

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790241

研究課題名(和文) 新生仔期の尿細管ミトコンドリア内膜における Maxi-K チャネルとアポトーシス抑制

研究課題名(英文) Inner Mitochondrial Maxi-K+ Channels in Neonatal Renal Tubular Cells: Novel Therapeutic Targets to Control Apoptosis

研究代表者

風間 逸郎 (KAZAMA, Itsuro)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60593978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：新生仔期の腎臓では、胎生期に形成されたネフロンが、その数と大きさを増してゆく。細胞が分化してゆくためには、増殖とともにアポトーシスも必須であるが、先行研究の結果、新生仔期の腎臓近位尿細管では、細胞増殖に対し、アポトーシスはむしろ抑制されていた。しかし、その詳細なメカニズムについては、まだよく分かっていない。本研究では、近年明らかにされた、ミトコンドリア内膜 Maxi-K チャネル(電位および Ca<sup>2+</sup> 依存性 K<sup>+</sup> チャネル)の生理学的機能に着目し、新生仔期の近位尿細管におけるその発現を確かめ、さらにアポトーシスが抑制される生理学的メカニズムとの関連を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In developing kidneys, the total cell population is partly regulated by apoptosis. Despite our understanding of the molecular involvement in the regulatory pathway of apoptosis, we know little about the physiological involvement. Cardiomyocytes express large conductance voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (Maxi-K<sup>+</sup>) channels in their inner mitochondrial membranes. Triggering the mitochondrial K<sup>+</sup> influx necessary to inhibit apoptosis, the channels play cytoprotective roles during ischemic injury. Since proximal tubular cells in neonatal kidneys are physiologically under hypoxic stress, and since the channel activity is stimulated by hypoxia, those cells would share the same regulatory mechanism of apoptosis with ischemic cardiomyocytes. Therefore, we hypothesize here that the proximal tubular cells in neonatal kidneys would also express the maxi-K<sup>+</sup> channels in their inner mitochondrial membranes, and that the channels would play regulatory roles in apoptosis.

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：Maxi-Kチャネル ミトプラスト 腎臓 発生

### 1. 研究開始当初の背景

新生仔期の腎臓では、胎生期に形成されたネフロンが、その数と大きさを増してゆく。細胞が分化してゆくためには、増殖とともにアポトーシスも必須であるが、先行研究の結果、新生仔期の腎臓近位尿細管では、細胞増殖に対し、アポトーシスはむしろ抑制されていた。しかし、その詳細なメカニズムについては、まだよく分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、近年明らかにされた、ミトコンドリア内膜 Maxi-K チャネル(電位および  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャネル)の生理学的機能に着目し、新生仔期の近位尿細管におけるその発現を確かめ、さらにアポトーシスが抑制される生理学的メカニズムとの関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究ではまず、新生仔期の近位尿細管細胞ミトコンドリア内膜における、Maxi-K チャネルの存在を確認するために、生後 0~7 日目の新生仔マウスの腎臓から皮質領域を切り出し、機械的処理および酵素処理を施した後、遠心法により近位尿細管セグメントを分離した。さらに、単離した近位尿細管細胞からミトコンドリア内膜の標本(ミトプラスト)を作成し、パッチクランプ法を行った。

### 4. 研究成果

その結果、Maxi-K チャネルを示唆するような電流応答が得られず、新生仔期の近位尿細管細胞ミトコンドリア内膜からだけでは、十分な量の Maxi-K チャネルが得られない可能性が考えられた。そこで、生後 0~7 日目の新生仔マウスの腎臓から皮質領域と髄質領域とを切り分け、Real time PCR 法を用いて Maxi-K チャネルの mRNA 発現状態を調べた。その結果、皮質領域に比べ、外髄質領域において Maxi-K チャネルの発現が有意に高かった。Maxi-K チャネルを介したミトコンドリア内への  $K^+$  の流入は、カルシウム単輸送体を介した  $Ca^{2+}$  の流入を阻害し、Caspase 活性を低下させることにより、アポトーシスを抑制すると考えられる(Fig. 1)。

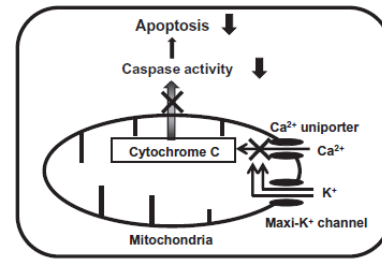


Fig. 1. Regulatory mechanism of apoptosis triggered by the activation of mitochondrial maxi-K<sup>+</sup> channel. The elevated intra-mitochondrial K<sup>+</sup> levels, as a result of increased activity of mitochondrial maxi-K<sup>+</sup> channels, counteract with Ca<sup>2+</sup> influx through the uniporter. This inhibits the release of cytochrome C from mitochondria and the following caspase activity in the cytosol, leading to the inhibition of apoptosis.

