

平成21年 5月30日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590212

研究課題名 (和文) クロライドイオンによる Akt/JNK の活性化を介した細胞生存・死の決定機構

研究課題名 (英文) Cell survival and apoptosis through Cl⁻dependent regulation of Akt and JNK in renal epithelium

研究代表者

新里 直美 (NIISATO NAOMI)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00237645

研究成果の概要：

腎遠位尿細管由来培養細胞である A6 細胞では、細胞内クロライド濃度を増大させると細胞が生存するシグナルが活性化して細胞は増殖へと導かれ、逆に減少させると細胞死 (アポトーシス) のシグナルが活性化して、細胞はプログラムされた死へと導かれる可能性が示唆された。このように、細胞の生死は、細胞内クロライドイオン濃度により制御され、最終的には細胞内クロライドイオン濃度を積極的に制御するクロライドイオン輸送体 (NKCC) の発現・活性制御が重要であることが示された。このようなイオン輸送体による細胞の生死の制御という考え方は、これまでにない新しいアプローチである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：クロライドイオン, Akt, JNK, NKCC, VSOR

1. 研究開始当初の背景

細胞の運命は生存・死のシグナルのバランスにより決定されるが、両者のシグナルがどのように統合され、最終的な細胞の運命が決定されるか十分に理解されていない。Akt は増殖因子やインテグリンを介した細胞接着による生存促進メカニズムで中心的な役割を担っており、DNA 損傷などによるアポトーシスの誘導には JNK の活性化が必要であると報告されている。一方で我々は細胞内クロライドイオンが Akt と JNK の活性を制御している可能性を見出し、細胞内クロライドイオン濃

度の制御に関わる NKCC や Cl⁻channel の転写・活性制御が細胞の生存・死のシグナルのバランスに重要ではないかとの研究仮説に至った。

2. 研究の目的

「細胞内クロライド濃度を制御する NKCC の転写・機能制御による Akt/JNK の活性制御を介して細胞の生死が決定される」という研究仮説を解明することが本研究の研究目的である。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

- ① 実験材料としてアフリカツメガエル遠位尿管由来上皮細胞である A6 細胞を permeable support 上で培養し、全ての実験に供与した。
- ② 人為的な細胞内のクロライド濃度置換法は、培養液の Cl^- を NO_3^- で全て置換して長時間培養するか、イオノフォアを用いて短時間で外液と同様の Cl^- 濃度に置換する方法を用いた。

(2) ウェスタンブロット法

- ① 本研究の Akt や JNK などのシグナル分子の活性制御は、特異的なリン酸化認識抗体によるウェスタンブロットによる検出で判断した。
- ② カスパーゼの活性は基質の分解産物をウェスタンブロットで検出することにより行った。

(3) 86Rb 取り込みによる NKCC 活性測定と転写制御

- ① 細胞内のクロライド濃度の制御因子として考えられる NKCC の活性制御は、カリウムイオンと同様に NKCC により輸送される放射性同位元素である 86Rb の細胞内への取り込みを測定することにより検討した。
- ② NKCC の転写制御は realtime PCR により測定した。

(4) ルシフェラーゼによるプロモーター活性測定

- ① クローニングした NKCC のプロモーター領域を様々な長さに断片化し、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを導入してあるベクターに組み込む。
- ② ① で作製した様々なベクターを適切な細胞に形質導入して、検証したいクロライド濃度で培養し、発現したルシフェラーゼの活性を蛍光測定により検討する。

(5) アポトーシスの測定

- ① 前述のようにカスパーゼの断片化をウェスタンブロットで検出し、検討する。
- ② DNA の断片化をゲル電気泳動とフローサイトメーターで検討する。

(6) 細胞増殖の測定

生存している細胞を染色で区別し、顕微鏡下で細胞数をカウントして検討する。

4. 研究成果

腎遠位尿管由来培養細胞である A6 細胞では、細胞内クロライドイオン濃度を増大させると Akt が活性化し、逆に減少させると JNK の活性化が引き起こされることが明らかとなった。さらに、クロライドイオンの増大は増殖を亢進し、クロライドイオン濃度の減少は増殖を抑制し、条件によってはアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。これらの結果から、細胞内のクロライドイオン濃度の増大は細胞生存のシグナルを活性化し、増殖を亢進し、細胞内クロライドイオン濃度の減少は、細胞死への誘導を引き起こす可能性が示唆された。従って、クロライドイオン濃度が細胞の生死を制御するシグナル因子である可能性が示された。

