	GGGCTGGGTGTGTATCCTG
GLUT2	CTGGAGCCCTCTTGATGGGA	CCAGTCCTGAAATTAGCCCACA
SGLT2	TGAGTGGAATGCGCTCTTCG	CTTGCGGAGGTACTIONGAGGC
18S rRNA	GTCTGTGATGCCCTTAGATG	AGCTTATGACCCGCACTTAC

SMIT; sodium *myo*-inositol transporter, TauT; taurine transporter, NKCC2; Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 2, UT-A1; Urea transporter A1, GLUT2; glucose transporter 2, SGLT2; sodium/glucose cotransporter 2

腎臓分画方法

腎臓の分画は Marples らの方法¹¹⁾を改良して行った。瞬時冷凍した腎臓から、氷上で髄質内層および皮質を分離し、これを dissecting buffer (0.3 M sucrose, 25 mM imidazole, 1 mM EDTA, 8.5 μM leupeptin, 1 μM PMSF; pH 7.2) を用いて、それぞれ氷上でホモジナイズ (1,250 rpm、5 stroke) した。各ホモジネートを遠心分離 (4,000×g for 15 min at 4°C) した。上清を遠心分離 (17,000×g for 30 min at 4°C) した後、上清を除去した。沈殿に dissecting buffer を加え超音波分散機により分散させ、これを plasma membrane を豊富に含む PM 画分とした。

ウエスタンブロッティング法

タンパク質濃度の測定には、Lowry 法¹²⁾を用いた。標準品には BSA を用いた。

電気泳動は、Laemmli 法¹³⁾に基づいて行った。それぞれの画分に loading buffer (84 mM Tris, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue, 4.6% SDS, 10% 2-mercaptoethanol; pH 6.3) を加え 5 分間煮沸し、12.5% ポリアクリルアミドゲルに 4 µg/lane をアプライした。電気泳動後、分離されたタンパク質はセミドライブロッティング装置を用いて、PVDF メンブレンに転写した。1.0% skim milk powder で 1 時間ブロッキングを行った後、rabbit anti-AQP1 (1:500)、rabbit anti-AQP2 (1:1,000)、rabbit anti-AQP3 (1:500) あるいは rabbit anti-AQP4 (1:500) と 1 時間反応させた。メンブレンを TBS-Tween (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20; pH 7.6) を用いて洗浄後、donkey anti-rabbit IgG (whole molecule) horse radish peroxidase conjugate (AQP1 and AQP3; 1:2,000, AQP2 and AQP4; 1:5,000) と 1 時間反応させた。メンブレンを洗浄後、ECL plus western blotting detection reagents と反応させ、ルミノイメーリアナライザー LAS-3000mini で露光し、検出されたバンドを解析した。

統計学的有意差検定

実験値は平均値±標準偏差 (mean±S.D.) として表示した。統計学的有意差検定には、Tukey 法を用いた。

3. 結果

血糖値、尿量、摂水量およびクレアチニンクリアランスに及ぼす Li_2CO_3 の影響

Normal マウスの血糖値は約 200 mg/dL であった。 Li_2CO_3 投与による血糖値の変化は見られなかった。STZ マウスの血糖値は約 800 mg/dL であり、尿糖は 3 g/day であった。 Li_2CO_3 を 0.1%あるいは 0.2%混餌投与した STZ マウスの血糖値および尿糖は、STZ マウスとほぼ同じであった (Figure 8A and B)。

Normal マウスの 1 日あたりの尿量は約 1 mL であり、 Li_2CO_3 の投与により 7 mL に増加した。STZ マウスの 1 日当たりの尿量は約 36 mL であった。 Li_2CO_3 を投与した STZ マウスの尿量は、 Li_2CO_3 非投与 STZ マウスに比べて有意に増加した。特に、 Li_2CO_3 0.2%処置 STZ マウスの尿量は STZ マウスに比べて約 2 倍高く、70 mL であった (Figure 8C)。

Normal マウスの 1 日あたりの摂水量は約 2 mL であり、 Li_2CO_3 の投与により約 6 倍に増加した。STZ マウスの 1 日当たりの摂水量は 50 mL/day であった。 Li_2CO_3 を投与した STZ マウスの摂水量は Li_2CO_3 非投与 STZ マウスに比べて有意に増加した。特に、 Li_2CO_3 0.2%処置 STZ マウスの摂水量は STZ に比べて約 1.6 倍高く、80 mL であった (Figure 8D)。

Normal マウスの Ccr は、約 0.3 mL/min であり、 Li_2CO_3 投与による Ccr の変化は見られなかった。 Li_2CO_3 を投与したマウスの Ccr は、Normal マウスおよび STZ マウスとほぼ同程度であった (Figure 8E)。

