

「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

本研究は、浸透圧性膨張直後の容積調節 (Regulatory Volume Decrease: RVD) の分子メカニズムを解明し、病的条件下におけるその破綻による細胞死のメカニズムを明らかにし、それを防御するための分子戦略を確立することを目的としている。そのために、RVDに關与するチャンネル、トランスポータ、レセプター分子を同定すること、その活性化メカニズムを明らかにすること、更には、虚血性細胞死及びプログラム細胞死とRVD異常の關係を明らかにすることに取組んでいる。

2. 研究実施内容

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歸する能力を持っている。ところが虚血などの病的条件下ではその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。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

二光子レーザー蛍光顕微鏡を用いた三次元的容積測定法の開発に成功をみたので、この方法を、形態が複雑でこれまで研究対象としてとり上げにくかった脳神経細胞や腎密集斑細胞に適用した。その結果、神経型に分化したNG108-15細胞はRVDを示さないこと、腎密集斑細胞膜の水透過性はかなり高いことが明らかとなった。

RVDを実現するCl流出を担う容積感受性Clチャンネル (VSCC) の活性化メカニズムは未だ不明である。私達はヒト上皮細胞を用いて生物物理学的検討を行い、VSCC活性化のメカニズムは細胞容積変化そのものや、膜張力変化や静水圧には直接關係せず、細胞内骨格系が關与した膜のバネエネルギーに關係することを明らかにした。

胞膨張時には細胞内からATPも放出され、これが細胞外から作用してRVDを促

進させることを前年度に明らかにしたが、このメカニズムは細胞内Ca動員増にもとづく容積調節性Kチャネルの活性化亢進によることを新たに明らかにした。また、肝細胞においてはこの細胞膨張時の放出ATPこそがVSCC活性化の原因であるとの説が提唱されたが、ヒトやマウスの上皮細胞では（CFTRの発現の有無にかかわらず）この説は正しくないことを明らかにした。

RVD機能蛋白の分子論的同一

RVDは細胞からのKCl流出と、それに駆動された水流出によって達成される。多くの細胞でこのKCl流出はCa依存性Kチャネルと容積感受性Clチャネル（VSCC）の開口によってもたらされる。このKチャネル活性化のためのCa動員は、膜伸展感受性メカノセンサーカチオンチャネル（SAチャネル）の開口と、細胞内Caストアからの放出によってもたらされる。細胞膨張時のATP放出はこの細胞内Ca動員を亢進させる。以上がこれまで私達が明らかにしてきたRVDの分子メカニズムであるが、これに関与するVSCC、SAチャネル、ATP放出路の分子実体は未だ不明である。VSCCについてはCIC3説が提出されたが、私達はこれに対して同定基準を提出して、その同定は充分でないことを指摘してきた。ATP放出路についてはVSCCやCFTRを介して行われるという説が提出されているが、私達は自ら開発したモノクローナル抗体や特異的阻害剤を使用して、その両者ともそれに該当するものではないことを明らかにした。この放出ATPの細胞外作用点であるATPレセプターはヒト上皮細胞株Intestine407ではP2Y2型であることを同定した。また、SAチャネルの候補蛋白として酵母からSAチャネル遺伝子mid1を同定することに成功した。

虚血性細胞死・プログラム細胞死におけるRVD異常

RVDに関与するVSCC活性には細胞内でのATP結合が不可欠である。虚血条件下でのATP欠乏は、Naポンプ活性の低下（によるダブルドナン平衡の破綻）による細胞膨張をもたらすが、それに対抗するRVD機能までもが抑制されることになるので、持続性膨張が強いられてネクローゼ細胞死がもたらされるものと考えられる。事実、ミトコンドリア毒素3-NPAによる脳線条体傷害には、アストロサイトの著しい膨張とネクローゼ死が伴われていること、これはニューロン死より先行すること、を明らかにした。

一方、アポトーシス過程には持続性細胞収縮（私達はこれをApoptotic Volume Decrease: AVDと命名した）が伴われることが知られており、アポトーシスと細胞収縮後の容積調節（Regulatory Volume Increase: RVI）との関係についてはアメリカにおいて調べられはじめているが、RVD能との関係についてはこれまで知られていない。そこで私達は、スタウロスポリンやTNF 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に關与するVSCCを阻害すると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、電子顕微鏡像変化など）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。

3 . 主な研究成果の発表（論文発表）

Hazama A, Shimizu T, Ando-Akatsuka Y, Hayashi S, Tanaka S, Maeno E & Okada Y (1999) Swelling-induced, CFTR-independent ATP release from a human epithelial cell line. Lack of correlation with volume-sensitive Cl⁻ channels. *J Gen Physiol* 114: 525-533

Sabirov RZ, Azimov RR, Ando-Akatsuka Y, Miyoshi E & Okada Y (1999) Na⁺ sensitivity of ROMK1 K⁺ channel: Role of the Na⁺/H⁺ antiporter. *J Membrane Biol* 172: 67-76

