

機関番号：37111
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20500366
 研究課題名（和文） イノシトールリン脂質による容積感受性クロライドチャネル調節機構の解明
 研究課題名（英文） Role of Phosphatidylinositol Signaling in the Activation of Volume-Regulated Anion Channels
 研究代表者
 山本 信太郎（YAMAMOTO SHINTARO）
 福岡大学・医学部・准教授
 研究者番号：40336110

研究成果の概要（和文）：心筋細胞の容積調節に関わる容積感受性クロライドチャネル（VRAC）の活性化メカニズムを明らかにするため、VRAC とイノシトールリン脂質による調節機構を検討した。その結果、I 型糖尿病モデルマウスにおける PIP3 と VRAC の関係、PIP3 産生に関与する $\alpha 1$ 受容体刺激の心筋 VRAC との関連そして PIP3 の下流情報伝達系の PDK1 の抑制による心機能への影響と、PDK1 による VRAC 調節が判明した。これらは VRAC の調節メカニズムに、新知見を加えるものである。

研究成果の概要（英文）：Since it is fully unknown the mechanism in the activation of Volume-regulated anion channel (VRAC) that is an important regulator of the cell-size, I studied the relationships between VRAC activation and phosphatidylinositol signaling in mouse ventricular cells. I found the attenuation of VRAC current by PIP3 depletion in type 1 diabetic mice, the inhibition of VRAC current by $\alpha 1$ -adrenoceptor-mediated PIP2 depletion. In addition, preliminary data suggested that the modulation of VRAC by PIP3-PDK1-Akt signaling. These results provide novel evidences in the activation of cardiac VRAC current.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2009 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2010 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：心臓生理学

科研費の分科・細目：神経・筋肉生理学

キーワード：受容体、細胞内シグナル伝達、イオンチャネル、膜電流

1. 研究開始当初の背景

全ての細胞には、内外の環境変化（浸透圧など）に対する容積調節機構が存在する。心筋細胞では容積感受性クロライドチャネル（VRAC）が重要である。VRAC は、他にも、細

胞分化、薬物耐性、催不整脈性、アポトーシスなどに関与する。しかし膜伸展後の VRAC 活性化のメカニズムは依然不明である。イノシトールリン脂質が関与する $\alpha 1$ 受容体刺激、I 型糖尿病（IDDM）、圧負荷等のモデルマウスでは、心肥大または心筋症に進展することが

知られている。これら病的心筋における心筋 VRAC の役割が示唆されている。そのため VRAC 活性化へのイノシトールリン脂質の関与が示唆されるが、詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、様々なモデルマウスから急速単離した心室筋細胞を用いて、各種イノシトールリン脂質による VRAC の調節を明らかにすることと、その結果として、イノシトールリン脂質や関連する細胞内情報伝達系と VRAC の活性化との関係、そして病態モデルとの関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

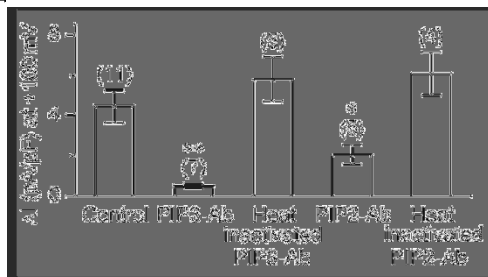
マウス心室筋細胞をランゲンドルフ法による酵素処理をすることで単離心室筋細胞を作製し、各種浸透圧刺激時の細胞容積変化を解析した。本実験には、独自に開発した細胞容積測定用ビデオ画像解析システムを用いた。更に、全細胞電流記録法を用いて VRAC 電流を測定した。モデルマウスにおける VRAC 電流の電気生理学的特性や薬理学的変化について比較検討した。

4. 研究成果

(1) PIP2 や PIP3 による VRAC 電流活性化への作用 (図1 図2)

低浸透圧刺激による細胞膜伸展によってイノシトールリン脂質の PIP2 を PIP3 に変換させる Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) が活性化されることが知られている。このため、抗 PIP2 抗体と抗 PIP3 抗体の細胞内投与の VRAC 活性化への影響を検討した。低浸透圧刺激での VRAC 電流は、抗 PIP2 抗体と抗 PIP3 抗体の投与によって有意に減少した (図1)。

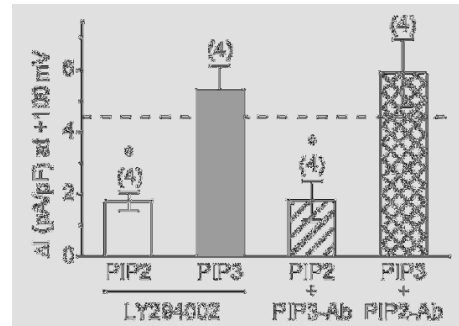
図 1



PI3K 抑制剤である LY294002 によっても、

VRAC 電流の活性化は抑制されたが、細胞内 PIP3 投与は、この LY294002 や前述の抗 PIP2 抗体による作用を抑制した (図2)。このため、低浸透圧刺激による VRAC 電流の活性化には PIP3 の存在が重要であることが示された。

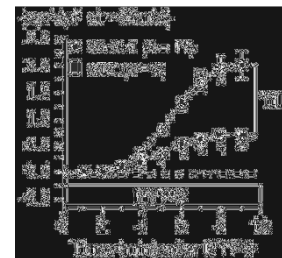
図 2



(2) IDDM マウス心室筋細胞における VRAC 電流と PIP3 との関係 (図3 図4)

IDDM はインスリン分泌が低下または欠損することによって発症する糖尿病である。インスリンは、前述の PI3K を活性化させる作用があることが知られている。このため、膵ランゲルハンス島 β 細胞に対する毒性を持つストレプトゾトシン (STZ) を腹腔内投与によって発生させた IDDM のモデルマウスの心臓から単離した心室筋細胞の VRAC 電流を測定した。その結果、IDDM 細胞では明らかに VRAC 電流活性化の抑制が観察された (図3)。

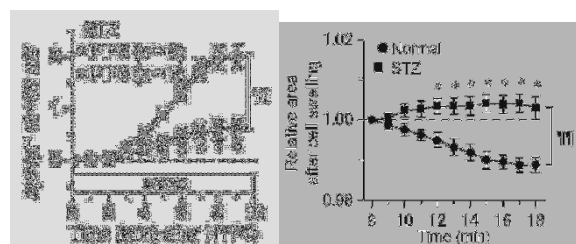
図 3



更に、細胞内に PIP3 を投与すると、この VRAC 電流の減弱は回復した (図4左)。かつて心筋 VRAC 電流は細胞容積調節機構の

一つ、Regulatory volume decrease (RVD) に関与することを報告した。そのため RVD をビデオ画像解析法で検討したところ、確かに IDDM マウスでは RVD が減少していることが確認された (図4右)。

図 4



(3) $\alpha 1$ 受容体刺激における VRAC 電流への作用と PIP3 との関係 (図 5 図 6)

$\alpha 1$ 受容体刺激では、PIP2 を IP3 と DAG に変換する Phospholipase C (PLC) を活性化することが知られている。PIP2 は PIP3 の上流に存在するため、 $\alpha 1$ 受容体刺激による PLC の活性化により、PIP2-PIP3 が減少することが予想された。このため、各種 $\alpha 1$ 受容体刺激薬による VRAC 電流への作用を検討した。その結果、 $\alpha 1A$ 受容体刺激により VRAC 電流は抑制されることが判明 (図 5) し、その抑制作用は、細胞内 PIP2 投与により減弱する (図 6) することが判明した。

図 5

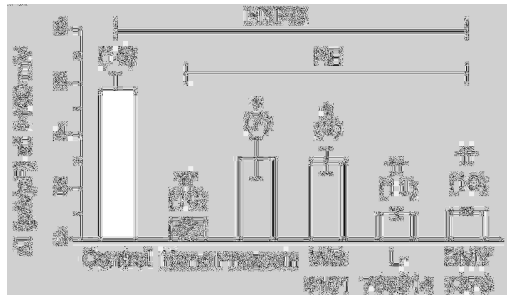
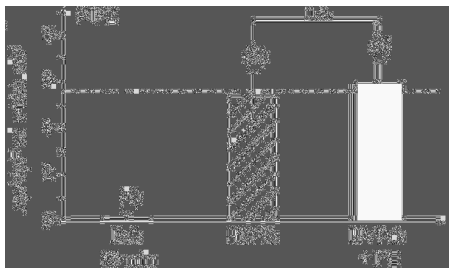


図 6



(4) 結論及び考察

今回の一連の実験結果により、心筋 VRAC 電流の活性化には、細胞膜イノシトールリン脂質である PIP3 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。現在では、その詳細な情報伝達系を明らかにするために、電気生理学的、薬理学的な検討やビデオ画像解析を継続している。その結果、preliminary data であるが、PIP3-PDK1-Akt という情報伝達系の関与が示唆される結果を得ている。

VRAC は、細胞容積調節に加え、様々な機能が報告されている重要なチャネルである。今回の報告は、その VRAC の調節メカニズムに、新知見を加えるものである。

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 6 件)

1. Yamamoto S*, Iyoda T, Kita S, Yamada T, Iwamoto T. OSU-03012, a novel celecoxib derivative, induces cell swelling and shortens action potential duration in mouse ventricular cells. *Biomed Res*: 31 (6): 413-417, 2010. 査読あり
2. Ichishima K, Yamamoto S*, Iwamoto T, Ehara T. $\alpha 1$ -Adrenoceptor-mediated PIP2 depletion inhibits activation of volume-regulated anion channels in mouse ventricular myocytes. *Bri J Pharmacol*: 61(1):193-206, 2010. 査読あり
3. 山本信太郎*, 塩谷孝夫, 穎原嗣尚, 岩本隆宏. 心筋細胞を中心とした細胞の容積調節に関する評価法. *日本薬理学雑誌* 135(6): 245-249, 2010. 査読あり
4. Yamamoto S*, Yamada T, Iyoda T, Kita S, Iwamoto T. Role of Cl⁻ Channels and Transporters in the Cardiac Cell Volume Homeostasis. *Med Bull Fukuoka Univ* 36: 243-255, 2009. 査読あり
5. Yamamoto S*, Ichishima K, Ehara T. Reduced volume-regulated outwardly rectifying anion channel activity in ventricular myocyte of type 1 diabetic mice. *J Physiol Sci* 59:87-96, 2009. 査読あり
6. Yamamoto S, Ichishima K, Ehara T. Regulation of volume-regulated outwardly rectifying anion channels by phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate in mouse ventricular cells. *Biomed Res* 29(6):307-315, 2008. 査読あり

*: corresponding author

[学会発表] (計 20 件)

1. Yamamoto S, Iyoda T, Kita S, Yamada T, Iwamoto T. Effect of OSU-03012 on the activation of volume-regulated anion channels in mouse ventricular cells. 第 88 回日本生理学会大会 (東北地方太平洋沖地震のため中止。抄録集上での開催)
2. Yamamoto S, Iyoda T, Kita S, Yamada T, Iwamoto T. OSU-03012, a novel

- celecoxib derivative, suppresses volume-regulated anion channels in mouse ventricular cells. 第84回日本薬理学会年会(東北地方太平洋沖地震のため中止。抄録集上での開催)
3. Ichishima K, Yamamoto S, Ehara T. Regulation of volume-regulated anion channels by phosphatidylinositol signaling in heart. 第75回日本循環器学会学術集会(東北地方太平洋沖地震のため中止。抄録集上での開催)
 4. Yamamoto S, Kita S, Iyoda T, Yamada T, Iwamoto T. Caveolin-3 regulates the volume-regulated anion channel in mouse ventricular cells. 55th Annual Meeting of Biophysical Society. 2011年3月7日. Baltimore MD USA
 5. 山本信太郎 喜多紗斗美 伊豫田拓也 山田敏樹 岩本隆宏. Properties of volume-regulated anion channel in hypertrophic ventricular cells from caveolin-3 deficient mice. 第63回日本薬理学会西南部会. 2010年11月26日. 鹿児島市
 6. 山本信太郎 喜多紗斗美 伊豫田拓也 山田敏樹 岩本隆宏. カベオリン-3による細胞容積調節性アニオンチャネルの制御. 第61回西日本生理学会. 2010年10月15日. 長崎市
 7. 山本信太郎 喜多紗斗美 伊豫田拓也 山田敏樹 穎原嗣尚 岩本隆宏. 肥大心筋細胞における細胞容積調節性アニオンチャネルの電気生理学的特性. トランスポーター研究会第4回九州部会. 2010年9月11日. 佐世保市
 8. 山本信太郎 喜多紗斗美 岩本隆宏. The properties of the cardiac volume-regulated outwardly rectifying anion channel in caveolin-3 deficient mice. 第33回心筋代謝研究会. 2010年7月3日. 東京都港区
 9. 山本信太郎 喜多紗斗美 伊豫田拓也 山田敏樹 穎原嗣尚 岩本隆宏. Caveolin-3 modulates the activity of the volume-regulated chloride channel in mouse ventricular cells. 第87回日本生理学会総会. 2010年5月19日. 盛岡市
 10. 山本信太郎 喜多紗斗美 伊豫田拓也 岩本隆宏. Caveoline-3 deficiency restrains the cardiac volume-regulated outwardly rectifying anion channel. 第83回日本薬理学会年会. 2010年3月16日. 大阪市
 11. 山本信太郎 喜多紗斗美 伊豫田拓也 市島久仁彦 穎原嗣尚 岩本隆宏. PI3Kは細胞容積感受性アニオンチャネルを介して心筋細胞容積を制御する. 第39回日本心脈管作働物質学会. 2010年2月5日. 名古屋市
 12. 山本信太郎 喜多紗斗美 市島久仁彦 穎原嗣尚 岩本隆宏. 心筋細胞の容積調節はイノシトールリン脂質によって制御される. 第19回日本循環薬理学会. 2009年11月27日. 京都市
 13. 山本信太郎 市島久仁彦 岩本隆宏 穎原嗣尚. 細胞容積調節性アニオンチャネルのPI3Kによる調節機構. 第60回西日本生理学会. 2009年11月6日. 福岡市
 14. 山本信太郎 岩本隆宏. 細胞容積調節におけるイノシトールリン脂質による制御. 「生体膜トランスポートソームの分子構築と生体機能」平成21年度第1回班会議. 2009年8月26日. 阿蘇市
 15. Yamamoto S. Reduced volume-regulated outwardly rectifying anion channel activity in ventricular myocyte of type 1 diabetic mice. International Joint Symposium: Physiology of Anion Transport and Cell Volume Regulation (PAT-CVR 2009). 2009年8月3日. Okazaki
 16. Yamamoto S, Ichishima K, Ehara T. Regulation of volume-regulated outwardly rectifying anion channels by phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate in mouse ventricular cells. XXXVI International Congress of Physiological Sciences (IUPS 2009). 2009年7月27日. Kyoto
 17. Yamamoto S, Ichishima K, Ehara T. The Regulation of Volume-Regulated Outwardly Rectifying Anion Channels by Membrane Phosphatidylinositides in Mouse Ventricular Cells. 53th Annual Meeting of Biophysical Society. 2009年2月28日. Boston MA USA.
 18. 山本信太郎. マウス心室筋における細胞容積調節性アニオンチャネルのイノシトールリン脂質による調節. トランスポーターワークショップ IN 福岡. 2008年11月2日. 福岡市
 19. 市島 久仁彦 山本信太郎 穎原嗣尚.

α 受容体刺激によるマウス心筋型

$I_{Cl,swell}$ の抑制に PIP3 減少が関与する.

第 59 回西日本生理学会, 2008 年 10 月 3 日, 熊本市

20. 山本信太郎. マウス心室筋における細胞容積調節性アニオンチャネルのイノシトールリン脂質による調節. 「生体膜トランスポートソームの分子構築と生体機能」平成 20 年度第 1 回班会議, 2008 年 9 月 24 日, 淡路市

[その他: シンポジウム] (計 3 件)

1. 山本信太郎 喜多紗斗美 岩本隆宏. Cardiac hypertrophy and cell-volume regulation. 第 83 回日本薬理学会年会, 2010 年 3 月 16 日, 大阪市
2. 山本信太郎 喜多紗斗美 岩本隆宏. イノシトールリン脂質シグナル伝達による心筋細胞の容積調節. トランスポーター研究会第 3 回九州部会, 2009 年 11 月 21 日, 鹿児島市
3. Yamamoto S, Ehara T. Cell-volume regulation in mammalian heart. International Joint Symposium: Physiology of Anion Transport and Cell Volume Regulation (PAT- CVR 2009). 2009 年 8 月 3 日, Okazaki

6. 研究組織

研究代表者

山本 信太郎 (YAMAMOTO SHINTARO)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号: 40336110