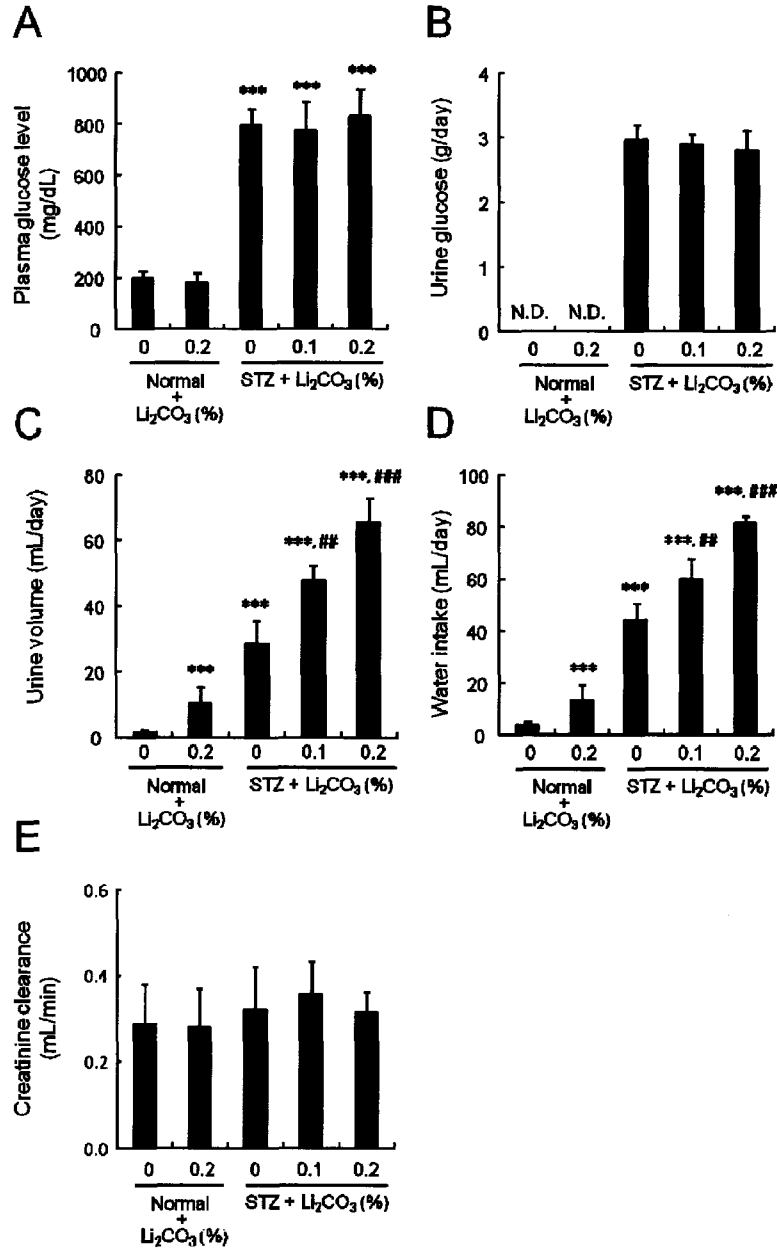


Figure 8 Changes in plasma glucose level (A), urine glucose level (B), urine volume (C), water intake (D), and creatinine clearance (E) following treatment of normal mice and STZ mice with lithium carbonate

Normal mice and STZ treated mice were provided with control chow, chow containing 0.1% or 0.2% Li₂CO₃ for ten days, ad libitum. Seven days after administration, water intake and 24-hour urine volume were measured. After ten days, plasma glucose and urine glucose level were measured. Plasma and urinary creatinine concentrations were determined to calculate creatinine clearance. Data show the mean \pm S.D. of six mice per group. Tukey's test: *** p <0.001 vs. normal mice; ## p <0.01, ### p <0.001 vs. STZ mice.

浸透圧調節関連遺伝子に及ぼす Li_2CO_3 の影響

集合管における尿の浸透圧を調べる目的で、浸透圧調節関連遺伝子の発現量を測定した^{40,43}。STZ マウスの sodium *myo*-inositol transporter (SMIT) の mRNA 発現量は、Normal マウスに比べて約 2 倍有意に高かった。Normal マウスにおいても STZ マウスにおいても、 Li_2CO_3 は SMIT の発現量に影響を及ぼさなかった (Figure 9A)。また、taurine transporter (TauT) の mRNA 発現量についても、SMIT の mRNA 発現量と同様の傾向を示した (Figure 9B)。

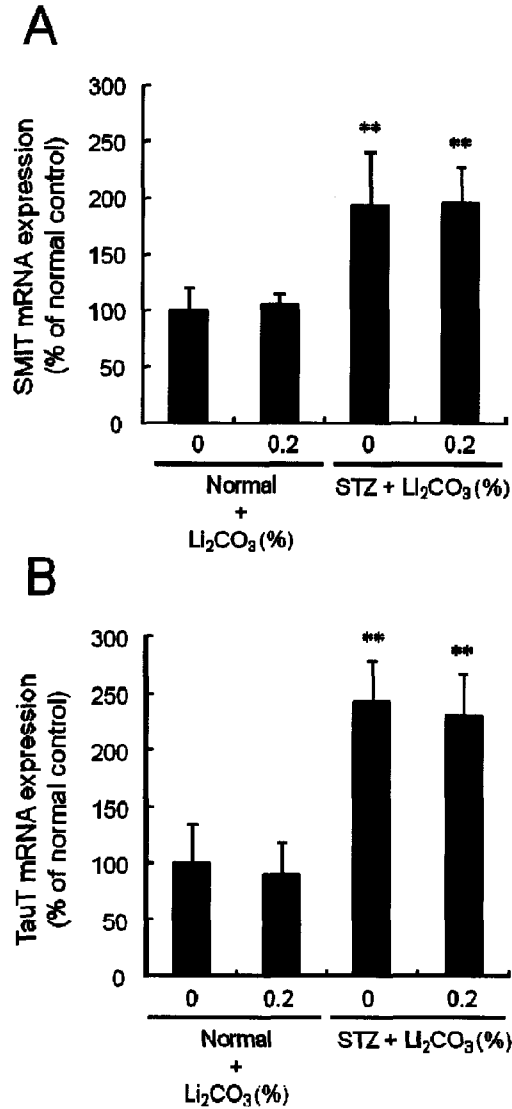


Figure 9 Changes in the mRNA expression levels of sodium myo-inositol transporter (SMIT, A) and taurine transporter (TauT, B) in the renal outer medulla following treatment of normal mice and STZ mice with lithium carbonate

Normal mice and STZ treated mice were provided with control chow, chow containing 0.2% Li₂CO₃ for ten days, *ad libitum*. The kidneys of the mice were removed, and the mRNA expression levels of SMIT and TauT in the renal outer medulla were measured by real-time RT-PCR. 18S rRNA was used as a house-keeping gene, and the averages of values derived from the un-treated normal mice were expressed as 100%. Data show the mean \pm S.D. of six mice per group. Tukey's test: ** $p < 0.01$ vs. normal mice.

腎臓におけるナトリウムトランスポーター、尿素トランスポーターおよび糖トランスポーターの発現に及ぼす Li_2CO_3 の影響

集合管を多く含む腎臓髄質内層におけるナトリウムトランスポーター (NKCC2; $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter 2)、尿素トランスポーター (UT-A1; Urea transporter A1) および糖トランスポーター (GLUT2; glucose transporter 2, SGLT2; sodium/glucose cotransporter 2) の mRNA 発現量を測定した (Figure10)。

STZ マウスの NKCC2 の mRNA 発現量は、Normal マウスとほぼ同程度であった。一方、Normal マウスにおいても、STZ マウスにおいても、 Li_2CO_3 投与により、NKCC2 の mRNA 発現量の変化は見られなかった。

STZ マウスの UT-A1、GLUT2 および SGLT2 の mRNA 発現量は、Normal マウスに比べて有意に増加した。一方、Normal マウスにおいても STZ マウスにおいても、これらの mRNA 発現量は Li_2CO_3 投与により減少した。

