

報告番号	甲栄 第 230 号
論 文 内 容 要 旨	
氏 名	塩崎 雄治
題 目	Relationship between sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-IIc) function and cellular vacuole formation in opossum kidney cells (フクロネズミ腎近位尿細管細胞におけるナトリウム依存性リン酸トランスポーター NaPi-IIcと細胞内vacuole形成の関連)
<p>腎臓近位尿細管におけるナトリウム依存性無機リン酸 (Pi) トランスポーターSlc34a1/NaPi-IIaおよびSlc34a3/NaPi-IIcは、リン代謝の中心分子として機能しており、血中リン濃度調節に必須の分子である。NaPi-IIaは、げっ歯類において機能している重要なリン輸送分子であり、内因性にNaPi-IIaを発現する近位尿細管細胞株が見出され、scaffolding 蛋白質やシグナル伝達経路が詳細に調べられている。また、ヒトにおいては、NaPi-IIc遺伝子変異が高カルシウム尿を伴う低リン血症性クル病 (HHRH) の原因であることから、その重要性が示唆されている。しかし、NaPi-IIc調節機構の詳細は、内因性にNaPi-IIcを発現する細胞が見出されていない為に、研究が進展していない。さらに、NaPi-IIc遺伝子異常により発症するHHRHの病態に関しては、未だ、詳細は不明のままである。そこで、本研究はフクロネズミ腎近位尿細管細胞 (OK細胞) 内因性NaPi-IIc (oNaPi-IIc) 蛋白質の発現および局在を解析し、さらに、HHRHにより生じる NaPi-IIc機能異常とその病態発症に関して検討を加えた。</p> <p>oNaPi-IIc特異的抗体により認識される蛋白質は、増殖期OK細胞で発現が高まり、分化と共に発現の消失がみられた。加えて、血清除去による細胞増殖の抑制はoNaPi-IIc蛋白質の減少を誘導し、血清再添加による細胞増殖刺激はoNaPi-IIc蛋白質発現を増加させた。細胞蛍光免疫染色による局在解析からは、oNaPi-IIcは増殖期細胞において細胞膜およびprotrusionに局在がみられた。また、oNaPi-IIcはphosphatidylinositol 4,5-bisphosphonate (PIP₂) マーカーであるPLC-δPHと共局在を示したことから、PIP₂産生に関与する可能性が示された。外因性にNaPi-IIcを発現させた場合においても、内因性蛋白質と同様、細胞膜およびprotrusionへの局在が観察された。またこれらの細胞では、vacuole形成が観察され、vacuole膜上においてNaPi-IIcとPIP₂の共局在が見られた。一方、起電性にリンを輸送する外因性NaPi-IIaおよびNaPi-IIbを発現させた際には、vacuole形成は観察されなかった。これらの結果より、NaPi-IIc野生型の有する電気的中性のリン輸送がvacuole形成に重要であることが示唆された。さらに、起電性にリン輸送を行うNaPi-IIc変異体を作成しvacuole形成能を評価したが、これらの変異体はvacuole形成能を示さなかった。さらに、HHRH患者で報告されたS138FおよびR468を有するNaPi-IIc変異体は、リン輸送能およびvacuole形成能が抑制されていた。これら結果よりNaPi-IIcのvacuole形成誘導には電気的中性のリン輸送活性が必要であることが示唆された。</p> <p>以上、本研究より、OK細胞に発現するNaPi-IIcは増殖期に発現が亢進し、PIP₂産生や細胞内vacuole形成に関与する可能性が示唆された。加えて、HHRHにおいて、NaPi-IIcが担うPIP₂産生と小胞輸送機構の</p>	

