

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12702

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670112

研究課題名(和文) 神経細胞酸毒性死防御にむけた酸感受性アニオンチャネルの温度感受性解明と分子同定

研究課題名(英文) Studies on temperature sensitivity and molecular identity of the acid-sensitive outwardly rectifying anion channel (ASOR) in neurons in relation to the mechanism of hypothermic neuroprotection

研究代表者

岡田 泰伸 (Okada, Yasunobu)

総合研究大学院大学・学長

研究者番号：10025661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳内は虚血条件、テンカン、脳外傷および過血糖症において強度に酸性化し、ニューロンやグリアは酸毒性死に至る。一方、強酸条件下では、外向整流性アニオンチャネルASORが活性化され、酸毒性死誘導に関与することが、他の細胞種において知られている。今回、私達はマウス大脳皮質ニューロンにもASORが発現し、酸毒性ネクロシス死の誘導に関与すること、そしてこのASORは高い温度感受性を示し、25℃以下の低温で酸毒性死が救済され、脳障害低体温療法の一部の成因となることを明らかにした。また、これまで考えられてきた多くの候補分子が、ASOR分子実体から排除されること示した。

研究成果の概要(英文)：In the brain, strong acidosis is a common feature of ischemia, seizure, trauma and hyperglycemia, and it contributes to neuronal injury. On the other hand, the acid-sensitive outwardly rectifying anion channel (ASOR) has been found in non-neuronal cell types and to be involved in acidotoxic cell death. In the present study, we found that ASOR is expressed in mouse cortical neurons and involved in acidotoxic neuronal cell death. Also, it was found that the neuronal ASOR exhibits strong sensitivity to temperature and that acidotoxic neuronal necrosis is largely protected by reduction of temperature to 25°C. Thus, it is suggested that this high temperature sensitivity provides a basis for hypothermic neuroprotection under acidotoxic conditions. Furthermore, we tried to identify the ASOR molecule. Using the gene-silencing technique, a number of the candidates were excluded from the molecular entity of ASOR.

研究分野：生理学一般 神経生理学

キーワード：アニオンチャネル 温度感受性 酸毒性 ニューロン 低体温療法

1. 研究開始当初の背景

(1) ニューロンにおけるアシドーシス細胞死と ASOR 活性

強度のアシドーシスをもたらす脳障害時には、脳ニューロンにおいて急性的にはネクローシス死が、遅延的にはアポトーシス死がもたらされることが知られている(Martin et al. 1998 Brain Res Bull; Ding et al. 2000 Exp Neurol)。一般に、急性ネクローシス死の初期には Na^+ と Cl^- の流入による細胞膨張 (NVI: necrotic volume increase) が伴われ、カチオンチャンネルとアニオンチャンネルの同時的活性化の重要性が考えられている (Okada et al. 2001 J Physiol)。事実、上皮細胞の酸毒性ネクローシスには、酸感受性外向整流性アニオンチャンネル ASOR (acid-sensitive outwardly rectifying anion channel) の活性化が本質的に関与することを私達は既に明らかにしている (Wang et al. 2007 Pfluegers Arch)。しかし、脳ニューロンにおける酸毒性死においても ASOR が関与するかどうか、またそのチャンネル活性のブロックによってネクローシス死が救済されるかどうかは未だ不明であった。

