

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2005～2008

課題番号：17209006

研究課題名（和文） 細胞死の誘導 / 防御へのチャネルメカニズム

研究課題名（英文） Channel-mediated mechanisms of induction of and protection against cell death

研究代表者

岡田 泰伸（OKADA YASUNOBU）

生理学研究所・所長

研究者番号：10025661

研究成果の概要：アポトーシス時において見られる細胞縮小（Apoptotic Volume Decrease: AVD）の誘導は、容積感受性外向整流性アニオンチャネル（VSOR）と K⁺チャネルの活性化による KCl の細胞外流出によってもたらされる。今回、類上皮癌細胞の抗癌剤シスプラチンによるアポトーシス死についてもこれは同様であること、そしてシスプラチン耐性を獲得した本細胞の亜株においては両チャネル活性が欠失することを明らかにした。また、高浸透圧活性化カチオンチャネル（HICC）は、細胞縮小後の容積調節をもたらし、アポトーシス死に対して救済的に働くことを見出した。ネクローシス時に見られる細胞膨張（Necrotic Volume Increase: NVI）の誘導は NaCl の細胞内流入によってもたらされるが、酸毒性やアンモニア毒性時における Na⁺流入には TRPM7 や TRPM2 カチオンチャネルが、過興奮毒性時における Cl⁻流入には VSOR アニオンチャネルが関与することを明らかにした。虚血・再灌流性の心筋細胞や海馬ニューロンのアポトーシスの誘導には VSOR 活性化が関与し、心筋梗塞下の心筋細胞ネクローシス死に対しては CFTR アニオンチャネルが防御的に働くことを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	12,100,000	3,630,000	15,730,000
2006年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2007年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
総計	37,800,000	11,340,000	49,140,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：アポトーシス、ネクローシス、虚血、アニオンチャネル、カチオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

細胞は異常浸透圧条件下で膨張や縮小を強いられたとしても、それぞれ Regulatory Volume Decrease (RVD) および Regulatory Volume Increase (RVI) というメカニズムによって速やかに元の容積にもどるとい

積調節能を持っている。しかるにアポトーシス時においては細胞は丸ごと次第に縮小化（AVD）して、ついには断片化して死んでいき、ネクローシス時においては反対に次第に膨張化（NVI）して、ついには破裂して死んでいく。RVD や RVI メカニズムには多種のイ

オンチャネルの関与が知られているので、細胞死過程においてはこれらのチャネルの機能異常が伴われるものと考えられる。しかしその全容については未だ不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、これら容積関連性イオンチャネルのいずれがいかにしてアポトーシス死やネクローシス死、そして虚血-再灌流性細胞死に關与するのか、という点について明らかにし、細胞死誘導/防御のチャネルメカニズムの解明をすることを目的とする。

3. 研究の方法

用いた細胞は、ヒト上皮細胞 HeLa 株、ヒト上顎類上皮癌細胞 KB 株とそのシスプラチン耐性 KCP-4 垂株、ラットやマウスの培養心筋細胞、マウス大脳皮質由来の培養ニューロン及び培養アストロサイトである。それらの細胞死の判定には MTT アッセイを、アポトーシス死判定にはカスパーゼ活性化や DNA 断片化を、ネクローシス死判定には PI 染色性を用いた。細胞容積の測定には、コールターカウンター法や、単一細胞断面積測定法を用いた。イオンチャネル活性は、パッチクランプ全細胞電流記録法や単一チャネル電流記録法によって観察した。心筋梗塞および脳梗塞作成実験には、マウス個体内での左冠状動脈および総頸動脈の一過性閉塞とその解除による虚血-再灌流処置を施した。

4. 研究成果

(1) アポトーシス誘導/防御のチャネルメカニズム

スタウロスポリンやデスレセプターアゴニストによるアポトーシス死と AVD の誘導に VSOR アニオンチャネル活性化が關与することは、私達によって多くの細胞種で明らかにされてきた。心筋細胞においても同様であり、スタウロスポリンによるアポトーシス死は VSOR 活性化によるものであり、VSOR 阻害剤でその救済がもたらされることを今回明らかにした。(Tanabe et al. 2005 FEBS Lett; Takahashi et al. 2005 Cell Physiol Biochem)。同様のことは KB 類上皮癌細胞の抗癌剤シスプラチンによるアポトーシス死誘導についても成立することも明らかにした(Ise et al. 2005 J Membr Biol)。一方シスプラチン耐性を獲得した KB 細胞垂株 KCP-4 細胞においては、AVD をもたらず VSOR 活性も Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル IK1 活性も共に失われること、そしてヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によって VSOR や IK1 の活性を部分的に回復させるとシスプラチン感受性も部分的に回復すること明らかにした(Lee et al. 2006 J Cell Physiol; 2008 Am J Physiol Cell Physiol; Shimizu et al. 2008

