

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860167

研究課題名(和文)腎皮質集合管における低浸透圧刺激により活性化する細胞外カルシウム流入経路の同定

研究課題名(英文)Identification of the Ca²⁺ entry pathway during hypotonicity in the principal cells of kidney cortical collecting ducts.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腎皮質集合管主細胞における低浸透圧刺激時のCa²⁺流入経路を明らかにするために実験を行い、以下の結果を得た。1)低浸透圧刺激時のBKチャネル活性化にニカルジピン感受性Ca²⁺流入経路が関与することが示唆された。2)RT-PCR法から皮質集合管におけるT型カルシウムチャネルの発現が示された。3)低浸透圧刺激時にニカルジピン感受性、ガドリニウム及びニッケル非感受性の陽イオン電流の活性化が観察された。この電流はTRPC3チャネル選択的阻害薬であるpyr3によって強く抑制された。以上の結果からこれまで予想されていたTRPV4チャネルとは異なる低浸透圧活性化陽イオンコンダクタンスの存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was carried out to explore the Ca²⁺ entry pathway during hypotonicity in the principal cells of kidney cortical collecting ducts. Using cell-attached patch recordings, it was found that a nicardipine-sensitive Ca²⁺ entry pathway involved in the hypotonicity-induced BK channel activation. RT-PCR analysis showed the presence of transcripts of T-type Ca²⁺ channel in cortical collecting ducts. Under the whole-cell voltage clamp condition, the hypotonicity-activated cation current, which was nicardipine sensitive but insensitive to Gd³⁺ and Ni²⁺, was observed. In addition, the cation current was strongly inhibited by pyr3, a selective TRPC3 channel blocker. These results suggest that nicardipine and Pyr3 sensitive cation conductance, which is activated by hypotonicity, is present in the principal cells of kidney cortical collecting ducts. Further experiments are needed to identify the molecular basis underlying this conductance.

研究分野：細胞生理学

キーワード：チャネル 生体膜 低浸透圧 カルシウムチャネル 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

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)。RVDには K^+ コンダクタンスの上昇、陰イオンコンダクタンスの上昇及びそれらの活性化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。しかしながら、浸透圧変化による細胞内カルシウム濃度上昇のメカニズムについてはこれまで対象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、細胞外からのカルシウム流入及び小胞体ストアからのカルシウム放出いずれの可能性も提示されており確定的なメカニズムは分かっていない。

2. 研究の目的

腎集合管は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) するため、皮質集合管では浸透圧の変動にตอบสนองした細胞容積調節メカニズムが常に働き上皮細胞の機能に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。集合管由来の株化細胞においては TRPV4 チャンネルが容積調節時の細胞内カルシウム濃度上昇に重要な役割を担っているという報告がある。一方で、研究代表者は以前、ラット皮質集合管主細胞における低浸透圧刺激による細胞内カルシウム濃度上昇に TRPV4 チャンネルとは異なる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可能性を示唆する報告をした (*Cell Calcium* 49:35-42.2011)。本研究ではこの皮質集合管における低浸透圧刺激によって活性化されるカルシウム流入経路の実体を明らかにすることを目的に主に電気生理学的手法を用いて実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 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。

(2) 電流測定: 標本を顕微鏡下に設置し、皮質集合管主細胞の管腔側からパッチクランプ法によるイオン電流の測定を行った。

cell-attached patch clamp 法には KCl を主体とした溶液を電極内液として使用した。whole-cell 電流の測定には Cl^- 電流の混入を最小限に抑えるためにピペット内液に NMDG-methansulfonate に富む溶液を用い、細胞外液を Na-gluconate 又は NMDG-gluconate 溶液に置換した。さらに Cl^- チャンネル阻害剤である Niflumic acid (100 μ M) を細胞外液に添加し実験を行った。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。

(3) RT-PCR: パッチクランプ法で用いたのと同様の手順で採取した皮質集合管単離標本から mRNA を抽出しその cDNA を鋳型として、T 型カルシウムチャンネルの 1_c サブユニット及び L 型カルシウムチャンネルの 1_c サブユニットに特異的な配列のプライマーを用いて PCR 反応を行った。

4. 研究成果

(1) 低浸透圧刺激による BK チャンネル活性化に対するニカルジピン感受性 Ca^{2+} 流入経路の関与

cell-attached patch mode による測定によって低浸透圧刺激後、細胞外カルシウム依存性に large-conductance Ca^{2+} -activated K channel (BK チャンネル) の開口確率の顕著な上昇が観察された (図 1)。この低浸透圧刺激による BK チャンネルの活性化はニカルジピン (10 μ M) 存在下では観察されなかった (図 2)。この結果から、低浸透圧刺激時の BK チャンネル活性化にニカルジピン感受性のカルシウム流入経路が関与している可能性が示唆された。

