

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591187

研究課題名(和文)腎虚血再灌流障害におけるギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションの役割

研究課題名(英文)Role of gap junction-mediated intercellular communication on schamaemia/reperfusion renal injury

研究代表者

姚建(YAO, Jian)

山梨大学・医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：50303128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、虚血による尿細管障害におけるギャップ結合の役割を解明することを目的とした。虚血性腎障害マウスモデルにおいて、Cx43の発現レベルは、細胞傷害の程度と深く関わることを明らかにした。虚血性及び酸化ストレス刺激状況下、腎尿細管細胞のCx43ヘミチャネルを開放し、ATPが細胞外へ放出することを見出した。ヘミチャネル由来のATPは、プリン受容体/AKT/mTORシグナル伝達経路を介して、AMPKを制御することを初めて明らかにした。ヘミチャネルを阻害することで、AMPKを活性化し、虚血性細胞傷害を抑えた。以上の結果から、Cx43ヘミチャネルは細胞傷害に深く関わっていることを示唆されている。

研究成果の概要(英文)：Connexin-forming channels regulates cell survival with little information available regarding its mechanisms. Using a ischemic renal injury model, we explored the potential mechanisms of Cx43-forming channels on renal cell survival. Our results showed that Cx43 influenced cell susceptibility to ischemic renal injury. Cells with higher level of Cx43 were more vulnerable to ischemic oxidative injury. On the contrary, cells with no or lower level of Cx43 were resistant. Further analysis revealed that oxidative stimuli activated Cx43 hemichannels, leading to extracellular loss of ATP. The released ATP, in turn, suppressed AMPK activation through purinergic receptor-mediated activation of AKT and mTOR. Suppression of hemichannels enhanced AMPK activation, thus protecting cells from oxidative injury. Our study indicates that Cx43 hemichannels determines cell susceptibility to oxidative injury. Targeting Cx43 could be developed for prevention and treatment of ischemic renal injury.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓学

キーワード：病理学 腎臓 虚血 細胞死 ギャップ結合 酸化ストレス AMPK ATP

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 虚血による急性腎不全は、医学療法が飛躍的に進歩したにもかかわらず、死亡率および罹病率があいかわらず高いままであり、临床上の大きな問題となっている。その発症機序は十分に解明されてはならず、有効な治療方法も限られている。

(2) 腎傷害とその修復には、様々なメディエーターや接着分子を介した複雑な細胞間相互作用が寄与することが知られている。しかし、隣接する細胞間でシグナル分子の直接的な遣り取りを司るギャップ結合の腎組織傷害における役割は、まだ十分に解明されていない。

(3) ギャップ結合は細胞間結合様式の一つであり、細胞膜に形成されることで、細胞間シグナル伝達に直接関与している。ギャップ結合を構成するヘミチャンネルをコネクソンといい、コネクソンは connexin(Cx) 蛋白によって構成されている。ギャップ結合の機能としては分子量 1.2kDa 以下の細胞内シグナル伝達物質を隣接する細胞へ直接輸送することが可能で、細胞の分化・増殖を制御し、ホメオスタシスを維持している。

(4) 我々は、これ数年間、腎におけるギャップ結合構成蛋白の組織局在、機能、機能制御に関して研究を行ってきた。その結果、connexin 構成チャンネルは、腎細胞の機能調節及び腎細胞傷害に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

本研究は、これまでの研究を進展させ、虚血再灌流による腎傷害の発症、進展及においてギャップ結合が担う役割及作用機構を解明することを目的とした。

具体的には、以下の研究課題について研究を進めてきた。(1) 腎尿管細胞において、機能的な Cx 構成チャンネルが存在するか、またその機能の特性は？(2) Cx 構成チャンネルを抑制することで、尿管細胞傷害を抑えることができるか？(3) 酸化ストレスによる Cx 構成チャンネルに対する影響は？(4) 細胞傷害に対する Cx 構成チャンネルの分子調節メカニズム。

## 3. 研究の方法

(1) ラット腎尿管上皮細胞株 NRK52E 細胞(以下 NRK 細胞)およびブタ腎尿管上皮細胞株 LLC-PK1 は、5% fetal bovine serum (FBS) を含む D-MEM/F-12 培地を用いて培養した。

(2) 腎尿管上皮細胞を培養し、培養細胞におけるコネクシン 43 (Cx43) の局在を蛍光抗体法により検索した。マイクロインジェクションした蛍光色素の隣接細胞への拡散により、機能的ギャップ結合の有無を評価した。Cx43ヘミチャンネルの開閉を細胞膜内外の小分子物質の流動実験で測定した。

