

機関番号：23903

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390027

研究課題名 (和文) カルシウム活性化カリウムチャネルの新たな分子機能と創薬の新展開

研究課題名 (英文) Novel molecular functions of calcium-activated potassium channel as a target of drug development

研究代表者

今泉 祐治 (Imaizumi Yuji)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：60117794

研究成果の概要 (和文)：軟骨細胞、血管内皮細胞、Tリンパ球などの非興奮性細胞において Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル (BK, IK, SK) の機能発現が刺激応答における持続性細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に大きく貢献していることを明らかにした。その機序として細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により活性化された同チャネルが、過分極を誘発することにより、非選択性陽イオンチャネルの電気的駆動力を増加させ、容量依存性 Ca^{2+} 流入を増加させるという正帰還 Ca^{2+} 制御機構への寄与が重要であることを証明した。

研究成果の概要 (英文)：The present study revealed that functional expression of Ca^{2+} -activated K^+ (BK, IK, SK) channels in non-excitabile cells, such as chondrocytes, vascular endothelial cells and T-lymphocytes, substantially contributes to sustained increase in intracellular Ca^{2+} concentration in response to various types of stimuli. We proved that Ca^{2+} -activated K^+ channels play the central roles in the positive feedback mechanism for the regulation of intracellular Ca^{2+} concentration via the membrane hyperpolarization, which increases the driving force of store-operated Ca^{2+} influx through non-selective cation channels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：生物系薬学

科研費の分科・細目：

キーワード： Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル, 非興奮性細胞, 創薬ターゲット, 正帰還 Ca^{2+} 制御機構, 非選択性陽イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

細胞の種類にかかわらず、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は刺激応答の細胞内情報伝達系において中心的な初期事象であり、多種多様な細胞活性上昇の引き金となっている。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇で活性化される Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルは大きく3種類 (BK, IK, SK チャネル) に分類される。BK, IK, SK チャネルは

それぞれ異なった組織分布、性質、機能、薬理学的特性を持ち、多様な細胞機能に寄与しているが、いずれも $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の高い (= 細胞活性の高い) 状態において機能し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 調節因子としての性質を共有している。これまで神経・筋等の興奮性細胞において、 Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルは過分極を引き起こし電位依存性 Ca^{2+} チャ

ネル活性を抑制して $[Ca^{2+}]_i$ を低下させるため、最も基本的な負帰還 $[Ca^{2+}]_i$ 制御機構を担う重要な分子と認識されてきた。しかし T リンパ球、赤血球、ミクログリアなどに加え、2004 年以降、他の多くの非興奮性細胞(内皮・上皮細胞、骨芽・軟骨細胞、繊維芽細胞、マクロファージ、腎メザンギウムなど)の細胞膜上にも Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルが発現していることが相次いで発見された。しかし、その生理的な機能は、まだ充分には解明されていなかった。

2. 研究の目的

多くの非興奮性細胞(内皮、上皮細胞、軟骨細胞、繊維芽細胞、角化細胞、T リンパ球、ミクログリアなど)において、刺激応答の初段階となる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇($[Ca^{2+}]_i$)を正帰還的に制御する機構が普遍的に存在する可能性を検証し、 Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルがその正帰還 Ca^{2+} 制御機構の中心的役割を担う分子として機能するというスキームを立証することが本研究の目的である。刺激による細胞分化・増殖の促進などの長期的細胞応答において生じる初期の超持続的 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には、特にこの正帰還 Ca^{2+} 制御機構が重要な寄与をする可能性が高い。さらに、各種疾患の新たな治療薬物の開発において、この機構の担い手分子としての Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルが創薬ターゲットとなる可能性を検討し、具体的な作用薬候補化合物探索、作用の分子機構解明を行うことも本研究の目的である。

