

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860155

研究課題名(和文) 発生腎および再生腎に発現するK⁺チャネルの生理的意義について

研究課題名(英文) Physiological significance of Kv1.3-channels expressed in developing and regenerating kidneys

研究代表者

風間 逸郎 (KAZAMA, ITSURO)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60593978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：電位依存性遅延整流型K⁺チャネルのひとつKv1.3は、成熟した腎臓では集合管細胞に多く発現し、尿中へのK⁺排泄に関与することが知られるが、発生・再生過程の腎臓における発現、およびその生理的意義については、これまでに調べられたことがない。本研究では、電気生理学的手法を、分子生物学的手法と組み合わせて用いることにより、発生腎および再生腎においては、Kv1.3の活性が、細胞の分化・増殖を促すことを明らかにした。とくに、尿管芽から後腎間葉細胞にかけて発現するKv1.3は、腎発生初期の分化の過程に大きな役割を果たしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Thymus-derived lymphocytes (T lymphocytes) or megakaryocytes predominantly express delayed rectifier K⁺-channels (Kv1.3) in their plasma membranes. The channels are also expressed in various types of cancer cells and are responsible for the proliferation or differentiation of cells. To reveal the involvement of the Kv1.3-channels in the development of embryonic kidneys, we examined the effects of a selective Kv1.3-channel inhibitor, margatoxin, on the growth of the isolated kidney rudiments. Since margatoxin worked to preserve the metanephric mesenchyme in the developing kidneys, Kv1.3-channels expressed in embryonic kidneys were thought to be involved in the differentiation of the metanephric mesenchyme.

研究分野：生理学一般

キーワード：発生腎 再生腎 慢性腎不全 Kv1.3

1. 研究開始当初の背景

電位依存性遅延整流型 K⁺チャンネルのひとつである Kv1.3 は、哺乳類の骨髄巨核球や胸腺リンパ球の細胞膜上に多く発現する膜6回貫通型の蛋白で、膜電位の安定化や細胞増殖能に関与することが知られている (McCloskey et al. *J Physiol* 2010)。成熟した腎臓においては、集合管細胞の基底膜側で Kv1.3 が同定されており、近年、尿中への K⁺分泌を促す役割を担うことが明らかになった (Carrisoza-Gaytan et al. *Am J Physiol* 2010)。しかし発生・再生過程の腎臓における Kv1.3(KCNA3)の発現については、これまで調べられたことがなく、その生理学的な意義についても明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、電気生理学的手法を、分子生物学的手法と組み合わせて用いることにより、発生腎および再生腎においては、Kv1.3の活性が、細胞の分化・増殖を促すことを明らかにする。さらに、そのシグナル伝達経路やメカニズムまでも明らかにする。

3. 研究の方法

本研究ではまず、胎生期マウス腎臓より後腎間葉細胞を単離し、パッチクランプ法やリアルタイムPCR法などを用いて、Kv1.3チャンネルを同定した。さらに、チャンネル阻害薬を加えたうえで胎生腎を組織培養し、細胞増殖・分化マーカーの発現を、抗体染色法などにより解析した。次に、再生過程にある尿管細胞の細胞膜上にもKv1.3が存在し、その活性が、細胞の分化・増殖を促すことを明らかにするために、慢性腎不全モデルマウスを作成し、腎臓尿管再生過程における、Kv1.3や細胞増殖・線維化マーカーの経時的な発現変化を、抗体染色法などにより解析した。

4. 研究成果

本研究では、まず、胎生腎における Kv1.3 mRNA の発現を、real-time PCR 法を用いて調べたところ、胎生 12 日目以降、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。また、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、このチャン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。本チャンネルの発現に関し、抗体染色法を用いて、蛋白レベルでの検証を試みた結果、胎生 14 日目の腎臓では、尿管芽から後腎間葉細胞にかけて、広い範囲で本チャンネル蛋白の発現が見られた。

そこで、本チャンネルの阻害薬である Margatoxin の存在下で胎生腎組織を培養した結果、その発育が有意に障害されたことから、Kv1.3 チャンネルは、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。さらに Real-time PCR 法や抗体染色の結果、尿管芽のマーカーである Calbindin の発現に比して、Pax2 や WT1 などの発現が有意に減少していた。従って、Kv1.3 チャンネルの阻害により、後腎間葉細胞から、その凝集塊である Cap mesenchyme や condensed mesenchyme への形成が障害されたと考えられた。一方で、より分化した構造体のマーカーである Wnt4 や BMP7 の発現量は変わらなかった。以上の研究結果より、尿管芽から後腎間葉細胞にかけて発現する Kv1.3 は、とくに腎発生初期の分化の過程に大きな役割を果たしていると考えられた。

