「生体防御のメカニズム」 平成9年度採択研究代表者

岡田 泰伸

(岡崎国立共同研究機構生理学研究所 教授)

「細胞容積調節の分子メカニズムとその破綻防御」

1. 研究実施の概要

すべての動物細胞の容積は固有の正常値に調節されており、たとえ異常浸透圧環境下において収縮・膨張が強いられたとしても、その後速やかに正常容積へと復帰する能力を持っている。浸透圧性膨張後の容積調節は Regulatory Volume Decrease (RVD)、浸透圧性収縮後の容積調節は Regulatory Volume Increase (RVI)と呼ばれる。本研究では、第一に、これら細胞容積調節の分子メカニズムの解明をめざした。とくに RVD に関与するチャネル、トランスポータ、レセプター分子を同定し、その活性化メカニズムを明らかにした。第二に、これを基礎に、病態生理学的条件下における容積調節メカニズムの破綻の分子メカニズムの解明をめざし、とくに虚血性細胞死及びプログラム細胞死と RVD 異常の関係を明らかにした。これらによって、病的条件下における容積調節破綻を防御し、細胞死から救済するための分子戦略を確立する道を拓いた。

2. 研究実施内容

容積調節機構は細胞機能・細胞増殖・細胞生存に不可欠である(Okada ed. 1998 "Cell Volume Regulation" Elsevier)。ところが虚血などの病的条件下ではこれらのメカニズムが破綻をきたし、細胞膨張の持続からネクローシス性細胞死に至ったり、細胞収縮の持続からアポトーシス性細胞死へと至る。本研究は、脳細胞、心筋細胞、上皮細胞における RVD メカニズムを分子レベルで解明し、心筋細胞、脳神経・グリア細胞及び上皮細胞の病的条件下における RVD 破綻の分子機構を解明し、それを防御するための分子論的戦略を確立するために行われている。

① RVD メカニズムの生理学的解明

多くの細胞で浸透圧性膨張直後の容積調節 RVD は、膜伸展感受性カチオンチャネルを介する Ca²⁺流入にトリッガーされた細胞内 Ca²⁺動員に基づく Ca²⁺依存性 K⁺チャネルの活性化と、細胞膨張による容積感受性 Cl⁻チャネル (VSCC) の活性化による KCl 流出によって達成されるというイオンメカニズムが、私達を含めて多くの研究によって明らかにされている(Okada ed. 1998 "Cell Volume Regulation")。しかしその分子メカニズムの詳細は不明であった。そこで本研究では、上皮細胞と神経系細胞においてこの RVD のメカニズムを分子論的に解明することを第一の目的とした。

H13 年度においては、まず第 1 に H12 年度までに明かにした RVD のレセプター制御メカニズムを総括して、細胞膨張時の Ca^{2+} 流出によって活性化された Ca レセプター (CaR) による VSCC 刺激

による RVD ポジティブフィードバック、膨張時の ATP 放出による ATP レセプター (P₂YR) 刺激にもと づく容積調節性 K⁺チャネル刺激による RVD ポジティブフィードバックの存在を打出した(Okada et al. 2001. J. Physiol.)。 第2に、VSCCの新しい阻害剤としてphloretinを見出し、これが低濃度では cAMP 依存性 Cl⁻チャネルや Ca²⁺依存性 Cl⁻チャネルは抑制せず、VSCC をのみ阻害することを明 かにした(Fan et al. 2001. Br. J. Pharmacol.)。第3に、細胞膨張時のATP放出の経路として、新し いVolume-Dependent ATP-Conductive Large conductance (VDACL)アニオンチャネルを発見し、 その性質を詳細に解明した(Sabirov et al. 2001. J. Gen. Physiol.)。 第4に、EGFレセプター刺激 による VSCC 活性亢進を見出し、本レセプターのチロシンキナーゼの関与を明らかにした (Abdullaev ら、生理学会 2002. 3 発表)。 第5 に、KCl の流出に駆動されて水の流出が引き起こさ れることが RVD の最終ステップであるが、これに水チャネル(Aquaporin: AQP)の関与が不可欠で あることをはじめて証明し、Intestine 407 細胞ではこの分子実体は AQP3 であることも明らかにした (Morishima et al.国際生理学会 2001. 8 発表)。第6に、水流入によってもたらせてた細胞膨張は 容積感受性 Cl゚チャネル(VSCC)と Ca²⁺賊活性 K゚チャネルを開口させて RVD を実現するが、この Ca²⁺賊活性 K⁺チャネル分子の同定を Intestine 407 細胞において機能的(生理学的)及び分子的 (分子生物学的)に行い、中間型コンダクタンスの IK1 チャネルであることをはじめて明らかにした (Wang et al, 2003. Am. I. Physiol.)。 第7に細胞分裂周期において最小容積となる M 期において CIC2 型アニオンチャネル活性が高まり、これにサイクリン依存性キナーゼが関与することを明らか にした(Furukawa et al. 2002. J. Physiol.)。

② アポトーシス細胞死における容積調節破綻

細胞死は、いくつかの防御線がドミノ現象的に破られていくことによってもたらされ、細胞容積調 節機構もその防御線の一つであると考えられる。そこで私達は、アポトーシス過程における容積調 節異常とその分子機構を解明し、これによって病的条件下でのプログラム細胞死の防御のための 基礎的情報を得ることを本研究の第二の目的とした。

アポトーシス過程には持続性細胞収縮が伴われるが、私達はこれを Apoptotic Volume Decrease (AVD)と名付け (Maeno et al. 2000. PNAS)、これが国際的にも広く採用されるようになっている。スタウロスポリンや TNFαでアポトーシスを誘導した場合に昨年度明かにしたように、Fas リガンドでアポトーシスを誘導した場合の AVDも RVD 異常亢進と共役しており、RVD に関与する CIチャネルや K⁺チャネルの阻害によって AVD のみならず、その後のすべてのアポトーシス性生化学反応を完全に阻止して、細胞死を救済することを明らかにした (Okada et al. 2001. J. Physiol.)。次に、この AVD は、汎カスパーゼ阻害剤によっても阻止されてないので、カスパーゼ活性化の上流の現象であることを明らかにした (Okada & Maeno 2001. Comp. Biochem. Physiol.)。更には、抗癌剤シスプラチンは KB 癌細胞をアポトーシス死に陥入れることが知られているが、このアポトーシスもVSCC 阻害剤で抑制されること、そしてシスプラチン耐性を獲得した KB 細胞株では VSCC 活性が全く見られなくなっていることを発見した (伊勢ら、生理学会 2002. 3 発表)。

③ ネクローシス細胞死における容積調節破綻

ネクローシス過程には持続性細胞膨張が伴われるが、私達はこれを Necrotic Volume Increase

(NVI)と名付けた(Okada et al. 2001. J. Physiol.)。そこでこの NVI 過程における容積調節異常とその分子機構を解明し、傷害性細胞死防御のために基礎的情報を得ることを本研究の第三の目的とした。

NVI は細胞内への Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- の流入によることが考えられるが、森泰生らは私達との共同研究によってこの Na^+ と Ca^{2+} の流入路を明らかにした。即ち、TRP 型チャネル LTRPC2 は Ca^{2+} , Na^+ 透過性のカチオンチャネルであり、これは活性酸素種によって活性化され、活性酸素によるネクローシス細胞死をトリガーすることを明らかにした(Hara et al. 2002. Mol. Cell)。

ところで、脳虚血においてはしばしば(嫌気的解糖反応の亢進による)乳酸の蓄積と一体となったアシドーシス (lactacidosis)が伴われる。この乳酸アシドーシス下において神経細胞は (lactate-proton symporterと Na+/H+ antiporterの共活性化による Na+取り込みにより)正常浸透圧環境下でも細胞膨張を示し、その後 RVD を示すことなく膨張しつづけて、やがて死へといたる。神経分化させた NG108-15 細胞を乳酸アシドーシス下におくと、事実膨張し、そののちに RVD を示すことができないこと、その原因に細胞内 pH 減少による VSCC の抑制が関与することを明らかにした(Mori et al, 2002. Brain Res.)。同様の乳酸アシドーシス下における NVI 様細胞膨張はアストロサイト由来のグリオーマ C6 細胞においても見られ、この容積調節異常は VacA と呼ばれるピロリ菌が産成放出するアニオンチャネル形成性毒性ペプチドの投与によって回復するので、容積調節性 Cl-チャネル異常に起因するものと結論できることを明らかにした(Nabekura et al, 2003 Glia)。

一方、てんかん発作など過剰な神経活動に伴って、脳組織の腫脹が起こることが知られている。この容積変化と神経活動との関連を調べてゆくため、海馬スライス標本における細胞容積変化を光学的にイメージするシステムを構築し、CA1 野の細胞容積が増加するメカニズムを解析した。その結果、過剰なシナプス入力によるニューロンの膨張には、グルタミン酸受容体の活性化だけでなく、GABAA 受容体の活性化が寄与することが明らかとなった(Takagi et al, 2002. Neurosci, Res.)。このシナプス入力による膨張は、電気刺激終了後2分程度で回復しており、細胞には容積の増加を速やかに元に戻すメカニズムが存在すると思われる。容積減少、すなわち細胞内からの水の流出を駆動するイオンは主に K+と C 「と考えられるので、これらを通すイオンチャネルやトランスポータの薬理学的阻害の効果を検討した。その結果、4-AP および TEA 感受性の電位依存性 K+チャネルを介するイオン流出が容積増加の回復に寄与していることが明らかとなった。

④ 虚血性脳神経細胞死における容積調節破綻

多くの細胞種は虚血などの病的条件下では細胞容積調節メカニズムが破綻をきたし、細胞膨張の持続から細胞死へと至る。しかもその細胞死はアポトーシス性の様相を示したり、ネクローシス性の様相を示したり、それらの中間混合的な様相を示したりすることが知られている。そこで私達は、この虚血条件下における脳神経細胞死過程における容積調節破綻の分子機構を解明し、それによって虚血性脳神経細胞死防御のための基礎的情報を得ることを本研究の第四の目的とした。

海馬神経細胞の遅発性細胞死の誘導と抑制に関与する IL-1, IL-6, TNFαなどの機能をしらべるために、これらの遺伝子改変マウスを用いて脳虚血実験を行い機能形態学的解析を行った。 さらに遅発性神経細胞死の過程における細胞容積変化におよぼす容積調節性クロライドイオンチ マネルの影響についても本チャネルブッロカーを用い in vivo における影響を検討した。神経細胞 死誘導実験方法は、動物の両総頚動脈をクリップにより遮断し脳虚血状態クリップの除去により再 潅流するという一過性前脳虚血モデル、もしくは中大脳脈を一過性に虚血-再潅流する局所脳虚 血モデルを用いた。虚血ー再潅流後、動物を経時的に固定し、トルイジンブルー染色により形態 的に観察するほか TUNEL 法、電子顕微鏡などを用いて遅発性神経細胞死(アポトーシス)のおきることを確認した。IL-1 および TNFα欠損マウスでは細胞死の抑制がおき、IL-6 欠損マウスでは細胞死が誘導されることも明らかになった。一方、生後 14 日のマウスを用い、虚血ー再潅流後 24、48、72 時間後に海馬からスライスを採取し錐体細胞容積変化を調べたところ、神経細胞死に伴い細胞 容積の減少(AVD)が著明にみとめられた(森ら、生理学会 2002.3 発表)。

神経細胞容積調節の多くのステップは細胞内 ATP に依存する。ATP 感受性 K*(K_{ATP}) チャネルは細胞内 ATPレベルを感知して開閉する K*チャネルであり、虚血時に開口し細胞膜を過分極すると考えられる。そこで、虚血時における K*イオン膜透過性の変化に及ぼす K_{ATP} チャネルの役割について検討した。心筋や脳では K_{ATP} チャネルは虚血時に細胞内 ATP レベルが減少すると開口し、K*イオンのコンダクタンスが増大し、膜が過分極することによって細胞の興奮や細胞内 ATP 消費を抑制し、細胞保護に働くと予想されているが不明な点が多かった。従来より脳の黒質網様部においては K_{ATP} チャネルが最も豊富に発現していること、またこの部位は全身痙攣の発症に重要な役割を果たしていることが知られていた。我々は、黒質網様部ニューロンに発現している K_{ATP} チャネルが K_{IT6} 2 と SUR1 から構成される膵 β 細胞型 K_{ATP} チャネルであることを明らかにし、 K_{ATP} チャネルの構成サブユニットである K_{IT6} チャネルの役割について検討した。その結果、低酸素時には黒質網様部ニューロンの細胞内 ATP が枯渇することにより、 K_{ATP} チャネルが開口し、その結果ニューロンの活動が抑制されることにより、全身痙攣の発症が抑制される可能性が示唆された (Yamada et al. 2001. Science)。

3. 研究実施体制

- (1) 統合的研究グループ(生理研・機能協関)
 - ① 研究者名:岡田泰伸 生理研 教授
 - ② 研究項目:細胞容積調節の分子メカニズムとその破綻防御の統合的研究
- (2) 海馬虚血研究グループ(昭和大グループ)
 - ① 研究者名:塩田清二 昭和大•医 教授
 - ② 研究項目:モデルマウスとノックアウトマウスを用いた虚血性海馬神経細胞死防御の研究
- (3) 黒質痙攣グループ(秋田大グループ)
 - ① 研究者名:稲垣暢也 秋田大・医 教授
 - ② 研究項目: 虚血時における黒質の細胞防御とその破綻

