

「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

(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す。とくにRVDに関与するチャネル、トランスポーター、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する。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す。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する。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く。

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。

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 Ca^{2+} 流入にトリIGGERされた細胞内 Ca^{2+} 動員に基づく Ca^{2+} 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。H12年度においては、RVDのレセプター性制御のメカニズムの解明に取り組んだ。

細胞外 Ca^{2+} や Mg^{2+} に対するレセプターであるG蛋白共役性Caレセプター (CaR) 刺激による細胞内サイクリックAMP上昇によって、VSCCの容積感受性が著しく高まることを初めて明らかにした (Shimizu et al. 2000 J. Physiol .)。この事実は、細胞膨張時の細胞内 Ca^{2+} 動員の後のポンプ排出による細胞外 Ca^{2+} 増によってVSCC効率が高まることを意味しており、RVD制御におけるCaRから Cl^- チャネル刺激を介したポジティブフィードバック回路 (図1右半分) の存在を示している (Okada et al. 2001 J. Physiol .)。

一方、細胞膨張時には細胞内からATPが放出されるが、最近この放出路はCFTRチャネルそのものであるという説と、この放出ATPこそが細胞膨張時のVSCC活性化の原因因子であるという説が提唱された。私達は新たに作成したモノクローナル抗体やいくつかの薬理学的方法を用いてこのATP放出路の検討を行ったところ、両説とも正しくないこと、そしてCFTR発現はATP放出を制御はするがCFTRアニオン透過ポアとは異なる別個のルートからATPは放出されることを明らかにした (Hazama et al. 2000 J. Physiol .)。放出されたATPは細胞外からATPに対するレセプター (P2YR) に作用し、細胞内 Ca^{2+} 動員増を介して容積調節性 K^+ チャネルの活性化亢進をもたらすことによってRVDを促進させることを証明した (Dezaki et al. 2000 Jpn. J. Physiol .)。これによって、RVD制御におけるP2YRから K^+ チャネル刺激を介したポジティブフィードバック回路 (図1左半分) の存在を示すことができた (Okada et al. 2001 J. Physiol .)。

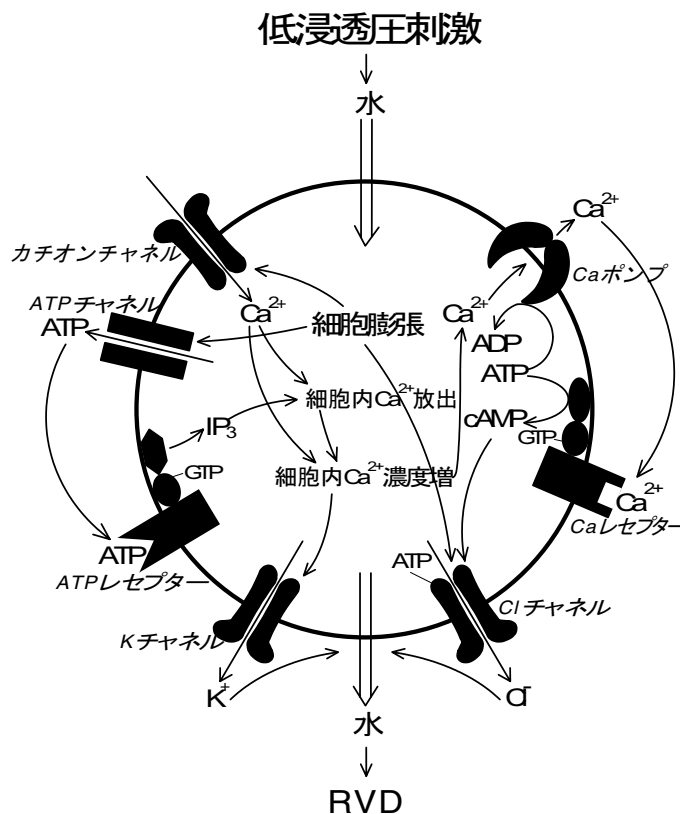


図1 RVDの分子メカニズムとそのレセプター性制御

アポトーシス性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。最近、アポトーシスにおいても細胞容積調節異常との関連が注目されはじめている。そこで私達は、プログラム細胞死とRVI異常の相関関係やプログラム細胞死過程におけるRVD異常、およびそれら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ことが知られており、私達はこれをApoptotic Volume Decrease (AVD)と命名した (Maeno et al. 2000 PNAS)。そして私達は、スタウロsporinやTNF α などによってアポトーシスを誘導した神経系、上皮系及びリンパ系培養細胞においてRVDを観察し、AVD時にはRVDの異常亢進が必ず伴われることを発見し、更に加えて、RVDに参与するCl⁻チャンネルやK⁺チャンネルを阻害すると生化学的アポトーシス諸反応 (チトクロームc放出、カスパーゼ活性化、DNAラダー) は完全に阻止されて、細胞死も救済されることを明らかにした (Maeno et al. 2000 PNAS)。Fasを介するアポトーシスにおいても全く同様であることも確認した (Okada et al. 2001 J.

Physiol.).

虚血性神経細胞死の分子メカニズムと細胞容積

海馬神経細胞の遅発性細胞死の誘導と抑制に關与するIL-1, IL-6, TNF α 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。実験方法であるが、動物の心臓をガス麻酔下で5 - 15分間完全に停止させ、その後に酸素付加して心肺蘇生を行った。虚血 - 再灌流後、動物を経時的に固定し、TUNEL法、電子顕微鏡などを用いてアポトーシスの発生することを確認した。またIL-1およびTNF α 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。これによって今後、in vivo虚血誘導性細胞死過程における細胞容積変化の観察を行うための実験系が確立した。

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るために、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て、CA1野の細胞容積が増加するメカニズムを解析した。海馬など細胞が高密度に存在する脳内部位では、細胞が容積変化を起こすと、一定体積あたりの細胞と細胞間隙の占有パターンが変わり、それに応じて近赤外光の透過率が変化することが知られている。この性質を利用して、海馬スライス標本のニューロンから電気生理学的記録を行うと共に、内因性光学シグナルのイメージングを行い、興奮性変化と容積異常の時間的・空間的特性を解析した。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、GABA_A受容体の活性化が寄与することが明らかとなった。

黒質網様部 (SNr) におけるATP感受性K⁺ (K_{ATP})チャネルの虚血時における生体防御としての役割を研究した。K_{ATP}チャネルのノックアウトマウスを用いることにより、低酸素時に細胞内ATPレベルが低下するとSNrのK_{ATP}チャネルが活性化し、その結果細胞膜を過分極させ興奮が抑制されることにより、全身痙攣の発症が抑制されることを明らかにした (Yamada et al. 2001 science)。今後、本チャネルと細胞容積調節との関係、病態や生体防御における役割について検討する。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- A. Hazama, H. Fan, I. Abdullaev, E. Maeno, S. Tanaka, Y. Ando-Akatsuka & Y. Okada (2000) Swelling-activated, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-augmented ATP release and Cl⁻ conductances in C127 cells. *J. Physiol. (London)* 523, 1-11
- K. Dezaki, T. Tsumura, E. Maeno & Y. Okada (2000) Receptor-mediated facilitation of cell volume regulation by swelling-induced ATP release in human

- epithelial cells. *Jpn. J. Physiol.* 50, 235-241
- S. Morishima, T. Shimizu, H. Kida & Y. Okada (2000) Volume expansion sensitivity of swelling-activated Cl^- channel in human epithelial cells. *Jpn. J. Physiol.* 50, 277-280
 - E. Maeno, Y. Ishizaki, T. Kanaseki, A. Hazama & Y. Okada (2000) Normotonic cell shrinkage due to disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9487-9492
 - S. Shimizu, S. Morishima & Y. Okada (2000) Ca^{2+} -sensing receptor-mediated regulation of volume-sensitive Cl^- channels in human epithelial cells. *J. Physiol. (London)* 528, 457-472
 - 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]
 - Y. Suketa, E. Carafoli, M. Lazdunski, K. Mikoshiba, Y. Okada & E. M. Wright (eds) (2000) "Control and Disease of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels" Elsevier, Amsterdam
 - A. Hazama, Y. Ando-Akatsuka, H.-T. Fan, S. Tanaka & Y. Okada (2000) CFTR-dependent and -independent ATP release induced by osmotic swelling. In, "Control and Disease of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels" (eds. Y. Suketa, E. Carafoli, M. Lazdunski, K. Mikoshiba, Y. Okada & E. M. Wright) pp 429-431. Elsevier, Amsterdam
 - T. Shimizu, S. Morishima & Y. Okada (2000) Effect of extracellular Ca^{2+} on volume sensitivity of the swelling-activated Cl^- channel in human epithelial cells. In, "Control and Disease of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels" (eds. Y. Suketa, E. Carafoli, M. Lazdunski, K. Mikoshiba, Y. Okada & E. M. Wright) pp 271-272, Elsevier, Amsterdam
 - H.-T. Fan, H. Kida, S. Morishima & Y. Okada (2000) Phloretin inhibits a regulatory volume decrease in human epithelial cells. In, "Control and Disease of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels" (eds. Y. Suketa, E. Carafoli, M. Lazdunski, K. Mikoshiba, Y. Okada & E. M. Wright) pp 281-282, Elsevier, Amsterdam
 - Y. Okada, A. Hazama, I. Abdullaev, S. Tanaka, Y. Ando-Akatsuka, T. Shimizu, R. Z. Sabirov, S. Hayashi & H.-T. Fan (2000) Cell volume-sensitive Cl^- channel and ATP release. In, "Control and Disease of Sodium Dependent Transportation Proteins and Ion Channels" (eds. Y. Suketa, E. Carafoli, M. Lazdunski, K.

- Mikoshiba, Y. Okada & E. M. Wright) pp 261-264, Elsevier, Amsterdam
- H. Mizushima, W.A. Banks, K. Dohi, S. Nakamura, K. Matsumoto & S. Shioda (2000) The effect of cardiac arrest on the permeability of the mouse blood-testis barrier and blood-spinal cord barrier to PACAP. *Ann. NY Acad. Sci.* 921, 289-292
 - H. Matsumoto, H. Mizushima, W.A. Banks, K. Dohi, S. Shioda & K. Matsumoto (2000) The effect of cardiac arrest on testis blood-testis barrier to albumin and TNF- α in the mouse. *Showa J. Med. Sci.* 12, 119-126
 - 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- α , pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, sucrose and verapamil in the mouse. *J. Androl.* 22, 255-260
 - 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
 - K. Yamada, M. Nakata, N. Horimoto, M. Saito H. Matsuoka & N. Inagaki (2000) Measurement of glucose uptake and intracellular calcium concentration in single, living pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* 275, 22278-22283
 - L.-X. Zhao, C.-J. Zhou, A. Tanaka, M. Nakata, T. Hirabayashi, T. Amachi, S. Shioda, K. Ueda & N. Inagaki (2000) Cloning, characterization and tissue distribution of the rat ATP-binding cassette (ABC) transporter ABC2/ABCA2. *Biochem. J.* 350, 865-872.
 - H. Fujita, T. Matsuura, K. Yamada, N. Inagaki & I. Kanno (2000) A sealed cranial window system for simultaneous recording of electrical, blood flow, and optical signals in rat barrel cortex. *J. Neurosci. Meth.* 99, 71-78
 - 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.