

氏名（本籍）	佐竹正子	（東京都）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲第147号	
学位授与年月日	平成23年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	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	
論文審査委員	主査	教授 杉山 清
	副査	教授 中陳 静男
	副査	教授 大西 啓

論文内容の要旨

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。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、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。

1-1. KKAy マウスの病態の進行に伴う腎臓 AQP2 の発現変化

AQP2 は細胞内小胞から管腔側膜へ移行し、水チャネルとして機能することが知られている。そこで、腎臓の細胞全体の膜を含む CM (crude membrane) 画分、細胞膜を豊富に含む PM (plasma membrane) 画分および細胞内小胞を豊富に含む IV (intracellular vesicle) 画分に分離し、AQP2 のタンパク質発現量をウエスタンブロッティングにより調べた。その結果、C57BL/6J マウスの腎臓髄質内層 CM 画分における AQP2 のタンパク質発現量は加齢に伴い有意に減少したが、KKAy マウスでは有意に増加した。また、C57BL/6J マウスにおける腎臓髄質内層の IV 画分に対する PM 画分の AQP2 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。

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。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。そこで、KKAy マウスにおける腎臓 AQP2 の発現増加メカニズムを解明する目的で、視床下部における vasopressin の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により測定した。その結果、C57BL/6J マウスの視床下部における vasopressin の mRNA 発現量は、加齢に伴う変化は見られなかった。これに対して、KKAy マウスにおいては mRNA 発現量が 12 週齢まで増加し、その後も高値を示した。

これらのことから、2型糖尿病モデル 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。

1-2. KKAy マウスへのインスリン投与による腎臓 AQP2 および視床下部 vasopressin の発現変化

11 週齢の KKAy マウスにインスリンを 7 日間皮下投与し、糖尿病の病態が改善した際の腎臓 AQP2 のタンパク質発現量について検討した。KKAy マウスにインスリンを投与した際の血糖値および尿量は、インスリン非投与 KKAy マウスに比べて有意に低下した。また、KKAy マウスへのインスリンの投与により、腎臓髄質内層 CM 画分の AQP2 のタンパク質発現量は有意に減少し、膜移行も抑制された。さらに、KKAy マウスへのインスリン投与により、視床下部における vasopressin の mRNA 発現量も減少した。

これらのことより、糖尿病の改善に伴い、尿量および vasopressin の分泌量が減少し、それと同時に、腎臓 AQP2 の発現量が減少することがわかった。

以上の結果は、尿量、vasopressin 分泌量、腎臓 AQP2 発現量の 3 者に正の相関があることを示すものである。しかし、AQP2 が vasopressin の機能分子として尿量を減少するために働いているのか、あるいは vasopressin とは関係なく尿量を増加するための機能分子として働いているのかは結論付けることはできない。そこで、このことを確かめる目的で、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 の関係を調べた。

2-1. STZ マウスへの Li₂CO₃ 投与による原尿生成量および近位尿細管での再吸収量の変動

Li₂CO₃ をマウスに投与することにより、腎臓 AQP の転写および膜移行の両経路が阻害され、尿崩症を発症することが知られている。1 型糖尿病モデル STZ マウスに Li₂CO₃ を 10 日間投与し、AQP の発現量が減少した際の尿量の変化について検討した。Normal マウスの血糖値は約 200 mg/dL であったのに対し、STZ マウスの血糖値は約 800 mg/dL であった。Normal マウスおよび STZ マウスともに、Li₂CO₃ 投与による血糖値の変動は認められなかった。一方、Normal マウスの 1 日あたりの尿量は約 1 mL であり、この尿量は Li₂CO₃ の投与により 7 mL に増加した。また、STZ マウスの 1 日当たりの尿量は約 36 mL であり、Li₂CO₃ を投与した STZ マウスの尿量は 70 mL であった。これらの結果から、Li₂CO₃ は血糖値に影響を及ぼさずに尿量を増加させることが示された。

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。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クレアチニンクリアランス (Ccr) を算出した。その結果、STZ マウスに Li_2CO_3 を投与しても、Ccr は変化しないことがわかった。このことより、 Li_2CO_3 を投与した STZ マウスと非投与 STZ マウスとの間で、原尿生成量は変化しないことが示された。

原尿の約 70% を再吸収する近位尿細管には AQP1 が局在している。そこで、近位尿細管での水の再吸収量に及ぼす Li_2CO_3 の影響を調べる目的で、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エスタンブロッティングにより解析した。その結果、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。また、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。

これらのことから、 Li_2CO_3 投与による尿量の増加は、原尿の増加や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いことが示唆された。

