

機関番号 : 31201

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009 ~ 2010

課題番号 : 21790212

研究課題名 (和文) 腎皮質集合管における細胞容積調節に寄与する陰イオンチャネルの分子同定

研究課題名 (英文) Identification of the anion channel involved in volume regulation in the principal cells of rat cortical collecting duct.

研究代表者

駒切 洋 (KOMAGIRI YOU)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 80405753

研究成果の概要 (和文) :

低浸透圧刺激時の細胞容積調節には K⁺チャネル、陰イオンチャネル及びそれらの調節因子として細胞内カルシウムが重要な役割を果たすと考えられている。本研究では細胞内カルシウム濃度変化と陰イオンチャネルコンダクタンスについて、ラット皮質集合管新鮮単離標本を用いて蛍光レシオイメージング及び電気生理学的解析を行うことにより、1) 低浸透圧刺激時の細胞内カルシウム濃度上昇機構にニカルジピン感受性の細胞外カルシウム流入経路が関与する、2) 低浸透圧刺激によって NPPB 感受性、グリベンクラミド非感受性の Cl⁻電流が活性化することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) :

Anion efflux and intracellular Ca²⁺ increase have been known to play important roles in cell volume regulation during hypotonicity. This study was carried out to explore the mechanisms of hypotonicity-induced intracellular Ca²⁺ elevation and characterize anion conductance activated by hypotonicity in the principal cells of freshly isolated rat cortical collecting ducts. Using Fura-2 fluorescence Ca²⁺ imaging and whole-cell voltage-clamp techniques, it was found that a nifedipine-sensitive Ca²⁺ entry pathway was involved in the mechanisms underlying the hypotonicity-induced intracellular Ca²⁺ increase and a NPPB-sensitive/glibenclamide-insensitive Cl⁻ current was activated by hypotonic stimulation in the principal cells of rat cortical collecting ducts.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

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 : 生体膜・チャネル・トランスポーター・能動輸送

1. 研究開始当初の背景

腎集合管は抗利尿ホルモンやアルドステロンによる調節を受け、最終的な尿の量と組成の

決定に関わることから体液の恒常性の維持に重要な機能的役割を持つ。特に、皮質部の集合管の管腔側膜はヘンレのループ上行脚及び遠位曲尿細管での電解質の再吸収を経た後の

比較的浸透圧の低い管内液にさらされ、その浸透圧の値は水の透過性の変化による水の再吸収量の調節の過程で大きく変動(100~300 mOsm)する。一方で、皮質集合管での Na^+ と水の再吸収に作用するプロスタグランジン E_2 が皮質集合管の細胞容積を膨張させるという報告もある。そのため皮質集合管では水及び電解質輸送の調節及び管内液の浸透圧の変動と平行して、何らかの細胞容積調節メカニズムが常に働き上皮細胞の機能と恒常性の維持に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

一般的に低浸透圧溶液にさらされると、細胞は一過性に膨張した後、細胞内からの溶質と水の排泄により細胞容積を減少させる(regulatory volume decrease, RVD)。

これまでの研究から、RVDの過程には1)細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇、2) K^+ コンダクタンスの上昇及び、3)陰イオンコンダクタンスの上昇が生じることが確認されている。

K^+ チャンネルに関しては高コンダクタンス型(BK channel)又は中コンダクタンス型(IK channel)の Ca^{2+} -activated K^+ チャンネルがRVDに関与していることが示唆されている。一方でこれと対をなす陰イオンコンダクタンスを担う分子実体については対照とする組織や細胞系、実験系によって議論が分かれておりいくつかの候補分子が挙げられているが確定的な報告はなく、皮質集合管においてもRVDに関与する陰イオンコンダクタンスの電気生理学的性質及びその分子実体については不明である。

2. 研究の目的

細胞容積の調節は多くの細胞が持つ生命維持に必須の機能である。本研究は生理的条件下で低浸透圧溶液に曝される可能性のある腎皮質集合管上皮細胞を用いて、低浸透圧刺激時の Cl^- 排泄に関与するイオンコンダクタンスの詳細な電気生理学的性質を明らかにし、その分子実体を同定することを目的に実験を行う。上皮系細胞の重要な特徴である細胞極性を保持した新鮮単離標本を用いて実験を行うことで容積調節機構についての新たな知見の獲得を目指す。

3. 研究の方法

前述のように低浸透圧時の細胞容積調節には細胞内 Ca^{2+} が重要な役割を果たしていることが多数報告されている。代表者はラット皮質集合管において低浸透圧刺激によって管腔側膜の K^+ チャンネルが活性化し、これがpaxilline感受性の Ca^{2+} -activated large conductance K^+ channel (BKチャンネル)であること及び細胞内 Ca^{2+} 濃度が実際に上昇することを確認した。そのためラット皮質集合管においても水の駆動力となるイオンの排泄をなす K^+ チャンネル及び陰イオンチャンネルの活性化に細胞内 Ca^{2+} が