3. 研究の方法

Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルが非選択性陽イオンチャネルと機能連関して正帰還 Ca^{2+} 制御機構の中心的役割を担い、刺激応答における持続的細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇とその結果としての長期的な細胞応答を引き起こすという事象を、多種の非興奮性細胞で実証することとした。また正帰還 Ca^{2+} 制御機構が組織内の細胞で機能することによって、組織としてはどのような機能変化が生じるのかを検討した。さらにこれらを基盤として Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル作用薬がどのような疾患治療薬の創薬ターゲットとなるか、可能性を検討した。そのため主に以下の3つの実験系を用いた。

- A) 単離細胞の実験系:軟骨細胞・骨芽細胞・T リンパ球(Juekat T 細胞も含む)・繊維芽細胞を用いて、BK, SK, IK のいずれが高発現しているかをPCR, Western blot 法で同定した。また単一細胞でパッチクランプによる電流測定と Ca^{2+} 蛍光色素による $[Ca^{2+}]_i$ 測定を同時に行って機能解析し、正帰還 Ca^{2+} 制御機構が機能しているか検証した。同様に Ca^{2+} 透過型非選択性陽イオンチャネルの分子同定も一部行った。
- B) 組織の実験系:動脈あるいは前立腺組織標本を用いて、組織内の内皮細胞および間質細胞における正帰還 Ca^{2+} 制御機構の役割をパッチクランプ法と Ca^{2+} 画像解析法により

機能解析を試みた。

- C) 疾患モデル動物の実験系:接触性皮膚炎や前立腺肥大症のモデル動物を用いて、 Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル作用薬の効果を検討した。

4. 研究成果

4-1. 脳神経等の興奮性細胞では、強い刺激と興奮により細胞に Ca^{2+} 負荷が生じた場合、自己防衛的にスパイク発生頻度を減じて Ca^{2+} 過負荷による細胞障害を回避するシステムが幾種か存在する。特に Ca^{2+} 活性化 K^+ (KCa)チャネルはその活性化により、過分極を介して電位依存性 Ca^{2+} チャネル活性を低下させるため、多くの興奮性細胞において最も基本的な $[Ca^{2+}]_i$ 負帰還調節機構を担う重要な分子と認識されている。一方、電位依存性 Ca^{2+} チャネルが機能発現を充分にはしていない非興奮性細胞においては、電位に依存しない非選択的陽イオンチャネルが Ca^{2+} 流入経路となるため、KCa チャネル活性の上昇による過分極は、むしろ Ca^{2+} 流入を増大させ、 $[Ca^{2+}]_i$ 正帰還調節機構を担うことになる(図1)。

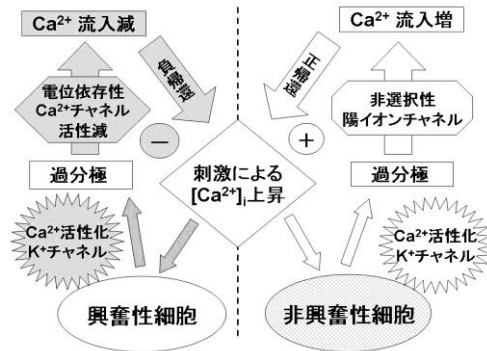


図1

このスキームを幾つかの非興奮性細胞で証明した。

4-2. 骨芽細胞において BK チャネルの新規サブライソバリエント体が高発現していることを発見し、細胞内 Ca^{2+} 濃度調節の正帰還調節機構に寄与している可能性を示した(Calcif Tissue Int. 2008)。

4-3. 軟骨細胞由来培養細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度制御機構において、非選択的陽イオンチャネルとの機能連関により、BK チャネルなどの Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルが重要な役割を果たしていることを明らかにした。病態時の軟骨細胞において肥満細胞から遊離するヒスタミンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇において、 Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK)チャネルによる正帰還 Ca^{2+} 制御機構が重要であることを証明し、軟骨機能の制御に深く関わっていることが明らかとなった。(Am J Physiol, 2010)。また Cl^- チャネル

との機能連関を明らかにした (J Pharmacol Sci, 2010)