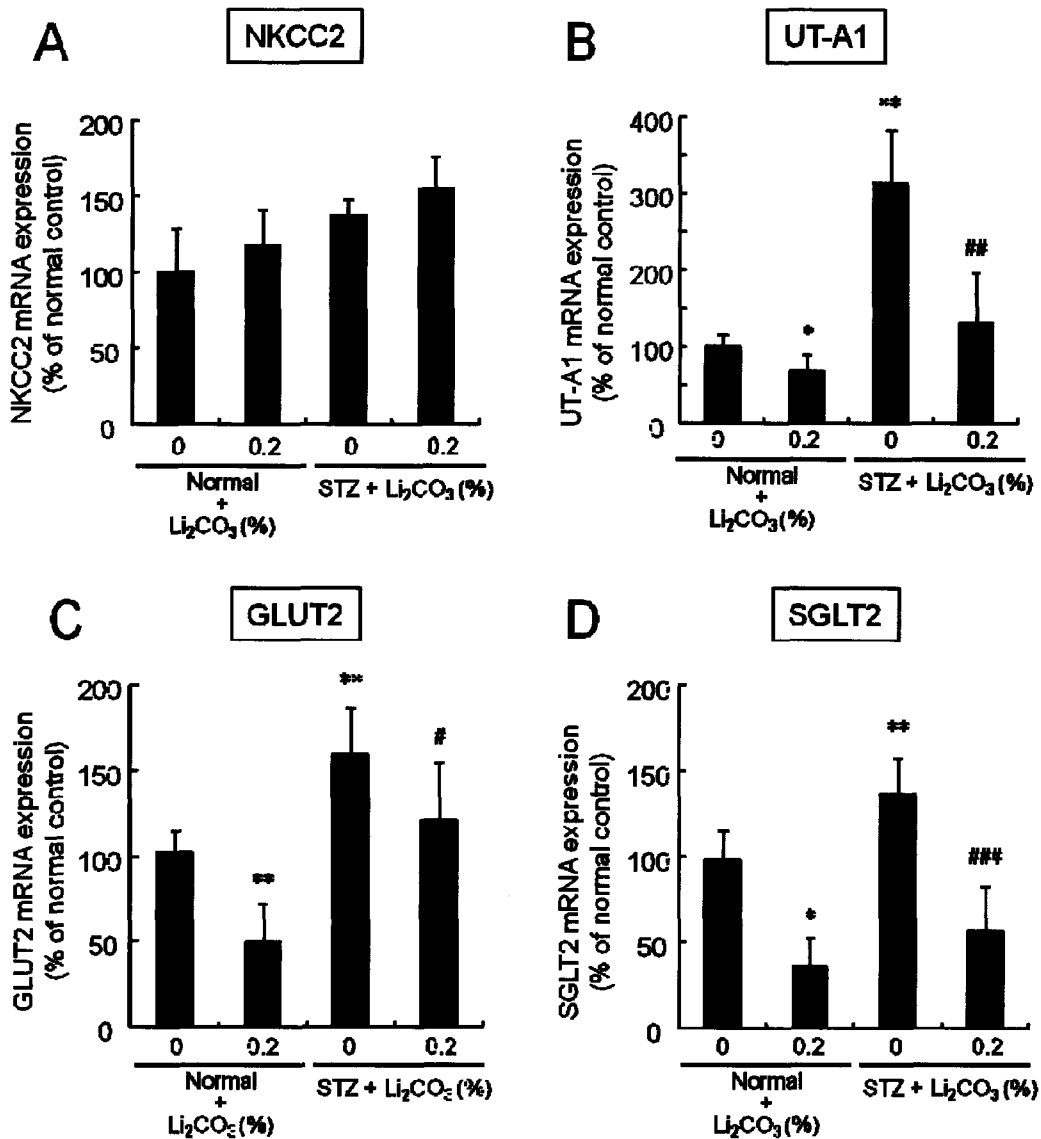


Figure 10 mRNA expression levels of sodium, urea, and glucose transporter in the kidneys

Normal mice and STZ treated mice were provided with control chow, chow containing 0.2% Li₂CO₃ for ten days, *ad libitum*. The kidneys of the mice were removed, and the mRNA expression levels of NKCC2 (A), UT-A1 (B), GLUT2 (C) and SGLT2 (D) in the inner medulla were measured by real-time RT-PCR. 18S rRNA was used as a house-keeping gene, and the averages of values derived from the un-treated normal mice were expressed as 100%. Data show the mean ± S.D. of six mice per group. Tukey's test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. normal mice; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. STZ mice.

腎臓における AQP1、AQP2、AQP3、AQP4 の発現に及ぼす Li_2CO_3 の影響

近位尿細管を多く含む皮質の PM 画分における AQP1 のタンパク質発現量をウェスタンブロッティング法で分析した。AQP1 は 2 本のバンドが検出された (Figure 11A)。25 kDa 付近のバンドは糖鎖が結合していない AQP1、35-45 kDa 付近のバンドは糖鎖が結合している AQP1 である。糖鎖の有無は AQP の安定性や膜移行に関与している^{15, 16)}が、水の透過性には影響がない¹⁷⁾。したがって、本研究では、バンドの合計を AQP1 の発現量として解析した。STZ マウスの AQP1 のタンパク質発現量は、Normal マウスとほぼ同程度であった。Normal マウスおよび STZ マウスにおいて、 Li_2CO_3 処置による AQP1 の発現量の変化は見られなかった。

集合管を多く含む腎臓髄質内層の PM 画分における AQP2 のタンパク質のバンドは、29 kDa と 40-50 kDa 付近に検出された (Figure 11B)。STZ マウスにおいては、AQP2 のバンドの合計が、Normal マウスに比べて約 2.7 倍有意に増加した。Normal マウスおよび STZ マウスにおいて、 Li_2CO_3 処置により AQP2 の発現量は有意に減少した。

集合管を多く含む腎臓髄質内層の PM 画分における AQP3 のタンパク質のバンドは、糖鎖が結合していない AQP3 が 27 kDa 付近に、糖鎖が結合した AQP3 が 33-40 kDa 付近に検出された (Figure 11C)。STZ マウスにおいては、AQP3 の発現量が Normal マウスに比べて有意に増加した。Normal マウスおよび STZ マウスにおいて、 Li_2CO_3 処置により AQP3 の発現量は有意に減少した。

集合管を多く含む腎臓髄質内層の PM 画分における AQP4 のタンパク質は、33 kDa 付近に単一にバンドが検出された (Figure 11D)。Normal マウスと STZ マウス間で、AQP4 の発現量に変化は見られなかった。Normal マウスおよび STZ マウスにおいて、 Li_2CO_3 処置による AQP4 の発現量に変化は見られなかった。