一方で、疾患モデルラットを用いた in vivo の実験により、尿管の再生過程を伴う慢性腎不全の病態下では、間質の線維化とともに、腎臓のリンパ球における Kv1.3 チャンネルの発現が増加することが明らかになった。さらに、本チャンネルの阻害薬である Margatoxin を治療的に投与したところ、腎線維化の改善とともに、リンパ球の増殖が抑えられたことから、本チャンネルが、リンパ球の細胞増殖を促している可能性が高いと考えられた。

また、マウス胸腺リンパ球を用いた in vitro の実験の結果、Margatoxin や一部の Ca²⁺拮抗薬、抗生物質、スタチン系の脂質降下薬は、Kv1.3 チャンネルを阻害することにより免疫抑制作用を発揮すると考えられた。Kv1.3 はストア作動性 Ca²⁺チャンネルと連動しているため、Kv1.3 は Ca²⁺シグナ

ルを介して作用を発揮すると考えられた。

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 16件)

- 1) Baba A, Tachi M, Ejima Y, Endo Y, Toyama H, Matsubara M, Saito K, Yamauchi M, Miura C, Kazama I (Corresponding author) : Anti-allergic drugs tranilast and ketotifen dose-dependently exert mast cell-stabilizing properties. *Cell Physiol Biochem*, 38:15-27, 2016. doi:10.1159/000438605 (査読有り).
- 2) Mori T, Abe N, Saito K, Toyama H, Endo Y, Ejima Y, Yamauchi M, Goto M, Mushiake H, Kazama I (Corresponding author) : Hydrocortisone and dexamethasone dose-dependently stabilize mast cells derived from rat peritoneum. *Pharmacol Rep*, 68:1358-1365, 2016. doi: 10.1016/j.pharep (査読有り).
- 3) Kazama I (Corresponding author) : Burn-induced subepicardial injury in frog heart: a simple model mimicking ST segment changes in ischemic heart disease. *J Vet Med Sci*, 78:313-316, 2016. doi: 10.1292/jvms.16-0413
- 4) Kazama I (Corresponding author), Saito K, Baba A, Mori T, Abe N, Endo Y, Toyama H, Ejima Y, Matsubara M, Yamauchi M : Clarithromycin dose-dependently stabilizes rat peritoneal mast cells. *Chemotherapy*, 61:295-303, 2016. doi: 10.1159/000445023 (査読有り).
- 5) Kazama I (Corresponding author), Ejima Y, Endo Y, Toyama H, Matsubara M, Baba A, Tachi M :

- Chlorpromazine-induced changes in membrane micro-architecture inhibit thrombopoiesis in rat megakaryocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1848:2805-2812, 2015. doi:10.1016/j.bbamem.2015.08.013 (査読有り).
- 6) Kazama I (Corresponding author), Baba A, Endo Y, Toyama H, Ejima Y, Matsubara M, Tachi M : Mast cell involvement in the progression of peritoneal fibrosis in rats with chronic renal failure. *Nephrology (Carlton)*, 20:609-616, 2015. doi: 10.1111/nep.12489 (査読有り).
 - 7) Baba A, Tachi M, Maruyama Y, Kazama I (Corresponding author) : Olopatadine inhibits exocytosis in rat peritoneal mast cells by counteracting membrane surface deformation. *Cell Physiol Biochem*, 35:386-396, 2015. doi: 10.1159/000369704 (査読有り).
 - 8) Kazama I (Corresponding author), Baba A, Endo Y, Toyama H, Ejima Y, Matsubara M, Tachi M. Salicylate inhibits thrombopoiesis in rat megakaryocytes by changing the membrane micro-architecture : *Cell Physiol Biochem*, 35:2371-2382, 2015. doi: 10.1159/000374039 (査読有り).
 - 9) Kazama I (Corresponding author) : Roles of lymphocyte Kv1.3-channels in gut mucosal immune system: novel therapeutic implications for inflammatory bowel disease. *Med Hypotheses*, 85:61-63, 2015. doi: 10.1016/j.mehy.2015.03.023 (査読有り).
 - 10) Baba A, Tachi M, Maruyama Y, Kazama I (Corresponding author) : Suppressive effects of diltiazem and

verapamil on delayed rectifier K⁺-channel currents in murine thymocytes. *Pharmacol Rep*, 67:959-964, 2015. doi: 10.1016/j.pharep.2015.01.009 (査読有り).

11) Kazama I (Corresponding author), Baba A, Matsubara M, Endo Y, Toyama H, Ejima Y : Benidipine suppresses *in situ* proliferation of leukocytes and slows the progression of renal fibrosis in rat kidneys with advanced chronic renal failure. *Nephron Exp Nephrol*, 128:67-79, 2014. doi: 10.1159/000368080 (査読有り).