尚、これまでに明らかにした内容については、英文雑誌に発表している ([Kazama I, Maruyama Y. Inner Mitochondrial Maxi-K<sup>+</sup> Channels in Neonatal Renal Tubular Cells: Novel Therapeutic Targets to Control Apoptosis. Medical Hypothesis, 78, pp800-801, 2012](#) )。

一方、Maxi-K チャネルの他、同じ電位依存性  $K^+$  チャネルのひとつである Kv1.3 も、胎生期の早い時期から、マウス腎臓における発現がみられた。実際、発生腎より単離した細胞に対し、パッチクランプ法を行った結果、このチャネルの存在を示唆する電位依存性の電流応答が得られた。

さらに、マウス胎児より摘出した胎生腎に対し、Kv1.3 チャネルの阻害薬を加えたうえで組織培養を行った結果、その発育が有意に障害されたことから、Kv1.3 チャネルは胎生腎の分化や増殖、アポトーシスの抑制に関与している可能性が高いと考えられた。

本研究の最終目標は、発生腎の分化・増殖過程における  $K^+$  チャネルの関与を明らかにすることである。今後は、対象を他の電位依存性  $K^+$  チャネルに変更して、引き続き研究を進め、その生理的意義について明らかにしてゆく。

### 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 9 件)

- 1) [Kazama I](#), Matsubara M, Kanai Y, Hatano R, Asano S, Endo Y, Toyama H, Ejima Y, Kurosawa S, Maruyama Y.

Decreased Expression of a Novel Prostaglandin Transporter, OAT-PG, Facilitates Renocortical PGE<sub>2</sub> Accumulation during Rat Pregnancy. *Gynecol Obstet Invest*, 2013, 76 (163-170) (査読有り).

2) Kazama I, Maruyama Y, Takahashi S, Kokumai T. Amphipaths Differentially Modulate Membrane Surface Deformation in Rat Peritoneal Mast Cells during Exocytosis. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31 (592-600) (査読有り).

3) 風間逸郎 「リンパ球に発現する K<sup>+</sup>チャネル(Kv1.3)の生理的、および病的意義の解明」、『東北医学雑誌』、東北医学会、2013、第 125 巻第 1 号(70-74) (査読無し).

4) Kazama I, Maruyama Y. Differential Effects of Clarithromycin and Azithromycin on Delayed Rectifier K<sup>+</sup>-Channel Currents in Murine Thymocytes. *Pharm Biol*, 2013, 51 (760-765) (査読有り).

5) Kazama I, Maruyama Y, Matsubara M. Benidipine Persistently Inhibits Delayed Rectifier K<sup>+</sup>-Channel Currents in Murine Thymocytes. *Immunopharmacol and Immunotoxicol*, 2013, 35 (28-33) (査読有り).

6) Kazama I, Maruyama Y, Endo Y, Toyama H, Ejima Y, Matsubara M, Kurosawa S. Overexpression of Delayed Rectifier K<sup>+</sup>-Channels Promotes *in situ* Proliferation of Leukocytes in Rat Kidneys with Advanced Chronic Renal Failure. *Int J Nephrol*, 2012; 2012: 581581. Epub 2012 May 31 (査読有り).

7) Kazama I, Maruyama Y. Inner Mitochondrial Maxi-K<sup>+</sup> Channels in Neonatal Renal Tubular Cells: Novel Therapeutic Targets to Control Apoptosis.

*Medical Hypothesis*, 2012, 78 (800-801) (査読有り).

8) Kazama I, Maruyama Y, Murata Y. Suppressive Effects of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Diclofenac Sodium, Salicylate and Indomethacin on Delayed Rectifier K<sup>+</sup>-Channel Currents in Murine Thymocytes. *Immunopharmacol and Immunotoxicol*, 2012, 34 (874-878) (査読有り).