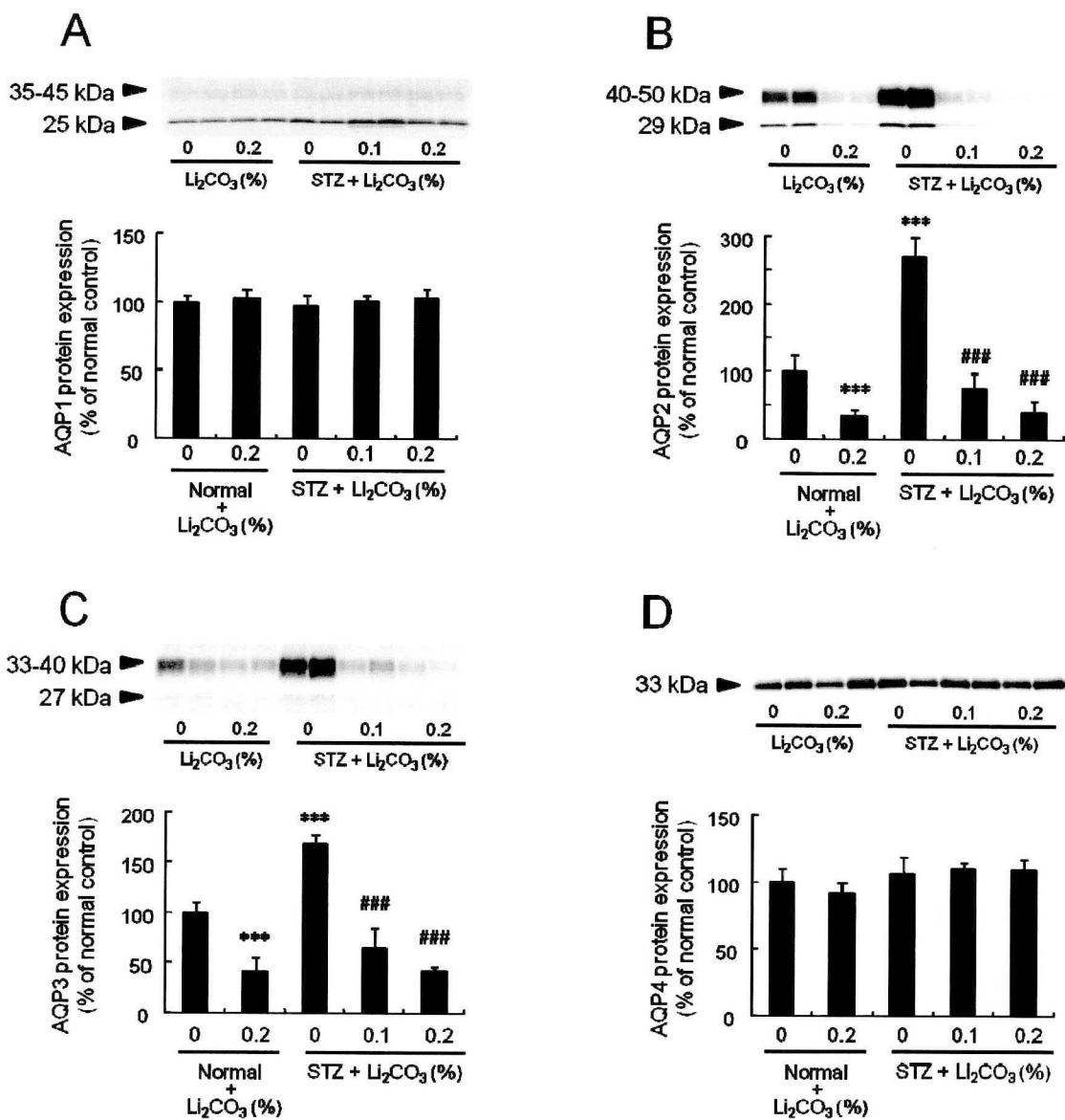


Figure 11 Protein expression levels of AQP1 (A), AQP2 (B), AQP3 (C), and AQP4 (D) in the kidneys

Normal mice and STZ treated mice were provided with control chow, chow containing 0.1% or 0.2% Li₂CO₃ for ten days, ad libitum. After completion of administration, the kidneys were removed and the renal cortex and inner medulla were separated. Using the plasma membrane fraction separated by centrifugation, protein expression levels of AQP1 in the renal cortex and of AQP2, AQP3, and AQP4 in the renal medulla were determined by Western blotting. The averages of values derived from the normal mice were expressed as 100%. Data show the mean \pm S.D. of six mice per group. Tukey's test: ^{***} $p < 0.001$ vs. normal mice; ^{###} $p < 0.001$ vs. STZ mice.

4. 考察

マウスに STZ を投与することにより、膵臓の β 細胞が破壊され、インスリンの欠乏が生じ、血糖値の増加および尿糖が出現する。また、尿糖の出現により多尿が生じ、それに伴い摂水量も増加することが報告されている⁴⁴⁾。本研究では、重度な糖尿病を呈しているマウスを実験に用いた (Figure 8)。Li₂CO₃ 処置 STZ マウスの血糖値および尿糖は、STZ マウスとほぼ同程度であったが、尿量および摂水量は有意に増加した (Figure 8)。これらの結果から、Li₂CO₃ は血糖値に影響を与えずに尿量を増加させることが示された。

ヒトの腎臓では 1 日当たり約 150 L の水が糸球体で濾過され、原尿が生成する。この原尿は、近位尿細管で約 65 %、ヘンレ下行脚で約 15 %、遠位尿細管で約 15 %、集合管で約 4 %が再吸収され、最終的に約 1.5 L が尿として排泄される。このように、尿量は原尿の生成量と尿細管および集合管における水の再吸収量に依存している⁷⁾。本研究ではまず、原尿の生成量を調べる目的で、血漿クレアチニン濃度および尿中クレアチニン濃度より Ccr を算出した³⁹⁾。Ccr は糸球体濾過速度 (GFR) と近似しており、原尿の生成量の指標となる。STZ マウスに Li₂CO₃ を投与しても、Ccr は変化しないことが分かった (Figure 8E)。このことより、Li₂CO₃ を投与した STZ マウスと非投与 STZ マウスの間で、原尿生成量は変化しないことが示唆された。