重要な役割を担っている可能性がある。また皮質集合管新鮮単離標本におけるwhole-cell Cl^- 電流の測定についてはPalmerらの報告(*Am J Physiol Renal Physiol.* 2006 291:F1157-68)が唯一であり、非刺激時にみられる Cl^- 電流の薬理学的性質も明らかになっていない。そこで本研究では研究期間中に、ラット皮質集合管新鮮単離標本を用いて(1)低浸透圧刺激時の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇メカニズム、(2)非刺激時のwhole-cell Cl^- 電流及び低浸透圧刺激によって活性化する Cl^- 電流の性質の検討を行った。具体的方法は以下の通り行った。

標本作製: ラットから摘出した腎臓のスライスから実体顕微鏡下で皮質集合管を単離し、マイクロマニピュレーターに固定したガラス管を用いて皮質集合管を長軸方向に沿って切り開いた(split-open)。この操作によって上皮細胞の管腔側への電極の直接アプローチによる膜電流測定が可能となる。

細胞内 Ca^{2+} 濃度測定: 標本作製後 Ca^{2+} 蛍光指示薬 Fura-2AMを負荷し、蛍光レシオイメージング法により低浸透圧刺激時の細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を観察した。

Whole-cell電流測定: 標本を顕微鏡下に設置し、管腔側からガラス電極をアプローチし、conventional whole-cell voltage clamp法により全細胞電流(whole-cell電流)を測定した。ピペット内液はCs-glutamateに富む溶液を用い、 Cl^- 電流測定時には細胞外液をNMDG- Cl 溶液に置換した。等張溶液の浸透圧をマンニトールによって調節し、低浸透圧刺激の前後でイオン組成が変化しないようにした。

4. 研究成果

(1) 低浸透圧刺激時の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇メカニズム

低浸透圧に応答した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇機構について、新鮮単離したラット皮質集合管を対象に、Fura-2/AM を使用した蛍光レシオイメージング法、および細胞外 Ca^{2+} 流入の観察に用いられる Mn^{2+} クエンチ法を用いて検討した。その結果、皮質集合管を低浸透圧溶液に暴露すると主細胞内の Ca^{2+} 濃度が一過性に上昇し、この細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は細胞外 Ca^{2+} の除去により顕著に抑制されたが、プリン受容体阻害薬のスラミン、機械受容性陽イオンチャンネルの阻害剤である Gd^{3+} 、 La^{3+} 及びルテニウムレッドでは抑制されなかった。一方、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの阻害剤であるニカルジピンはこの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を有意に抑制した(図1)。

細胞外に Mn^{2+} を添加し Mn^{2+} 流入による Fura-2 蛍光の減衰を観察したところ、低浸透圧刺激直後に蛍光強度の急速な減少が見られたが、この蛍光強度の減少はニカルジピンによって有意に抑制された(図2)。

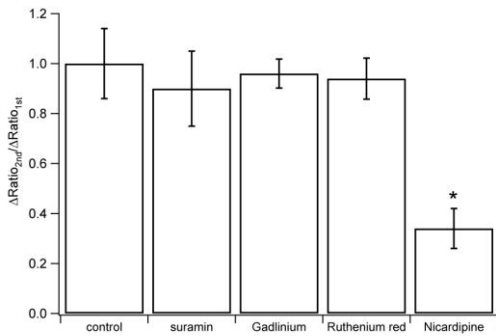


図1 細胞内 Ca²⁺濃度上昇に対するブロッカーの効果

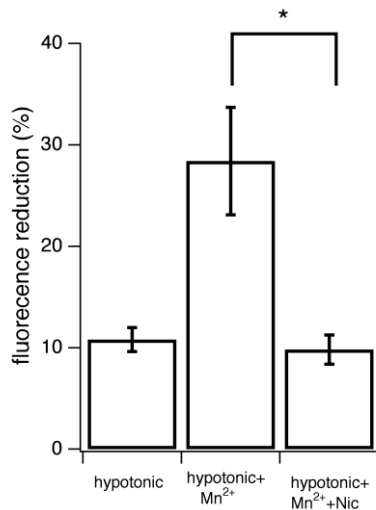


図2 低浸透圧刺激時の蛍光強度の減少率

以上の結果からラット皮質集合管における低浸透圧刺激時の細胞内 Ca²⁺濃度上昇機構にはニカルジピン感受性の細胞外 Ca²⁺流入経路が関与していることが示唆された。