図 1

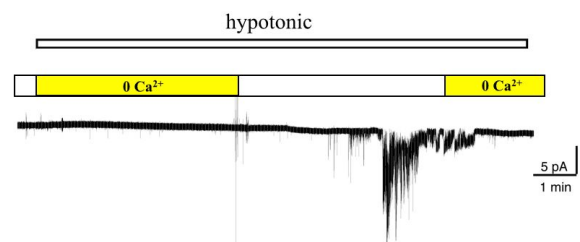
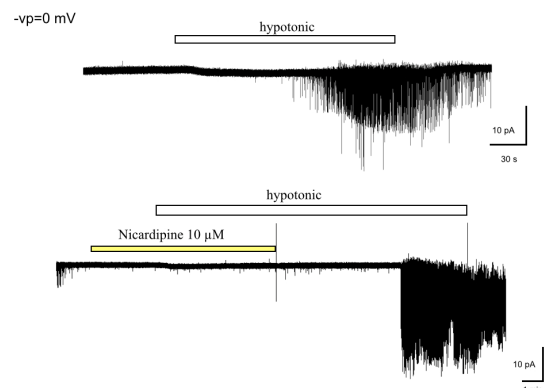


図 2



(2) 皮質集合管主細胞における低浸透圧刺激によって活性化する陽イオンコンダクタンスの性質

実験開始当初、conventional whole-cell voltage clamp 法による測定では whole-cell 電流に占める Cl⁻ 電流の割合が大きく、低浸透圧刺激による変化を観察することが困難であった。そこで実験条件の再検討を行い、Cl⁻ 電流の混入を極力抑えた条件を設定し、さらに電動式マイクロマニピュレーター（申請設備）を用いることで安定した電流測定が可能となり、低浸透圧刺激下での whole-cell 電流の振幅の変化を測定することが可能となった。電位固定下で -80 mV 及び +80 mV の電位パルスを与えながら低浸透圧刺激を行うと、-80 mV における内向きの whole-cell 電流の振幅のゆるやかな増加が見られた(図 3)。各イオンの平衡電位及び電流-電圧曲線 (図 4)における低浸透圧活性化電流の反転電位から、低浸透圧刺激によって内向きの陽イオン電流が活性化することが示唆された。

図 3

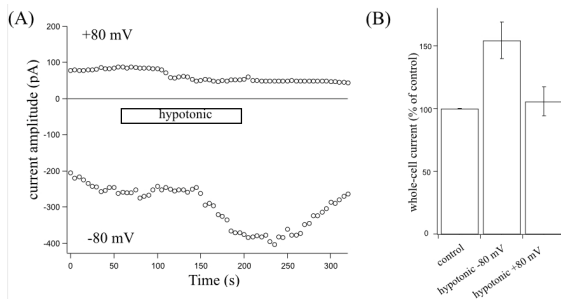
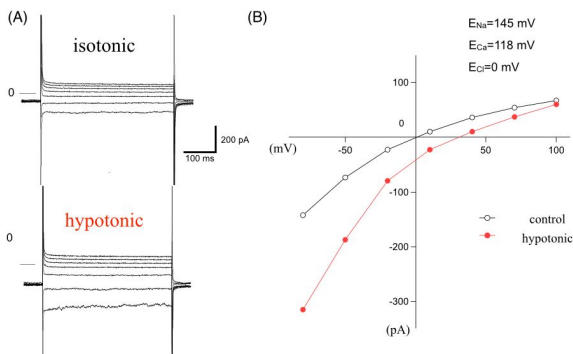
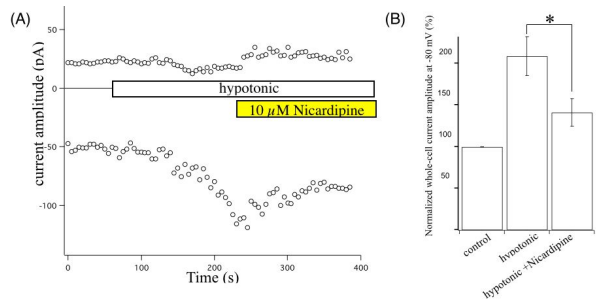