近年、尿量調節に AQP が重要な役割を担っていることが解明されてきた。AQP1 は近位尿細管を多く含む皮質に、AQP2、AQP3 および AQP4 は集合管を多く含む腎臓髄質内層に優位に発現している⁵⁾。AQP2 および AQP3 は、vasopressin によって発現が制御されている。腎臓集合管主細胞の側底膜に発現する V₂ 受容体に vasopressin が結合することで、AC を活性化する。AC の活性化により産生された cAMP は、protein kinase A (PKA) を活性化し^{45, 46)}、続いて cAMP response element binding protein (CREB) をリン酸化する^{47, 48)}。CREB のリン酸化は AQP2 および

AQP3 の発現および細胞膜への移行を調節する^{49, 50)}。一方、AQP1 および AQP4 の発現量は、vasopressin により制御されないことが知られている^{51, 52)}。糖尿病患者および糖尿病動物において、vasopressin の分泌が増加し、AQP2 および AQP3 の発現量が増加することが報告されている^{26, 53)}。本研究においても、STZ マウスの AQP2 および AQP3 の発現量は Normal マウスと比べて増加したが、AQP1 および AQP4 は変化しなかった (Figure 11)。この結果は、これまでの報告^{51, 52)}と一致するものであり、vasopressin は集合管の尿の濃縮はコントロールしているが、近位尿細管における尿の濃縮はコントロールしていないことが示唆された。加えて、Li₂CO₃ 投与による尿量の増加は、尿細管における水の再吸収の減少に起因したものではなく、集合管における水の再吸収の減少に起因している可能性が示唆された。

集合管における水の再吸収量は、尿の浸透圧と AQP の発現量に依存している^{54, 55)}。まず、尿量を最終的にコントロールしている集合管での浸透圧を調べる目的で、浸透圧調節関連因子である SMIT および TauT の mRNA 発現量を測定するとともに、浸透圧関連トランスポーターの mRNA 発現量を測定した。

SMIT および TauT は、浸透圧の上昇により発現量が増加することが知られている⁴⁰⁻⁴³⁾。本研究において、STZ マウスに Li₂CO₃ を投与しても腎臓髄質外層における SMIT および TauT の mRNA 発現量には、変化は見られなかった (Figure 9)。このことから、Li₂CO₃ の投与により、腎臓集合管内の浸透圧は変化していなかったことが示唆された。

集合管における浸透圧はナトリウム、尿素および糖などにより決定される。そこで、Li₂CO₃ 処置が集合管内のナトリウム、尿素および糖のトランスポーターに及ぼす影響について検討した。ナトリウムトランスポーターである NKCC2 の mRNA 発現量は Li₂CO₃ 処置による変化は見られなかった。一方、尿素トランスポーターである UT-A1、グルコーストランスポーターである GLUT2 および SGLT2 の mRNA 発現量は有意に低下した (Figure 10)。これらのことから、Li₂CO₃ の投与によりナトリ

ウムの再吸収量は変わらず、尿素および糖の再吸収量が低下している可能性が示唆された。Normal マウスにおいても、STZ マウスにおいても、 Li_2CO_3 処置の有無に関係なく、集合管まで到達した原尿の量は同一であると仮定すると、 Li_2CO_3 処置マウスにおいては、尿量が増加するので尿の浸透圧は低下するものと考えられる。しかし、実際のところ、SMIT および TauT の変化は見られなかった。本結果より、ナトリウムの吸収には変化が見られず、尿素やグルコースの吸収が低下したことが、 Li_2CO_3 の投与により尿量が増加しても集合管の浸透圧が変化しなかった理由として考えられる。以上の結果より、 Li_2CO_3 を投与しても、集合管での浸透圧は変化しないものと推測された。

次に、集合管を多く含む腎臓髄質内層に多く発現している AQP⁷ の発現量をウェスタンブロットティングにより測定した。STZ マウスの腎臓髄質内層 PM 画分における AQP2 および AQP3 のタンパク質発現量は、Normal マウスに比べて有意に高い値を示した (Figure 11B and 11C)。また、腎臓髄質内層の AQP2 および AQP3 のタンパク質発現量は、いずれも Li_2CO_3 の投与により減少した (Figure 11B and 11C)。このことから、腎臓の AQP2 および AQP3 の発現量が減少すると、尿量が増加することが示された (Figure 8C, 11B and 11C)。AQP は浸透圧勾配にしたがって水を輸送することが知られている^{54, 55)}。また、集合管の内側の浸透圧より、血管側の浸透圧が常に高く、水は管腔側から血管側に輸送されることが知られている⁵⁶⁾。したがって、糖尿病時の多尿状態において、集合管の AQP2 および AQP3 の発現量増加は水の再吸収を促進している可能性が強く示唆された。

ここで、糖尿病による浸透圧利尿に起因した尿量と AQP2 および AQP3 に起因した尿量を推定すると以下のようなになる。すなわち、AQP2 および AQP3 の発現量が同一で、浸透圧が異なる 2 者の比較 ($0.2\%\text{Li}_2\text{CO}_3$ 投与した STZ マウスと $0.2\%\text{Li}_2\text{CO}_3$ 投与した Normal マウスの差, Figure 8C, 11B and 11C) から、糖尿病による浸透圧利尿に起因した尿量は約 63 mL (70 mL-7 mL) と推定される。一方、浸透圧が同一

で、AQP2 および AQP3 が異なる 2 者の比較 (0.2%Li₂CO₃ 投与 STZ マウスと非投与 STZ マウスの差, Figure 8C and 9) から、STZ マウスにおける AQP2 および AQP3 に起因した尿量は約 34 mL (70 mL-36 mL) と推定される。したがって、STZ マウスの理論的な尿量を算出すると 30 mL (1 mL+63 mL-34 mL) となり、STZ マウスの尿量の実測値 (36 mL) と近似になる。このことから、糖尿病時の AQP2 および AQP3 の増加が、集合管における水の再吸収を増加させ、ひいては脱水症状を回避するためであることがわかる。

Li₂CO₃ は臨床において双極性障害の治療薬として用いられる。これまで、利尿薬であるヒドロクロチアジドが、リチウム誘導性尿崩症ラットの腎臓における AQP2 のタンパク質発現量の減少を抑制し、尿崩症を改善することが報告されている⁵⁷⁾。しかし、本研究において、Li₂CO₃ 投与 STZ マウスの尿量は Li₂CO₃ 投与 Normal マウスに比べて著しく高かった (Figure 8C)。この結果は、糖尿病患者に対して Li₂CO₃ を投与すると、さらなる多尿を引き起こす可能性があることを示すものであり、糖尿病患者の Li₂CO₃ 使用には注意を要するものと思われる。

これまで、1 型、2 型を問わず、糖尿病の多尿状態において、腎臓 AQP2 発現量は尿量の増加と相関することが報告されている^{32, 33)}。本章の結果より、糖尿病時の多尿状態では、集合管における AQP2 および AQP3 の発現量増加は、水の再吸収を促進し、体内水分量の減少を補う補償機構として働いていることが強く示唆された。

【総括】

薬物の主たる排泄経路の一つに、腎排泄がある。腎排泄は糸球体濾過、尿細管分泌、尿細管および集合管における再吸収という一連の物質移動の総和としてあらわれる。一般に、尿流速が速いほど、管腔側の薬物濃度と血管側の薬物濃度差が減少するため、再吸収量は低下することが知られている。糖尿病に伴う多尿時、利尿薬服用時、薬物の副作用により多尿が生じた場合などには、再吸収が減少するため、薬物の体内動態が変動することは知られているが、尿細管および集合管における水の移動に関する詳細なメカニズムが不明なため、明らかに尿量に変化が見られる場合を除き、薬物の体内動態に及ぼす再吸収の影響は注視されてこなかった。しかしながら、ジゴキシンなどのように再吸収の影響を受ける薬物で、かつ、有効血中濃度域が狭い薬物は、水の再吸収に影響を及ぼす諸因子を明確にする必要がある。そこで本研究では、尿細管および集合管において水の移動に関するメカニズムを明らかにするために、尿細管において水の移動に重要な役割を担っているアクアポリン (AQP) に着目し、多尿を呈する病態である糖尿病モデル動物を用い、検討した。まず、尿量の変動と AQP の発現変動の関連性について、2 型糖尿病モデル KKAY マウスを用いて検討した。その結果、KKAY マウスにおいては病態の進行に伴い、尿量および vasopressin の分泌量が増加し、それと同時に腎臓 AQP2 の発現量が増加することがわかった。次に、腎臓の AQP の発現量を特異的に低下させる Li_2CO_3 を用いて、尿量の変動における AQP の意義について検討した。その結果、腎臓の AQP2 の発現増加は腎臓での水の再吸収を促進し、尿量を減少させる方向に機能していることが明らかとなった。

本研究で得られた知見を以下に要約する。

〈第一章〉

1. KKAY マウスは、2 型糖尿病の病態の進行とともに多尿が生じ、これに伴い、腎

臓髄質内層 AQP2 の発現量が増加することが明らかとなった。また、細胞内小胞から細胞膜への移行も促進した。

2. KKAY マウスの病態の進行に伴い、視床下部における vasopressin の mRNA 発現量が増加し、腎臓 AQP2 の発現量と正の相関が認められた。
3. 病態が進行している KKAY マウスにインスリンを投与することにより、尿量が減少し、腎臓 AQP2 の発現量の低下および膜移行の抑制が見られた。また、視床下部における vasopressin の mRNA 発現量も低下した。

《第二章》

1. 尿量が増加した 1 型糖尿病モデル STZ マウスにおいて、腎臓髄質内層細胞膜画分の AQP2 および AQP3 のタンパク質発現量が増加していることが確認できた。
2. STZ マウスに腎臓 AQP2 および AQP3 の発現量を低下させる Li_2CO_3 を投与した際の尿量は、 Li_2CO_3 無処置マウスに比べて著しく増加した。
3. Li_2CO_3 処置 STZ マウスの尿量の増加は、糸球体濾過量、近位尿細管での再吸収量および尿細管浸透圧には起因せず、腎臓集合管での AQP2 および AQP3 の発現量低下に起因していることがわかった。

本研究の結果から、多尿状態において、腎臓の AQP2 の発現量が尿量の増加に伴い、増加することが明らかとなった（第一章）。また、この増加は腎臓での水の再吸収を促進し、多尿時における脱水症状を回避するための補償機構として働いていることが強く示唆された（第二章）。

これまで、尿量の増加に伴って発現量が増加する集合管における AQP2 の機能に関しては、推測の域を出なかった。本研究により、AQP2 の発現増加が水の再吸収を増加するためであることが明確になった。 Li_2CO_3 を含むいくつかの薬物が集合管の AQP2 の発現に影響を及ぼすことが知られている^{58, 59)}。これらの薬物とジゴキシン

などを併用する場合には、ジゴキシンの再吸収が変動する可能性があるため、注意を要する。今後、薬物の適正使用において、腎臓の AQP に影響を及ぼす薬物についても注視していく必要があると考える。

【謝辞】

本研究に際し、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました星薬科大学薬動学教室 杉山 清 教授に深く感謝致しますと共に、謹んで御礼申し上げます。

本研究にあたり、多分の御指導、御助言及び御協力を賜りました同教室 落合 和 講師に深く感謝致しますと共に、心より御礼申し上げます。

本研究にあたり、適切な御助言、御協力を賜りました同教室 五十嵐信智 助手に心より御礼申し上げます。

本研究にあたり、多分の御指導と御助言を賜りました武蔵野大学薬学部薬物動態学研究室 伊藤清美 教授に深く感謝致しますと共に、厚く御礼申し上げます。

本研究にあたり、種々の御協力、御助言を賜りました星薬科大学薬動学教室 戸田 雄大 氏、武蔵野大学薬学部薬物動態学研究室 工藤敏行 氏に深く感謝致します。

本研究にあたり、多大なる御協力を戴きました間庭彩香 氏、市川裕平 氏、鏡 真依 氏、小林靖史 氏、荻上尚樹 氏に感謝いたします。

最後に、本研究を遂行するにあたり、種々の御協力、御助言を賜りました星薬科大学薬動学教室の皆様深く感謝致します。

【参考文献】

- 1) Borgnia M., Nielsen S., Engel A., Agre P., Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels, *Annu Rev Biochem*, **68**, 425-458 (1999).
- 2) Preston G. M., Carroll T. P., Guggino W. B., Agre P., Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein, *Science*, **256**, 385-387 (1992).
- 3) Fushimi K., Sasaki S., Yamamoto T., Hayashi M., Furukawa T., Uchida S., Kuwahara M., Ishibashi K., Kawasaki M., Kihara I., et al., Functional characterization and cell immunolocalization of AQP-CD water channel in kidney collecting duct, *Am J Physiol*, **267**, F573-582 (1994).
- 4) Fujiyoshi Y., Mitsuoka K., de Groot B. L., Philippsen A., Grubmuller H., Agre P., Engel A., Structure and function of water channels, *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 509-515 (2002).
- 5) Nielsen S., Frokiaer J., Marples D., Kwon T. H., Agre P., Knepper M. A., Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine, *Physiol Rev*, **82**, 205-244 (2002).
- 6) Loonen A. J., Knoers N. V., van Os C. H., Deen P. M., Aquaporin 2 mutations in nephrogenic diabetes insipidus, *Semin Nephrol*, **28**, 252-265 (2008).

- 7) Nejsum L. N., The renal plumbing system: aquaporin water channels, *Cell Mol Life Sci*, **62**, 1692-1706 (2005).
- 8) Koren G., Klein J., Bentur Y., Giesbrecht E., The effects of mannitol diuresis on digoxin and phenobarbital handling by the kidney: implications for tubular reabsorption and secretion of the cardiac glycoside, *Clin Invest Med*, **12**, 279-284 (1989).
- 9) King H., Aubert R. E., Herman W. H., Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections, *Diabetes Care*, **21**, 1414-1431 (1998).
- 10) Spira A., Gowrishankar M., Halperin M. L., Factors contributing to the degree of polyuria in a patient with poorly controlled diabetes mellitus, *Am J Kidney Dis*, **30**, 829-835 (1997).
- 11) Marples D., Knepper M. A., Christensen E. I., Nielsen S., Redistribution of aquaporin-2 water channels induced by vasopressin in rat kidney inner medullary collecting duct, *Am J Physiol*, **269**, C655-664 (1995).
- 12) Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, **193**, 265-275 (1951).

- 13) Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 14) Mizuno S., Wen J., Mizuno-Horikawa Y., Repeated streptozotocin injections cause early onset of glomerulosclerosis in mice, *Exp Anim*, **53**, 175-180 (2004).
- 15) Hendriks G., Koudijs M., van Balkom B. W., Oorschot V., Klumperman J., Deen P. M., van der Sluijs P., Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum, *J Biol Chem*, **279**, 2975-2983 (2004).
- 16) Umenishi F., Narikiyo T., Schrier R. W., Effect on stability, degradation, expression, and targeting of aquaporin-2 water channel by hyperosmolality in renal epithelial cells, *Biochem Biophys Res Commun*, **338**, 1593-1599 (2005).
- 17) Baumgarten R., Van De Pol M. H., Wetzels J. F., Van Os C. H., Deen P. M., Glycosylation is not essential for vasopressin-dependent routing of aquaporin-2 in transfected Madin-Darby canine kidney cells, *J Am Soc Nephrol*, **9**, 1553-1559 (1998).
- 18) Nishimura M., Breeding of mice strains for diabetes mellitus, *Experimental Animals*, **18**, 147-157 (1969).

- 19) Ikarashi N., Toda T., Okaniwa T., Ito K., Ochiai W., Sugiyama K., Anti-obesity and anti-diabetic effects of acacia polyphenol in obese diabetic KKAY mice fed high-fat diet, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, (2010).
- 20) Tsuchida A., Yamauchi T., Takekawa S., Hada Y., Ito Y., Maki T., Kadowaki T., Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination, *Diabetes*, **54**, 3358-3370 (2005).
- 21) Combet S., Gouraud S., Gobin R., Berthouaud V., Geelen G., Corman B., Verbavatz J. M., Aquaporin-2 downregulation in kidney medulla of aging rats is posttranscriptional and is abolished by water deprivation, *Am J Physiol Renal Physiol*, **294**, F1408-1414 (2008).
- 22) Preisser L., Teillet L., Aliotti S., Gobin R., Berthouaud V., Chevalier J., Corman B., Verbavatz J. M., Downregulation of aquaporin-2 and -3 in aging kidney is independent of V(2) vasopressin receptor, *Am J Physiol Renal Physiol*, **279**, F144-152 (2000).
- 23) Boone M., Deen P. M., Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption, *Pflügers Arch*, **456**, 1005-1024 (2008).

- 24) Nielsen S., DiGiovanni S. R., Christensen E. I., Knepper M. A., Harris H. W., Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11663-11667 (1993).
- 25) Wilke C., Sheriff S., Soleimani M., Amlal H., Vasopressin-independent regulation of collecting duct aquaporin-2 in food deprivation, *Kidney Int*, **67**, 201-216 (2005).
- 26) Kusaka I., Saito T., Nakamura T., Nagasaka S., Ishibashi S., Ishikawa S. E., Urinary excretion of aquaporin-2 water channel in diabetic ketoacidosis, *Nephron*, **91**, 167-169 (2002).
- 27) Milles J. J., Baylis P. H., Wright A. D., Plasma vasopressin during insulin withdrawal in insulin-dependent diabetes, *Diabetologia*, **20**, 607-611 (1981).
- 28) Bustamante M., Hasler U., Kotova O., Chibalin A. V., Mordasini D., Rousselot M., Vandewalle A., Martin P. Y., Feraille E., Insulin potentiates AVP-induced AQP2 expression in cultured renal collecting duct principal cells, *Am J Physiol Renal Physiol*, **288**, F334-344 (2005).

- 29) Marr N., Bichet D. G., Hoefs S., Savelkoul P. J., Konings I. B., De Mattia F., Graat M. P., Arthus M. F., Lonergan M., Fujiwara T. M., Knoers N. V., Landau D., Balfe W. J., Oksche A., Rosenthal W., Muller D., Van Os C. H., Deen P. M., Cell-biologic and functional analyses of five new Aquaporin-2 missense mutations that cause recessive nephrogenic diabetes insipidus, *J Am Soc Nephrol*, **13**, 2267-2277 (2002).
- 30) Verkman A. S., Weyer P., Brown D., Ausiello D. A., Functional water channels are present in clathrin-coated vesicles from bovine kidney but not from brain, *J Biol Chem*, **264**, 20608-20613 (1989).
- 31) Ohara M., Cadnapaphornchai M. A., Summer S. N., Falk S., Yang J., Togawa T., Schrier R. W., Effect of mineralocorticoid deficiency on ion and urea transporters and aquaporin water channels in the rat, *Biochem Biophys Res Commun*, **299**, 285-290 (2002).
- 32) Bardoux P., Ahloulay M., Le Maout S., Bankir L., Trinh-Trang-Tan M. M., Aquaporin-2 and urea transporter-A1 are up-regulated in rats with type I diabetes mellitus, *Diabetologia*, **44**, 637-645 (2001).
- 33) Kim D., Sands J. M., Klein J. D., Changes in renal medullary transport proteins during uncontrolled diabetes mellitus in rats, *Am J Physiol Renal Physiol*, **285**, F303-309 (2003).