2-2. STZ マウスへの Li_2CO_3 投与による腎臓集合管の AQP タンパク質発現量と尿量の関係

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。そこで、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 mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により測定した。sodium *myo*-inositol transporter (SMIT) および taurine transporter (TauT) の mRNA 発現量は、浸透圧の上昇により増加することが知られている。STZ マウスの腎臓における 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。これは過去の報告と一致しており、集合管内のグルコース濃度の上昇による浸透圧上昇に起因していると考えられた。一方、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。また、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。このことから、 Li_2CO_3 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。

次に、集合管を多く含む腎臓髄質内層の PM 画分における AQP2、AQP3 および AQP4 のタンパク質発現量をウエスタンブロッティングにより測定した。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。また、AQP3 のタンパク質発現量についても、AQP2 と

同様の傾向を示した。これに対して、 Li_2CO_3 処置による AQP4 の発現量に変化は見られなかった。

これらのことから、 Li_2CO_3 投与による尿量の増加は、腎臓集合管における AQP2 および AQP3 の発現低下によるものであることが示された。

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。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関しても注視していく必要があると考える。

論文審査の結果の要旨

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であり、このうち、再吸収は尿流速（尿量）の影響を受ける。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、薬物の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。しかし、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、薬物の再吸収に関しては注視されてこなかった。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ため、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（糖尿病）を研究材料とし、尿量の変動と AQP の発現変動との関係を検討した。

C57BL/6J マウスおよび 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について検討した。KKAY マウスでは病態の進行に伴い、尿量が大きく増加したのに対し、C57BL/6J マウスでは尿量は常に一定であった。腎臓の AQP2 のタンパク質発現量は、KKAY マウスでは尿量の増加に伴い有意に増加したのに対し、C57BL/6J マウスでは大きな変化が認められなかった。また、KKAY マウスでは尿量の増加に伴い、AQP2 の細胞内小胞から細胞膜への移行も促進していた。視床下部における vasopressin の mRNA 発現量は、KKAY マウスでは、尿量の増加に伴い高値を示した。これらのことから、KKAY マウスにおいては尿量の増加に伴い、vasopressin の分泌量および腎臓 AQP2 の発現量が増加することがわかった。一方、KKAY マウスにインスリンを投与し、多尿を改善した場合の腎臓 AQP2 の発現量と尿量との関係を調べた結果、尿量の減少に伴い、vasopressin の分泌量および腎臓 AQP2 の発現量が減少することがわかった。

炭酸リチウム (Li_2CO_3) をマウスに投与すると、腎臓 AQP2 の転写および膜移行の両経路が阻害され、尿崩症を発症する。1 型糖尿病モデル STZ マウスに Li_2CO_3 を投与し、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、多尿時における腎臓 AQP2 の役割を調べた。その結果、 Li_2CO_3 投与による血糖値の変動は認められなかったが、尿量は Li_2CO_3 投与により約 2 倍の約 70mL に増加した。原尿の生成量を調べる目的で、クレアチニンクリアランス (Ccr) を算出した結果、STZ マウスに Li_2CO_3 を投与しても、Ccr は

変化しないことがわかった。また、STZ マウスへ Li_2CO_3 を投与した場合には、尿細管の AQP1 の発現量は変化しないことがわかった。これらのことから、 Li_2CO_3 投与による尿量の増加は、原尿の増加や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いことが示唆された。腎臓集合管の sodium myo-inositol transporter (SMIT) および taurine transporter (TauT) の mRNA 発現量は、STZ マウスへの Li_2CO_3 投与による影響は認められなかった。このことから、 Li_2CO_3 の投与により、集合管内の浸透圧は変化していないことが示唆された。集合管の AQP2 のタンパク質発現量を測定した結果、STZ マウスへの Li_2CO_3 処置により有意に減少した。このことから、 Li_2CO_3 投与による尿量の増加は、集合管における AQP2 の発現低下によるものであることが示された。以上の結果から、多尿状態での集合管における AQP2 の発現量増加は、水の再吸収を促進していることが強く示唆された。また、多尿時の腎臓 AQP2 の発現増加は、体内水分量を制御するための重要な役割を担っていることが明らかとなった。

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。これらの薬物とジゴキシンなどを併用する場合には、ジゴキシンの尿細管および集合管で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関しても注視していく必要があると考える。

以上のように、本論文内容は薬物の体内動態における腎臓 AQP2 の役割を明確にしたものであり、薬物の適正使用を実施する上で、有益な基礎的情報を提供するものである。よって、博士（薬学）の学位に十分に値するものと考えらる。