

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5月13日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591063

研究課題名（和文）カルシウムチャネルを標的とした二次性副甲状腺機能亢進症治療基盤の構築

研究課題名（英文）Involvement of L-type calcium channels in high extracellular calcium-induced increase in cytoplasmic calcium concentration in parathyroid cells isolated from the patients with secondary hyperparathyroidism.

研究代表者

横山 啓太郎（YOKOYAMA KEITARO）

東京慈恵会医科大学 医学部 准教授

研究者番号：70211654

研究成果の概要（和文）：

培養副甲状腺細胞に Ca^{2+} 感受性蛍光色素を負荷し、共焦点レーザー顕微鏡下に、150 mM K^+ 溶液を10秒間投与すると細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過性の上昇を示す蛍光強度変化が得られ、無 Ca^{2+} 溶液中では応答しないこと、細胞を150 mM K^+ 溶液中に30秒以上さらした後では上記応答が完全に不活性化されることを示した。また、パッチクランプ法にて形質膜の脱分極により Ca^{2+} および Ba^{2+} に透過性の内向き電流が記録され、L型 Ca^{2+} チャネルに類似した電流電圧特性と薬理特性が得られた。これらの結果より、ヒト培養副甲状腺細胞に電位依存性L型様 Ca^{2+} チャネルが発現し、 Ca^{2+} 流入経路として機能していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Patch-clamp and fluorescence measurements of cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were performed to directly detect extracellular Ca^{2+} entry into cultured parathyroid cells from patients with secondary hyperparathyroidism. Cells loaded with fluo-3 AM or fluo-4 AM showed a transient increase in fluorescence (Ca^{2+} transient) following 10 s exposure to 150 mM K^+ solution in the presence of mM external Ca^{2+} . The Ca^{2+} transient was completely inactivated after 30-40 s exposure to the high K^+ solution, was reduced by dihydropyridine antagonists, and enhanced by FPL-64176, an L-type Ca^{2+} -channel agonist.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：二次性副甲状腺機能亢進症、 Ca^{2+} チャネル

1. 研究開始当初の背景

副甲状腺は生体 Ca^{2+} の恒常性の維持に中心

的役割を担っている。しかし、PTH の分泌制御機構に関しては、 Ca^{2+} 感受性受容体 (CaR)

を介したシグナル系の解析に焦点が当てられ、副甲状腺生細胞を用いた機能解析は殆ど行われていない。そこで、我々は2次性機能亢進症で増殖したヒト副甲状腺摘出組織を用いた単離培養系を確立し、電気生理学的ならびに光学的手法を用いて電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが外液 Ca^{2+} 濃度上昇時の細胞内 Ca^{2+} 濃度増加の主要経路として機能することを明らかにしつつある。

2. 研究の目的

本研究はヒト副甲状腺細胞への外液 Ca^{2+} 流入経路の特性および副甲状腺ホルモン (PTH) 分泌に及ぼす Ca^{2+} 流入の効果を定量的に解析することで、副甲状腺疾患に対する創薬の基盤を確立するものである。我々は、ヒト培養副甲状腺生細胞を用いて近年取得したデータを基に、「副甲状腺細胞における Ca^{2+} チャンネルの発現量が慢性的な血清 Ca^{2+} 濃度の上昇により増加し、さらに、このチャンネルを介した Ca^{2+} 流入が副甲状腺に隣接する甲状腺のC細胞より分泌されるカルシトニンにより傍分泌的に増強されることで、PTH分泌が抑制される」とする作業仮説を立てた。本研究の目的はこの作業仮説を検証することにある。

3. 研究の方法

L型様 Ca^{2+} チャンネル活性 (発現量も含む) の培養液 Ca^{2+} 濃度依存性について検討する。電流計測では、活性化、不活性化の時定数、電流-電圧特性など他のL型 Ca^{2+} チャンネルとの相違点を明らかにし、その制御機構について検討した。

2) パッチクランプ法にて膜電位を -60 mV 付近に固定し、脱分極しなくとも細胞外 Ca^{2+} 濃度上昇のみで内向き流入が観察されるかどうか検討する。実際、細胞外の

生理的な Ca^{2+} 濃度上昇で誘起される Ca^{2+} トランジェントがDHP系阻害薬で抑制されることを確認した。

3) 細胞外 Ca^{2+} 濃度上昇で誘発される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の主要経路を同定するため、ホールセルパッチクランプ法にて IP_3 受容体阻害薬の 2APB、Xestospongin、ヘパリン、PLC 阻害薬の U73122、 Ca^{2+} ストア涸渴薬の CPA や Thapsigargin 等で細胞内還流することにより細胞内 Ca^{2+} ストアからの CaR を介した Ca^{2+} 放出を強く抑制した条件下に、外液 Ca^{2+} 濃度上昇で誘起される Ca^{2+} トランジェントの抑制効果を検討した。