- (4) てんかんシグナル研究グループ(生理研・脳機能計測センターグループ)
 - ① 研究者名:坪川 宏 生理研 助教授
 - ② 研究項目:ニューロンの機能障害-容積変化カップリングの解析

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- O H.-T. Fan, S. Morishima, H. Kida & Y. Okada (2001) Phloretin differentially inhibits volume-sensitive and cAMP-activated, but not Ca-activated, Cl⁻ channels. *Br. J. Pharmacol.* 133, 1096-1106
- O R.Z. Sabirov, A.K. Dutta & Y. Okada (2001) Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J. Gen. Physiol.* 118, 251–266
- O Y. Hara, M. Wakamori, M. Ishii, E. Maeno, M. Nishida, T. Yoshida, H. Yamada, S. Shimizu, E. Mori, J. Kudoh, N. Shimizu, H. Kurose, Y. Okada, K. Imoto & Y. Mori (2002) LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Molecular Cell* 9, 1–20
- O Y. Okada, E. Maeno, T. Shimizu, K. Dezaki, J. Wang & S. Morishima (2001) Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J. Physiol. (London)* 532, 3-16 [Topical Review]
- O Y. Okada & E. Maeno (2001) Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. Comp. Biochem. Physiol. Part A. 130, 377-383
- O Y. Okada, R.Z. Sabirov, K. Dezaki, A. Hazama, H.-T. Fan, I. Abdullaev, T. Shimizu, A.K. Dutta, S. Hayashi, Y. Ando-Akatsuka, T. Tsumura & E. Maeno (2001) The pathway and roles of ATP release from epithelial cells. In, "Electrolyte Transport across Exocrine Epithelia" (eds. A. Dinudum & D.I. Cook) pp 11-13, University of Sydney Printing House, Sydney
- O R.Z. Sabirov, A.K. Dutta & Y. Okada (2001) Swelling-induced maxi-anion channel in murine C127 cells: ATP-block and ATP-permeation. In, "Electrolyte Transport across Exocrine Epithelia" (eds. A. Dinudum & D.I. Cook) pp 145-146, University of Sydney Printing House, Sydney
- O H. Mizushima, Y. Nakamura, H. Matsumoto, K. Dohi, K. Matsumoto, S. Shioda, W.A. Banks (2001) The effect of cardiac arrest on the blood-testis barrier to albumin, tumor necrosis factor-alpha, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, sucrose and verapamil in the mouse. J. Androl. 22, 255-260
- O C.J. Zhou, L.X. Zhao, N. Inagaki, J.L. Guan, S. Nakajo, T. Hirabayashi, S. Kikuyama, S. Shioda (2001) ATP-binding cassette transporter ABC2/ABCA2 in the rat brain: a novel

- mammalian lysosome-associated membrane protein and a specific marker for oligodendrocytes but not for myelin-sheath. *J. Neurosci.* 21, 849-857
- O H. Imaizumi, H. Mizushima, H. Matsumoto, K. Dohi, K. Matsumoto, H. Ohtaki, H. Funahashi, S. Matsunaga, R. Horai, M. Asano, Y. Iwakura, H. Funahashi, S. Shioda (2001) Increased expression of interleukin-1β in mouse hippocampus after global ischemia. Acta Histochem. Cytochem. 34, 357-362
- O K. Yamada, J.-J. Ji, H. Yuan, T. Miki, S. Sato, N. Horimoto, T. Shimizu, S. Seino, N. Inagaki (2001) Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. Science 292, 1543-1546
- O T. Furukawa, Y. Ono, H. Tsuchiya, Y. Katayama, M.-L. Bang, D. Labeit, S. Labeit, N. Inagaki, C. Gregorio (2001). Specific interaction of the potassium channel β-subunit minK with the sarcomeric protein T-cap suggests a T-tubule-myofibril linking system. J. Mol. Biol. 313, 775-784
- O G. Yamano, H. Funahashi, O. Kawanami, L.-X. Zhao, N. Ban, Y. Uchida, T. Morohoshi, J. Ogawa, S. Shioda, N. Inagaki (2001) ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett.* 508, 221-225
- K. Yamada, N. Inagaki (2001) A role for neuronal K_{ATP} channels in metabolic control of the seizure gate. Trends Pharmacol. Sci. 22, 601-602
- (2) 特許出願

なし