(3) 細胞傷害は細胞形態の変化、LDH の放出、及び Cell Counting Kit-8 を用いて評価した。

(4) 培養細胞の蛋白を抽出し、SDS - PAGE にて分離し、PVDF membrane へ転写した後、一次、二次抗体を反応させ、化学発光法を用いて検出した。

(5) Cx43 遺伝子や Cx43 siRNA を用いて、Cx43 安定発現及びノックダウン細胞を制作した。

(6) Cx43 野生型 (Cx43<sup>+/+</sup>) と Cx43 3ヘテロマウス (Cx43<sup>+/-</sup>) を用いて虚血再灌流モデルを作製し、腎機能及び酸化ストレス傷害に関する検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) 生後 10~12 週齢の Cx43 野生型とヘテロマウスから右腎摘出後、左腎を 45 分間クリップして虚血とした。再灌流後 24 時間の時点で血液クレアチニン値及び腎臓組織 P38 のリン酸化レベルを測定したところ、Cx43 ヘテロマウス群では野生型群と比べて有意に減少していた。再灌流後 1 週間内の生存率の比較では、Cx43 野生型群に比し、ヘテロで生存率が高くより生き延びた。以上の結果から、ギャップ結合は腎虚血再灌流による急性尿管細胞死発症に深く関与することが示唆された。

(2) 1 つの NRK 細胞および LLC-PK1 細胞に蛍光色素 Lucifer Yellow (LY) を注入し蛍光色

素の周囲の細胞への拡散を観察した。また、ギャップ結合構成蛋白である Cx43 が NRK 細胞において存在することを、蛍光抗体法を用いて明らかにした。

(3) ラット培養腎尿管細胞を用いた *in vitro* 虚血モデルとして培養メEDIUM中のグルコースを除去することで Cx43 ヘミチャネルを開くことが、細胞膜内外の小分子量物質の流動を測定する実験で明らかになった。ヘミチャネルを阻害することで、抗酸化作用を有する AMPK を活性化させ、細胞傷害を抑制することを初めて発見した。更に、ヘミチャネルを介した AMPK の調節機構は、チャネルから放出された ATP がプリン受容体に結合し、PLC/AKT/mTOR シグナル伝達経路を活性化することも明らかになった。

(4) プリン受容体阻害剤である suramin は、Cx43ヘミチャネルを阻害することを初めて発見した。Suraminがプリン受容体及びヘミチャネルを両方阻害することで、細胞傷害の治療薬として有望であることが示唆された。

以上の結果から、ギャップ結合ヘミチャネルが虚血及び酸化ストレスによる尿管細胞傷害に深く関わることを示した。ヘミチャネルを介した AMPK の活性調節は、細胞傷害制御の新たな分子機構として明らかにされた。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Chi Y, Gao K, Zhang H, Takeda M and Yao J: Suppression of cell membrane permeability by suramin: involvement of its inhibitory actions on connexin 43 hemichannels. *Br J Pharmacol*, 2014, doi: 10.1111/bph.12693, 査読有

Chi Y, Gao K, Li K, Nakajima S, Kira S, Takeda M and Yao J: Purinergic control of AMPK activation by ATP released through connexin 43 hemichannels: pivotal roles in hemichannel-mediated cell injury. *J Cell Sci*, 2014 Vol.1, pp. 1487-1499, doi:10.1242/jcs.139089, 査読有

Gao K, Chi Y, Sun W, Takeda M and Yao J: 5'-AMP-Activated protein kinase attenuates adriamycin-induced oxidative podocyte injury through thioredoxin-mediated suppression of the apoptosis signal-regulating kinase 1-P38 signaling pathway. *Mol Pharmacol*, 2014, Vol. 85, No. 3, pp 460-471, doi: 10.1124/mol.113.089458, 査読有

Morioka T, Okada S, Nameta M, Kamal F, Yanakieva-Georgieva NT, Yao J, Sato A, Piao H and Oite T: Glomerular expression of connexin 40 and connexin 43 in rat experimental glomerulonephritis. *Clin Exp Nephrol*, 2013, Vol.17, No. 2, pp 191-204, doi: 0.1007/s10157-012-0687-2, 査読有

Li K, Yao J, Chi Y, Sawada N, Araki I, Kitamura M and Takeda M: Eviprostat activates cAMP signaling pathway and suppresses bladder smooth muscle cell proliferation. *Int J Mol Sci* 2013, Vol. 14, No. 6, pp. 12107-12122, doi: 10.3390/ijms140612107, 査読有

Li K, Chi Y, Gao K, Yan Q, Matsue H, Takeda M, Kitamura M and Yao J: Connexin43 hemichannel-mediated regulation of connexin43. *PLoS one*, 2013; Vol. 8, No. 2, pp: e58057, doi: 10.1371/journal.pone.0058057, 査読有

Yan Q, Gao K, Chi Y, Li K, Zhu Y, Wan Y, Sun W, Matsue H, Kitamura M and Yao J: NADPH oxidase-mediated upregulation of connexin43 contributes to podocyte injury. *Free Radic Biol Med*, 2012, Vol.53, No. 6, pp. 1286-97, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.012, 査読有

Li K, Yao J, Sawada N, Kitamura M, Andersson KE and Takeda M: -catenin signaling contributes to PDGF-elicited bladder smooth muscle cell contraction through upregulation of Cx43 expression. *J Urol*, 2012, Vol. 188, No. 1, pp. 307-315, doi: 10.1016/j.juro.2012.02.2556, 査読有

Li K, Yao J, Shi L, Sawada N, Chi Y, Yan Q, Matsue H, Kitamura M and Takeda M: Reciprocal regulation between proinflammatory cytokine-induced inducible NO synthase and connexin43 in bladder smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 2011, Vol. 286, No. 48, pp. 41552-41562, doi: 10.1074/jbc.M111.274449, 査読有

Chi Y, Li K, Yan Q, Koizumi S, Shi L, Takahashi S, Zhu Y, Matsue H, Takeda M, Kitamura M and Yao J: Nonsteroidal anti-inflammatory drug flufenamic acid is a potent activator of AMPK. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, Vol. 339, No. 1, pp. 257-66, doi: 10.1124/jpet.111.183020, 査読有

[学会発表](計9件)

Gao K, Sun W, Chi Y, Kitamura M, and Yao J: Activation of AMPK Protects podocytes from Adriamycin-elicited Injury. International Society of Nephrology (ISN) *World Congress of Nephrology 2013*, May 31-June 4, 2013, Hong Kong

Yao J: Purinergic control of AMPK activation by ATP released through connexin43 hemichannels: pivotal roles in hemichannel-mediated disassembly of tight junction and cell injury. *International Gap Junction Conference*, Charleston, South Carolina, July 15, 2013.

Chi Y, Gao K, Kato H, Nakajima S, Kitamura M, and Yao J: Connexin43 hemichannel-mediated release of ATP suppresses AMPK activation in renal tubular epithelial cells. *45<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology*, San Diego, November 2, 2012.

Li K, Yao J, Sawada N, Miyamoto T, Kitamura M, Takeda M: beta-catenin signaling contributes to PDGF-elicited bladder smooth muscle cell contraction through upregulation of Cx43 expression. *2012 Annual Meeting of American Urology Association*, Atlanta, May 19, 2012.

Yao J: Roles of gap junctional intercellular communication in renal cell injury. *国際中西医結合腎臓病学術大会*, 中国北京, 11月25日, 2011.

Chi Y, Yan QJ, Zhu Y, Kitamura M, and Yao J: Suppression of inflammatory cytokines-triggered NFκB activation and iNOS expression in renal tubular cells by gap junction inhibitor flufenamic acid: a critical involvement of AMPK. *44<sup>th</sup> Annual Meeting of The American Society of Nephrology*, Pennsylvania, Philadelphia, November 8-13, 2011.

Yan QJ Chi Y, Zhu Y, Kitamura M, and Yao J: Connexin43 contributes to puromycin-elicited podocyte injury. *44<sup>th</sup> Annual Meeting of The American Society of Nephrology*, Pennsylvania, Philadelphia, November 8-13, 2011.

Yao J, Zhu Y, and Kitamura M: Dysfunction of gap junctions stimulates COX-2 expression in juxtaglomerular renin-secreting cells. *44<sup>th</sup> Annual Meeting of The American Society of Nephrology*, Pennsylvania, Philadelphia, November 8-13, 2011.

Li K, Yao J, Sawada N, Nakagomi H, Miyamoto T, Kira S, Kobayashi H, Tsuchida T, Kitamura M and Takeda M: NF- B/iNOS/cAMP signaling cascade mediates inflammatory cytokines-induced upregulation of connexin43 expression and function in urinary tract infection. *The 2011 American Urological Association Annual Meeting*, Washington, D.C. May 14-19, 2011.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

姚建 (YAO, Jian)  
山梨大学・医学工学総合研究部・准教授  
研究者番号: 50303128

### (2) 研究分担者

北村 正敬 (KITAMURA, Masanori)  
山梨大学・医学工学総合研究部・教授  
研究者番号: 90333062