4. 研究成果

副甲状腺細胞 (正常および二次性副甲状腺機能亢進による過形成組織) を単離・培養する系を3年前に確立した。培養副甲状腺細胞に Ca^{2+} 感受性蛍光色素を負荷し、共焦点レーザー顕微鏡下に、 150 mM K^+ 溶液を10秒間投与すると細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過性の上昇を示す蛍光強度変化が得られ、無 Ca^{2+} 溶液中では応答しないこと、細胞を 150 mM K^+ 溶液中に30秒以上さらした後では上記応答が完全に不活性化されることを示した。また、パッチクランプ法にて形質膜の脱分極により Ca^{2+} および Ba^{2+} に透過性の内向き電流が記録され、L型 Ca^{2+} チャンネルに類似した電流電圧特性と薬理特性が得られた。これらの結果より、ヒト培養副甲状腺細胞に電位依存性 L型様 Ca^{2+} チャンネルが発現し、 Ca^{2+} 流入経路として機能しうることが示唆された。

さらに生理的な遊離 Ca^{2+} 濃度である $1.2 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_o$ あるいはより低濃度 ($0.9 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_o$) で培養した場合の電位依存性 Ca^{2+} チャンネル活性について検討した。その結果、 $1.5 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_o$ 中で 150 mM K^+ 溶液の投与により誘起される Ca^{2+} トランジェントの大きさは $1.8 > 1.2 > 0.9 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_o$ となった。このことから

外液Ca²⁺濃度が高くなった場合、電位依存性Ca²⁺チャネルの発現量が増え、その結果副甲状腺細胞内のCa²⁺濃度が上昇し、血清Ca²⁺濃度上昇作用を有する副甲状腺ホルモンの分泌が抑制されるという負のフィードバック機構が副甲状腺細胞そのものに存在する可能性が示唆された。

平成22年度からは、副甲状腺のCa流入と関連するKlotho蛋白に焦点を当てて検討を行った。

。まず、二次性副甲状腺機能亢進症患者の副甲状腺摘出標本で、膜型Klotho蛋白の免疫染色を行った。副甲状腺の結節病変と過形成病変とでは膜型Klotho蛋白の染色性に差異があった。

また、Klotho蛋白と副甲状腺のCa応答の関連を評価するために、ヒトにおいては血清分泌型Klothoを測定した。

さらに、二次性副甲状腺機能亢進症モデルであるアデニンマウスを作成に着手した。

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7件)

1. Yokoyama K, Imura A, Ohkido I, Maruyama Y, Yamazaki Y, Hasegawa H, Urae J, Sekino H, Nabeshima Y, Hosoya T. Serum soluble α -Klotho in hemodialysis patients. Clin Nephrol. 2012 (in press)

2. Ohkido I, Yokoyama K, Kagami S, Hosoya T. Alpha-Klotho (α -Kl) expressions remained in the parathyroid glands of patients with secondary hyperparathyroidism. Nephrol Dial Transplant. 2010

3. Yokoyama K, Urashima M, Ohkido I, Kono T, Yoshida T, Muramatsu M, Niu T, Hosoya T. L-type voltage-dependent calcium channel α subunit 1C is a novel candidate gene associated with secondary

hyperparathyroidism: an application of haplotype-based analysis for multiple linked single-nucleotide polymorphisms. Nephron Clin Pract. 2010;115(4):c237-43.

4. Ohkido I, Yokoyama K, Kagami S, Hosoya T. The hypothesis that bone turnover influenced FGF23 secretion. Kidney Int. 2010 Apr;77(8):743

5. Yokoyama K, Yoshida H, Maruyama Y, Ozaki A, Yamamoto H, Hosoya T. Should the targeted value of the phosphate be reviewed lower to normal range from the viewpoint of vascular calcification? Kidney Int. Kidney Int. 2010 May;77(10):928

6. Ohkido I, Yokoyama K, Kagami S, Hosoya T. Alpha-Klotho (α -Kl) expressions remained in the parathyroid glands of patients with secondary hyperparathyroidism. Nephrol Dial Transplant. 2010

7. Yokoyama K, Matsuba D, Adachi-Akahane S, Takeyama H, Tabei I, Suzuki A, Shibasaki T, Iida R, Ohkido I, Hosoya T, Suda N. Dihydropyridine- and voltage-sensitive calcium entry in human parathyroid cells. Experimental Physiology 94 (7): 847-855, 2009.

[学会発表] (計3件)

1. Yamamoto I, Yokoyama K, Ohkido I et. al. Mice fed adenine-containing diet is optimal model of tubulointerstitial

damage with renal dysfunction. 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology. November 10, 2011; Philadelphia

2. Yokoyama K, Ohkido I, Iwamoto T, Ishida M, Hosoya T Decrease of serum sphingosine-1-phosphate levels in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism treated with Cinacalcet. November 12, 2011; Philadelphia

3. YokoyamaK, Ohkido I, Ito I, Murayama A, Yanagisawa J, Hosoya T. Vitamin D analogues with TGF- β signal inhibition property ameliorates renal fibrotic lesions in UUO mice. 42th Annual Meeting of American Society of Nephrology. October 31, 2009 San Diego, California

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 啓太郎 (YOKOYAMA KEITARO)

東京慈恵会医科大学 医学部 准教授

研究者番号 : 70211654

(2) 研究分担者

大城戸 一郎 (OHKIDO ICHIRO)

東京慈恵会医科大学 医学部 助教

研究者番号 : 40372966