4-4. 脳血管内皮由来培養細胞において、SK2チャンネルが細胞内Ca²⁺濃度調節の正帰還調節機構に寄与し、細胞増殖に関与しているとともに、内向き整流性Kir2.1チャンネル発現が増えて増加する場合には、細胞死を引き起こすことを明らかにした。ATPによる脳血管内皮細胞への刺激が、内皮細胞の増殖と同時に細胞死を促進し、内皮細胞の更新を早めているが、この機構にCa²⁺活性化K⁺(SK)チャンネル及び内向き整流性K⁺チャンネルKir2.1の活性化による正帰還Ca²⁺制御機が深く関与していることが明らかとなった (Am J Physiol, 2011)。

4-5. Tリンパ球においてCa²⁺活性化K⁺(IK)チャンネルの不活性異性体を発見し、その機能と接触性皮膚炎モデルにおける発現変化が病態に関わる可能性を明らかにした (J Biol Chem, 2001)。またJurkat T細胞を用いて、電位依存性K⁺チャンネルKv1.3の活性制御機構についても、重要な知見を得た (BBRC, 2008; Am J Physiol., 2009)。

以上より、BK, IK, SKチャンネルの(機能)発現は、多くの非興奮性細胞において重要な役割を果たしており、特にCa²⁺活性化K⁺チャンネルによる正帰還Ca²⁺制御機構への寄与が重要であることを証明することができた。本研究成果は、非興奮性細胞におけるCa²⁺活性化K⁺チャンネル機能の重要性を、幾つかの疾患との関連を含めて解明し、疾患治療薬の創薬ターゲットとしての可能性を明らかにした点で重要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

- 1: Ohya S, Niwa S, Kojima Y, Sasaki S, Sakuragi M, Kohri K, Imaizumi Y. Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, KCa3.1, as a novel therapeutic target of benign prostatic hyperplasia. J Pharmacol Exp Ther. 2011 In Press
- 2: Ohya S, Niwa S, Yanagi A, Fukuyo Y, Yamamura H, Imaizumi Y. Involvement of Dominant-negative Spliced Variants of the Intermediate Conductance Ca²⁺-activated K⁺ Channel, KCa3.1, in Immune Function of Lymphoid Cells. J Biol Chem. 2011; 286(19): 16940-52.
- 3: Yamazaki D, Kito H, Yamamoto S, Ohya S, Yamamura H, Asai K, Imaizumi Y. Contribution of K(ir)2 potassium channels to ATP-induced cell death in brain capillary endothelial cells and reconstructed HEK293 cell model. Am J Physiol Cell Physiol. 2011; 300(1):C75-86.
- 4: Ohya S, Fujimori T, Kimura T, Yamamura H, Imaizumi Y. Novel spliced variants of

large-conductance Ca(2+)-activated K(+)-channel β 2-subunit in human and rodent pancreas. J Pharmacol Sci. 2010; 114(2): 198-205.

- 5: Funabashi K, Fujii M, Yamamura H, Ohya S, Imaizumi Y. Contribution of chloride channel conductance to the regulation of resting membrane potential in chondrocytes. J Pharmacol Sci. 2010;113(1):94-9.
- 6: Murata H, Hotta S, Sawada E, Yamamura H, Ohya S, Kita S, Iwamoto T, Imaizumi Y. Cellular Ca²⁺ dynamics in urinary bladder smooth muscle from transgenic mice overexpressing Na⁺-Ca²⁺ exchanger. J Pharmacol Sci. 2010;112(3):373-7.
- 7: Funabashi K, Ohya S, Yamamura H, Hatano N, Muraki K, Giles W, Imaizumi Y. Accelerated Ca²⁺ entry by membrane hyperpolarization due to Ca²⁺-activated K⁺ channel activation in response to histamine in chondrocytes. Am J Physiol Cell Physiol. 2010;298(4):C786-97.
- 8: Ohno A, Ohya S, Yamamura H, Imaizumi Y. Regulation of ryanodine receptor-mediated Ca(2+) release in vas deferens smooth muscle cells. J Pharmacol Sci. 2009;110(1): 78-86.
- 9: Matsushita Y, Ohya S, Suzuki Y, Itoda H, Kimura T, Yamamura H, Imaizumi Y. Inhibition of Kv1.3 potassium current by phosphoinositides and stromal-derived factor-1alpha in Jurkat T cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2009;296(5):C1079-85.
- 10: Ohya S, Kimura K, Niwa S, Ohno A, Kojima Y, Sasaki S, Kohri K, Imaizumi Y. Malignancy grade-dependent expression of K⁺-channel subtypes in human prostate cancer. J Pharmacol Sci. 2009;109(1): 148-51.
- 11: Ohno A, Ohya S, Yamamura H, Imaizumi Y. Gender difference in BK channel expression in amygdala complex of rat brain. Biochem Biophys Res Commun. 2009; 378(4):867-71.
- 12: Tanaka R, Muraki K, Ohya S, Yamamura H, Hatano N, Itoh Y, Imaizumi Y. TRPV4-like non-selective cation currents in cultured aortic myocytes. J Pharmacol Sci. 2008; 108(2):179-89.
- 13: Hirukawa K, Muraki K, Ohya S, Imaizumi Y, Togari A. Electrophysiological properties of a novel Ca(2+)-activated K(+) channel expressed in human osteoblasts. Calcif Tissue Int. 2008;83(3):222-9.
- 14: Sakamoto K, Ohya S, Muraki K, Imaizumi Y. A novel opener of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channel reduces ischemic injury in rat cardiac myocytes by activating mitochondrial K(Ca) channel. J Pharmacol Sci. 2008;108(1):135-9.
- 15: Tanaka R, Muraki K, Ohya S, Itoh Y, Hatano N, Imaizumi Y. Cell-culture-dependent change

of Ca²⁺ response of rat aortic myocytes to sphingosine-1-phosphate. J Pharmacol Sci. 2008;107(4):434-42.

16: Matsushita Y, Ohya S, Itoda H, Kimura T, Suzuki Y, Yamamura H, Imaizumi Y. Molecular mechanisms for Kv1.3 potassium channel current inhibition by CD3/CD28 stimulation in Jurkat T cells. Biochem Biophys Res Commun. 2008;374(1):152-7.

〔学会発表〕（計 92 件）

1. Yuji Imaizumi et al The regulation of melatonin release by BK channel activity in pinealocytes. The 16th World congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2010.7.21, Copenhagen, Denmark

2. Yuji Imaizumi et al. Molecular assembly in functional Ca²⁺ microdomain in vascular smooth muscle cells. 12th Symposium on Vascular Neuroeffector Mechanisms. 2010.7.24, Odense, Denmark

3. Yuji Imaizumi, Molecular Imaging Analyses Of Ca²⁺ Signaling Units Regulating The Excitability And Tone Of Vascular Smooth Muscle Cells. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences 2009 年 7 月 29 日国立京都国際会館(京都府)

4. 今泉祐治 創薬標的としてのイオンチャネル研究の現状と展望 日本薬学会 第 130 年会 2010 年 3 月 29 日 岡山コンベンションセンター (岡山県)

〔図書〕（計 1 件）

今泉祐治, 大矢 進, 山村寿男 血管平滑筋における興奮収縮連関 学術季刊誌『血管医学』 Vol.9 No.3, 247-254 (2008).

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称: イオンチャネルに作用する化合物のスクリーニング用材料及びその利用

発明者: 今泉祐治 藤井将人、大矢進、山村寿男

権利者: 名古屋市立大学、有限会社チャネロサーチテクノロジー

番号: 特願 2010-147255

出願年月日: 平成 22 年 6 月 29 日

〔その他〕

ホームページ

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ysg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今泉 祐治 (IMAIZUMI YUJI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 60117794

(2) 研究分担者

大矢 進 (OHYA SUSUMU)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号: 70275147

山村 寿男 (YAMAMURA HISAO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号: 80398362

(3) 連携研究者

浅井 清文 (ASAI KIYOFUMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70212462.

樋口 恒彦 (HIGUCHI TUNEHIKO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 50173159