(2) 脳障害低温療法とニューロン ASOR 温度感受性

脳卒中や脳外傷時の脳障害防御に低温療法 Therapeutic Hypothermia が大変有効であることは Hypothermia Neuroprotection として古くから知られているが、その正確なメカニズムは未だに不明である。ニューロンの Na^+ および K^+ チャンネルの温度感受性は一般に $Q_{10}=2\sim 4$ と低く (Hille 2001 Ion Channels of Excitable Membrane) それらの主役的関与は考えにくい。一方、いくつかのアニオンチャンネルにおいては、例えば電位依存性 Cl^- の Q_{10} は 40 (Pusch et al. 1997 J Gen Physiol)、 Ca^{2+} 依存性 ANO1 (TMEM16A) の Q_{10} は 19.4 (Cho et al. 2012 Nature Neurosci) と極めて高いことが報告されている。それゆえ脳障害低温療法のメカニズムには、脳ニューロンのアニオンチャンネル ASOR が主動的に関与している可能性が高いと考えられる。事実、私達は、上皮細胞 ASOR は 22 °C では酸性 (pH 5.5) 条件下でも活性化されないが、温度を 37 °C に上昇させていくと次第に活性化されることを見出している (Sato-Numata et al. 2013 Pfluegers Arch)。しかし、脳ニューロンの ASOR の温度感受性や Q_{10} 値については不明であった。

(3) ASOR の分子同定

ASOR は当初その薬理的性質の相似性などによって細胞膨張時に活性化されるアニオンチャンネル VSOR (volume-sensitive outwardly rectifying anion channel) が酸性条件下で機能スイッチするものと推定された (Noble et al. 2004 Am J Physiol Cell Physiol)。しかし、その後いくつかの性質における本質的差異からこの仮説は否定されている (Wang et al. 2007 Pfluegers Arch)。

また、 ClC-3 が ASOR の分子実体であるという報告が最近なされた (Matsuda et al. 2010 J Biol Chem) が、私達の追試では否定された (Sato-Numata et al. 2013 Pfluegers Arch)。私達は最近、 ClC-3 のイソマーのうちでこれまで未クロニングであった ClC-3d のフルクロニングに成功したが、これの関与の可能性については未検討であった。更に最近私達は、ヒト癌細胞 KB 株のシスプラチン耐性亜株において ASOR 活性が欠失していることを見出した (Sato-Numata et al. 2013 Pfluegers Arch)。そこで、この亜株と親株の間の遺伝子発現差をマイクロアレイ法で解析し、それから得られた候補遺伝子から分子同定をめざすというアプローチが開かれた。

2. 研究の目的

一般に虚血条件下においては解糖優位となり pH は酸性に傾く。特に脳においては、虚血条件やテンカンや脳外傷や過血糖症によって pH は 6 以下ともなり、そのような強度アシドーシス下ではニューロンやグリアは酸毒性死に至ることが知られている。一方、私達は上皮細胞の酸毒性死には、酸性下で活性化される ASOR が関与することを明らかにしている。そこで本研究では、大脳皮質ニューロンにも ASOR が発現し、酸毒性死に ASOR が関与するかどうかをまず第 1 に明らかにする。また、一般に虚血性脳障害に対して低温療法がよく奏効することが知られている。そこで第 2 に、このニューロンの ASOR と酸毒性死の温度感受性を調べ、その低温療法のメカニズムへの関与を明らかにする。第 3 に、私達が最近フルクロニングした ClC-3d が ASOR 分子である可能性を検討する。更に最近、私達はシスプラチン耐性癌細胞の 1 亜株に ASOR 活性を欠失しているものを発見している。そこで第 4 に、この亜株と親株との間の遺伝子発現差異から、ASOR 分子同定を行いたい。

3. 研究の方法

(1) 大脳皮質ニューロンにおける ASOR 電流の同定と、その温度感受性の解析

胎仔マウス大脳皮質より単離して初代培養したニューロンにパッチクランプ全細胞記録によるアニオンチャンネル電流観察を、既に報告 (Inoue & Okada 2007 J Neurosci) した方法によって実施する。そして外液酸性条件下で活性化される電流の性質を調べ、上皮細胞 ASOR (Wang et al. 2007 Pfluegers Arch) と同様に、酸感受性、強度外向整流性、電位依存性活性化キネティクス、低フィールド・アニオン選択性、強度 DIDS 感受性、中等度 phloretin 感受性などの ASOR 特有の生物物理学的・薬理的性質を示すことを確認する。その上で、ASOR 電流の温度感受性を脳ニューロンにおいて定量的に観察する。即ち、この絶対温度の逆数に対して、電流値の

対数をプロット(アルレニウスプロット)し、アルレニウス式から活性化エネルギーと Q_{10} 値を計算し、他の電位依存性アニオンチャンネル CIC-0 ($Q_{10}=40$: Pusch et al. 1997 J Gen Physiol), Ca^{2+} 依存性アニオンチャンネル ANO1 ($Q_{10}=19.4$: Cho et al. 2012 Nature Neurosci)と同様に、高い温度感受性 (Q_{10} 値 >5) を有するチャンネルであるかどうかを調べる。

(2) 大脳皮質ニューロン酸毒性死とその低温救済への ASOR 関与の検討

大脳皮質ニューロンを外液酸性条件下で培養し、以前報告 (Inoue & Okada 2007 J Neurosci; Wang et al. 2007 Pfluegers Arch) した同じ手法を用いて、そのネクローシス死を PI 染色陽性で、アポトーシス死の関与のないことをカスパーゼ 3 活性化がみられないことで定量的に確認する。そして、この酸毒性ネクローシス死の温度感受性を調べ、ASOR の温度感受性と比較する。また、この酸毒性ネクローシス死の DIDS、phloretin 感受性を調べ、ASOR の薬理的性質と比較する。更には、ネクローシス死初期過程に伴われるネクローシス性細胞膨張 (NVI: necrotic volume increase) (Okada et al. 2001 J Physiol) が、酸毒性条件下で上皮細胞で見られた (Wang et al. 2007 Pfluegers Arch) と同じように、皮質ニューロンでも実際に見られることを確認し、その NVI の ASOR 阻害剤感受性や温度感受性を調べ、ASOR の酸毒性ネクローシスへの本質的関与を確かなものとする。

(3) ASOR アニオンチャンネルの分子同定の試み

まず第 1 に、CIC-3 が ASOR 分子に関係する可能性を本格的に調べるために、CIC-3 遺伝子の siRNA ノックダウンによる HeLa 細胞内在性 ASOR 電流が受ける影響、CIC-3 遺伝子強制発現による HEK293T 細胞内在性 ASOR 電流が受ける影響、そして ASOR 発現 KB 細胞と ASOR 活性欠失 KCP-4 細胞の間の CIC-3 遺伝子およびタンパク質の発現差、以上の 3 点を調べる。第 2 に、私達が最近フルクローニングに成功した CIC-3d (Okada et al. 2014 Cell Physiol Biochem) が ASOR 分子に関係している可能性を、この遺伝子の強制発現効果を観察して検討する。最近私達は、VSOR 活性 (Lee et al. 2006 J Cell Physiol) のみならず ASOR 活性もまた KCP-4 細胞において欠失していることを見出した (Sato-Numata et al. 2013 Pfluegers Arch)。しかも更に、最近、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による遺伝子転写・発現促進により、VSOR 電流は回復する (Lee et al. 2006 J Cell Physiol; Shimizu et al. 2008 Anticancer Res) のに対して、ASOR 電流は回復しないことを予備実験において確認している (佐藤・岡田: 未発表)。即ち、シスプラチン耐性獲得によって ASOR 遺伝子そのものが欠落した可能性が高い。そこで第 3 に、KB 細胞と KCP-4 細胞の両方を

DNA マイクロアレイ解析にかけて、ゲノムワイドな遺伝子発現プロファイルを比較し、KCP-4 細胞において著しく発現の低い膜タンパク質遺伝子を選定する。そして、これらの候補膜タンパク質遺伝子に対する siRNA を KB、HeLa、HEK293T 細胞に導入してこれらの ASOR 電流が抑制されるかどうかを検定し、最終候補遺伝子として選定していく。

4. 研究成果

(1) 大脳皮質ニューロンにおける ASOR の発現とその温度感受性

パッチクランプ全細胞電流記録下におかれた初代培養大脳皮質ニューロンは、室温 (25)において細胞外液 pH を 7.4 から 4.5 に下げると、アニオンチャンネル電流の亢進で応答した。その電流は強度の外向整流性、アニオンチャンネルブロッカーの DIDS に対する強度感受性 (IC_{50} 値 $4.7 \mu M$)、phloretin に対する中等度感受性 (IC_{50} 値 $22 \mu M$) という ASOR 独特の性質を示した (図 1)。また、この電流は、高温 (37)にすると著しく増大し、 Q_{10} 値 5.6 という高い温度感受性を示した (図 2)。

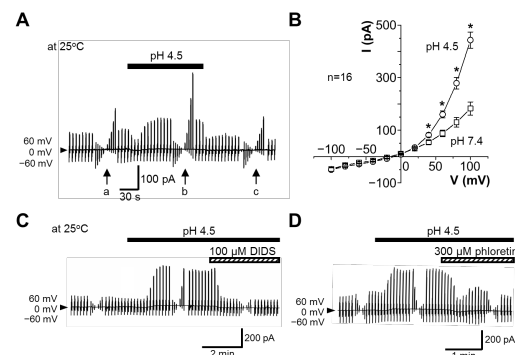


図1 ニューロンASOR電流の電位依存性とブロッカー感受性

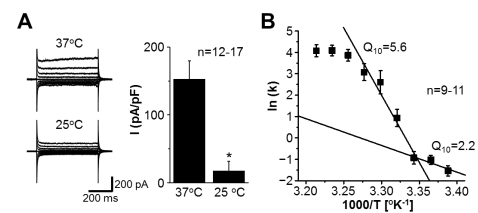


図2 ニューロンASOR電流の温度感受性

(2) ニューロン酸毒性死およびその低温防御への ASOR の関与

プロピジウム沃度 (PI) 染色法によって細胞死をモニターしたところ、大脳皮質ニューロンを酸性細胞外液 (pH 5.25) 中に 1 時間置くと細胞死が誘導され、それは 25 でより 37 での方がより顕著であること、その温度感受性成分は DIDS と phloretin で著しい抑制を受けることが明らかになった。(図 3)。この過程には、カスパーゼ 3 の活性化は伴われないこと、そして細胞膨張 (NVI) が伴われ、その NVI もまた温度感受性、DIDS 感受性、

phloretin 感受性を示すことが観察され、この酸毒性死はネクローシスであることが明らかとなった。

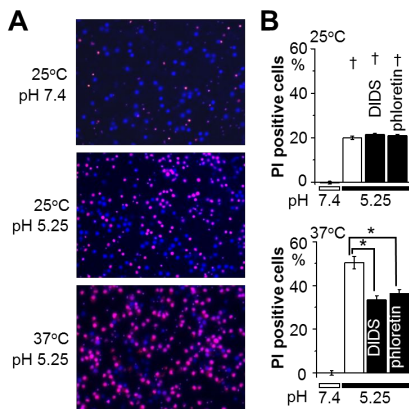


図3 ニューロン酸毒性死の温度・ブロッカー感受性

(3) ASOR アニオンチャネルの分子同定の試み

CIC-3 が ASOR の分子であるという報告 (Matsuda et al. 2010 J Biol Chem) に対する検討を、綿密に行うことを第一に行った。その結果は、HeLa細胞のASOR電流は、CIC-3の遺伝子サイレンシングで影響を受けず、(図4A) HEK293T細胞のASOR電流も、CIC-3強制発現で影響を受けず(図4B) ASOR電流発現KB細胞とそのASOR欠失亜株KCP-4細胞の間で、CIC-3遺伝子の発現において差がない(図5)というものであり、CIC-3説を完全に否定した。次に、私達ははじめてフルクローニングしたCIC-3のd-イソフォーム(CIC-3d)をHEK293T細胞に強制発現したところ、そのASOR電流には何らの影響も見られなかったため、CIC-3dの可能性も排除された(図6)。

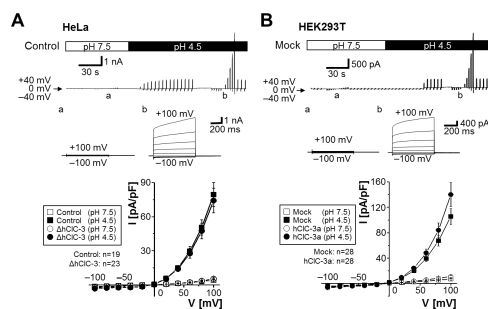


図4 上皮細胞ASOR電流へのCIC-3ノックダウン(A)と強制発現(B)の影響

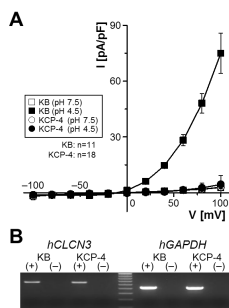


図5 KB細胞とシスプラチン耐性KCP-4細胞のASOR活性発現差とCIC-3遺伝子発現差

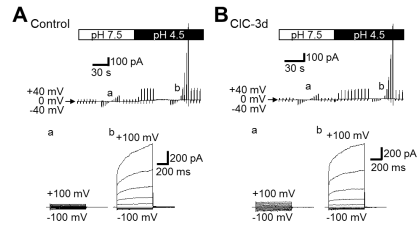


図6 CIC-3d強制発現前後における上皮細胞のASOR電流

更には、DNA マイクロアレイ解析を行い、KB細胞とKCP-4細胞の間で遺伝子発現差のある膜タンパク質として、AQP3、AQP5、CLIC3、SLC10A5、SLC16A6、SLC16A14、SLC44A2、TMC5を選定し、これらすべてに対する遺伝子サイレンシングをHeLa細胞で一つ一つ行った結果、すべて影響が見られなかったことから、これらを候補分子から排除した。残された数少ない候補遺伝子に対する検討は、次年度以降に残された。

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8件)

1. K. Sato-Numata, T. Numata & Y. Okada (2014)

Temperature sensitivity of acid-sensitive outwardly rectifying (ASOR) anion channels in cortical neurons is involved in hypothermic neuroprotection against acidotoxic necrosis.

Channels 8, 1-6

DOI:10.4161/chan.27748

2. T. Okada, T. Akita, K. Sato-Numata, M.R. Islam & Y. Okada (2014)

A newly cloned CIC-3 isoform, CIC-3d, as well as CIC-3a mediates Cd²⁺-sensitive outwardly rectifying anion currents.

Cell. Physiol. Biochem. 33, 539-556

DOI:10.1159/000358633

3. T. Akita & Y. Okada (2014)

Characteristics and roles of the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel in the central nervous system.

Neuroscience 275, 211-231

doi:10.1016/j.neuroscience.2014.06.015

4. 岡田泰伸 (2014)

生から死へ、死から生への生理学 - 統合科学序説 -

総合研究大学院大学葉山彙報 5, 31-51

Doi: 無

5. K. Sato-Numata, T. Numata, T. Okada & Y. Okada (2013)

Acid-sensitive outwardly rectifying (ASOR) anion channels in human epithelial cells are highly sensitive to temperature and independent of ClC-3. *Pflügers Arch.* 465, 1535-1543
DOI: 10.1007/s00424-013-1296-y

6. T. Shimizu, T. Iehara, K. Sato, T. Fujii, H. Sakai & Y. Okada (2013)
TMEM16F is a component of a Ca²⁺-activated Cl⁻ channel but not a volume-sensitive outwardly rectifying Cl⁻ channel. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 304, C748-C759
DOI: 10.1152/ajpcell.00228.2012

7. R.Z. Sabirov, R.S. Kurbannazarova, N.R. Melanova & Y. Okada (2013)
Volume-sensitive anion channels mediate osmosensitive glutathione release from rat thymocytes. *PLoS One* 8(1), e55646
doi: 10.1371/journal.pone.0055646

8. 岡田泰伸 (2013)
細胞死のチャネルメカニズムとその病態.
日本病態生理学雑誌 21, 14-16
Doi: 無

〔学会発表〕(計10件)

1. Islam Md R, Okada T, Merzlyak PG, Sabirov RZ, Okada Y (2015)
Annexin A2 is a modulator of maxi-anion channel (Maxi-Cl) in mouse mammary C127 cells.
第92回 日本生理学会大会
3月21-23日、神戸

2. Sato-Numata K, Numata T, Okada Y (2015)
Exploration of temperature sensitivity and new antagonists of acid-sensitive outwardly rectifying anion channel (ASOR).
第92回 日本生理学会大会
3月21-23日、神戸

3. Okada T, Sato-Numata K, Islam Md R, Sabirov RZ, Okada Y (2015)
Examination of the role of LRRC8A in the function of volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR).
第92回 日本生理学会大会
3月21-23日、神戸

4. Sabirov RZ, Tsiferova NA, Merzlyak PG, Okada Y (2015)
Volume-sensitive anion channels in melanoma cells before and after tumor formation.
第92回 日本生理学会大会

3月21-23日、神戸

5. Okada Y, Sato-Numata K (2014)
Correlation between the mechanisms for cell volume regulation and for body fluid osmolarity control. *J. Physiol. Sci.* 64 (Suppl 1), S66 (第91回 日本生理学会大会、3月16-18日、鹿児島)

6. Shimizu T, Iehara T, Fujii T, Okada Y, Sakai H (2014)
TMEM16F forms a Ca²⁺-activated Cl⁻ channel. *J. Physiol. Sci.* 64 (Suppl 1), S124 (第91回 日本生理学会大会、3月16-18日、鹿児島)

7. Sato-Numata K, Ueta Y, Okada Y (2014)
AVP neurons possess the cell volume regulation mechanism under hyperosmotic conditions. *J. Physiol. Sci.* 64 (Suppl 1), S213 (第91回 日本生理学会大会、3月16-18日、鹿児島)

8. 岡田泰伸、沼田(佐藤)かお理、沼田朋大、清水貴浩、秋田天平、岡田俊昭(2013)
細胞生死スイッチに關与する細胞容積關連性イオンチャネル. プログラム抄録集 p28 (第22回 日本 Cell Death 学会学術集会、7月19-20日、京都)
招待講演

9. Okada Y, Sato-Numata K, Shimizu T, Sakai H, Akita T, Okada T (2013)
Anion channels involved in cell survival-death switching. *J Gen Physiol* 142, 12a-13a (Society of General Physiologists: 67th Annual Meeting and Symposium: The Enigmatic Chloride Ion: Transport, Regulation and Roles in Physiology, September 4-8, 2013, Woods Hole, USA)
招待講演

10. Okada Y, Sato-Numata K, Numata T, Wehner F, Shimizu T, Sakai H, Akita T, Okada T (2013)
Volume-related ion channels involved in cell survival-death switching. *Bulletin of Siberian Medicine* 12, 54 (10th International Congress : Cell Volume Regulation: Novel Therapeutic Targets & Pharmacological Approaches (CVR2013), August 26-29, 2013, Moscow, Russia)
招待講演

〔図書〕(計1件)

1. 岡田泰伸(監訳者)
丸善、東京

“ギャノング 生理学”(原書 24 版)
(2014)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 泰伸 (Yasunobu Okada)
総合研究大学院大学・学長
研究者番号: 10025661

(2) 研究分担者

沼田 (佐藤) かもり (SATO-NUMATA Kaori)
生理学研究所・細胞器官研究系・研究員
研究者番号: 60614196