図 4



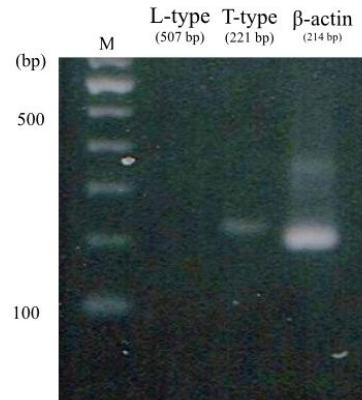
低浸透圧刺激による whole-cell 電流の活性化は細胞外に添加した電位依存性カルシウムチャンネルの阻害剤であるニカルジピン (10 μM) によって有意に抑制された(図 5)。一方でガドリニウム及びアミロライドには非感受性であった。この結果から低浸透圧刺激による whole-cell 電流の振幅の増加は上皮性ナトリウムチャンネル及び TRPV4 チャンネルとは異なる陽イオンチャンネルの活性化である可能性が示唆された。

図 5



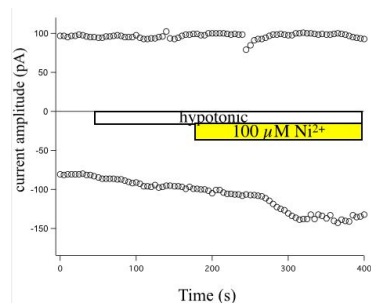
ニカルジピン感受性のイオンチャンネルの候補として皮質集合管における電位依存性カルシウムチャンネルの発現を RT-PCR 法を用いて調べたところ、L型ではなく T型カルシウムチャンネルが少なくとも mRNA レベルでは発現していることが示唆された (図 6)。

図 6



しかしながら、低浸透圧刺激による whole-cell 電流の活性化は T型カルシウムチャンネルの阻害剤であるニッケル (100 μM) には影響を受けなかった (図 7)。さらにこの電流の薬理的性質を詳細に調べたところ、TRPC3 チャンネル選択的阻害薬である pyr3(10 μM) によって強く抑制されることが分かった (図 8)。

図 7



以上の結果はこれまで皮質集合管における低浸透圧刺激時の Ca²⁺流入経路として予想されていた TRPV4 チャンネルとは異なる低浸透圧活性化陽イオンコンダクタンスが存在す

ることを示唆している。本研究で新たに観察された低浸透圧活性化陽イオン電流を担うニカルジピン及び pyr3 に感受性のイオンチャネル分子のより詳細な同定については今後の課題である (図9)。

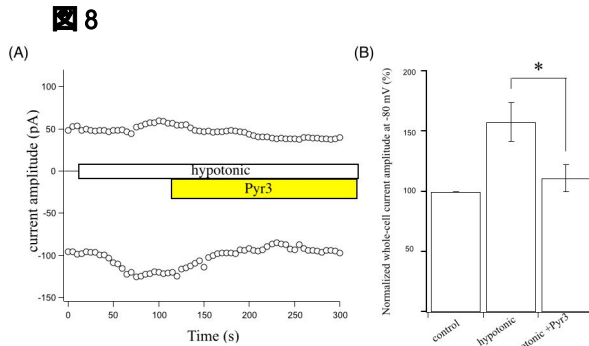
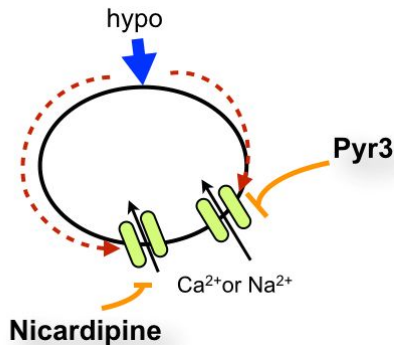


図 9



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 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 駒切 洋、中村一芳、久保川学
ラット皮質集合管における低浸透圧刺激に
応答する Cl⁻チャネルの探索 第 56 回日本腎
臓学会学術集会 2013.5.10 東京
2. 駒切 洋、中村一芳、久保川学
ラット皮質集合管における低浸透圧刺激に
よる BK チャネル活性化に対するニカルジピン
感受性 Ca²⁺流入経路の関与 第 57 回日本
腎臓学会学術集会 2014.7.05 横浜
3. Komagiri Y, Suzuki T, Nakamura K,
Kubokawa M.
Hypotonicity-activated cation currents in
the principal cells of isolated rat Kidney
cortical collecting Ducts. 第 92 回日本生理学
会大会 第 120 回 日本解剖学会総会 全国学

術集会合同大会 2015.3.21 神戸

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：