Anticancer Res)。

アポトーシス死誘導時には RVI 能の抑制が伴われていることを明らかにした(Maeno et al. 2007 FEBS Lett)が、その原因には主として RVI を担う HICC カチオンチャネルの抑制が關与しており、HICC を事前に活性化しておくこと逆にスタウロスポリンによるアポトーシス死が救済されることを明らかにした(Numata et al. 2008 Apoptosis)。

AVD 誘導と RVI 抑制によってもたらされる持続的細胞縮小は、それ自体でアポトーシス死誘導の十分条件であることを、細胞外イオン組成変化によって等浸透圧条件下において持続的に容積減小させると、特に何らのアポトーシス刺激なしに細胞はアポトーシス死におちいることから証明した(Nukui et al. 2006 J Physiol Sci; Maeno et al. 2006 Acta Physiol)。

アポトーシス時の持続的細胞縮小は、AVD 誘導と RVI 抑制の両者によってもたらされるが、この RVI 抑制のシグナルメカニズムには Akt (プロテインキナーゼ B) の抑制と ASK1 の活性化が關与することを明らかにした(Takahashi et al. 2007 国際シンポジウム発表、サルツブルグ)。また、アポトーシス時に活性化される JNK や p38 MAPK の活性化(リン酸化)は、AVD 誘導の上流シグナルではなく、下流シグナルであることを明らかにした(Hasegawa et al. 2009 国際生理学会発表予定、京都)。

(2) ネクローシス誘導/防御のメカニズム

脳ニューロンのグルタミン酸曝露による過興奮毒性下でのネクローシス死の前段階には、ニューロン細胞体の膨張と樹状突起上にビーズ状に出現する varicosity とよばれる局所膨張の形成によって特徴づけられる NVI が見られる。この NVI の形成の原因としての $NaCl$ の流入は、グルタミン酸レセプター・カチオンチャネルを介する Na^+ の流入と、それによる脱分極で駆動される Cl^- の流入によるが、VSOR がその Cl^- の流入経路を与えることを明らかにし、VSOR 阻害剤でニューロンの過興奮毒性死の救済がもたらされることを証明した(Inoue & Okada 2007 J Neurosci)。

一方、ニューロンの過興奮毒性の原因となるグルタミン酸はグリア細胞から放出されるが、虚血条件下におけるその放出の経路は、エクソサートーシスなどのこれまでによく知られたメカニズムによるのではなく、VSOR 及び巨大単一チャネルコンダクタンスを示す Maxi- Cl チャネルの両者によって与えられること(Liu et al. 2006 Glia)、炎症因子ブラジキニン刺激下でのその放出は VSOR のみによって与えられること(Liu et al. 2009 J Physiol)を明らかにした。

アンモニア毒性条件下における脳グリア細胞のネクローシス死にも NVI が伴われ、そ

れをもたらす Na⁺流入の経路には TRPM2 カチオンチャンネルが関与することを明らかにした (Li et al. 論文準備中)。

一方、強酸性条件下における脳ニューロンや上皮細胞のネクローシス死にも NVI が伴われ、その後の Cl⁻流入路には酸感受性外向整流性アニオンチャンネル (ASOR) が関与し、ASOR 阻害剤によってネクローシス死から救済されることを明らかにした (Numata et al. 論文準備中)。また、上皮細胞の酸毒性条件下におけるネクローシス死誘導の原因となる Na⁺流入については、TRPM7 カチオンチャンネルがその経路を与えることを証明した (Numata et al. 論文準備中)。

(3) 虚血-再灌流性細胞死誘導 / 防御メカニズム

マウス培養心筋細胞における虚血-再灌流刺激によるアポトーシス死には、活性酸素種 (ROS) の産成が伴われ、これによって活性化される VSOR が重要な役割を果たしていること、そして VSOR 阻害剤の投与によって細胞死は救済されることを明らかにした (Wang et al. 2005 Cell Physiol Biochem)。

マウスの総頸動脈の短時間閉塞化と再開通によって虚血-再灌流刺激を行うと、2-3 日後に海馬 CA1 領域ニューロンにアポトーシス性細胞死がみられ、これは遅発性神経細胞死と呼ばれている。この遅発性神経細胞死においても AVD や VSOR が重要な役割を果たしており、VSOR 阻害剤の体内 in vivo 投与によってその細胞死は著しく救済されることを見出した。 (Inoue et al. 2007 J Neurosci Res)。

次に、心筋栓塞時の心筋細胞のネクローシス死へのアニオンチャンネルの関与を調べた。マウス心臓の in vivo 虚血-再灌流によって発生する心筋梗塞は、CFTR 活性化剤の再灌流時注入によって著しく軽減され、逆に CFTR 阻害剤投与によって増悪されること、そして CFTR ノックアウトマウスにおいては心筋梗塞サイズが著しく増加し、CFTR 活性化剤によっても救済がもたらされないことを見出した (Uramoto et al. 2007 国際シンポジウム発表、ザルツブルグ)。