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 12 件)

- ① Yasuda M†, NIISATO N†, Miyazaki H, Iwasaki Y, Hama T, Dejima K, Hisa Y, Marunaka Y. Epithelial Na^+ channel and ion transport in human nasal polyp and paranasal sinus mucosa. *Biochem Biophys Res Commun* 362: 753-758, 2007. (査読有)
- ② Taruno A, NIISATO N, Marunaka Y. Hypotonicity stimulates renal epithelial sodium transport by activating JNK via receptor tyrosine kinases. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F128-F138, 2007. (査読有)
- ③ NIISATO N, Taruno A, Marunaka Y. Involvement of p38 MAPK in hypotonic stress-induced stimulation of β - and γ -ENaC expression in renal epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 819-824, 2007. (査読有)
- ④ Nakajima K, Miyazaki H, NIISATO N, Marunaka Y. Essential role of NKCC1 in NGF-induced neurite outgrowth. *Biochem Biophys Res Commun* 359: 604-610, 2007. (査読有)
- ⑤ NIISATO N†, Taruno A†, Marunaka Y. Aldosterone-induced modification of osmoregulated ENaC trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 162-168, 2007. (査読有)

- [学会発表] (計 16 件)
- ⑥ Maki M, Miyazaki H, Nakajima K, Yamane J, NIISATO N, Morihara T, Kubo T, Marunaka Y. Chloride-dependent acceleration of cell cycle via modulation of Rb and cdc2 in osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 1038-1043, 2007. (査読有)
- ⑦ Tokuda S, NIISATO N, Marunaka Y. Regulation of paracellular ion conductances by NaCl gradients in renal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 566-571, 2007. (査読有)
- ⑧ Taruno A, NIISATO N, Marunaka Y. Intracellular calcium plays a role as the second messenger of hypotonic stress in gene regulation of SGK1 and ENaC in renal epithelial A6 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F177-F186, 2008. (査読有)
- ⑨ Miyazaki H, Shiozaki A, NIISATO N, Ohsawa R, Itoi H, Ueda Y, Otsuji E, Yamagishi H, Iwasaki Y, Nakano T, Nakahari T and Marunaka Y. Chloride ions control the G1/S cell cycle checkpoint by regulating the expression of p21 through a p53-independent pathway in human gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 366: 506-512, 2008. (査読有)
- ⑩ Yamada T, Takemura Y, NIISATO N, Mitsuyama E, Iwasaki Y, Marunaka Y. Action of N-acylated ambroxol derivatives on secretion of chloride ions in human airway epithelia. *Biochem Biophys Res Commun* 380: 586-590, 2009. (査読有)
- ⑪ Maki Y, Miyazaki H, NIISATO N, Morihara T, Marunaka Y and Kubo T. Blockers of K⁺/Cl⁻ transporter/channels diminish proliferation of osteoblastic cells. *Biomedical Research* 30: 137-140, 2009. (査読有)
- ⑫ Asano J, NIISATO N, Nakajima K, Miyazaki H, Yasuda M, Iwasaki Y, Hama T, Dejima K, Hisa Y, Marunaka Y. Quercetin Stimulates Na⁺/K⁺/2Cl⁻ Cotransport via PTK-dependent Mechanisms in Human Airway Epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. (in press) (査読有)
- ① NIISATO N, Marunaka Y. Cytosolic Cl⁻ acts as a signal molecule in hypotonic stress by regulating tyrosine phosphorylation state of src kinase. The 84th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan. 2007 March 20 – 22. Osaka.
- ② Miyazaki H, Shiozaki A, NIISATO N, Marunaka Y. Cl⁻-dependent regulatory mechanism of proliferation of human gastric cancer cells via G0/G1 arrest. The 84th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan. 2007 March 20 – 22. Osaka.
- ③ 丸中良典、新里直美、青井渉、宮崎裕明、中島謙一、徳田深作. フラボノイドによる血圧制御の分子機構. 日本農芸化学会 2007 年度大会. 2007 年 3 月 24 日. 東京.
- ④ NIISATO N, Marunaka Y. Intracellular chloride-dependent modulation of aldosterone action on Na⁺ reabsorption. Aldosterone and ENaC: from Gene to Disease. 2007 Oct 3 – 7. Zermatt, Switzerland.
- ⑤ Taruno A, NIISATO N, Marunaka Y. Regulation of ENaC function by hypotonic stress in renal epithelial A6 cells: genomic and non-genomic mechanisms. Aldosterone and ENaC: from Gene to Disease. 2007 Oct 3 – 7. Zermatt, Switzerland.
- ⑥ 新里直美、岩崎吉伸、丸中良典. ヒト気道上皮細胞でのケルセチンによる NKCC 活性化とクロライド分泌制御. 第 3 回京滋呼吸器リサーチフォーラム. 2008 年 4 月 26 日. 京都.
- ⑦ NIISATO N, Marunaka Y. Involvement of PTK in Regulation of NKCC by Quercetin in Human Airway Epithelial Calu-3 cells. American Thoracic Society 2008 International Conference. 2008 年 5 月 20 日. Toronto, Canada.
- ⑧ 新里直美、西尾恭介、丸中良典. アルドステロンによる p38MAPK 依存的なナトリウム再吸収制御. 第 51 回日本腎臓学会学術総会. 2008 年 5 月 31 日. 福岡.
- ⑨ 丸中良典、新里直美、樽野陽幸、西尾恭介. Aldosterone modifies osmoregulated ENaC trafficking. 第 51 回日本腎臓学会学術総会. 2008 年 5 月 31 日. 福岡.