(2) ラット皮質集合管新鮮単離標本における非刺激時の whole-cell Cl⁻電流及び低浸透圧刺激によって活性化する Cl⁻電流の性質

ラット皮質集合管新鮮単離標本に対して、電極内液に Cs-glutamate 溶液、細胞外液として NMDG-Cl 溶液を用いて whole-cell 電流の測定を行った所、内向き、外向きともに時間依存性に素早く不活性化する外向き整流性の Cl⁻電流が観察された。この Cl⁻電流は NPPB(100 μM)および DIDS(1 mM)によってそれぞれ 75%、40%抑制されたがグリベンクラミド(200 μM)には非感受性だった(図3)。細胞外液を低浸透圧溶液に置換すると、whole-cell 電流の振幅が+90 mVで30%、-90 mVで87%増大した(図4)。

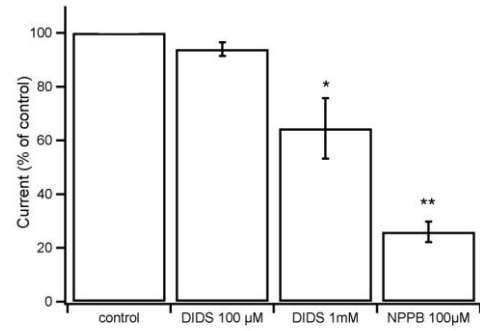


図3 非刺激時の whole-cell Cl⁻電流に対するブロッカーの効果

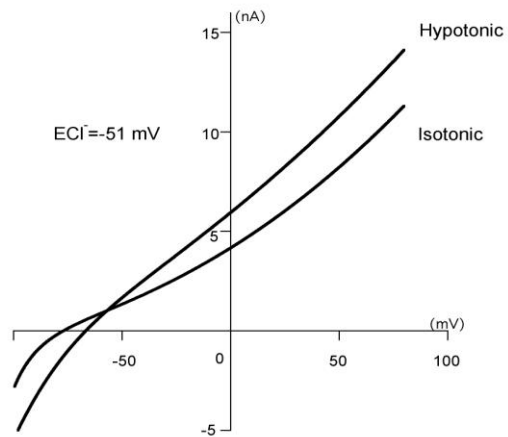


図4 低浸透圧刺激による whole-cell 電流の増大

さらに低浸透圧刺激後に内向き電流の不活性化速度の遅延が観察された。低浸透圧刺激による Cl⁻電流の振幅の増大は NPPB によって約 80%減少したがグリベンクラミドには影響を受けなかった。Cl⁻チャネルの阻害剤は特異性が高くないため薬理的性質のみから分子を特定することはできない。詳細なイオン選択性及び細胞内調節因子、特に細胞内 Ca²⁺による調節の有無等の検討は今後の課題である。

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1件)

Komagiri Y, Nakamura K, Kubokawa M. A nicardipine-sensitive Ca²⁺ entry contributes to the hypotonicity-induced increase in [Ca²⁺]_i of principal cells in rat cortical collecting duct. Cell Calcium. 49:35-42 (2011) 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. Komagiri Y, Nakamura K, Kubokawa M. Characterization of hypotonicity-induced channel activation and $[Ca^{2+}]_i$ elevation of principal cells in rat kidney cortical collecting ducts. 第 88 回日本生理学会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会 2011. 3. 28 横浜
2. Komagiri Y, Nakamura K, Kubokawa M. Involvement of extracellular Ca^{2+} entry through a nicardipine-sensitive pathway in the hypotonicity-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ of principal cells in rat cortical collecting duct. 第 87 回日本生理学会 2010. 5. 20 盛岡
3. Komagiri Y, Kojo T, Nakamura K, Kubokawa M. Hypotonicity-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation of principal cells in isolated rat kidney cortical collecting ducts. 国際合同シンポジウム：アニオン輸送と細胞容積調節 (PAT-CVR 2009) 2009. 8. 4 岡崎
4. Komagiri Y, Kojo T, Nakamura K, Kubokawa M. A Ca^{2+} entry pathway for the hypotonicity-induced elevation in $[Ca^{2+}]_i$ of principal cells in isolated rat kidney CCDs. 第 36 回国際生理学会世界大会 (IUPS 2009) 2009. 7. 31 京都
5. 駒切 洋、古城俊之、中村一芳、久保川 学ラット腎皮質集合管における低浸透圧刺激時の主細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇における細胞外 Ca^{2+} 流入経路の検討 第 52 回日本腎臓学会学術総会 2009. 6. 3 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

駒切 洋 (KOMAGIRI YOU)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：80405753

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし