

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：20590211

研究課題名（和文）リソソーム安定化によるネクロシス性細胞死防御

研究課題名（英文） Cytoprotection against necrotic cell death by the stabilization of the lysosome.

研究代表者 挟間章博（Akihiro Hazama）

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60218394

研究成果の概要（和文）：

ペプスタチン、リソセンサー等を用いてHeLa細胞のリソソームの可視化を行った。ネクロシス性細胞傷害により、リソソームの消失が観察され、細胞傷害によるリソソームの破綻が明らかになった。また、塩素イオン除去または塩素イオンチャネル阻害剤投与によりリソソームのシグナルが保持されることが明らかとなった。これらのことから、塩素イオンチャネル阻害はリソソームの安定化を介して細胞保護を行うことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We visualized the lysosome of HeLa cells using pepstatine or lysosensor. The lysosomal signal disappeared by the necrotic cell damage. The replacement of Cl⁻ by other anion or the application of Cl⁻ channel blocker protected the lysosomal signal against the necrotic cell damage. These results indicate that the inhibition of Cl⁻ fluxes has the cytoprotective effect via the stabilization of lysosome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,900,000	190,000	2,090,000
21年度	1,200,000	120,000	1,320,000
22年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	490,000	4,190,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：細胞死 ネクロシス 塩素イオン リソソーム

1. 研究開始当初の背景

細胞が機械的損傷を受け、ネクロシスに陥る時、細胞外からの塩素イオンの流入による細胞内塩素イオン濃度上昇が起こると考えられる。これは、細胞内ATP枯渇に起因するナトリウムポンプの機能低下による細胞内ナトリウムイオン蓄積と細胞膜透過性の亢進による脱分極に応じて、塩素イオ

ンの細胞内外の分布が変化することに起因する。一方、臓器移植の時に用いられる臓器保存液の組成として、塩素イオンを他の有機アニオンに置き換えたものが実際に使用されるなど、細胞外塩素イオン除去が組織損傷を軽減させることが経験的に知られている。しかし、「何故、塩素イオンが細胞障害に結びつくか？」という問題は、は未

だ解決されていない。申請者は、平成 17 年度－18 年度の科学研究費・基盤研究 (C) の研究で、血管内皮細胞における細胞障害と塩素イオンとの関係を調べてきた。その過程で、細胞膜透過性を亢進させるような物理的ダメージを細胞に加えたことによって起こるネクローシスについても細胞外塩素イオンの除去や塩素イオンチャネル阻害によりネクローシスが軽減できることを明らかにした。

2. 研究の目的

この研究の過程で、細胞内塩素イオン濃度の増加が細胞内ベジクル (リソソーム) の過剰な酸性化と破綻を引き起こすことを示唆する予備的データが得られ、「細胞内塩素イオンの増加がリソソーム膜を不安定にしてリソソームの破綻を引き起こし、リソソーム酵素が細胞膜に障害を与えることがネクローシス性細胞死を引き起こす」という仮説を得た。本研究は、この仮説を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

ネクローシスを引き起こすような細胞障害を加えた場合、実際にどの程度塩素イオン濃度が上昇するか、塩素イオン感受性蛍光色素 (SPQ) を用いて定量する。細胞障害を与える方法については、細胞膜透過性を亢進させるようなイオノフォア (amphotericin-B) を細胞に投与することで、物理的な細胞障害を模擬することにする。さらに、通常は細胞膜を通過しないような蛍光色素 (PI) を用いて、どのような時間経過で細胞膜の透過性が亢進していくかを細胞内塩素イオン濃度変化と比較しながら明らかにする。細胞障害を加えた場合のリソソームの破綻について、リソソームのマーカータンパクを指標として、単一細胞レベルで可視化する。具体的には、カテプシンと結合するペプスタチンに蛍光ラベルしたものを用いる。また、塩素イオンを種々の陰イオンで置換し、リソソーム破綻と陰イオンの関係を調べる。また、塩素イオンチャネル阻害剤 (DIDS, Phloretin, arachidonate など) を与えることによりリソソームの破綻を防げることを明らかにする。

4. 研究成果

リソソーム安定化によるネクローシス性細胞死防御という研究課題の下に研究をスタートした。これまでの研究で、細胞外塩素イオン条件がネクローシス性細胞死を抑制するという機序は明らかになってきたが、細胞内における塩素イオンの役割については、明らかでなかった。作業仮説としては、細胞内のリソソーム破綻がネクローシス性細胞死を促進させ、細胞外低塩素イオン条件では、細胞内リソソームが安定化するために、細胞

死が遅延するということである。リソソームの可視化を行うために、リソソームに取り込まれるペプスタチン、リソソームを蛍光ラベルするリソセンサー、リソトラッカーを用いて H e L a 細胞のリソソームのラベルを試み、成功した。amphotericin-B を用いて細胞膜の透過性を亢進させるとラベルされたリソソームの消失が観察され、細胞傷害によるリソソームの破綻が明らかになった。また、細胞外低塩素イオン条件にて同様の細胞傷害実験を行うと、リソソームのシグナルが保持され、塩素イオンチャネル阻害剤を用いることで、やはりリソソームのシグナルが保持されることが明らかとなった。これらのことから、塩素イオンチャネル阻害はリソソームの安定化を介してまた、このようなリソソームを安定化されるることが明らかとなり、上記の仮説が正しいことが示唆された。

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 4 件)

A tissue-engineered trachea derived from a framed collagen scaffold, gingival fibroblasts and adipose-derived stem cells. Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Wada I, Nakamura T, Omori K.

Biomaterials. 2010;31(18):4855-63.

(査読有)

The effect of topical amiloride eye drops on tear quantity in rabbits.

Hara S, Hazama A, Miyake M, Kojima T, Sasaki Y, Shimazaki J, Dogru M, Tsubota K.

Mol Vis. 2010 4;16:2279-85.

(査読有)

Plasma membrane aquaporin AqpZ protein is essential for glucose metabolism during photomixotrophic growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Akai M, Onai K, Kusano M, Sato M, Redestig H, Toyooka K, Morishita M, Miyake H, Hazama A, Checchetto V, Szabò I, Matsuoka K, Saito K, Yasui M, Ishiura M, Uozumi N.

J Biol Chem. 2011 15;286:25224-35.

(査読有)

Improved islet yield and function by use of a chloride channel blocker during collagenase digestion.

Anazawa T, Sato Y, Saito T, Tsuchiya T,

Kenjo A, Kimura T, Haga J, Miyake M,
Waguri S, Hazama A, Gotoh M.
Transplantation. 2011 27:92:871-7.
(査読有)

〔学会発表〕(計4件)

アンフォテリシン B 誘導性ネクロシス
における細胞骨格の役割
三宅将生、挾間章博
福島医大・医・細胞統合生理
日本生理学会大会 2010年

リソソーム安定化機構と細胞死
挾間章博 三宅将生
福島医大・医・細胞統合生理
日本生理学会大会 2011年

ウシ卵細胞における膜電位分布解析
三宅将生 1、宮村元晴 2、濱野晴三 2、兼子智
3、挾間章博
(1)福島医大・医・細胞統合生理、(2)家畜改良
事業団家畜バイオテクセンター、(3)東京歯科
大・市川総合病院
日本生理学会大会 2012年

セシウムは細胞増殖を抑制する
小林大輔、垣野内景、松村香楠、挾間章博
福島医大・医・細胞統合生理
日本生理学会大会 2012年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

挾間 章博 (Akihiro Hazama)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：60218394

(2) 研究分担者

勝田 新一郎 (Shin-ichiro Katsuda)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80285022

三宅 将生 (Masao Miyake)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：00381385

小林 大輔 (Daisuke Kobayashi)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：40528080

(3) 連携研究者

無し