⑩ 新里直美、宮崎裕明、西尾恭介、丸中良典。
Abnormal regulation of ENaC and SGK1 by aldosterone in Dahl salt-sensitive hypertension rats. 第51回日本腎臓学会学術総会. 2008年5月31日. 福岡.

⑪ 新里直美、宮崎裕明、西尾恭介、丸中良典。
Dietary sodium induces abnormal expression of ENaC and SGK1 mRNA in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. 第51回日本腎臓学会学術総会. 2008年5月31日. 福岡.

⑫ 樽野陽幸、新里直美、西尾恭介、丸中良典。
Nongenomic osmoregulation of ENaC-mediated sodium reabsorption. 第51回日本腎臓学会学術総会. 2008年5月31日. 福岡.

⑬ 樽野陽幸、新里直美、西尾恭介、丸中良典。
Osmoregulation of ENaC-mediated renal sodium reabsorption via genomic mechanisms. 第51回日本腎臓学会学術総会. 2008年5月31日. 福岡.

⑭ 宮崎裕明、新里直美、西尾恭介、丸中良典。
調節性容積減少 (RVD) によって引き起される細胞内 Cl⁻濃度低下は細胞内シグナルとして機能する. 第51回日本腎臓学会学術総会. 2008年5月31日. 福岡.

⑮ 宮崎裕明、大澤るみ、新里直美、丸中良典。
ヒト胃癌細胞株における細胞内 Cl⁻低下によって引き起される G1/S 細胞周期遅延は MAPK を介して調節される. 第3回トランスポーター研究会年会. 2008年6月7、8日. 京都.

⑯ Miyazaki H, Ohsawa R, Shiozaki A, Niisato N, Marunaka Y. Intracellular chloride is a key regulator of the G1/S transition in MKN28 human gastric cancer cells. THE BEATSON CONFERENCE 2008 Cell growth, Metabolism and Cancer. 2008年6月15-18日, Glasgow, Scotland.

[図書] (計 1 件)

① NIISATO N, and Marunaka Y. Osmotransduction through volume-sensitive Cl⁻ channels: Mechanosensitive Ion Channels. Springer, Netherlands. pp179-202, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新里 直美 (NIISATO NAOMI)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：00237645

(2) 研究分担者

丸中 良典 (MARUNAKA YOSHINORI)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：00127036

宮崎 裕明 (MIYAZAKI HOROAKI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：30360027

中島 謙一 (NAKAJIMA KEN-ICHI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：40398392

(3) 連携研究者
該当者なし