Okada Y (1999) A scaffolding for regulation of volume-sensitive Cl⁻ channels. *J Physiol (London)* 520: 2 [Perspectives]

Hazama A, Fan H, Abdullaev I, Maeno E, Tanaka S, Ando-Akatsuka Y & Okada Y (2000) Swelling-activated, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-augmented ATP release and Cl⁻ conductances in C127 cells. *J. Physiol. (London)* 523: 1-11

中村敏夫、有井滋樹、岡田泰伸（1999）肝線維化に關わる活性化肝星細胞に強発現するNa・Ca交換トランスポータ．*臨床検査* 43: 90-94

三好毅志、岡田泰伸（1999）チャンネル型ABCタンパクCFTR. *最新医学* 54: 367-373

丸茂文昭、岡田泰伸、倉智嘉久（1999）イオンチャンネルと疾患．*現代医療* 31: 876-892

赤塚（安藤）結子、岡田泰伸（1999）嚢胞性線維症とCFTR. *現代医療* 31: 983-987

岡田泰伸（1999）イオンチャンネルに關する研究の動向. *心臓* 31: 847-853

Kanzaki M, Nagasawa M, Kojima I, Sato C, Naruse K, Sokabe M & Iida H (1999) Molecular identification of a eukaryotic, stretch-activated nonselective cation channel. *Science* 285:882-886

Kawakubo T, Naruse K, Matsubara T, Hotta N & Sokabe M (1999) Characterization of a newly found stretch-activated KCa,ATP channel in cultured chick ventricular myocytes. *Am J Physiol* 276: H1827-H1838

Qi Z, Donowaki K, Ishida H & Sokabe M (1999). A structure-function study on a de novo sythetichydrophobic ion channel. *Biophys J* 76: 631-641

Sai X, Naruse K & Sokabe M (1999) Activation of pp60src is critical for stretch-induced orienting response in fibroblasts. *J Cell Sci* 112: 1365-1373

Tatsumi H, Katayama Y & Sokabe M (1999) Attachment of growth cones on substrate

observed by multi-mode light microscopy. *Neurosci Res* 35: 197-206

Wang J, Sakaguchi H & Sokabe M (1999) Sex differences in the vocal motor pathway of the zebra finch revealed by real-time optical imaging technique. *NeuroReport* 10: 2487-2491

Wang J, Akaike T & Sokabe M. (1999) Spatiotemporal properties of neural activity propagation from the subicular complex to the posterior cingulate cortex in rat brain slices detected by the optical recording technique. *Jpn J Physiol*, 49: 445-455

Sasaki, N, Takano, M, Mitsuiye, T & Noma A (1999) Changes in cell volume induced by ion channel flux in guinea-pig cardiac myocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 698-706

Sasaki, N, Mitsuiye T, Noma A & Powell T (1999) Sarcomere length during contraction of isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Pflugers Archiv* 437: 804-811

Ishii T M, Takano M, Xie L H, Noma A & Ohmori H (1999) Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem* 274:12835-12839

Mitsuiye T, Guo J & Noma A (1999) Nicardipine-sensitive Na⁺-mediated single channel currents in sinoatrial node pacemaker cells of guinea-pig. *J Physiol* 521:69-79

Kumazaki M, Ungsuparkorn C, Despande SB, Fukuda A & Nishino H (1999) Mechanisms of action of 3-NPA: dopamine overflow and vulnerability of the lateral striatal artery. In: *Mitochondrial Inhibitors and Neurodegenerative Disorders* (Sanberg PR, Nishino H, Borlongan CV eds) The Humana Press 157-165

Nakajima K, Shimano Y, Torii K & Nishino H (1999) Gender related difference of the effect of 3-NPA on striatal artery. In: *Mitochondrial Inhibitors and Neurodegenerative Disorders* (Sanberg PR, Nishino H, Borlongan C eds) The Humana Press 121-127

Ishida K, Ungsuparkorn C, Hida H, Aihara N, Ida K & Nishino H (1999) Argyrophilic dark neurons distribute with a different pattern in the brain after over hours treadmill running and swimming in the rat. *Neurosci Lett* 277: 149-152

Hida H, Hashimoto M, Fujimoto I, Nakajima K, Shimano Y, Nagatsu T, Mikoshiba K & Nishino H (1999) Dopa-producing astrocytes generated by adenoviral transduction of human tyrosine hydroxylase gene : in vitro study and transplantation to hemiparkinson model rats. *Neurosci Res* 35: 101-112

Anzai N, Izumida I, Kobayashi Y & Kawahara K (1999) Roles of vasopressin and hypertonicity in basolateral Na/K/2Cl cotransporter expression in rat kidney inner medullary collecting duct cells. *Jpn J Physiol* 49: 201-206

Zhou M, Tanaka O, Sekiguchi M, Sakabe K, Anzai N, Izumida I, Inoue T, Kawahara K

& Abe H (1999) Localization of the ATP-sensitive potassium channel subunit (Kir6.1/uKATP-1) in rat brain. *Molec Brain Res* 74: 15-25