以上の、細胞死誘導 / 防御チャンネルメカニズムに関する研究成果の 1 部は、英文総説にまとめて出版した (Okada et al. 2009 J Physiol)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 31 件)

Y. Okada, K. Sato & T. Numata (2009) Pathophysiology and puzzles of the volume-sensitive outwardly rectifying

anion channel. J. Physiol. (London) 587, 2141-2149 査読有

T. Numata, K. Sato, Y. Okada & F. Wehner (2008) Hypertonicity-induced cation channels rescue cells from staurosporine-elicited apoptosis. Apoptosis 13, 895-903 査読有

H. Inoue, H. Ohtaki, T. Nakamachi, S. Shioda & Y. Okada (2007) Anion channel blockers attenuate delayed neuronal cell death induced by transient forebrain ischemia. J. Neurosci. Res. 85, 1427-1435 査読有

H. Inoue & Y. Okada (2007) Role of volume-sensitive chloride channel in excitotoxic neuronal injury. J. Neurosci. 27, 1445-1455 査読有

E.L. Lee, T. Shimizu, T. Ise, T. Numata, K. Kohno & Y. Okada (2007) Impaired activity of volume-sensitive Cl⁻ channel is involved in cisplatin resistance of cancer cells. J. Cell. Physiol. 211, 513-521 査読有

[学会発表] (計 43 件)

Y. Okada, F. Wehner, T. Numata (2008) Rescue of apoptosis by activation of hypertonicity-induced cation channels in human epithelial cells. J. Physiol. Sci. 58 (Suppl) S209 (第85回日本生理学会大会、3月25 - 27日、東京)

N. Takahashi, M. Subramanyan, Y. Hasegawa & Y. Okada (2007) Reciprocal regulation of regulatory volume increase (RVI) by Akt and ASK. Abstract p112 (6th International Symposium on Cell Volume Regulation in Health and Disease, September 21-24, Salzburg, Austria)

H. Uramoto, N. Takahashi & Y. Okada (2007) Protection of cardiomyocytes from ischemic injury by activation of CFTR Cl⁻ channel. Abstract p103 (6th International Symposium on Cell Volume Regulation in Health and Disease, September 21-24, Salzburg, Austria)

Y. Okada (2007) Physiology in Cell Death Induction: Roles of Anion Channels and Disordered Cell Volume Regulation. J. Physiol. Sci. 57 (Suppl) S2 (第84回日本生理学会大会、田崎記念レクチャー、3月20 - 22日、大阪)

H. Inoue, Y. Okada (2006) Volume-sensitive chloride channel involved in necrotic neuronal death by excitotoxicity. J. Physiol. Sci. 56 (Suppl) S113 (第83回日本生理学会大会、

3月28 - 30日、前橋)

[図書](計 2件)

Y. Okada (2006) Cell volume-sensitive chloride channel: Phenotypic properties and molecular identity. In, "Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation" (ed. F. Lang), pp 9-24, Karger, Basel

Y. Okada, E. Maeno, T. Nabekura & S. Mori (2005) Essential role of anion channel in induction of apoptotic and necrotic cell death. In, "Ion Channels in the Pulmonary Vasculature" (ed. J. X.-J. Yuan), pp 527-544, Taylor & Francis: Boca Raton, FL

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 泰伸 (OKADA YASUNOBU)

生理学研究所・所長

研究者番号: 10025661

(2) 研究分担者

清水 貴浩 (SHIMIZU TAKAHIRO)

生理学研究所・細胞器官研究系

・助手 (17年度)

研究者番号: 40353437

高橋 信之 (TAKAHASHI NOBUYUKI)

生理学研究所・細胞器官研究系

・助手 (17~18年度)

京都大学・農学研究科・助教 (19年度)

研究者番号: 50370135

井上 華 (INOUE HANA)

生理学研究所・細胞器官研究系

・特任助手 (17~18年度)

研究者番号: 20390700

浦本 裕美 (URAMOTO HIROMI)

生理学研究所・細胞器官研究系・特別協力研究員
(17~19年度)

研究者番号: 50390696

沼田 朋大 (NUMATA TOMOHIRO)

京都大学・工学研究科・助教 (19年度)

研究者番号: 20455223

(3) 連携研究者

高橋 信之 (TAKAHASHI NOBUYUKI)

京都大学・農学研究科・助教 (20年度)

研究者番号: 50370135

浦本 裕美 (URAMOTO HIROMI)

生理学研究所・細胞器官研究系・特別協力研究員
(20年度)

研究者番号: 50390696