異常が、その病態に関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨	
報告番号	甲栄第 230 号 氏名 塩崎 雄治
審査委員	主査 竹谷 豊 副査 酒井 徹 副査 馬渡 一諭
<p>題目</p> <p>Relationship between sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-IIc) function and cellular vacuole formation in opossum kidney cells (フクロネズミ腎近位尿細管細胞におけるナトリウム依存性リン酸トランスポーターNaPi-IIcと細胞内 vacuole形成の関連)</p> <p>著者</p> <p><u>Yuji Shiozaki, Hiroko Segawa, Saori Ohnishi, Akiko Ohi, Mikiko Ito, Ichiro Kaneko, Shinsuke Kido, Sawako Tatsumi, Ken-ichi Miyamoto</u></p> <p>平成27年6月1日 The Journal of Medical Investigationに受理済</p> <p>要旨</p> <p>腎臓近位尿細管におけるナトリウム依存性リン酸トランスポーターSlc34a1/NaPi-IIaおよび Slc34a3/NaPi-IIcは、リン代謝の中心分子として機能しており、血中リン濃度調節に必須の分子である。NaPi-IIaは、げっ歯類において機能している重要なリン酸輸送分子であり、内因性にNaPi-IIaを発現する近位尿細管細胞株が見出され、scaffolding タンパク質やシグナル伝達経路が詳細に調べられている。一方、NaPi-IIcは、ヒトにおける高カルシウム尿を伴う低リン血性クル病 (Hereditary</p>	

hypophosphatemic rickets with hypercalciuria; HHRH) の原因遺伝子であることから、その重要性が示唆されている。しかし、腎近位尿細管におけるNaPi-IIc発現調節機構の詳細は、内因性にNaPi-IIcを発現する細胞が見出されていないために、研究が進展していない。さらに、NaPi-IIc遺伝子異常により発症するHHRHの病態に関しては、未だ、詳細は不明のままである。そこで、本研究はフクロネズミ腎近位尿細管細胞 (OK細胞) 内因性NaPi-IIc (oNaPi-IIc) タンパク質の発現および局在を解析し、さらに、HHRHにより生じる NaPi-IIc機能異常とその病態発症機構における役割に関して検討した。

oNaPi-IIc特異的抗体により認識されるタンパク質は、増殖期のOK細胞で発現が高まり、分化と共に発現の消失がみられた。加えて、血清除去による細胞増殖の抑制はoNaPi-IIcタンパク質の減少を誘導し、血清再添加による細胞増殖刺激はoNaPi-IIcタンパク質発現を増加させた。細胞蛍光免疫染色による局在解析からは、oNaPi-IIcは増殖期細胞において細胞膜およびprotrusionに局在がみられた。また、oNaPi-IIcはphosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) マーカーであるPLC- δ PHと共局在を示したことからPIP₂産生に関与する可能性が示された。外因性にNaPi-IIcを発現させた場合においても、内因性タンパク質と同様、細胞膜およびprotrusionへの局在が観察された。またこれらの細胞では、vacuole形成が観察され、vacuole膜上においてNaPi-IIcとPIP₂の共局在が見られた。一方、起電性にリン酸を輸送する外因性NaPi-IIaおよびNaPi-IIbを発現させた際には、vacuole形成は観察されなかった。これらの結果より、NaPi-IIc野生型の有する電気的中性のリン酸輸送がvacuole形成に重要であることが示唆された。さらに、起電性にリン酸輸送を行うNaPi-IIc変異体を作成しvacuole形成能を評価したが、これらの変異体はvacuole形成能を示さなかった。さらに、HHRH患者で報告されたS138FおよびR468を有するNaPi-IIc変異体は、リン酸輸送能およびvacuole形成能が抑制されていた。これらの結果より、NaPi-IIcによるvacuole形成誘導には電気的中性のリン酸輸送活性が必要であることが示唆された。

以上、本研究より、OK細胞に発現するNaPi-IIcは増殖期に発現が亢進し、PIP₂産生や細胞内vacuole形成に関与する可能性が示唆された。加えて、HHRHにおいて、NaPi-IIcが担うPIP₂産生と小胞輸送機構の異常が、その病態に関与する可能性が示唆された。

本研究は、HHRH病態形成にナトリウム依存性リン酸トランスポーターNaPi-IIcのvacuole形成機能が関与する可能性を明らかにしたものであり、リン代謝異常症の解明に貢献するものであることから、博士(栄養学) に値すると判定した。