

9432 ガラス細管内培養腎尿細管細胞における機械刺激感受性Na, Caチャネルの発現

助成研究者: 河原 克雅 (千葉大学 医学部)

共同研究者: 福田康一郎 (千葉大学 医学部)

研究目的

腎は、摂取食塩量の変動による細胞外液量の変動を是正し、血中Na濃度と体液量を正常値に保っている。腎糸球体濾液中のNaの再吸収量は、体液性(renin-angiotensin-aldosterone系や心房性Na利尿ホルモンの調節)と腎の自動調節機構(血管系、糸球体-尿細管間の機械力を介する)により調節されている。腎尿細管の関与する自動調節能には、濾液の「流れ」から派生するずり応力(shear-stress)と圧力(pressure)の機械力が重要と考えられる。この機械刺激に抗するため、近位曲尿細管の湾曲部外側の基底膜は、湾曲部内側や近位直尿細管の基底膜に比べ肥厚している(電顕所見)。濾液の「流れ」が尿細管細胞の構造・機能の維持に大きな役割を演じていると推測されるが、その細胞膜レベルにおける作用機序には不明の点が多い。

我々は、濾液の「流れ」が尿細管細胞に及ぼす影響の中で、特に重要と思われる以下の2点について、電気生理学的実験法(パッチクランプ法)および共焦点レーザー顕微鏡を使って解析した。

- (1) ガラス細管内培養法の確立と共焦点レーザー顕微鏡像。
- (2) 機械刺激感受性チャネルと細胞骨格との関連。

研究結果

1 ガラス細管内でのA6細胞培養

細管内培養は、通常のプラスチックディッシュやカバーガラス上(シャーレ内)での培養に比べ、接着性に問題はなかったが、細胞の増殖はやや悪かった。

2 カバーガラス小片上で培養されたラット腎髄質内層集合管細胞への機械刺激

培養腎集合管細胞表面にパッチ電極先端で機械刺激を加えると、次の変化が観察された。1) 機械刺激後、核が収縮し徐々に上方に変移した。2) 細胞内および核内Caが増加した。これらの変化は、細胞外液のCaを除去しても同様に観察された。

3 サイトカラシンBと細胞変形

ガラス小片上に培養したA6細胞に、サイトカラシンB(5 $\mu\text{g/ml}$)を灌流すると、5-10分経過後、単一細胞およびコロニー周辺細胞表面に小さな瘤やくびれが多数出現した。また、コロニー中央の細胞間隙が広がり細胞表面の滑らかさが消失した。この瘤やくびれ、細胞間隙の増大はサイトカラシンBを洗い流すと10-20分で消失し、元の滑らかな細胞表面になった。

4 サイトカラシンB灌流中のstretch-activatedチャネル活性

サイトカラシンB灌流中の細胞は、細胞膜の抗張力性が減弱し変形し易くなっているので、ギガシールの成功確率は約30%に低下した。しかし、パッチ電極内陰圧に反応して活性化するチャネルの電気生理学的特性(コンダクタンス、キネティクス、イオン選択性)には、サイトカラシンB投与前に比し、著しい変化は見られなかった。

9432 ガラス細管内培養腎尿細管細胞における機械刺激感受性Na, Caチャネルの発現

助成研究者: 河原 克雅 (千葉大学 医学部)

共同研究者: 福田康一郎 (千葉大学 医学部)

1. 研究目的

体内のナトリウム (Na) はおもに細胞外液中に分布し、その浸透圧成分の大部分 (陽イオンの90%) を占めている。細胞外液の浸透圧はほぼ一定に保たれているから、細胞外液量は経口摂取される食塩量に左右される。腎は、摂取食塩量の変動による細胞外液量の変動を是正し、血中Na濃度と体液量を正常値に保っている。腎糸球体で濾過された濾液中のNaは、尿細管通過中に大部分 (99%) 再吸収される。Naの再吸収量は、体液の恒常性維持に極めて重要な働きをしている renin-angiotensin-aldosterone 系や心房性Na利尿ホルモンにより調節されている。さらに腎は、血管系、糸球体-尿細管間に種々の自動調節機構を持ち、濾液の再吸収量や濾過量を調節している。腎尿細管の関与する自動調節能は、濾液の「流れ」から派生する様々な物理化学的力、中でもずり応力 (shear-stress) と圧力 (pressure) 等の機械的力が重要と考えられる。濾液は、尿細管細胞管腔膜に、濾液自身の持つ粘性と流速に比例する shear-stress を発生し、濾液の管内圧は尿細管細胞を変形させ細胞膜に張力を発生する。例えば、尿細管内静水圧は、セグメント各部により異なるが、ほぼ静脈圧に匹敵し (1)、生ずる shear-stress は、尿細管内径は細いので、動脈内に発生する shear-stress に匹敵する。これらの機械刺激に抗するため、近位曲尿細管の湾曲部外側の基底膜は、湾曲部内側や近位直尿細管の基底膜に比べ肥厚している (電子顕微鏡所見) (2)。このように、濾液の「流れ」が尿細管細胞の構造・機能の維持に大きな役割を演じていると推測されるが、その細胞膜レベルにおける作用機序には不明の点が多い。

我々は、濾液の「流れ」が尿細管細胞に及ぼす影響の中で、特に重要と思われる以下の2点について、電気生理学的実験法 (パッチクランプ法) および共焦点レーザー顕微鏡を使って解析した。

(1) ガラス細管内培養法の確立と共焦点レーザー顕微鏡像。

(2) 機械刺激感受性チャネルと細胞骨格との関連。

さらに、尿細管の受ける機械刺激を、ずり応力 (shear-stress) と管内圧 (pressure) による細胞変形に派生する膜張力 (membrane tension) に分類し考察した。

2. 研究方法

2.1 ガラス細管内培養

エタノール (99.5%) に浸したガラス細管 (径1.5mm, 長さ25mm) を、ピンセットで取上げ小炎の中に投入して滅菌する。滅菌フラスコで継代しているA6細胞 (Xenopus 腎尿細管由来) (3) をトリプシン/EDTAで剥離する。両生類用培養液 (15%超純水を加えたDMEM液、10%FBSを含む) 中に浮遊させたA6細胞 (約 10^3)

細胞/ml)を無菌的にガラス細管につめる。ガラス細管を滅菌シャーレ内で水平に静置し、CO₂インキュベーターの中で数時間放置する。A6細胞がガラス細管内面に接着したことを確認し、シャーレ内に培養液を満たす。この状態で数日培養し、ガラス細管内面に単層のA6細胞のコロニーを形成させる。

A6細胞の培養基質として使用したガラス細管は、滅菌シリコンチューブ、液溜めボトルと結合することにより、無菌的な閉鎖回路を作ることができる。このシリコンチューブ内の培養液を定量送液ポンプで灌流することにより、細管内に層流を作ることができる。ガラス細管の径や灌流液流量を適当に設定することにより、細管内のshear-stressをコントロールすることができる。

2.2 カバーガラス上（シャーレ内）での培養

エタノール（99.5%）に浸したカバーガラス小片（9mm角）をピンセットで取上げ、小炎の中に投入して滅菌する。このガラス小片を、滅菌シャーレの底に置く。新生児ラット腎髄質内層部を単離し、0.5%コラゲナーゼ液で約20分（33℃）酵素処理し、小ハサミで小片に刻む。培養液で数回リンス後、軽く遠心し（800r.p.m.）、単離集合管を含む細胞のペレットを得る。これを培養液（DMEM液、10%FBSを含む）中に浮遊させ、ガラス小片の上（シャーレ内）に播種する。CO₂インキュベーターの中で短時間培養し（6-24時間）、ガラス小片表面に腎集合管初代培養細胞のコロニー（20-40細胞、単層）を形成させる。

2.3 Ca蛍光指示薬 fluo-3 の細胞負荷

Fluo3-AM（2.5 μM）を含む哺乳類 HEPES 標準液（in mM）（140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 5.5 D-glucose, 1 Na-pyruvate, pH=7.4）に、培養腎集合管細胞を（ガラス小片と共に）移し、室温で約40分負荷する。fluo3-AM を含まないHEPES標準液で3回リンスし、細胞内Ca依存性の蛍光強度変化を測定する。励起波長488nm、測定波長530nm。

2.4 パッチ電極先端による機械刺激

パッチ電極による機械刺激は、引伸ばし（stretching）、突き（prodding）、擦り（rubbing）に分類される（4）。腎髄質集合管細胞表面に加えられる機械刺激の定量化は現実的でなかったが、細胞圧迫によるパッチ電極抵抗の変化を、約40%減少にとどめた（5）。この機械刺激により細胞膜が断裂していないことは、細胞に負荷されたfluo-3の蛍光量で確認することができた。細胞膜が断裂した場合、細胞内蛍光は激減し、バックグラウンドと同じレベルになった。

2.5 共焦点レーザー顕微鏡

ガラス細管およびガラス小片上に培養した腎尿細管細胞の微分干渉像およびCa蛍光像は、共焦点レーザー顕微鏡（LSM410およびAxiovert135M）により行った。油浸対物レンズ（x63）の焦点距離は短かったため（300 μm以下）、肉薄のガラス管を培養基質として使用した。観察時には、ガラス細管内培養液を両生類HEPES標準液（in mM）（120 NaCl, 3 KCl, 0.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 5.5 D-glucose, 1 Na-pyruvate, pH=7.6）に置換した。

2.6 パッチクランプ法

パッチ電極は、ヘマトクリット毛細管（テルモ）を使用し、Neherらの開発・改良した一般的方法に従って作った（6）。ギガシール形成後、stretch-activated イオンチャ

ネルの電気生理学的特性、例えば単一チャネルコンダタンス、イオン選択性、張力チャネル活性等を、記録・解析した（日本光電CEZ2300）。stretch-activated チャネル活性は、サイトカラシンB投与前（コントロール）と投与後と比較した。

3. 研究結果

3.1 ガラス細管内でのA6細胞培養

細管内培養は、通常のプラスチックディッシュやカバーガラス上（シャーレ内）での培養に比べ、接着性に問題はなかったが、細胞の増殖はやや悪かった。Fig.1 は、ガラス細管内に形成された単層のコロニーを、最も歪みの小さい条件で観察したものである。A6細胞の分裂・増殖によって形成されたコロニー中央は多面形状を呈したが、多くの細胞は紡錘形であった。ガラス細管断面は曲線なので、中央から離れるにしたがい焦点面からのずれの影響とガラス管壁の曲面により光路がまがる影響が大きくなり、微分干渉像に歪みがみられた。

今回の研究期間中に、A6細胞がガラス細管内で増殖することを確認した。さらに、静置している培養液に「流れ」を作るため、定量送液ポンプをCO₂インキュベーターの中に導入した。しかし、定量送液ポンプは庫内に予想以上の熱を発生させ（恐らくモーターの熱）、培養環境を26-28℃に保つことは不可能になった。

3.2 カバーガラス小片上で培養された腎髄質集合管細胞への機械刺激

培養腎集合管細胞表面にパッチ電極先端で機械刺激を加えると、次の二つの変化が観察された。1) 機械刺激後、核が収縮し徐々に上方に変移した（位相差顕微鏡像（図の表示なし）と共焦点レーザー顕微鏡微分干渉像（Fig. 2, upper））。核の収縮と上方変移との間には、明らかな時間のずれが存在し、両者の反応には異なる細胞内メカニズムが働いていると考えられた。2) 細胞内および核内Caが増加した（共焦点レーザー顕微鏡におけるCa蛍光像（Fig. 2, lower））。細胞質内・核内Caは、刺激前は共に低く、細胞質-核の境界は不明瞭であった。刺激後、核内Caの増加は、細胞質のCa増加を上回り、円形の白い核の領域が明らかになった。これらの変化は、細胞外液のCaを除去しても同様に観察された。

機械刺激後の細胞質内・核内Caの時間経過を Fig. 3 に示した。

3.3 サイトカラシンBと細胞変形

サイトカラシンBは、細胞骨格(microfilamentを可逆的に脱重合)を破壊することが知られている。ガラス小片上に培養したA6細胞に、サイトカラシンB(5 μg/ml)を灌流すると、5-10分経過後、単一細胞およびコロニー周辺細胞表面に小さな瘤やくびれが多数出現した。また、コロニー中央の細胞間隙が広がり細胞表面の滑らかさが消失した。この瘤やくびれ、細胞間隙の増大はサイトカラシンBを洗い流すと10-20分で消失し、元の滑らかな細胞表面になった（Fig.4a）。このことは、サイトカラシンBが可逆的に細胞骨格を阻害し細胞変形をひき起こしたこと、断裂の激しい部分の細胞膜にブラを形成したことを示唆する。

3.4 サイトカラシンB灌流中のstretch-activated チャネル活性

サイトカラシンBは、細胞骨格を破壊するので、膜張力を感知するstretch-activated チャネル活性に影響すると考えられる(7)。サイトカラシンB灌流中の細胞は、細胞膜の抗張力性が減弱し変形し易くなっているため、ギガシールの成功確率は約30%に低下した。しかし、パッチ電極内陰圧に反応して活性化されるチャネルの電気

生理学的特性（コンダクタンス、キネティクス、イオン選択性）には、サイトカリンB投与前に比し、著しい変化は見られなかった（Fig.4b）。しかし、パッチ電極内陰圧を解放（0気圧）した後も、チャネル活性が持続したので、細胞膜（細胞骨格に裏打ちされた細胞膜）のもつ復元性が消失し、パッチ電極内での細胞膜変形が残存した（stretch-activated チャネル蛋白局所のパッチ膜に張力が残った）と考えられた。

4. 考察

4.1 ガラス細管内に導入されたA6細胞は、細管内面に接着し、増殖した。2-3日の培養期間では、「ガラス管の長軸方向に成長が促進され、曲面方向の成長が抑制を受ける」ような事は、観察されなかった。また、あるコロニーに対して、側面や対側面（天井面）にもコロニーが存在し、（培養期間中、重力の方向が接触面に対して必ずしも鉛直でなかったにも拘わらず）その形状に大きな違いがみられなかった。このことは、一度ガラス内面に接着した細胞は、接着面でのガラス面-細胞表面相互作用がその後の分裂・増殖に大きく影響したことを示唆する。

血管内皮細胞は、流れのない培養条件では一定の方向を持たないで分裂・増殖するが（8）、流れのある培養条件では流れの方向に細胞の長軸が揃うことが知られている（8、9）。このことは、細胞表面に加えられた機械刺激が何らかの細胞内情報系を通して、細胞骨格の構造を可逆的に組替えていることを示唆する。

細胞に加えられた機械刺激が、ある種の遺伝子（c-jun等）を早期に発現することが知られている。しかし、既知のstretch-activated チャネルや細胞骨格は、その伝達経路として無効であることが心筋細胞で示された（10）。本実験では、細胞膜の機械刺激が細胞外液Caに非依存性に核内Caを増加させており、一過性の核内Ca増加が早期遺伝子発現の伝達路の一部である可能性を肯定する。

4.2 Shear-stress と膜張力の違い

糸球体濾液は、細い尿細管の中を流れるので、必然的に二種類の機械的力、ずり応力と圧力を尿細管細胞に及ぼす。濾液流量が大きく、蛇行している近位曲尿細管には、構造的にずり応力の影響が、結石や奇形で濾液の流れが悪くなっている尿細管部分の上流には圧力の影響が大きいと考えられる。糸球体濾液の「流れ」によるずり応力（ T' ）は、次の式で計算される。

$$T' = 4\mu Q/\pi r^3$$

μ : 糸球体濾液の粘性, Q : 濾液流量, r : 尿細管の半径。ラット近位尿細管の標準的な値 $\mu=0.0085 \text{ dyn}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$, $Q=0.5 \text{ nl}/\text{s}$, $r=8 \mu\text{m}$ を代入すると $T'=11 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ になる。この数値は、大動脈内部に発生するshear-stress に匹敵し、静脈系(2-6 dyn/cm^2)より大きい。

5. 今後の課題

5.1. ガラス細管内培養法は、「流れ」の機械的刺激効果を研究する目的において、均一な層流を作ることができるので、円形ディッシュ培養におけるスクリュウ法より優れている。しかし、定量送液ポンプの発熱は予想以上で、数日間の培養期間中、細胞に流れを継続して加えることができなかった。A6細胞の培養環境を26-28°Cに保つためには、冷蔵機能を持っている低温培養装置が必要であった。

5.2 共焦点レーザー顕微鏡の冷却装置の発する振動は、パッチ電極先端を共振させ細胞膜を断裂させた。このため、別の顕微鏡下で電極による機械刺激を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察するという手順を踏まざるを得なかった。本研究では、「刺激と観察」を同一顕微鏡下で連続して行えず、刺激直後の貴重な画像を記録することができなかった。

5.3 サイトカラシンBを灌流した細胞は、細胞が変形し、ギガシールを困難にした。stretch-activatedチャネルに対するサイトカラシンBの脱重合効果を、精密に調べるには、ギガシール形成後にサイトカラシンBを局所に灌流し、同一のstretch-activatedチャネルで薬物の効果を比較するような工夫が必要であった。

6. 文献

1. Sanjana, V.M., Johnston, P.A., Deen, W.M., Robertson, C.R., Brenner, B.M., and Jamison (1975) Hydraulic and oncotic pressure measurements in inner medulla of mammalian kidney. *Am J. Physiol.* 228: 1921-1926
2. Hijikata, T. and Sakai, T. (1991) Structural heterogeneity of the basement membrane in the rat proximal tubule. *Cell Tissue Res.* 266: 11-22
3. Kawahara, K. and Matsuzaki, K. (1992) Activation of calcium channel by shear-stress in cultured renal distal tubule cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 198-205
4. Morris, C.E. and Horn, R. (1991) Failure to elicit neuronal macroscopic mechanosensitive currents anticipated by single-channel studies. *Science* 251: 1246-1249
5. Kawahara, K., Onodera, M., and Fukuda, Y. (1994) A simple method for continuous measurement of cell height during a volume change in a single A6 cell. *Jpn. J. Physiol.* 44: 411-419
6. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391: 85-100
7. Sachs, F. (1987) Baroreceptor mechanisms at the cellular level. *Federation Proc.* 46: 12-16
8. Ando, J., Nomura, H., and Kamiya, A. (1987) The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc. Res.* 33: 62-70
9. Yoshizumi, M., Kirihara, H., Sugiyama, T., Takaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T., Yazaki, Y. (1989) Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161: 859-864
10. Sadoshima, J., Takahashi, T., Jahn, L., Izumo, S. (1992) Role of mechano-sensitive ion channels, cytoskeleton, and contractile activity in stretch-induced immediate-early gene expression and hypertrophy of cardiac myocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 89: 9905-9909

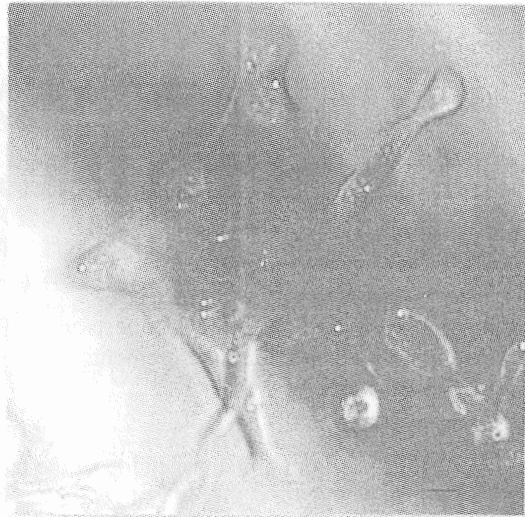


Fig. 1 Photomicrograph of A6 cells cultured in a glass micropipette, viewed by laser scanning differential-interference-contrast microscopy. The shining corner is due to a curved surface of the tube. A bar indicates 10 μm .

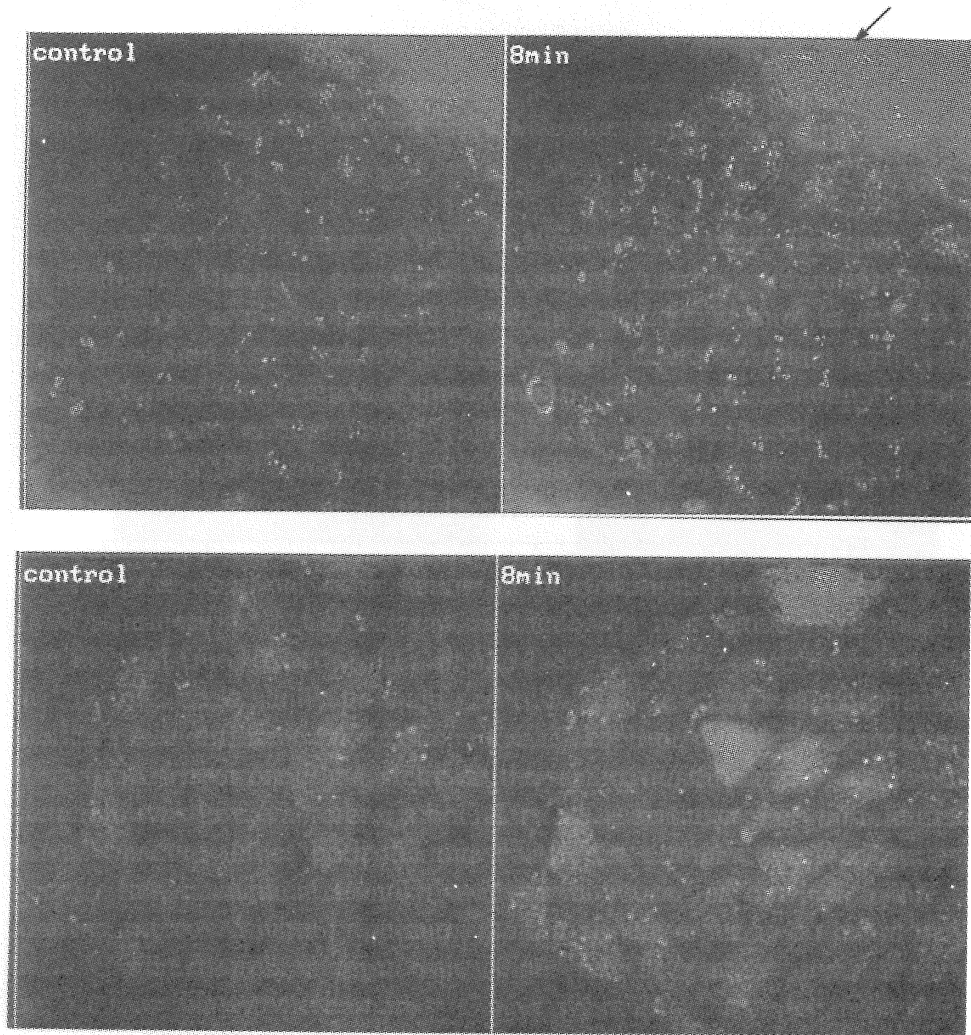


Fig. 2 Nuclear changes in neonatal rat IMCD cells after mechanical stress by a tip of the patch-pipette. Upper panels (differential-interference-contrast microscopy): the upper shift of nucleus at 8 min (arrows and double arrows). Lower panels (fluo3 fluorescence viewed by confocal laser scanning microscopy): the same colony. Increase in nuclear calcium (white) after mechanical stimulation.

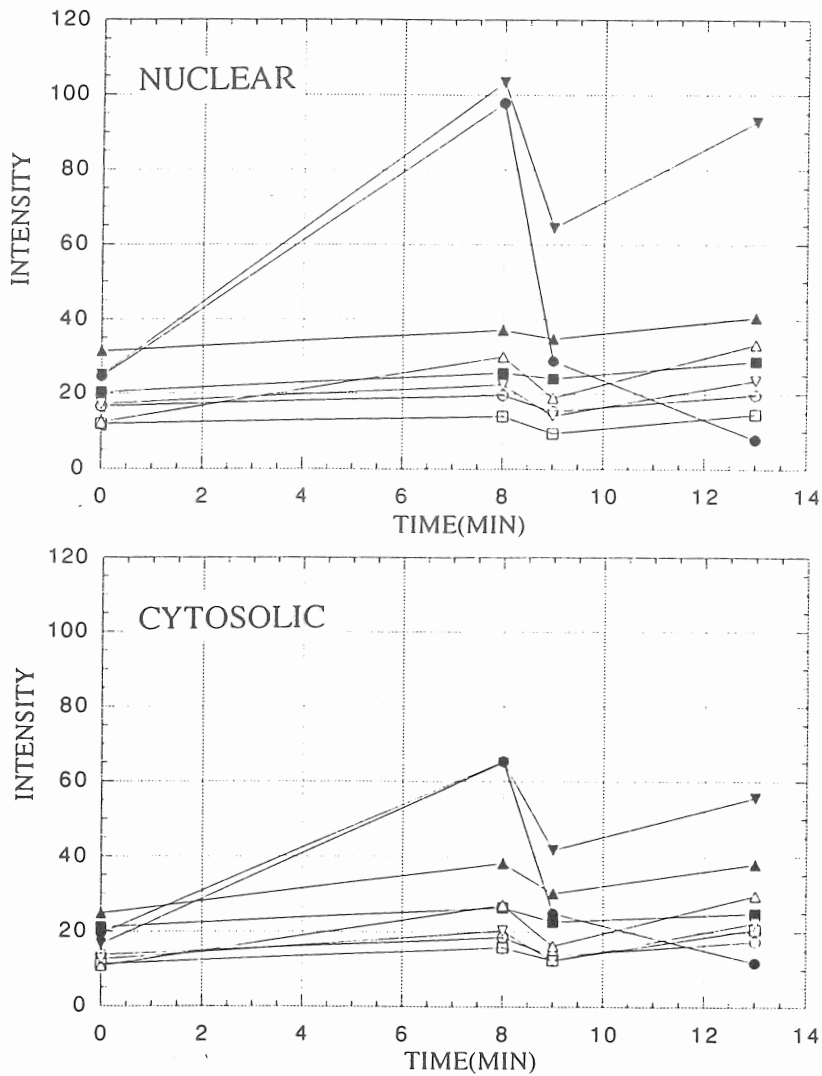


Fig. 3 Nuclear and cytosolic calcium changes in rat IMCD cells after mechanical stimulation. Note that nuclear calcium was higher than cytosolic calcium during stimulation. The same symbols indicate the same cells.

Mechanosensitive Na and Ca permeable ion channels in renal tubule cells cultured in a glass micropipette.

Katsumasa Kawahara and Yasuichiro Fukuda

Department of Physiology, Chiba University School of Medicine

Summary

Cells from the A6 line derived from *Xenopus* kidney were cultured in a glass micropipette. The cells suspended in a culture medium (about 10^3 /ml) were seeded in a glass micropipette (1.5 mm in diameter, 25 mm in length). Photograph of a monolayer colony of the A6 cells could be taken by laser scanning differential-interference-contrast microscopy. Second, neonatal rat kidney inner medullary collecting duct (IMCD) cells were cultured on a glass cover slip in a DMEM/F12 medium containing 10% FBS for a short period (6-24 hrs). In order to study a role of the mechanosensitive ion channels for the spread of intracellular calcium, we measured fluorescence intensity (fluo3) of the cells with the confocal laser scanning microscope, before and after mechanical stimulation. IMCD cells were incubated in a standard solution containing $2.5 \mu\text{M}$ fluo3-AM for 40 min at 24-26 °C. The surface membranes of the IMCD cells were gently prodded and rubbed by a tip of a patch-pipette under another phase difference microscope to avoid cell membrane damage due to vibration from a laser cooling system. At the resting condition, cytosolic and nuclear calcium was low. Therefore, a boundary between the cytoplasm and the nucleus was obscure under both the phase-difference and the fluorescence microscope. After mechanical stimulation the nucleus shrank by 50% in area and its density increased within a minute; then, it slowly moved up toward the apical surface. The fluorescence intensity (index for Ca concentration) of the shrunken nucleus was always increased and was higher than that of the cytoplasm. The ratios of the intensities between in the nucleoplasm and cytoplasm were increased from 1.1 to 1.5. Similar results were also obtained in a zero calcium solution containing $100 \mu\text{M}$ EGTA. These results indicate that nuclear calcium may be independent of the cytoplasm calcium, and suggest that the nuclear envelope may be a source of calcium for the nucleoplasm. Activation of the Ca-permeable mechanosensitive ion channels may not be required to control gene expression.