- 34) Nejsum L. N., Kwon T. H., Marples D., Flyvbjerg A., Knepper M. A., Frokiaer J., Nielsen S., Compensatory increase in AQP2, p-AQP2, and AQP3 expression in rats with diabetes mellitus, *Am J Physiol Renal Physiol*, **280**, F715-726 (2001).
- 35) Kwon T. H., Laursen U. H., Marples D., Maunsbach A. B., Knepper M. A., Frokiaer J., Nielsen S., Altered expression of renal AQPs and Na(+) transporters in rats with lithium-induced NDI, *Am J Physiol Renal Physiol*, **279**, F552-564 (2000).
- 36) Marples D., Christensen S., Christensen E. I., Ottosen P. D., Nielsen S., Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla, *J Clin Invest*, **95**, 1838-1845 (1995).
- 37) Thomsen K., Shirley D. G., A hypothesis linking sodium and lithium reabsorption in the distal nephron, *Nephrol Dial Transplant*, **21**, 869-880 (2006).
- 38) Yamaki M., Kusano E., Tetsuka T., Takeda S., Homma S., Murayama N., Asano Y., Cellular mechanism of lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus in rats, *Am J Physiol*, **261**, F505-511 (1991).

- 39) Stockelman M. G., Lorenz J. N., Smith F. N., Boivin G. P., Sahota A., Tischfield J. A., Stambrook P. J., Chronic renal failure in a mouse model of human adenine phosphoribosyltransferase deficiency, *Am J Physiol*, **275**, F154-163 (1998).
- 40) Burg M. B., Ferraris J. D., Dmitrieva N. I., Cellular response to hyperosmotic stresses, *Physiological Reviews*, **87**, 1441-1474 (2007).
- 41) Minami Y., Inoue K., Shimada S., Morimura H., Miyai A., Yamauchi A., Matsunaga T., Tohyama M., Rapid and transient up-regulation of Na⁺/myo-inositol cotransporter transcription in the brain of acute hypernatremic rats, *Brain Research. Molecular Brain Research*, **40**, 64-70 (1996).
- 42) Warskulat U., Wettstein M., Haussinger D., Osmoregulated taurine transport in H4IIE hepatoma cells and perfused rat liver, *Biochemical Journal*, **321 (Pt 3)**, 683-690 (1997).
- 43) Wiese T. J., Matsushita K., Lowe W. L., Jr., Stokes J. B., Yorek M. A., Localization and regulation of renal Na⁺/myo-inositol cotransporter in diabetic rats, *Kidney Int*, **50**, 1202-1211 (1996).
- 44) Hayashi K., Kojima R., Ito M., Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice, *Biol Pharm Bull*, **29**, 1110-1119 (2006).

- 45) Kammer G. M., The adenylyate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response, *Immunology Today*, **9**, 222-229 (1988).
- 46) Quayle J. M., Bonev A. D., Brayden J. E., Nelson M. T., Calcitonin gene-related peptide activated ATP-sensitive K⁺ currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A, *J Physiol*, **475**, 9-13 (1994).
- 47) Nguyen B. T., Dessauer C. W., Relaxin stimulates cAMP production in MCF-7 cells upon overexpression of type V adenylyl cyclase, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1041**, 296-299 (2005).
- 48) Nishihara H., Hwang M., Kizaka-Kondoh S., Eckmann L., Insel P. A., Cyclic AMP promotes cAMP-responsive element-binding protein-dependent induction of cellular inhibitor of apoptosis protein-2 and suppresses apoptosis of colon cancer cells through ERK1/2 and p38 MAPK, *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 26176-26183 (2004).
- 49) Umenishi F., Narikiyo T., Vandewalle A., Schrier R. W., cAMP regulates vasopressin-induced AQP2 expression via protein kinase A-independent pathway, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**, 1100-1105 (2006).
- 50) Yasui M., Zelenin S. M., Celsi G., Aperia A., Adenylyate cyclase-coupled vasopressin receptor activates AQP2 promoter via a dual effect on CRE and AP1 elements, *American Journal of Physiology*, **272**, F443-450 (1997).

- 51) Bedford J. J., Leader J. P., Jing R., Walker L. J., Klein J. D., Sands J. M., Walker R. J., Amiloride restores renal medullary osmolytes in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus, *Am J Physiol Renal Physiol*, **294**, F812-820 (2008).
- 52) Terris J., Ecelbarger C. A., Nielsen S., Knepper M. A., Long-term regulation of four renal aquaporins in rats, *American Journal of Physiology*, **271**, F414-422 (1996).
- 53) Brooks D. P., Nutting D. F., Crofton J. T., Share L., Vasopressin in rats with genetic and streptozocin-induced diabetes, *Diabetes*, **38**, 54-57 (1989).
- 54) Agre P., King L. S., Yasui M., Guggino W. B., Ottersen O. P., Fujiyoshi Y., Engel A., Nielsen S., Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine, *J Physiol*, **542**, 3-16 (2002).
- 55) Gao J., Wang X., Chang Y., Zhang J., Song Q., Yu H., Li X., Acetazolamide inhibits osmotic water permeability by interaction with aquaporin-1, *Analytical Biochemistry*, **350**, 165-170 (2006).
- 56) Kwon M. S., Lim S. W., Kwon H. M., Hypertonic stress in the kidney: a necessary evil, *Physiology (Bethesda)*, **24**, 186-191 (2009).

- 57) Kim G. H., Lee J. W., Oh Y. K., Chang H. R., Joo K. W., Na K. Y., Earm J. H., Knepper M. A., Han J. S., Antidiuretic effect of hydrochlorothiazide in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus is associated with upregulation of aquaporin-2, Na-Cl co-transporter, and epithelial sodium channel, *Journal of the American Society of Nephrology*, **15**, 2836-2843 (2004).
- 58) da Silva C. A., de Braganca A. C., Shimizu M. H., Sanches T. R., Fortes M. A., Giorgi R. R., Andrade L., Seguro A. C., Rosiglitazone prevents sirolimus-induced hypomagnesemia, hypokalemia, and downregulation of NKCC2 protein expression, *Am J Physiol Renal Physiol*, **297**, F916-922 (2009).
- 59) Kishore B. K., Krane C. M., Di Iulio D., Menon A. G., Cacini W., Expression of renal aquaporins 1, 2, and 3 in a rat model of cisplatin-induced polyuria, *Kidney Int*, **58**, 701-711 (2000).