9) Kazama I, Maruyama Y, Murata Y, Sano M. Voltage-Dependent Biphasic Effects of Chloroquine on Delayed Rectifier K<sup>+</sup>-Channel Currents in Murine Thymocytes. *J Physiol Sci*, 2012, 62, (267-274) (査読有り).

〔学会発表〕(計 15 件)

1) 風間逸郎、丸山芳夫、村田喜理、馬場あすか。リンパ球における Kv1.3 チャネル過剰発現と、慢性腎不全における病的意義について (平成 25 年度日本生理学会奨励賞受賞講演)。第 91 回日本生理学会大会。307J-1. 鹿児島。2014.3.18.

2) 風間逸郎。リンパ球に発現する K<sup>+</sup>チャネル(Kv1.3)の生理的、および病的意義の解明。日本生理学会 生体制御・創薬研究ワークショップ。O-6. 鹿児島。2014.3.15. (招待講演)

3) Kazama I. Physiological and pathological significance of delayed rectifier K<sup>+</sup>-Channels (Kv1.3) expressed in T-lymphocytes. Kitasato Joint Meeting 2014: Molecular Control of Cellular Function. Session I-3. 東京。2014. 2. 21. (招待講演)

4) Kazama I. OAT-PG in Pregnancy and Diseases. 2013 年度上皮バリア研究会。南草津。2013. 12. 4. (招待講演)

5) Kazama I. Overexpression of Leukocyte Kv1.3-Channels Promotes Renal Fibrosis in Rats with Advanced Chronic Renal Failure (Poster, TH-PO 935). American Society of Nephrology, annual meeting 2013, Atlanta, GA, USA, 11/7/2013.

6) 風間逸郎、丸山芳夫、村田喜理. 胸腺リンパ球 Kv1.3 チャネル電流に対するクロロキンの効果. 第 45 回東北生理談話会. P-4. 仙台. 2013.10.5.

7) 風間逸郎、丸山芳夫、村田喜理. 胸腺リンパ球 Kv1.3 チャネル電流に対する非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の効果. 第 90 回日本生理学会大会. 2PK-181. 東京. 2013.3.28.

8) 風間逸郎. リンパ球に発現する K<sup>+</sup>チャネル (Kv1.3)の生理的、および病的意義の解明. 381 回東北医学会例会. 平成 24 年度東北大学医学部 奨学賞受賞講演. 仙台. 2013.1.1

9) Kazama I. Accelerated thrombopoiesis in CRF rat megakaryocytes due to compensatory thrombopoietin production from the liver and bone marrow (Poster, SA-PO 152). American Society of Nephrology, annual meeting 2012, San Diego, CA, USA, 11/3/2012.

10) 風間逸郎、村田喜理、丸山芳夫. 巨核球細胞表面における脂質二重膜曲率の変化と膜小胞形成. 第 44 回東北生理談話会. 演題 6. 山形. 2012.10.27.

11) Kazama I, Maruyama Y, Matsubara M. Compensatory Thrombopoietin Production from Liver and Bone Marrow Stimulates Thrombopoiesis of Living Rat Megakaryocytes in Chronic Renal Failure (Poster, P7). International Symposium on Epithelial Barrier and Transport 2012, Kusatsu, Shiga, Japan, 9/16/2012.

12) Kazama I, Maruyama Y, Matsubara M. Voltage-Dependent Biphasic Effects of Chloroquine on Delayed Rectifier K<sup>+</sup>-Channel Currents in Murine Thymocytes (Poster, P6). International Symposium on Epithelial Barrier and Transport 2012, Kusatsu, Shiga, Japan, 9/16/2012.

13) 風間逸郎、丸山芳夫、佐野倫子. 慢性腎不全ラット骨髄における血小板産生能についての電

気生理学的検討. 第 55 回日本腎臓学会学術総会. P-329. 横浜. 2012.6.2.

14) 風間逸郎、丸山芳夫. 胸腺リンパ球由来遅延整流性カリウム電流に対する、クロロキンの膜電位依存性効果. 第 89 回日本生理学会大会. 3PJ-3. 松本. 2012.3.31.

15) 風間逸郎、丸山芳夫. ラット巨核球細胞の遅延整流性カリウム電流に対するサリチル酸の効果. 第 54 回日本腎臓学会学術総会. P-246. 横浜. 2011.6.16.

〔図書〕(計 0 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〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
風間 逸郎 (KAZAMA ITSURO)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：60593978

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：