12) Kazama I (Corresponding author), Maruyama Y, Nakamichi S : Aspirin-induced microscopic surface changes stimulate thrombopoiesis in rat megakaryocytes. *Clin Appl Thromb Hemost*, 20:318-325, 2014. doi: 10.1177/1076029612461845 (査読有り).

13) Kazama I (Corresponding author), Maruyama Y, Baba A : Amphipath-induced plasma membrane curvature controls microparticle formation from adipocytes: novel therapeutic implications for metabolic disorders. *Med Hypotheses*, 82:196-198, 2014. doi: 10.1016/j.mehy.2013.11.037 (査読有り).

14) Kazama I (Corresponding author), Baba A, Maruyama Y : HMG-CoA reductase inhibitors pravastatin, lovastatin and simvastatin suppress delayed rectifier K⁺-channel currents in murine thymocytes. *Pharmacol Rep*, 66:712-717, 2014. doi:10.1016/j.pharep.2014.03.002 (査読有り).

15) Hatano R, Mukouchi H, Matsumoto, Y, Kawaguchi K, Kazama I, Endo Y, Toyama H, Ejima Y, Kurosawa S, Kanai

Y, Matsubara M, Asano S : Glucocorticoid mediates the transcription of OAT-PG, a kidney specific prostaglandin transporter. *Pflugers Arch*, 466:925-935, 2014. doi: 10.1007/s00424-013-1351-8 (査読有り).

16) Kazama I (Corresponding author), 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 PGE₂ accumulation during rat pregnancy. *Gynecol Obstet Invest*, 76:163-170, 2013. doi: 10.1159/000353977 (査読有り).

〔学会発表〕(計 10 件)

1) 風間逸郎 : 腎間質免疫系細胞の電気生理現象とCKDにおける病的・治療的意義. 第110回東京腎生理集談会, 2016年9月10日, コングレスクエア日本橋(東京).

2) 風間逸郎 : リンパ球 Kv1.3 チャネルの機能異常と慢性腎臓病の病態生理への関与. 2016年度生理学研究所研究会『上皮膜輸送調節蛋白の異常と病態生理学の融合』, 2016年11月25日, 生理学研究所(岡崎).

3) 風間逸郎 : 肥満細胞における電氣的細胞膜容量変化と、臓器の線維化における病的・治療的意義について. 第93回日本生理学会大会シンポジウム「イオンチャネルと細胞機能: 難病解明の羅針盤」, 2016年3月22日, 札幌コンベンションセンター(札幌).

4) 風間逸郎 : Tリンパ球に発現するK⁺チャネル(Kv1.3)の細胞機能と、腎疾患における病的・治療的意義について. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会/第92回日本生理学会大会合同大会シンポジウム「細胞機能と膜輸送体・イオンチャネルの関連」, 2015年3月21日, 神戸国際会議場(神戸).

5) Kazama I : Therapeutic usefulness of mast cell-stabilizers in chronic kidney disease: molecular mechanisms in the progression of renal and peritoneal fibrosis.

The Second Kitasato-Yale Fluid Symposium: Molecular Control of Cellular and Epithelial Function, 2015.12.5, Kitasato University, Pharm Dep, Tokyo.

6) Kazama I : Roles of delayed rectifier K⁺-channels (Kv1.3) in T lymphocytes and their therapeutic implications for chronic kidney disease. 2015 Kitasato-Yale Fluid Symposium: Molecular Control of Cellular and Epithelial Function, 2015.3.2, Kitasato University, Pharm Dep, Tokyo.

7) Kazama I : Physiological and pathological significance of delayed rectifier K⁺-Channels (Kv1.3) expressed in T-lymphocytes. Kitasato Joint Meeting 2014: Molecular Control of Cellular Function, 2014.2.21, Kitasato University, Pharm Dep, Tokyo.

8) 風間逸郎 : 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. 第91回日本生理学会大会(平成25年度日本生理学会奨励賞受賞講演), 2014年3月18日, 鹿児島大学(鹿児島).

9) 風間逸郎 : リンパ球に発現する K⁺チャネル(Kv1.3)の生理的、および病的意義の解明. 生体制御・創薬研究ワークショップ, 2014年3月15日, プラザNヴァリエホール(鹿児島).

10) 風間逸郎 : 免疫・造血系細胞に発現するイオンチャネルの生理的、および病的意義の解明. 平成26年度東北大学民陵同窓会定期総会(平成26年度勾坂賞受賞記念講演), 2014年5月17日, 勝山館(仙台).

〔図書〕(計 2件)

1) 風間逸郎 (Corresponding author) : 腎臓内科クリニカルスタンダード. 第1版, 文光堂, 2016, 194-199頁.

2) 風間逸郎 (Corresponding author) : 腎臓内科クリニカルスタンダード. 第1版, 文光堂, 2016, 200-206頁.

〔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・准教授
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: