
助成研究報告書

医学プロジェクト研究

(2008－2010年度)

生体における K^+ 輸送とその制御機構

Regulatory Mechanism of K^+ Transport in the Body

The Salt Science Research Foundation
Project Research Report

平成24年3月



公益財団法人
ソルト・サイエンス研究財団

プロジェクト研究報告書 目次

医学分野

08C-10C 生体における K^+ 輸送とその制御機構

1	はじめに 森田 啓之 (岐阜大学)	1
2	腸管での K^+ 吸収・排泄機構とその制御 (08C1 - 10C1) 桑原 厚和 (静岡県立大学)	3
3	腎遠位尿細管 K^+ チャネルの機能発現制御機構の解明 (08C2 - 10C2) 種本 雅之 (帝京大学)	21
4	腎尿細管の K^+ 分泌と K^+ チャネル (08C3 - 10C3) 河原 克雅 (北里大学)	33
5	カリウム過剰摂取によるインスリン抵抗性改善作用とその作用機序の解明についての研究 (08C4 - 10C4) 佐藤 博亮 (福島県立医科大学)	41
6	膵 β 細胞における K_v チャネルによるインスリン分泌制御機構の解明 (08C5 - 10C5) 出崎 克也 (自治医科大学)	55
7	電位依存性及びカルシウム活性化カリウムチャネルの多様な生理機能と病態的意義 (08C6 - 10C6) 大矢 進 (名古屋市立大学)	67
8	まとめ 森田 啓之 (岐阜大学)	87

CONTENTS

PROJECT RESEARCHES OF MEDICAL SCIENSE

08C - 10C Regulatory Mechanism of K⁺ Transport in the Body

1	Introduction	
	Hironobu Morita (Gifu University)	2
2	Regulatory Mechanisms of K ⁺ Absorption/Secretion in the Gut (08C1 - 10C1)	
	Atsukazu Kuwahara (University of Shizuoka)	20
3	Mechanism for Functional Expression of the Distal Renal Tubular K ⁺ Channels (08C2 - 10C2)	
	Masayuki Tanemoto (Teikyo University)	32
4	K ⁺ Secretion through K ⁺ Channels along the Kidney Nephron (08C3 - 10C3)	
	Katsumasa Kawahara (Kitasato University)	40
5	The Mechanisms by which Excessive Potassium Intake Improves Insulin Resistance (08C4 - 10C4)	
	Hiroaki Satoh (Fukushima Medical University)	53
6	Physiological Role of Kv Channels in the Insulin Secretion from Islet β -Cells (08C5 - 10C5)	
	Katsuya Dezaki (Jichi Medical University)	66
7	Physiological and Pathophysiological Roles of Voltage-Gated and Ca ²⁺ -Activated K ⁺ Channels (08C6 - 10C6)	
	Susumu Ohya (Nagoya City University)	86
8	Conclusion	
	Hironobu Morita (Gifu University)	88

はじめに

森田 啓之

岐阜大学大学院医学系研究科

K^+ は人体に不可欠なイオンであり、細胞内の主要な陽イオンとして細胞容積調節、細胞内 pH 調節、神経・筋肉の興奮性の決定等に関わっている。通常、1 日 70~100 mmol の K^+ が経口摂取され、大部分は小腸において受動輸送により吸収される。一方、過剰な K^+ は主として尿中に排泄されるが、糞便中への排泄も見られる。特に、大腸には K^+ 吸収と排泄の両方の機序が存在することが知られており、腸管への排泄も何らかの意味を持つと考えられている。

細胞外液の K^+ 濃度は 3.5~4.5 mmol/l 程度と細胞内に比べ非常に低い。しかし、細胞外液の K^+ 濃度変化は生体にとり重篤な結果を引き起こすため、細胞外液濃度は厳密に保たれている。そのためには、腸管での吸収・分泌、腎臓での排泄を調節するばかりでなく、細胞内外での K^+ 移動を調節することも重要になる。このように、生体の K^+ 制御は多くの機構が互いに関連し合い、生体への出入りと細胞内外の移動を調節することにより、達成される。また、 K^+ チャネルは、筋収縮、神経伝達物質放出、ホルモン分泌、細胞増殖等の多様な生理機能において重要な役割を果たしている。従って、生体での K^+ 制御を解明するためには、これらの機構がどのように関連しているかを明確にする必要がある。このような観点から以下の 6 つのサブテーマで 2007 年に研究を公募した。

- 1) 腸管での吸収・排泄機構とその制御
- 2) 腎臓での排泄機構とその制御
- 3) 中枢性の制御
- 4) 細胞内外の移動による細胞機能制御

5) K^+ による細胞機能制御

6) その他

審査の結果、以下の研究が採択され、2008~2010 年の 3 年間に及ぶプロジェクト研究成果が提出された。

1. 腸管での K^+ 吸収・排泄機構とその制御
静岡県立大学環境科学研究所・教授
桑原 厚和
2. 腎遠位尿細管 K^+ チャネルの機能発現制御機構の解明
帝京大学医学部・准教授
種本 雅之
3. 腎尿細管の K^+ 分泌と K^+ チャネル
北里大学医学部・教授
河原 克雅
4. カリウム過剰摂取によるインスリン抵抗性改善作用とその作用機序の解明についての研究
福島県立医科大学・准教授
佐藤 博亮
5. 膵 β 細胞における K_v チャネルによるインスリン分泌制御機構の解明
自治医科大学医学部・准教授
出崎 克也
6. 電位依存性及びカルシウム活性化カリウムチャネルの多様な生理機能と病態的意義
名古屋市立大学大学院薬学研究所・准教授
大矢 進

Introduction

Hironobu Morita, MD & PhD

Gifu University, Graduate School of Medicine

Extracellular K^+ concentration is tightly regulated in mammals, because this is critical for normal membrane potentials and cell function. Extracellular K^+ homeostasis depends on the total body K^+ content and distribution of K^+ between intracellular and extracellular spaces. Total body K^+ content is maintained by a continuous balance between dietary intake and excretion of K^+ ($(K^+ \text{ intake} - K^+ \text{ excretion})$). Orally intaken K^+ (70-100 mmol/day) is absorbed at the intestine. The kidney is the main excretory pathway and responsible for ~90% of K^+ excretion; the residual 10% is excreted to feces. The kidney has a remarkable capacity to regulate K^+ excretion to match K^+ intake; thus the kidney play a predominant role in the maintenance of K^+ balance. However, in some clinical cases, ex. renal failure, a relative importance of the intestine in K^+ balance becomes greater. In addition, extrarenal tissues provide K^+ buffering capacity by shifting K^+ between intracellular and extracellular spaces, which is critically important in the acute regulation of extracellular K^+ . Furthermore, K^+ channels play an important role in many physiological events, such as muscle contraction, release of neurotransmitters and hormones, and cell proliferation. Thus, dysfunction of K^+ channels leads to serious consequences. Accordingly, to understand K^+ regulation in the body, following six themes were adopted and the 3-year project started at 2008.

1. Regulatory Mechanisms of K^+ Absorption/Secretion in the Gut
University of Shizuoka, Professor, Atsukazu Kuwahara
2. Mechanism for Functional Expression of the Distal Renal Tubular K^+ Channels
Teikyo University School of Medicine, Associate Professor, Masayuki Tanemoto
3. K^+ Secretion through K^+ Channels along the Kidney Nephron
Kitasato University School of Medicine, Professor, Katsumasa Kawahara
4. The Mechanisms by which Excessive Potassium Intake Improves Insulin Resistance
Fukushima Medical University, Associate Professor, Hiroaki Satoh
5. Physiological Role of K_v Channels in the Insulin Secretion from Islet β -Cells
Jichi Medical University, Associate Professor, Katsuya Dezaki
6. Physiological and Pathophysiological Roles of Voltage-Gated and Ca^{2+} -Activated K^+ Channels
Nagoya City University, Associate Professor, Susumu Ohya

腸管での K^+ 吸収・排泄機構とその制御

桑原 厚和, 唐木 晋一郎, 加治 いずみ

静岡県立大学環境科学研究所

概要 消化管の粘膜上皮には、消化により産生された化学物質や栄養素としてのアミノ酸、脂肪酸、糖など、さらには管腔内に放出される消化管ホルモンなどの化学物質を感知する化学物質受容センサーの存在が示唆されている。特に大腸においては、管腔内の常在菌により食物繊維から産生される短鎖脂肪酸が大腸粘膜を刺激し、蠕動・分泌反射を惹起することがラット大腸において報告されている。本研究では、大腸において短鎖脂肪酸により誘発される K^+ 分泌に注目し、腸管での K^+ 吸収・分泌機構について Ussing chamber を用いた短絡電流法および免疫組織化学的手法により解析を行った。

まず、大腸がん摘出手術により摘出した S 状結腸を用いて Ussing chamber 法により K^+ 電流の解析を行った。その結果、酢酸、プロピオン酸、酪酸は、 10^{-3} M 以上の濃度で、濃度依存的な漿膜側→粘膜側の電流(負の短絡電流変化)、および膜コンダクタンスの上昇が測定された。50 mM のプロピオン酸によって誘発される反応は、 $BaCl_2$ (30 mM) および TEA (30 mM) によって抑制されたことから、短鎖脂肪酸による短絡電流変化は K^+ 分泌であることが示唆された。次に、免疫組織化学的手法により、2 種の Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル、BK および IK チャネルが、陰窩細胞の頂端膜に明確に局在している所見を初めて得た。したがって、S 状結腸においては BK チャネルと IK チャネルの両方が起電的 K^+ 分泌に関与している可能性がある。同様の実験をラット大腸を用いて行い、ラットでは大腸の部位によりイオン輸送に違いがあることを明らかにした。すなわち、遠位結腸においてのみ正の短絡電流変化の前にヒトと同様、負の短絡電流変化が観察されたが、この負の短絡電流の変化はラットでも TEA (10 mM) により減少したため、遠位結腸ではプロピオン酸により K^+ 分泌が誘発されることが示唆された。

一般的に哺乳類の大腸ではアドレナリンの刺激により cAMP 濃度の上昇を介した K^+ 分泌が誘発されることが知られている。そこで、本研究においても内因性のリガンドであるアドレナリン刺激により誘発される K^+ 分泌について大腸各部位を用いて検討した。その結果、アドレナリンあるいはノルアドレナリン (5 μ M) の血管側への投与は、遠位結腸及び直腸で明瞭な K^+ 分泌と思われる負の短絡電流変化を誘発し、この K^+ 分泌には α_1 、 β_2 及び β_3 の関与が示唆された。

最後に、経口 K^+ 負荷ラット組織における短鎖脂肪酸誘発性 K^+ 分泌を検討した。 K^+ 負荷によって直腸および遠位結腸における定常的な K^+ 分泌は亢進したが、このような組織でもプロピオン酸誘発性 K^+ 分泌レベルは対照群と差がなかった。しかし正の短絡電流増加量が対照群と比べて有意に低下していたことから、正味の K^+ 分泌量は K^+ 負荷によって増加したと考えられ、高カリウム血症が起きている場合でも、大腸粘膜への短鎖脂肪酸の投与によって積極的な K^+ 分泌を誘発できる可能性が示唆され、大腸下部を標的とした短鎖脂肪酸による K^+ 排泄が、高カリウム血症の治療に利用できる可能性が示唆された。

1. 研究の背景と目的

消化管の粘膜上皮には、消化により産生された化学物質や栄養素としてのアミノ酸、脂肪酸、糖など、さらには管

腔内に放出される消化管ホルモンなどの化学物質を感知する化学物質受容センサーの存在が示唆されている⁽¹⁶⁾。特に大腸においては、管腔内の常在菌により食物繊維か

ら産生される短鎖脂肪酸が大腸粘膜を刺激し、蠕動^(17,21)・分泌⁽²²⁾反射を惹起することがラット大腸において報告されている。我々は、モルモット遠位結腸においてもプロピオン酸による分泌反射が存在し^(11,12)、水分泌の機構である Cl⁻ 分泌と共に、K⁺ 分泌も惹起されている可能性を示唆した^(13,14)。さらに最近、ヒト結腸においても、短鎖脂肪酸によって K⁺ 分泌が惹起される可能性を見出した⁽¹⁵⁾。しかしこれまで、短鎖脂肪酸によって誘発される K⁺ 分泌については注目されず、詳細な解析もなされていなかった。そこで本研究では、大腸において短鎖脂肪酸により誘発される K⁺ 分泌に注目し、腸管での K⁺ 吸収・分泌機構について Ussing chamber を用いた短絡電流法および免疫組織化学的手法により解析を行った。

2. 研究方法

2.1 結腸組織

ラット: Wistar 系および SD 雄性ラットを日本 SLC 株式会社より購入し静岡県立大学実験動物センターにおいて飼育した。動物の飼育および屠殺にあたっては、事前に静岡県立大学動物実験センター運営委員会に実験計画書を提出して実験計画の承認を受け、「静岡県立大学における動物実験に関する指針」に基づいて行った。

ヒト S 状結腸標本: 静岡済生会病院において、大腸がん摘出手術により摘出した S 状結腸の病巣周辺から、正常組織部分を提供していただいた。なお、組織の提供にあたっては静岡済生会病院および静岡県立大学の倫理委員会の承認を得ている。また、執刀医により、組織提供のインフォームドコンセントと同意書を患者本人からいただいた。摘出後、検体を可能な限り速やかに 95%O₂/5%CO₂ ガスで飽和した氷冷 Krebs-Ringer 液に浸漬し、静岡県立大学の環境生理学研究室に輸送した。

2.2 短絡電流法

ラットをジエチルエーテル麻酔後、断頭し、放血と殺した後開腹し、盲腸を除く大腸全体を摘出し、速やかに氷冷した Krebs-Ringer 液中に移した。その後、大腸を解剖学的基準により近位結腸、中位結腸、遠位結腸および直腸に分け、それぞれの部位を実体顕微鏡下で輪走筋及び縦走筋層を剥離し、粘膜下神経叢を含む粘膜-粘膜下組織標本作製した。作製したラット大腸粘膜-粘膜下組織標本を測定面積 0.64 cm² の Ussing chamber

(CHM2, WPI, FL, USA) に装着し、粘膜側、血管側共に 37°C の Krebs-Ringer 液 (117 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂ および 11 mM glucose) を 10 mL ずつ循環させ、95%O₂-5%CO₂ 混合ガスを曝気し pH を 7.4 に維持した。電位差および短絡電流 short-circuit current (I_{sc}) 測定には銀-塩化銀電極を用い、グルコース非添加の Krebs-Ringer 液を 4% の寒天で固めた塩橋を介して短絡電流測定用アンプ (CEZ-9100, 日本光電, 東京) に接続した。電気刺激用の電極はアルミホイルを利用して作製し、標本の周囲に標本と共に装着した。標本の粘膜側-血管側間に生じる電位差は常時 0 mV に固定し、 I_{sc} を感熱式記録計 (Recti-Horitz-8K, 日本電気三栄, 東京) に記録すると同時に MacLab System (Power Lab 4/26, ADInstrument, Castle Hill, Australia) を用いてコンピューターに記録した。また、1 分毎に 3 秒間、10 mV のコマンドパルスを標本に与え、短絡電流の変化量から膜コンダクタンス (G_t) を算出した。Ussing chamber に標本を装着してから 1-1.5 時間後、basal I_{sc} および G_t が安定したところで粘膜下神経に電気刺激 (25 V, duration of 0.5 ms, 5 Hz, 120 s) を行い、組織の状態を確認した。実験は、電気刺激による I_{sc} や G_t の上昇が再び基線に戻った後に開始した。ヒト大腸標本においても同様な方法により粘膜-粘膜下組織標本作製し、Ussing chamber に装着した。

2.3 免疫組織化学

検体を Zamboni 固定液 (2% PFA, 0.2% ピクリン酸 PB) に浸漬し、4°C で一晩固定した。固定された組織を PBS で洗浄 (10 min × 3) し、30% ショ糖 PBS (0.1% アジ化ナトリウム) に浸漬し、一晩以上 4°C で保存し、クリオプロテクションを行った。クリオプロテクションされた組織を O.C.T.-コンパウンドに包埋し、液体窒素で凍結させ、クリオスタットで厚さ 10 μm に薄切した。スライドガラスに貼り付けた切片を PBS で洗浄 (10 min × 3) した後、10% ロバ正常血清、1% Triton X-100、0.1% アジ化ナトリウム PBS に室温で 1 時間浸漬しプレブロックした。ヤギ抗 BK チャネル抗体 (sc-14746, SantaCruz) およびヤギ抗 IK チャネル抗体 (sc-27080, SantaCruz) を 0.3% Triton X-100、0.1% アジ化ナトリウム PBS にそれぞれ 1:50 で希釈した一次抗体で、切片を一晩 4°C で反応させた。一次反応させた切片を PBS で洗浄 (10 min × 3) し、二次抗体 (Alexa594 標識ロバ

抗ヤギ IgG 1 : 500) と DAPI 溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を室温で 1 時間反応させた。切片を PBS で洗浄 (10 min \times 3) し、マウンティング・メディアム (Dako) 中、カバーガラスをかけ、マニキュアで封入した。蛍光顕微鏡 (IX-70, オリンパス) で標本を観察し、冷却 CCD カメラ (AxioCam, Zeiss, Göttingen, Germany) で撮影、画像をコンピューターに取り込み、解析した (AxioVision, Zeiss, Göttingen, Germany)。

2. 4 高カリウム負荷ラットの作製

本実験では、高カリウム負荷餌の既報^(2,5,10)と比較するため、SD ラットを使用した。ラット購入後 4~7 日間の順化期間をおき、通常餌 (1% K^+) または K^+ 負荷餌 (10% K^+ , オリエンタル酵母) を自由摂食・飲水させた。 K^+ 負荷餌の配合は 100 g 当たりカゼイン 20 g, L-シスチン 0.3 g, コーンスターチ 21.1 g, α コーンスターチ 13.2 g, ショ糖 10 g, 大豆油 7 g, セルロースパウダー 5 g, AIN93G ミネラル 3.5 g, AIN93 ビタミン 1 g, 重酒石酸コリン 0.25 g, 第三ブチルヒドロキノン 0.0014 g, 塩化ナトリウム 0.229 g, 塩化カリウム 18.38 g とし、通常餌と同様のペレット状で与えた。 K^+ 負荷餌の摂餌期間は、摂餌量・体重増加曲線が通常餌を与えた場合と同レベルになる 14 日~18 日間とした。飼育室は、8 時から 20 時までを明期、20 時から翌 8 時までを暗期とする 12 時間の明暗条件下で飼育した。

短絡電流測定のための標本作製方法は上述のとおりであるが、ホルモン等の日内変動による影響を除くため、動物の解剖は午前 9 時 30 分から 9 時 45 分の間に行った。

血中 K^+ 及びアルドステロン濃度

ラットを断頭後、直ちに頸血 (全血) を HORIBA コンパクトイオンメーターに一滴のせ、 K^+ 濃度を測定した。また、頸部より血液をヘパリン入りのトレイに採取し、遠心 (3000 rpm, 4°C) によって血漿を得、-80 度に凍結保存した。全てのサンプルを収集後、一度に解凍し、Aldosterone EIA Kit (Enzo Life Sciences Int'l Inc., Plymouth Meeting, PA, USA) を用いてアルドステロン濃度を測定した。

統計

対照群 (通常餌) と K^+ 負荷群の結果を比較する際は、unpaired *t*-test を用いた。片側または両側検定の選択は、解析したデータの特性によった。チャンネル阻害剤の効果を検討する際、3 群以上の場合は Dunnett test または Bonferroni 補正を用いた。危険率 95% 以上 ($P \leq 0.05$) を有

意差ありとした。

3. 研究結果

3. 1 短鎖脂肪酸刺激により誘発される短絡電流の変化

3. 1. 1 ヒト S 状結腸粘膜-粘膜下組織標本における短鎖脂肪酸により誘発される短絡電流の変化

まず初めに、ヒト手術摘出組織がどのような電気生理学的特性を有するかを検討したのち実験に供した。組織をチャンバーに装着し、電圧固定した直後の I_{sc} は 100 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 程度であるが、徐々に減少し、1 時間後には、 $4.33 \pm 10.89 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n=16$) にまで減少した。この時の G_T は、 $8.92 \pm 0.78 \text{ mS}/\text{cm}^2$, PD は $-1.24 \pm 1.26 \text{ mV}$ であった。装着 2 時間から 3 時間後から、逆に上昇傾向に変化する標本が多かったが、最も安定していた装着後 1 時間 30 分から 2 時間 30 分の間に実験を行った。

ヒト S 状結腸粘膜-粘膜下組織標本の粘膜側に、酢酸、プロピオン酸、酪酸をそれぞれ、 $10^{-4} \text{ M} - 5 \times 10^{-2} \text{ M}$ 累加的に投与した。Figure 1A にプロピオン酸投与による短絡電流変化を示す。各短鎖脂肪酸 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ による ΔI_{sc} は、 $-20.79 \pm 11.60 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (酢酸)、 $-35.54 \pm 29.90 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (プロピオン酸)、 $-41.49 \pm 21.80 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (酪酸)、 ΔG_T は、 $2.11 \pm 1.22 \text{ mS}/\text{cm}^2$ (酢酸)、 $2.33 \pm 1.09 \text{ mS}/\text{cm}^2$ (プロピオン酸)、 $2.54 \pm 1.13 \text{ mS}/\text{cm}^2$ (酪酸) であった。また、 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ においても最大反応には達しなかった。しかし、酢酸、プロピオン酸 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ 投与によって、 I_{sc} は減少後、逆に上昇に転ずる場合があり、 10^{-1} M 投与では、ほとんどの場合 I_{sc} の上昇が観測された。NaCl や Na-gluconate 投与によっても同様の現象が観察されることから、高濃度の短鎖脂肪酸投与時 ($> 5 \times 10^{-2} \text{ M}$) の I_{sc} 上昇は、短鎖脂肪酸の特異的な反応ではなく、高 Na^+ あるいは高浸透圧による作用と考えられるので、 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ 以上での検討は行わなかった。

3. 1. 2 K^+ チャンネル・ブロッカー、 Ba^{2+} および TEA のプロピオン酸誘発陰性 I_{sc} 変化に対する作用

BaCl_2 (30 mM) の粘膜側投与により I_{sc} は上昇し (ΔI_{sc} : $18.02 \pm 3.06 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n=6$)、tetraethyl ammonium (TEA) $\cdot \text{Cl}$ (30 mM) 投与により減少した (ΔI_{sc} : $-8.73 \pm 8.29 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n=5$)。 BaCl_2 (30 mM) 存在下、プロピオン酸 (50 mM) により誘発される陰性 I_{sc} 変化は、コントロールの $49.59 \pm 16.46\%$ となり、また、TEA $\cdot \text{Cl}$ (30 mM) 存在下では $48.83 \pm 11.81\%$ となり、有意に抑制された ($P < 0.05$ vs control by

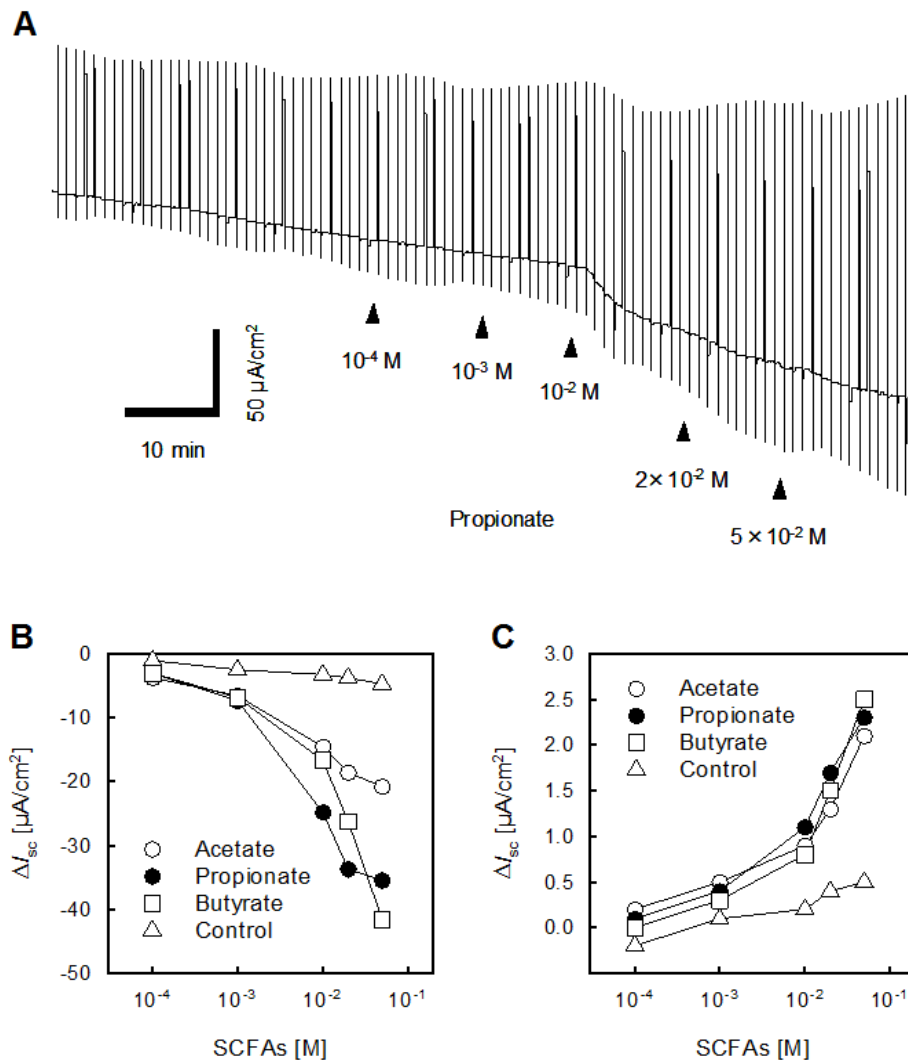


Figure 1. Concentration-dependency of mucosal SCFA-induced changes in I_{sc} and G_t . Acetate, propionate and butyrate were cumulatively added to the mucosal bathing solution at 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 2×10^{-2} and 5×10^{-2} M. A: Representative trace of cumulative addition of propionate. Graph B and C showed the concentration-dependent curves of the changes in I_{sc} and G_t , respectively. Values were expressed as means ($n=3$).

Dunnett test, $n=5-6$) (Figure 2).

3. 1. 3 ラット結腸におけるプロピオン酸誘発性短絡電流変化

ラット摘出大腸を遠位、中位、および近位結腸、および盲腸に分けてそれぞれ Ussing chamber に装着し、5 mM のプロピオン酸ナトリウムを粘膜側に投与すると、Figure 3 に示すような短絡電流変化が惹起された。遠位結腸においては、負の短絡電流変化に続く、正の短絡電流変化が測定されたが、中位結腸および盲腸においては、正の短絡電流変化のみが測定され、近位結腸においては、ほとんど変化がみられなかった。ヒトでは Figure 1 に示すように

短鎖脂肪酸投与により負の短絡電流変化を示し、この反応は起電性 K^+ 分泌であることが示された。したがって、ラット遠位結腸におけるプロピオン酸投与直後の短絡電流も、 K^+ 分泌であると考えられる。プロピオン酸によって惹起される K^+ 分泌の解析を行うため、以後の実験は、ラット遠位結腸を用いた。

3. 1. 4 ラット遠位結腸におけるプロピオン酸誘発性短絡電流変化に対する K^+ チャンネル・ブロッカー、TEA の作用

ラット遠位結腸において、プロピオン酸が誘発する負の短絡電流変化が K^+ 分泌であることを確認するため、TEA

·Cl (10 mM) を粘膜側へ投与し、プロピオン酸の作用を測定した。なお、TEA (10 mM) 投与によって、短絡電流は $15.42 \pm 0.94 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (投与前) から、 $19.09 \pm 1.89 \mu\text{A}/\text{cm}^2$

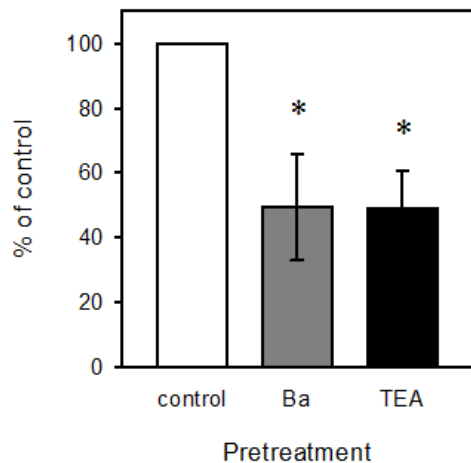


Figure 2. Effects of Ba²⁺ or TEA on propionate-induced changes in I_{sc} . BaCl₂ (30 mM) or TEA·Cl (30 mM) was added to mucosal bathing solution 10 min before the mucosal addition of propionate (50 mM). Inhibitory effects of Ba²⁺ and TEA were measured as % of control. * $P < 0.05$, statistically significant vs control by Dunnett test. Values were expressed as % of control \pm SEM ($n=5-6$).

(投与後) に上昇する傾向を示した ($P=0.060$ by paired t -test: $P=0.060$, $N=5$)。粘膜側プロピオン酸ナトリウム (5 mM) によって惹起される負の短絡電流変化は、 $-62.69 \pm 13.69 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ から $-11.25 \pm 3.32 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ に減少したが ($P < 0.01$ by unpaired t -test, $N=4-5$)、正の変化には影響を与えなかった (Figure 4)。

3. 1. 5 ラット遠位結腸におけるプロピオン酸誘発性短絡電流変化に対する Na⁺ チャンネル・ブロッカー、amiloride の作用

遠位結腸は、上皮性 Na⁺ チャンネルである ENaC を介した起電性 Na⁺ 吸収の活性が高い部位である。そこで、ラット遠位結腸において、プロピオン酸が誘発する負の短絡電流変化と ENaC との関連を検討するため、amiloride (100 μM) を粘膜側に投与し、プロピオン酸の作用を測定した。

なお、amiloride 投与によっては、短絡電流は変化しなかった。粘膜側プロピオン酸 (5 mM) によって惹起される負の短絡電流変化は $-25.47 \pm 5.35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ に減少したが ($P < 0.05$ by unpaired t -test, $N=4-5$)、正の変化には影響を与えなかった (Figure 5)。

3. 2 結腸粘膜における BK および IK チャンネルの免疫組織化学

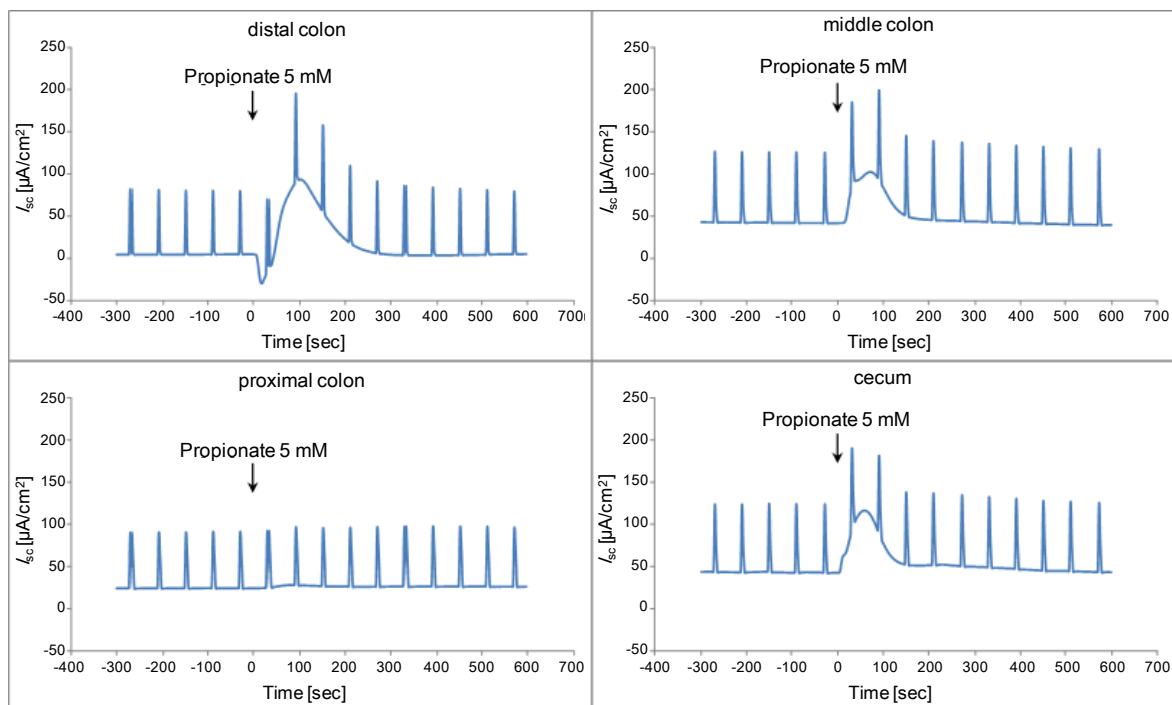


Figure 3. Effects of luminal propionate on I_{sc} in the rat distal, middle and proximal colon, and cecum

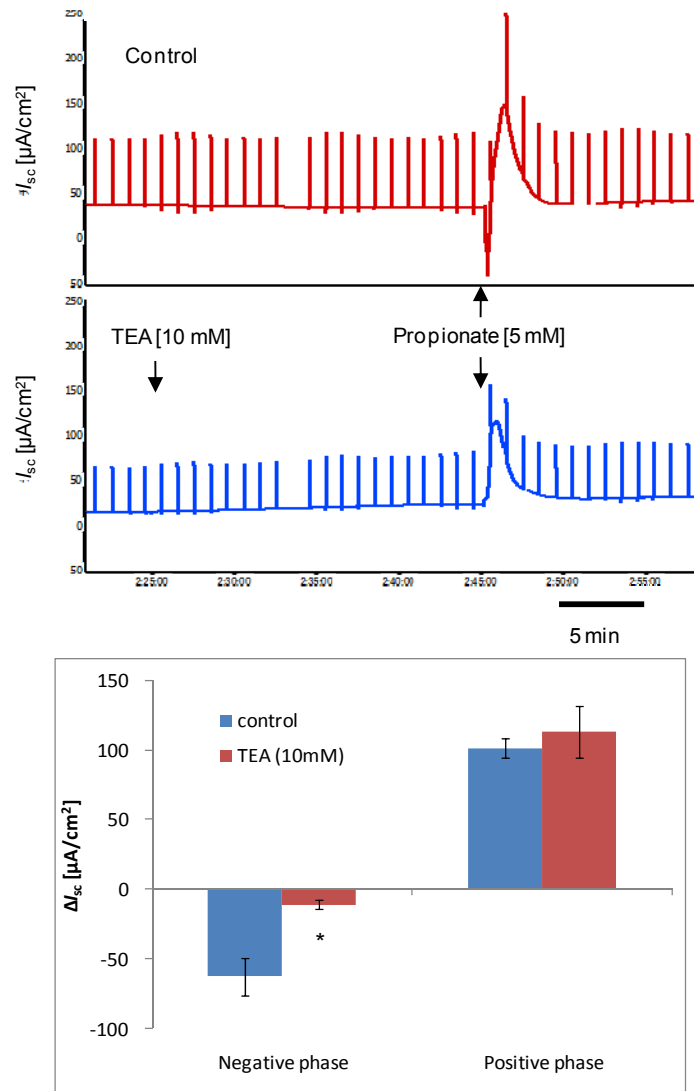


Figure 4. Effect of TEA on propionate-evoked I_{sc} responses in rat distal colon. Representative traces of the response of luminal propionate (5 mM) in the presence or absence of luminal TEA (10 mM). * $P < 0.01$ vs control by unpaired t -test ($N=4-5$).

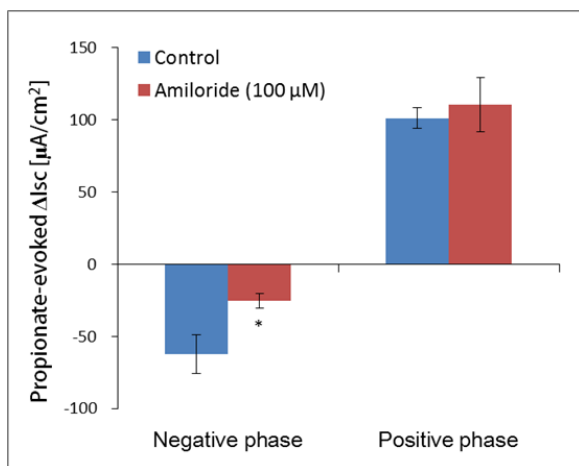


Figure 5. Effect of amiloride on propionate-evoked I_{sc} responses in rat distal colon. The biphasic I_{sc} changes induced by luminal propionate (5 mM) were measured in the presence or absence of luminal amiloride (100 μM). * $P < 0.05$ vs control by unpaired t -test ($N=4-5$).

3. 2. 1 ラット結腸粘膜における BK および IK チャンネルの発現様式

ラット結腸において、BK channel 免疫活性は、陰窩細胞の頂端膜側に局在がみられ、陰窩の下部半分に比較的集中していた(**Figure 6 BK**)。一方、IK channel 免疫活性も陰窩細胞の頂端膜側に局在が観察され、やはり陰窩の下部に集中していたが、さらに、表面上皮細胞の頂端膜にも活性が観察された(**Figure 6 IK**)。

3. 2. 2 ヒト結腸粘膜における BK および IK チャンネルの発現様式

BK および IK チャンネルの抗体は、ヒト S 状結腸粘膜において、陰窩細胞の頂端膜側に局在していた(**Figure 7, 8**)。また、陰窩の底部から中央部にかけて局在し、陰窩浅部、表面上皮の頂端膜には発現が比較的少なかった。BK チャンネルの染色では、表面上皮細胞の細胞質中にも Negative control では観察されない粒状の染色像がみら

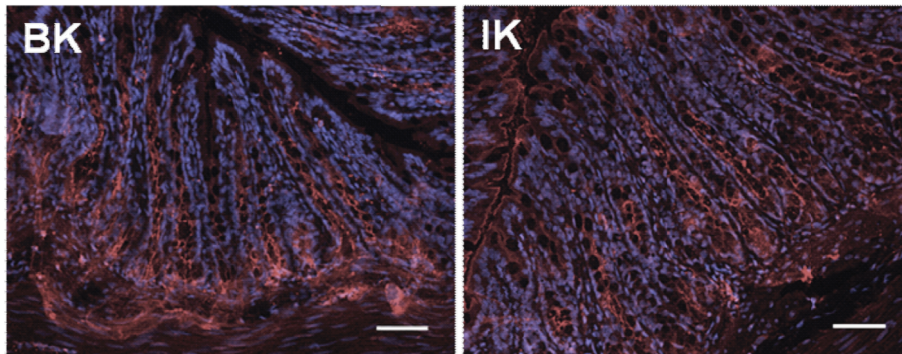


Figure 6. BK or IK channel -immunoreactivity in the rat colonic mucosa. Bar =50 μ m.

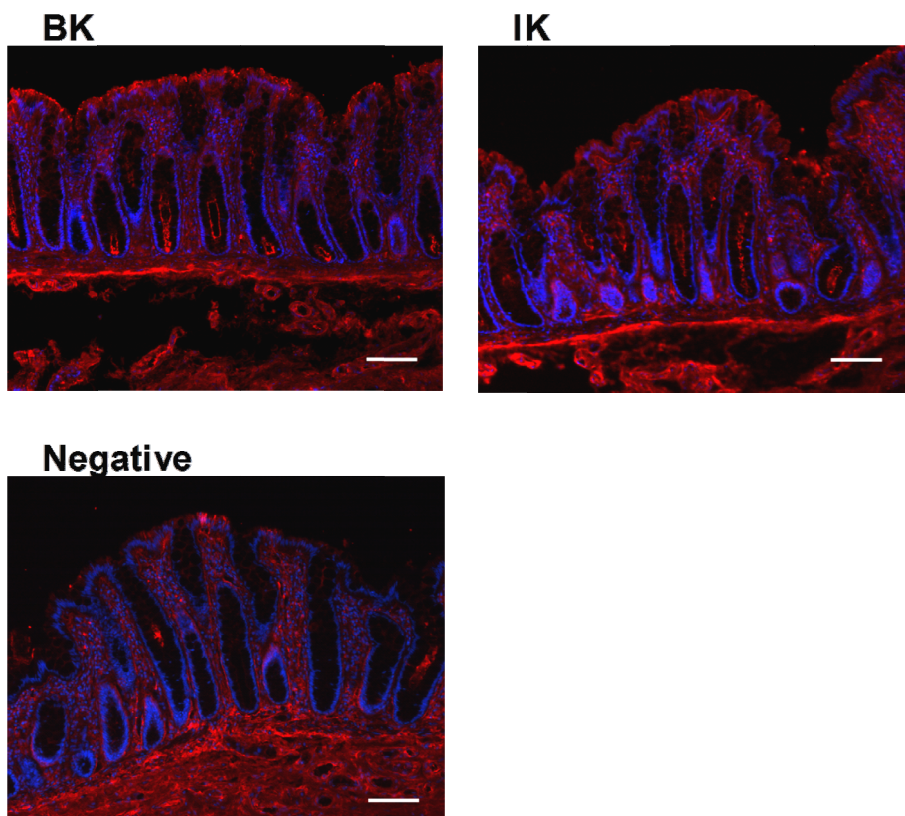


Figure 7. Immunoreactivities for BK and IK channels in mucosa of the human sigmoid colon. Arrowheads: BK- or IK channel -IR on apical membrane of crypt cells. Negative control indicates only secondary antibody staining without using primary antibodies. Bar 100 μ m.

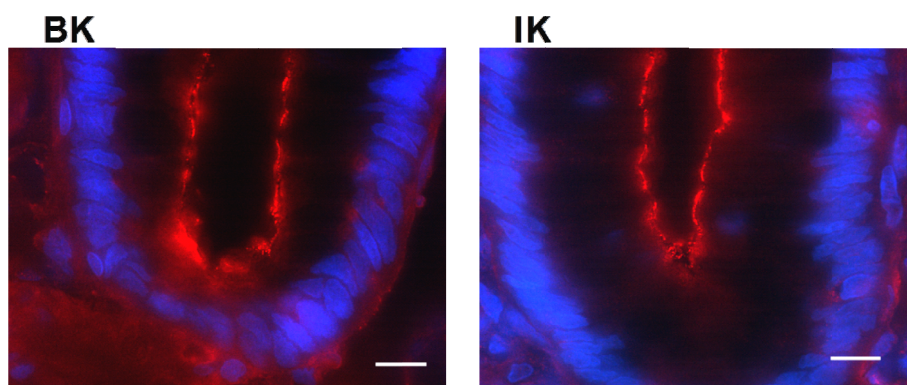


Figure 8. Immunoreactivities for BK and IK channels in bottom of crypt of the human sigmoid colon. Bar 10 μm .

れるが、特異的な染色かどうかは不明である。

3. 3 ラット結腸におけるアドレナリン受容体作動薬の短絡電流に及ぼす影響

一般的に哺乳類の大腸ではアドレナリンの刺激により cAMP 濃度の上昇を介した K^+ 分泌が誘発されることが知られている^(8,9,18)。そこで、本研究においても内因性のリガンドであるアドレナリン刺激により誘発される K^+ 分泌について大腸各部位を用いて検討した。

アドレナリンあるいはノルアドレナリン (5 μM) を血管側に投与すると、近位結腸、中位結腸、遠位結腸および直腸それぞれの部位により、**Figure 9** に示すような短絡電流の変化が観察された。遠位結腸及び直腸では明瞭な K^+ 分泌と思われる負の短絡電流変化が観察された。一方、近位結腸や中位結腸では、このような負の短絡電流変化は認められなかった。

次に、現在までに報告されているアドレナリン受容体のサブタイプ (α_1 、 α_2 、 β_1 、 β_2 及び β_3) 各々に特異的な作動薬のイオン分泌に対する作用を検討した。

血管側に各受容体サブタイプの作動薬を 10^{-9} – 10^{-5} M の濃度の範囲で重層的に投与した。その結果、近位結腸は α と β 受容体のどちらの作動薬に対してもほとんど反応を示さなかった。中位結腸においては β_2 作動薬である fenoterol 投与により短絡電流の増加が観察された。このことから、アドレナリン投与に対して示した一過性の短絡電流の増加反応は、 β_2 が関与している可能性が示唆された。遠位結腸および直腸では、 α_1 作動薬である phenylephrine、 β_1 – β_3 の作動薬である isoproterenol および、 β_2 作動薬である fenoterol 投与によって短絡電流の減少が観察されたため、 K^+ 分泌に α_1 と β_2 が関与している可能性が示唆された。

さらに、直腸においては以上の作動薬に加えて β_3 作動薬である BRL37344 によっても短絡電流の減少が観察された。これらのことから、直腸の K^+ 分泌においては α_1 と β_2 に加え β_3 の関与が示唆された。なお、アドレナリン受容体サブタイプの各作動薬による K^+ 分泌反応を大腸部位で比較すると、直腸において最も大きな反応が観察された。

3. 3. 1 アドレナリン作動薬により誘発される K^+ 分泌に関与する輸送体・チャネルの同定

ラットの各アドレナリン受容体サブタイプに対する作動薬の特異性については、ヒトのものほど詳しく検討されていない。今回は、直腸と遠位結腸において最も強く短絡電流の減少を惹起した isoproterenol を用い、この応答に関与する大腸上皮の輸送体・チャネルを検討した。

まず、神経性 Na^+ チャネル阻害薬 tetrodotoxin (TTX) を用い、isoproterenol に対する短絡電流の変化が TTX 感受性の腸管神経伝導を介しているかどうかを検討した。Isoproterenol (10 μM) による短絡電流の変化は **Figure 10A** (red trace) および B に示すように TTX (1 μM) の前投与により抑制されなかった (Figure 10, TTX group)。

続いて、 K^+ チャネル阻害薬 TEA·Cl の isoproterenol に対する応答への影響を検討した。粘膜側への TEA·Cl (30 mM) 投与により、basal I_{sc} は直腸で 12.2 ± 2.4 (Figure 10A, green trace)、遠位結腸で $8.2 \pm 3.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 増加した。このことは、直腸および遠位結腸では、定常的に TEA 感受性 K^+ チャネルから K^+ が分泌されていることを示唆している。Isoproterenol への応答は、TEA·Cl の前投与によってほぼ完全に抑制された。

さらに、Na-K-2Cl 共輸送体 (NKCC1) 阻害薬 bumetanide の isoproterenol に対する応答への影響を検討

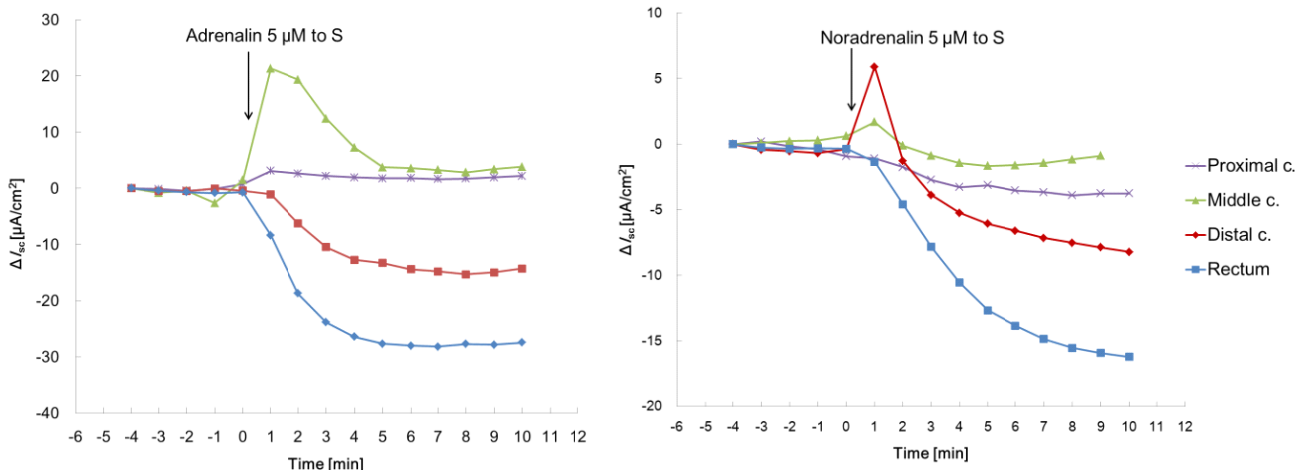


Figure 9. Segmental differences in the response to adrenalin and noradrenalin in rat large intestine

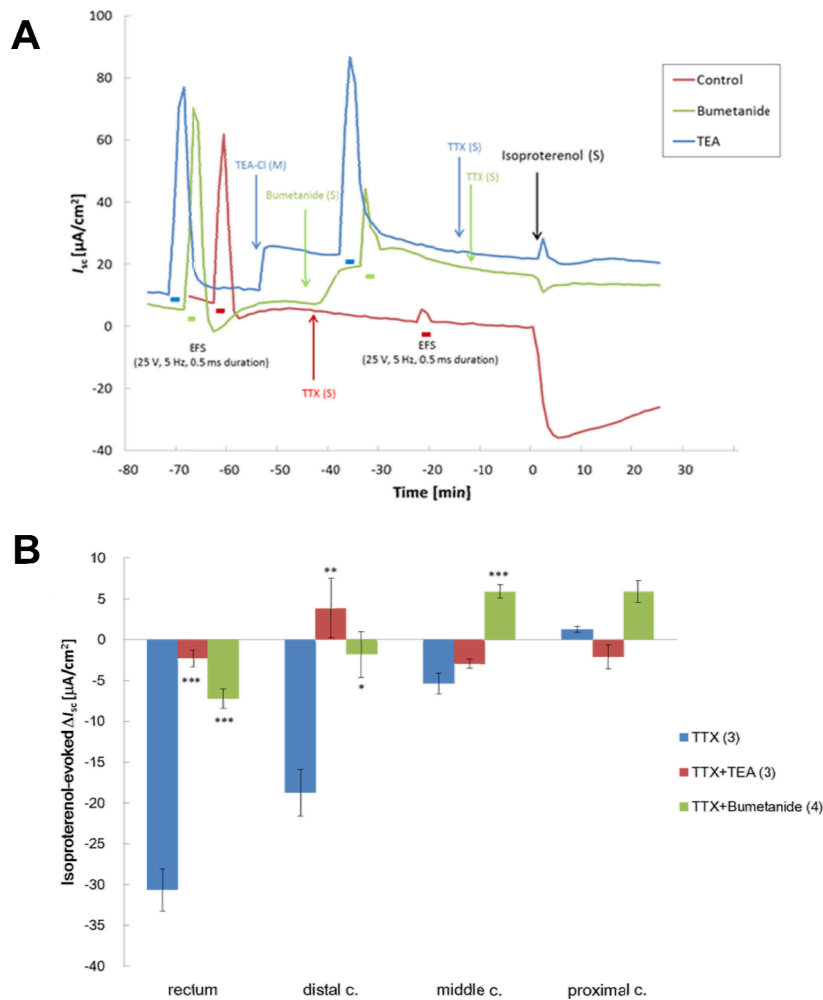


Figure 10. Effects of TTX, TEA or bumetanide on isoproterenol-induced changes in I_{sc} in rat rectum. A: Representative traces illustrated the effects of TTX, TEA or bumetanide on the responses to electrical field stimulation (EFS) and isoproterenol. B: The peak values were expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ by Dunnett test vs. TTX group. $N=3-4$.

した。Bumetanide (100 μM) の投与はわずかに basal I_{sc} を上昇させたが (ΔI_{sc} : rectum: $6.4 \pm 2.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; distal colon: $2.6 \pm 1.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$)、isoproterenol の反応は、bumetanide の前投与により、TEA の前処置と同様に大きく阻害された (Figure 10B)。

3. 3. 2 大腸各部におけるプロピオン酸により誘発される短絡電流応答

我々はこれまでに、ヒトの S 状結腸およびラットの遠位結腸において短鎖脂肪酸が一過性の K^+ 分泌を惹起する可能性を示した。さらに、アドレナリン受容体を介した K^+ 分泌にも大腸の部位による反応性の違いが見いだされ、直腸が最も高い反応性を示すことを明らかにした。そこで、プロピオン酸に対する直腸、遠位・中位・近位結腸における応答を定量的に比較した。

Figure 11 に示すように、粘膜側に 5 mM のプロピオン酸を投与した直後に観察される一過性の速い短絡電流の減少 (1st phase) は大腸の下部ほど反応が大きく、それに続く短絡電流の増加 (2nd phase) は反対に直腸から中位結腸に向かって大きくなった。近位結腸はほとんど応答しなかった。

アドレナリン受容体作動薬およびプロピオン酸の投与に対して最も強い K^+ 分泌反応を示した直腸において、各アドレナリン受容体作動薬がプロピオン酸に対する反応に影響するかどうかを検討した。血管側に noradrenalin (5 μM)、isoproterenol (1 μM)、phenylephrine (1 μM)、または clonidin (1 μM) を投与した 20 分後に、粘膜側に 5 mM の

プロピオン酸を投与した。その結果、isoproterenol のみが有意にプロピオン酸による K^+ 分泌を抑制した (Figure 12)。

3. 4 10% K^+ 負荷給餌が大腸 K^+ 分泌に与える影響について

大腸粘膜における K^+ 吸収・分泌機構は、体液中の K^+ 濃度の維持に 10% 程度寄与していると考えられている。これまでの検討結果から、大腸粘膜に短鎖脂肪酸を作用させると起電的 K^+ 分泌が惹起されることが示唆されている。本実験では、高カリウム餌を長期間投与したラット大腸組織において、 K^+ 分泌機構の解析と短鎖脂肪酸の分泌作用について検討を行った。

3. 4. 1 血中 K^+ および血漿中 Aldosterone 濃度の変化

午前 9 時 30 分から 9 時 45 分の間に採取した血液中の K^+ および Aldosterone 濃度を測定した。高 K^+ 餌投与により、全血中 K^+ 濃度は $4.4 \pm 0.2 \text{ mM}$ (対照群 $N=9$) より $6.4 \pm 0.2 \text{ mM}$ ($N=15$) へ、有意に増加した ($P < 0.001$ by unpaired t -test)。また、血漿中の Aldosterone 濃度は高 K^+ 食投与により、 $474.5 \pm 68.5 \text{ pg/mL}$ (対照群 $N=6$) より $1881.7 \pm 107.9 \text{ pg/mL}$ ($N=9$) へ、4 倍に増加した ($P < 0.001$ by unpaired t -test)。

3. 4. 2 10% K^+ 負荷餌による電気生理学的特性の変化

高 K^+ 餌を投与したラットの大腸各部位における、安定時の basal I_{sc} 、 G_1 および電気刺激に対する応答を Table 1 に示した。basal I_{sc} 、 G_1 は全ての部位で通常餌を投与した

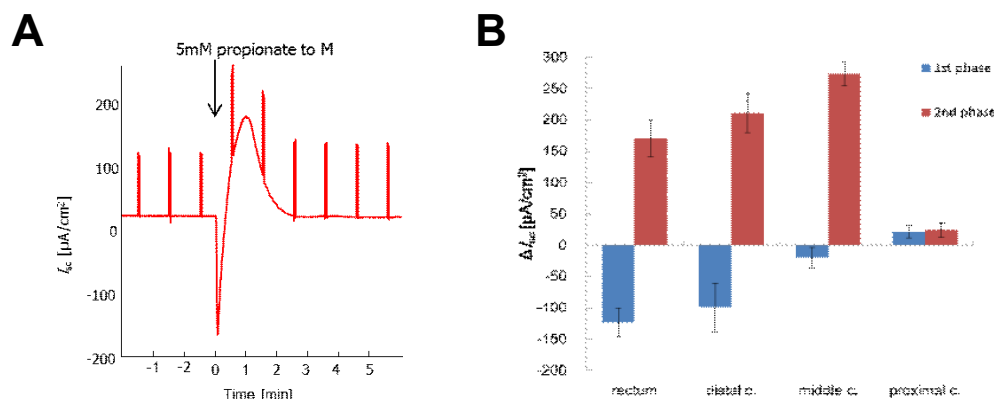


Figure 11. Effect of propionate on I_{sc} in rat colon and rectum. A: I_{sc} trace illustrated the biphasic responses to luminal propionate in rat rectum. B: Segmental differences in the responses to luminal propionate. The values are expressed as mean \pm SEM, $N=4$.

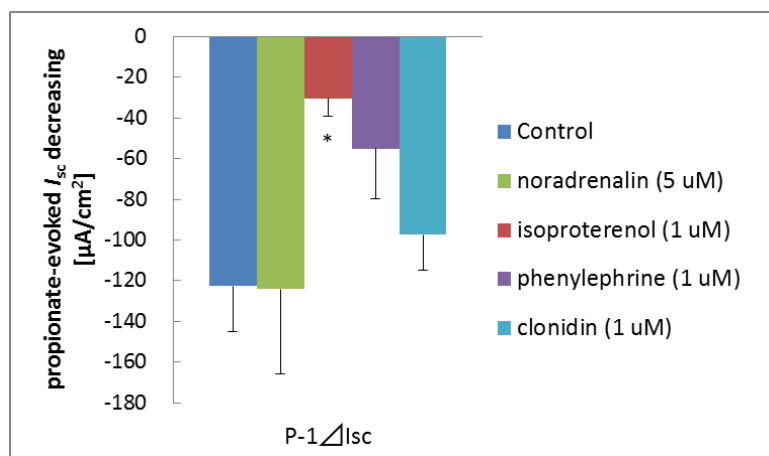


Figure 12. Effects of adrenoceptor agonists on propionate-evoked K^+ secretion in rat rectum. The values were expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ by unpaired t -test (one-way) with Bonferroni correction. $N = 3-4$.

Table 1. K^+ 負荷ラット組織における電気生理学的特性

Regions	Basal I_{sc} [$\mu A/cm^2$]	G_t [mS/cm^2]	EFS-evoked ΔI_{sc} [$\mu A/cm^2$]
Proximal colon	47.3 [†]	18.9*	81.3
Middle colon	36.1 [†]	15.4 [§]	81.7
Distal colon	136.6 [†]	12.1	56.6 [§]
Rectum	162.8 [†]	14.9 [†]	63.1*

* $P < 0.05$, [§] $P < 0.01$, [†] $P < 0.001$ comparing with control group. $N = 12$.

対照群に比べて増加したが、 I_{sc} と G_t の増加の割合が部位によって異なることから、この変化に関わるイオン組成が部位によって異なることが考えられた。最も顕著な変化が見られたのは、直腸であった。電気刺激に対する応答は、遠位結腸と直腸においてのみ、対照群よりも低かった。

3. 4. 3 K^+ 負荷ラット大腸における K^+ チャネル阻害剤 TEA の効果

定常的な K^+ 分泌または吸収のレベルを確かめるため、basal I_{sc} 安定時に粘膜側に TEA·Cl (30 mM) を投与し、短絡電流の変化を測定した。中位および近位結腸では TEA の短絡電流に対する影響はほとんどなかったが、直腸および遠位結腸においては、対照群 (Control) に比べ有意に短絡電流が増加した。これにより、遠位結腸および直腸においては定常的な K^+ 分泌が K^+ 負荷によって亢進していることが示唆される (Figure 13)。

3. 4. 4 Noradrenalin および isoproterenol への K^+ 分泌応答に対する K^+ 負荷の影響

対照群のラットにおいて刺激時の K^+ 分泌反応が大きかった直腸と遠位結腸に注目し、 K^+ 負荷時の noradrenalin および isoproterenol に対する短絡電流の変化を比較した。Figure 14 に示すように、直腸では対照群において noradrenalin 刺激で減少していた短絡電流が K^+ 負荷時では増加に転じた。一方、遠位結腸においては noradrenalin および isoproterenol による短絡電流の減少が K^+ 負荷によって促進された。ただし、TEA の前投与によって isoproterenol は直腸と遠位結腸のどちらにおいても短絡電流を増加させた。これにより、直腸においては noradrenalin または isoproterenol によって、 K^+ 分泌による短絡電流の変化を打ち消す方向に別のイオンが輸送されていることが示唆された。Figure 15 に示した直腸の短絡電流のトレースは、 K^+ 分泌による短絡電流の変化を Na^+ 吸収が相殺している可能性を示したものである。TEA 投与によって頂端膜の K^+ チャネル活性を阻害した組織の血管側に isoproterenol を投与すると、短絡電流は徐々に

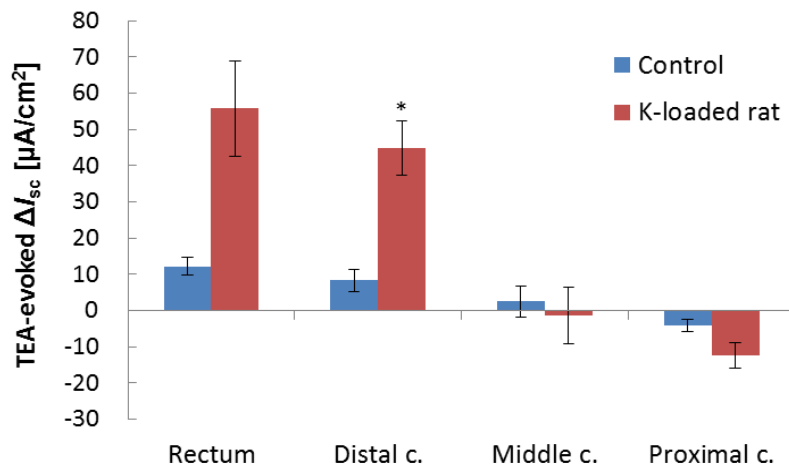


Figure 13. Effect of K-loading on the response to TEA. The values were expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ by unpaired t -test. $N=3$.

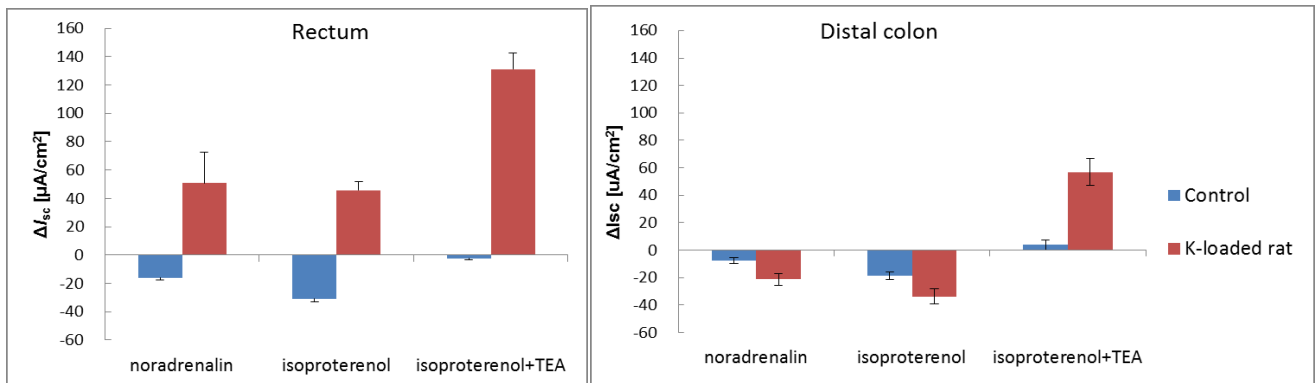


Figure 14. Effect of K-loading on the response to noradrenalin and isoproterenol in rat rectum and distal colon. The values were expressed as mean \pm SEM. $N=3$.

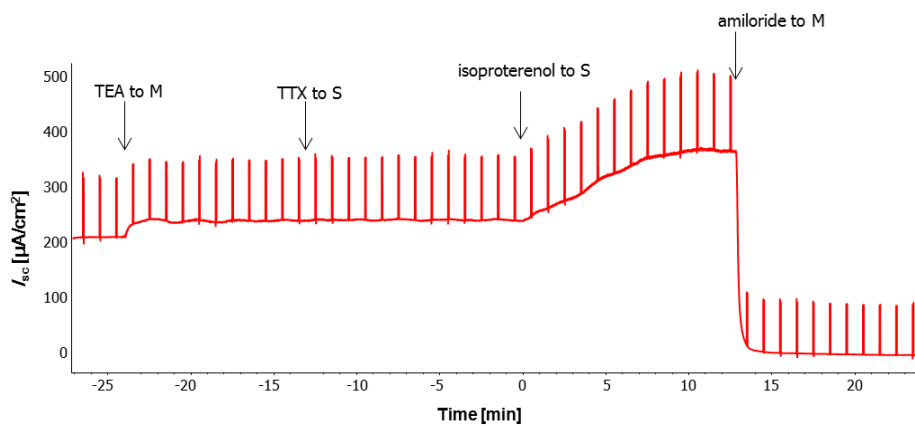


Figure 15. A representative trace illustrated the I_{sc} responses to TEA and isoproterenol, and further application of amiloride in K-loading rat rectum

増加した。ピークに達した時点で頂端膜の ENaC 阻害剤 amiloride (100 μ M) を粘膜側に投与すると、短絡電流はほぼ 0 に近づき安定した。

3. 4. 5 K^+ 負荷ラット大腸組織の isoproterenol への応答に対する ouabain の効果

腎集合管主細胞においては、 Na^+ 吸収および K^+ 分泌の促進は頂端膜の ENaC と基底側膜の Na-K-ATPase 活性の亢進によって引き起こされる。そこで、 K^+ 負荷ラット大腸においても上皮細胞基底側膜の Na-K-ATPase 活性が亢進しているかどうかを確認するため、 K^+ 負荷ラット大腸各部位における isoproterenol への応答に対する ouabain の効果を検討した。Figure 16 に示すように、直腸

および遠位結腸においては血管側への ouabain (100 μ M) 前投与によって isoproterenol への反応がほとんど抑制された。

3. 4. 6 K^+ 負荷ラット大腸におけるプロピオン酸が誘発する K^+ 分泌

10% K^+ 餌の投与により定常的な K^+ 分泌が亢進しているラット大腸の各部位において、粘膜側へ 5 mM のプロピオン酸を作用させた。その結果、Figure 17 に示すように直腸および遠位結腸において、 K^+ 分泌と考えられる短絡電流の大きな減少反応 (1st phase) が観察された。この K^+ 分泌応答の大きさは、Figure 11 で示した対照群の応答と同レベルであった。しかし、直腸、遠位および中位結腸に

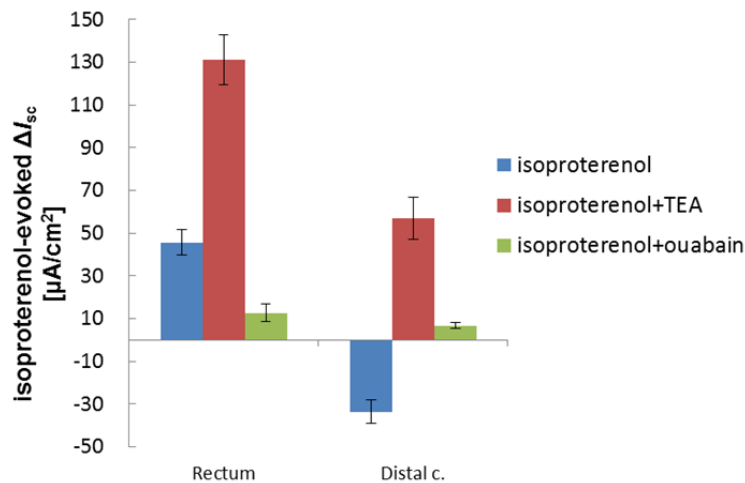


Figure 16. Effects of TEA and ouabain on the isoproterenol-evoked I_{sc} changes in K-loading rat rectum and distal colon. The values were expressed as mean \pm SEM. $N=3$.

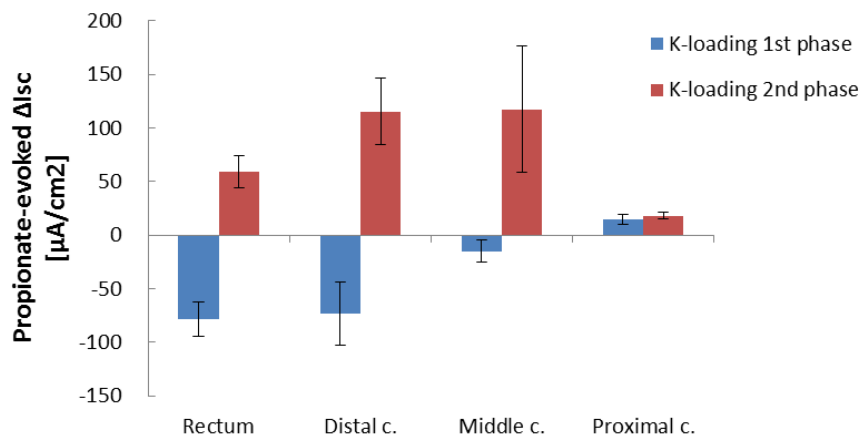


Figure 17. Effects of propionate in K-loading rat rectum and colon. The decreasing (1st phase) and decreasing (2nd phase) changes in I_{sc} were measured. The values were expressed as mean \pm SEM. $N=3$.

における短絡電流増加反応(2nd phase)の大きさは対照群に比べて有意に減少した($P < 0.05$ by unpaired *t*-test, one-way)。

4. 考 察

本研究では、ヒト大腸において、短鎖脂肪酸が K^+ 分泌を誘発する可能性を初めて示した。短鎖脂肪酸の濃度 10^3 M 以上で酢酸、プロピオン酸、および酪酸の全てで K^+ 分泌が誘発されたが、ヒトの結腸管腔においては総量として 100 mM ほどの短鎖脂肪酸が存在していることが報告されており⁽¹⁹⁾、生理的条件下においても、短鎖脂肪酸刺激による K^+ 分泌が誘発されているものと考えられる。ラット結腸における短鎖脂肪酸の惹起する短絡電流変化については、1988 年の矢島の報告によって、起電性の Cl^- イオン分泌であることが明らかにされているが⁽²²⁾、同時に K^+ 分泌が惹起されていることに関しては明らかにされていなかった。しかし、ヒトにおいてはむしろ起電性 K^+ 分泌が短鎖脂肪酸による主たる短絡電流変化であることから、ラットにおいても詳細な解析と議論が必要であると我々は考えた。そこで、我々は次にラット結腸において、プロピオン酸によって惹起される負の短絡電流変化に注目して解析を行った。

まず、プロピオン酸の作用の大腸部位特異性を検討したところ、起電性 Cl^- 分泌と考えられる一過性の正の短絡電流変化は、直腸、遠位および中位結腸と盲腸において測定されるが、負の短絡電流変化は、遠位結腸と直腸のみにみられることが明らかとなった(Figure 3 および 11)。ヒト結腸においては S 状結腸の結果を示したが、上行結腸、直腸など、他の部位においても短鎖脂肪酸による K^+ 分泌が観察されること予備実験の結果から得ている。したがって、ヒトにおいては、おそらく直腸および結腸のすべての部位で短鎖脂肪酸による K^+ 分泌が惹起されると考えられる。

次に、ラット遠位結腸で観察されたプロピオン酸による負の短絡電流変化が K^+ 分泌によるものなのかどうか TEA を用いて検討した。その結果、TEA によって負の短絡電流変化は強く抑制された(Figure 4)ことから、この反応も同様に K^+ 分泌によるものであると考えられ、頂端膜に発現する TEA 感受性の K^+ チャンネルの存在が示唆された。

大腸における起電性 K^+ 分泌に関与する K^+ チャンネルのタイプについては、ラットにおいては Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルである IK チャンネル^(7,10) や、BK チャンネル⁽³⁾ の関与が報告されている。しかし、その細胞内局在については、結論が出ていなかった。一方、ヒト大腸については BK チャンネルとする報告もあるが⁽²⁰⁾、明確な報告は存在しない。本研究における免疫組織化学の結果では、ラット結腸粘膜上皮においては 2 種の Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネル、IK および BK チャンネルが陰窩の頂端膜側に発現し、さらに IK チャンネルは表面上皮細胞の頂端膜側にも局在していることが示された(Figure 6)。したがって、ラット結腸における起電性 K^+ 分泌には、IK および BK 両チャンネルの関与が示唆された。また、ヒト大腸においても、BK および IK チャンネルが陰窩細胞の頂端膜に明確に局在している所見を初めて得(Figure 7, 8)、少なくとも S 状結腸においては、BK および IK チャンネルの両方が起電的 K^+ 分泌に関与している可能性が示唆された。さらに、発現が陰窩に局在していることから、腺分泌における水分の駆動力形成にも起電的 K^+ 分泌が関与していることが考えられる。これまで一般的に、水分のメカニズムとして、CFTR を介した起電的 Cl^- 分泌によって管腔内を負となる経上皮膜電位が形成され、この電氣的勾配によって受動的に、主として細胞間隙を通して Na^+ を管腔側に輸送すると考えられてきた。しかし、特にヒトの結腸粘膜上皮においては、起電的 K^+ 分泌が Cl^- 分泌と共に寄与している可能性が示唆された。

本研究によって、ラットにおいては、プロピオン酸誘発起電性 K^+ 分泌は、大腸遠位部においてのみ惹起されることが明らかとなったが、この部位特異性の意義については不明である。ただし、結腸の近位より遠位に向かって、上皮性 Na^+ チャンネルである ENaC 活性が強くなることが知られており、これは起電性 K^+ 分泌の部位特性と一致している。本研究では、プロピオン酸誘発性 K^+ 分泌が ENaC 阻害剤である amiloride によってもほぼ完全に抑制されることを見出し(Figure 5)、IK および BK チャンネルを介した起電性 K^+ 分泌が頂端膜 ENaC と連動している可能性が示唆された。大腸下部の内容物はすでに固形状であり、浸透圧に逆らって管腔側から水分を吸収するのは容易でない。このような状況下で ENaC は強力な電解質濃度勾配を生み出しているが、この Na^+ 吸収機構に管腔への K^+

分泌が一翼を担っているのかもしれない。

食事時の K^+ 濃度が高く、腎臓からの排出だけでは事足りない場合や、腎機能が低下した場合には、大腸における K^+ 排出機構が生命維持に重要になる。また、何らかの刺激によって大腸からの K^+ 排出を積極的に引き起こすことができれば、高カリウム血症の治療に応用できる可能性がある。内因性の大腸における K^+ 分泌誘発機構として、ラットでは交感神経の伝達物質であるノルアドレナリンと、その β 受容体を介した機構が知られている。そこで、本研究では次に、大腸粘膜へのプロピオン酸投与による K^+ 分泌とアドレナリン受容体との関連を検討し、さらに食餌中の K^+ 含量を 10 倍に増加させたラットにおける K^+ 分泌応答について検討した。アドレナリン受容体サブタイプの特異的作動薬を用いた検討の結果、近位および中位結腸では K^+ 分泌は観察されず、遠位結腸では、 K^+ 分泌に α_1 と β_2 が関与している可能性が示唆された。直腸においては、 α_1 と β_2 に加え β_3 の関与が示唆された。また、アドレナリン受容体の各作動薬による K^+ 分泌反応レベルを大腸部位で比較すると、直腸において最も大きな反応が観察された。Zang らは結腸の K^+ 分泌における β_2 の関与と結腸部位差を報告しているが、結腸粘膜に β_3 発現はほとんどないとしている⁽²³⁾。 β_3 は胃におけるインドメタシン潰瘍の緩和⁽¹⁾ や、盲腸における重炭酸分泌⁽⁴⁾ に関与していることが報告されているが、本研究で見出された直腸における K^+ 分泌については、これまでに報告がない。そこで、ラット直腸を用い β 受容体作動薬である isoproterenol の作用機序について検討したところ、直腸上皮に直接作用した isoproterenol は、上皮細胞基底側膜の NKCC1 によって K^+ をくみ上げ、頂端膜の K^+ チャネルを介して管腔への K^+ 分泌を誘発することが示唆された (Figure 9)。また、直腸粘膜における短鎖脂肪酸の作用はこれまで検討されてこなかったが、今回、粘膜側のプロピオン酸に対する反応強度の部位特性は isoproterenol に対する K^+ 分泌の反応と一致することを明らかにした (Figure 10 1st phase)。これらの結果から、大腸では肛門に近い部位ほど K^+ 分泌機構が発達しており、定常的な K^+ 分泌だけではなく、交感神経性および管腔からの短鎖脂肪酸刺激に対しても強い K^+ 分泌を引き起こすことができると考えられる。さらに本研究では、isoproterenol によるプロピオン酸応答の脱感作を見出し (Figure 11)、 β 受容体と短鎖脂肪酸による

直腸上皮細胞の K^+ 分泌が、共通した機構を介して引き起こされている可能性が示唆された。

これまでに SD ラットを用いた実験で、経口 K^+ 負荷によって結腸における管腔への K^+ 分泌が亢進するという報告が、幾つかなされている^(2,5,6)。今回、10% K^+ を含む餌を 14–18 日間ラットに食べさせたところ、血中 K^+ およびアルドステロン濃度が通常餌 (1% K^+) に比べ有意に上昇する結果を得た。8 日間の 0.3 M KCl 添加水による K^+ 負荷実験では、朝の採血で血中 K^+ 濃度に差はなかったという報告がある⁽²⁾。本研究では長期間の連続 K^+ 摂取により高カリウム血症が持続していたものと考えられる。このような K^+ 負荷ラット組織において、安定時の basal I_{sc} の値および TEA 投与による短絡電流の増加量、つまり定常的な K^+ 分泌は、対照群に比べて有意に亢進していた。 K^+ 負荷による定常的な電解質輸送の変化においても大腸の下部ほどを大きく影響を受けたことから、肛門に近い部位ほど大腸の K^+ 輸送に対する寄与率が高いことが示唆される。直腸においては、isoproterenol に誘発される K^+ 分泌と同時に ENaC 活性に依存した Na^+ 吸収が亢進している可能性が示唆された (Figure 13, 14)。また、この反応が ouabain によって抑制された (Figure 15) ことから、下部大腸粘膜で isoproterenol によって惹起される K^+ 分泌は、頂端膜の ENaC と基底側膜の Na-K-ATPase 活性に依存していることが示唆された。以上の Na^+ 輸送体および K^+ チャネルの発現はアルドステロンによって誘導されることが知られており、今回 K^+ 負荷によって血中濃度が上昇していたアルドステロンの作用によるものと考えられる。最後に、 K^+ 負荷ラット組織における短鎖脂肪酸誘発性 K^+ 分泌を検討した結果、直腸および遠位結腸における K^+ 分泌レベルは対照群と差がなかった。しかし、反対向きの I_{sc} として記録される Cl^- 分泌レベルは対照群と比べて有意に低下していた (Figure 17) ことから、正味の K^+ 分泌量は K^+ 負荷によって増加していたと考えられる。したがって、高カリウム血症が起きている場合でも、大腸粘膜への短鎖脂肪酸の投与によって、積極的な K^+ 分泌を誘発できる可能性が示唆され、大腸下部を標的とした短鎖脂肪酸による K^+ 排泄が、高カリウム血症の治療に利用できるかもしれない。

5. 今後の展望

短鎖脂肪酸受容によって起電的 K^+ 分泌が惹起される

生理的意義は何であろうか。我々は、モルモット遠位結腸において、プロピオン酸の誘発する KCl 分泌について報告している⁽¹¹⁻¹⁴⁾。モルモット遠位結腸でのプロピオン酸誘発性 Cl⁻ 分泌は、腸管神経系を介した神経反射として惹起されるが、K⁺ 分泌は TTX 存在下でも消失しなかった。これにより、Cl⁻ と K⁺ 分泌は独立した機序で制御されていることが示唆された。また、ラット遠位結腸において、Cl⁻ 分泌は酢酸によって誘発されず、むしろ酢酸の前投与によって、プロピオン酸の作用が抑制されることが報告されている⁽¹³⁾ が、本研究で明らかにしたヒト結腸においては、酢酸もプロピオン酸や酪酸の半分程度の I_{sc} 変化を惹起するし、 G_i 変化については、プロピオン酸や酪酸と同程度の変化を示した。以上のような、Cl⁻ と K⁺ 分泌のメカニズムの違いや、個別の短鎖脂肪酸に対する反応性の違い、さらに動物種と食性による応答の違いに、その意義を明らかにする鍵が隠されているかもしれない。今後、さらに詳細な解析をすすめて、その生理的意義を明らかにしていきたいと考えている。短鎖脂肪酸による K⁺ 分泌の生理的意義と分子レベルでのメカニズムが明らかになれば、大腸からの K⁺ 排泄を調節し、高カリウム血症の改善などに役立っているのではないだろうか。

文 献

- Bahl, A., Clayton, N. M., Coates, J., Martin, D. P., Oakley, I. G., Strong, P. and Trevethick, M. A. Comparison of the profiles of agonists as stimulators of the b3-adrenoceptor in vitro with their gastroprotective effects in the conscious rat. *Br. J. Pharmacol.*, 117: 580-586, 1996.
- Boyd, J. E. and Mulrow, P. J. Further studies of the influence of potassium upon aldosterone production in the rat. *Endocrinology*, 90: 299-301, 1972.
- Butterfield, I., Warhurst, G., Jones M. N. and Sandle, G. I. Characterization of apical potassium channels induced in rat distal colon during potassium adaptation. *J. Physiol.*, 501: 537-547, 1997.
- Canfield P. and Abdul-Ghaffar, T. Stimulation of bicarbonate secretion by alpha- and beta-adrenoceptor agonists in rat caecum in vitro. *Eur J Pharmacol.*, 216: 293-297, 1992
- Fisher, K. A., Binder, H. J. and Hayslett, J. P. Potassium secretion by colonic mucosal cells after potassium adaptation. *Am. J. Physiol.*, 231: 987-994, 1976.
- Foster, E. S., Sandle, G. I., Hayslett, J. P. and Binder, H. J. Cyclic adenosine monophosphate stimulates active potassium secretion in the rat colon. *Gastroenterology* 84: 324-330, 1983.
- Furness, J. B., Robbins, H. L., Selmer, I. S., Hunne, B., Chen, M. X., Hicks, G. A., Moore, S. and Neylon, C. B. Expression of intermediate conductance potassium channel immunoreactivity in neurons and epithelial cells of the rat gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.*, 314: 179-189. 2003.
- Grotjohann, I., Gitter, A. H., Kockerling, A., Bertog, M., Schulzke, J. D. and Fromm, M. Localization of cAMP- and aldosterone-induced K⁺ secretion in rat distal colon by conductance scanning. *J. Physiol.*, 507: 561-570, 1998.
- Horger, S., Schultheiss, G. and Diener, M. segment-specific effects of epinephrine on ion transport in the colon of the rat. *Am. J. Physiol.*, 275: G1367-G1376, 1998.
- Joiner, W. J., Basavappa, S., Vidyasagar, S., Nehrke, K., Krishnan, S., Binder, H.J., Boulpaep EL, Rajendran VM. Active K⁺ secretion through multiple KCa-type channels and regulation by IKCa channels in rat proximal colon. *Am. J. Physiol.*, 285: G185-196, 2003.
- Karaki, S.-I. and Kuwahara, A. Propionate-induced epithelial K⁺ and Cl⁻/HCO₃⁻ secretion and free fatty acid receptor 2 (FFA2, GPR43) expression in the guinea pig distal colon. *Pflugers Arch* 461: 141-152, 2011.
- Karaki, S.-I. and Kuwahara, A. Effects of short-chain fatty acids on ion transport in the guinea pig distal colon. *Jpn. J. Physiol.*, 51: S235, 2001.
- Karaki, S.-I. and Kuwahara, A. Secretory reflex induced by propionate in the guinea pig distal colon. *Jpn. J. Physiol.*, 53: S268, 2003.
- Karaki, S.-I. and Kuwahara, A. Propionate-induced anion secretory reflex in the guinea-pig distal colon: interaction with prostaglandin E₂. *Neurogastroenterol.*

- Motil., 15: 212, 2003.
15. Karaki, S.-I., Tazoe, H., Kaji, I., Otomo, Y., Yajima, T. and Kuwahara, A. Contractile and secretory responses of luminal short-chain fatty acids and the expression of these receptors, GPR41 and GPR43, in the human small and large intestines. *Gastroenterology* 134(4): A-368, 2008.
 16. Kuwahara, A. and Fujimiya, M. Luminal release of gut regulatory peptides: waste or physiological message? In: "*Biology of the intestine in growing animals*" edited by Zabielski R, Gregory PC and Westrom B, Chapter 12, pp 363-407, Elsevier, 2002.
 17. Mitsui, R., Ono, S., Karaki, S.-I. and Kuwahara, A. Neural and non-neural mediation of propionate-induced contractile responses in the rat distal colon. *Neurogastroenterol. Motil.*, 17: 585-594, 2005.
 18. Rechkemmer, G., Frizzell, R.A. and Halm, D. R. Active potassium transport across guinea-pig distal colon: action of secretagogues. *J. Physiol.*, 493: 485-502, 1996.
 19. Roediger, W. E., Heyworth, M., Willoughby, P., Piris, J., Moore, A. and Truelove, S. C. Luminal ions and short chain fatty acids as markers of functional activity of the mucosa in ulcerative colitis. *J. Clin. Pathol.*, 35: 323-326, 1982.
 20. Sandle, G. I., Perry, M. D., Mathialahan, T., Linley, J. E., Robinson, P., Hunter, M. and MacLennan, K. A. Altered cryptal expression of luminal potassium (BK) channels in ulcerative colitis. *J. Pathol.*, 212: 6-73, 2007.
 21. Yajima, T. Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *J. Physiol.*, 368: 667-678, 1985.
 22. Yajima T. Luminal propionate-induced secretory response in the rat distal colon in vitro. *J. Physiol.*, 403: 559-575, 1988.
 23. Zang, X. H., Ji, T., Guo, H., Liu, S. M., Li, Y., Zheng, L. F., Zhang, Y., Zhang, X. F. and Duan, D. P. Expression and activation of beta-adrenoceptors in the colorectal mucosa of rat and human. *Neurogastroenterology&Motil.* 22: 325-334, 2010.

Regulatory Mechanisms of K⁺ Absorption/Secretion in the Gut

Atsukazu Kuwahara, Shin-ichiro Karaki and Izumi, Kaji

*Laboratory of Physiology, Institute for Environmental Sciences,
University of Shizuoka*

Summary

Short-chain fatty acids (SCFAs), including acetate, propionate and butyrate, are fermented product from dietary fibers in the large intestine. They are not only known to be absorbed as nutrients, but also known as chemical stimuli inducing physiological gastrointestinal functions: peristaltic and secretory reflexes. In previous studies, it have been reported that SCFA-induced chloride (Cl⁻) secretion in the rat distal colon. Although the data in the previous reports showed that potassium (K⁺) secretion might also be evoked by propionate in addition to the Cl⁻ secretion, the authors seemed to neglect the responses. Thus in the present study, the SCFA-induced potassium (K⁺) secretion on colonic epithelium was investigated by short-circuit current technique using human and rat colon. Segments of human sigmoid colon were obtained from patients undergoing colectomy for carcinoma, and the mucosa-submucosa preparations were mounted between halves of Ussing flux chambers. In human sigmoid colon, acetate, propionate, and butyrate induced a negative change in short-circuit current (I_{sc}) and an increase in tissue conductance at $>10^{-3}$ M in a concentration-dependent manner. Application of 5 mM propionate to the cecum and middle and distal colon induced a transient positive changes in I_{sc} identified as electrogenic Cl⁻ secretion, but not proximal colon. However, luminal propionate only in the distal colon induced a negative change in I_{sc} before appearing the Cl⁻ secretion. The propionate (5-50 mM)-induced I_{sc} responses were reduced by pretreatment of barium chloride (30 mM) or tetraethylammonium (30 mM) both in human and rat colon. Therefore, it was suggested that the propionate-induced response is due to the K⁺ secretion. In immunohistochemistry, calcium (Ca²⁺)-activated big conductance K_{Ca}1.1 (BK) channel- and Ca²⁺-activated intermediate-conductance K_{Ca}3.1 (IK) channel-immunoreactivities were detected on apical, but not basolateral, membrane in the crypt epithelial cells both in human and rat colon. These results suggest that SCFAs stimulate mucosa and induce K⁺ secretion through both apical BK and IK channels in crypt of the human and the rat distal colon.

We further investigated the basal and stimulated K⁺ secretion in K-loading rats. Two weeks feeding of high K⁺-diet increased blood K⁺ and plasma aldosterone concentrations. Both the basal and luminal propionate (5 mM)-evoked K⁺ secretion were enhanced in the rectum and distal colon, but not in other colonic regions. These results suggest that segmental difference appeared in the contribution of K⁺ transport, and that the mucosal treatment of short-chain fatty acids might be effective in active K⁺ excretion from the large intestine even in the hyperkalemia.

腎遠位尿細管 K^+ チャネルの機能発現制御機構の解明

種本 雅之¹, 伊藤 貞嘉²

¹帝京大学医学部内科学講座, ²東北大学病院腎高血圧内分泌科

概要 【背景】腎臓は、生体の電解質恒常性を維持する器官として、生命活動の維持に不可欠の役割を果たしている臓器である。腎臓では、糸球体で濾過した血漿の 99% を尿細管で再吸収する過程を経て、電解質恒常性の維持を司っている。欧米型の食生活環境で認める相対的高 Na^+ ・低 K^+ 摂取の条件下では、遠位曲尿細管近傍が再吸収量の調節を担う主要セグメントであることが近年の生理学的研究や遺伝子異常に起因する疾患の原因解明により明らかにされた。遠位曲尿細管では、基底膜側に発現している Na^+/K^+ -ATPase を駆動力とし主に Na^+ 再吸収を担っているが、 Na^+ 再吸収に際して細胞に流入する K^+ を、管腔側・基底膜側 K^+ チャネルにより排泄・再吸収し、 K^+ 出納バランスを Na^+ と独立に制御する事により、生体は $Na^+ K^+$ イオンバランスを制御していると推定される。従来の研究で、遠位尿細管 K^+ チャネルの機能発現に関与する因子としてアンカータンパク MAGI-1 を同定していた。

【目的】 K^+ チャネルの尿細管細胞内での機能発現におけるアンカータンパク MAGI-1 の役割と、チャネル機能発現異常に起因する疾患におけるアンカータンパクの関与を解明することを試みた。

【方法】 食塩負荷とミネラルコルチコイド負荷を加えた個体で K^+ チャネル・MAGI-1 の発現量・相互作用の変化を測定し、変化を生ずる機構を解析した。チャネル機能発現異常に起因する遺伝病である EAST 症候群で認める遺伝子変異により K^+ チャネルの機能発現が変化する機構を培養細胞系で検討した。

【結果】 食塩負荷とミネラルコルチコイド負荷はともに K^+ チャネル・MAGI-1 の腎内での発現量に有意な変化をきたさなかったが、腎内における K^+ チャネル/MAGI-1 相互作用は食塩負荷にて促進され、ミネラルコルチコイド負荷にて抑制された。 K^+ チャネル/MAGI-1 相互作用は PDZ domain を介した相互作用であり、この相互作用は K^+ チャネルの PDZ-binding motif のリン酸化により阻害された。MAGI-1 は K^+ チャネルを細胞膜直下に誘導し、機能発現の準備段階を促進すると考えられた。基底膜側 K^+ チャネルの機能発現異常に起因する EAST 症候群を来す遺伝子変異は、①チャネルの細胞表面への輸送阻害 ②チャネルの pH感受性の亢進 の何れかにより尿細管機能障害を発症していた。以上より、尿細管細胞におけるチャネルの細胞表面への輸送においては MAGI-1 を含む細胞裏打ち構造へのチャネル輸送過程が不可欠であることが示唆された。

【考察】 MAGI-1 は遠位尿細管細胞の膜裏打ち構造を構成する分子として、尿細管細胞内における K^+ チャネルの機能的局在を規定することが判明した。ミネラルコルチコイドは、 K^+ チャネル分子上の PDZ-binding motif のリン酸化を介し、MAGI-1 によるチャネルの局在状態を調節することにより、遠位曲尿細管イオン輸送量を制御していると推定される。EAST 症候群の一家系においても、MAGI-1 を介した尿細管細胞内でのチャネル局在の制御異常が病態に関与していると考えられた。 K^+ チャネルの機能的発現を規定する機構は、生体における K^+ 輸送制御機構において重要な役割を担うと推定され、MAGI-1 との相互作用の調節による K^+ チャネル機能制御が K^+ 輸送機能異常に起因する疾患の治療に利用できる可能性を示す成果であると考えられる。

1. 研究背景と目的

生体の体液恒常性維持器官として機能する腎臓では、糸球体で濾過された血漿の 99% を尿細管が再吸収し、 K^+ バランスを含む体液恒常性を維持していると考えられる。イオン再吸収の制御を担うことが判明している遠位尿細管の中でも、欧米型の食生活環境で認める相対的高 Na^+ ・低 K^+ 摂取の条件下では、遠位曲尿細管近傍が生体内での電解質恒常性維持に関して主要な制御を担うセグメントであることが近年の生理学的研究により明らかにされている⁽⁷⁾。

遠位曲尿細管では、基底膜側に発現している Na^+/K^+ -ATPase を駆動力としたイオン再吸収を行っているが、 Na^+ 再吸収に際して細胞内に流入する K^+ に対して (1) 管腔側 K^+ チャネルを介した尿中への排泄、または (2) 基底膜側 K^+ チャネルを介した血中への再吸収、を介して、 Na^+ と独立に K^+ 排泄・再吸収のバランスを制御していると考えられる (Fig. 1 参照)⁽¹²⁾。生体は、遠位曲尿細管でこれら K^+ チャネルの機能的発現を制御する事により、細胞外液量を規定すると考えられている Na^+ と細胞の静止膜電位を規定すると考えられている K^+ を含む電解質バラン

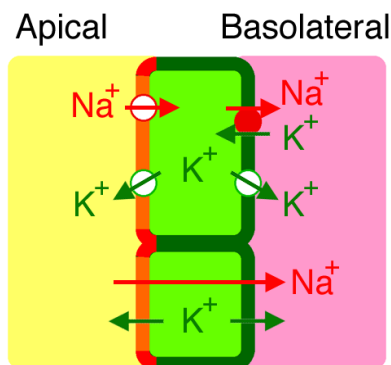


Fig. 1. “ K^+ -recycling” for renal distal tubular Na^+ -reabsorption. In renal distal tubules, Na^+/K^+ -ATPase conducts active transport on basolateral side, and Na^+ -transporters conduct passive transport on apical side (upper schematic cell). Because Na^+/K^+ -ATPase induces K^+ -entry into the cell, the pathway for K^+ -excretion, “ K^+ -recycling”, is indispensable for continuous Na^+ -reabsorption. The tubules have two (apical and basolateral) pathways for “ K^+ -recycling”, and by coordinating these pathways regulate the net K^+ -secretion/absorption without affecting the net Na^+ -reabsorption (lower schematic cell).

スを維持していると推定される^(4,12)。

本研究では、尿細管細胞内における K^+ チャネルの細胞膜上への機能発現を制御する機構の解明を試みた。生体における K^+ 輸送においては、 K^+ チャネルが細胞内の適所で機能する必要があるが、チャネル機能にはチャネルが細胞膜上への発現する必要があり、本研究は「生体における K^+ 輸送とその制御機構」の解明において、基幹となる研究と位置づけられると考えられる。また、上記のように、遠位曲尿細管における K^+ 輸送は細胞外液量や静止膜電位を規定する上で、不可欠の役割を果たすと考えられ、本研究結果は、生体内での電解質恒常性の異常に起因する様々な疾患に対する新たな治療法の解明に貢献すると考えられる。

2. 研究方法

従来の研究の結果、遠位曲尿細管 K^+ チャネルを構成するタンパクに関して、管腔側は Kir1.1/SUR2b or CFTR complex により構築され⁽²¹⁾、また、基底膜側は Kir5.1/Kir4.1 heteromer により構築されていることを解明していた⁽¹⁶⁾。チャネルを含む膜タンパクは、いわゆる膜裏打ちタンパクとの相互作用により、その細胞内での局在を規定されていると推定される。そこで、本研究では、これら遠位曲尿細管 K^+ チャネルを構成するタンパクと相互作用するいわゆる膜裏打ちタンパクの同定を試み、これらタンパク間の相互作用部位とその修飾因子を明らかにすることにより、遠位曲尿細管 K^+ チャネルの機能局在を制御する機構の解明を試みた。

2.1 基底膜側 K^+ チャネルとアンカータンパクの相互作用制御機構の解明

従来の研究で、基底膜側 K^+ チャネルの構成因子である Kir4.1 のカルボキシル末端に存在する局在シグナルの一つである PDZ-binding motif を認識するタンパクとして膜裏打ちタンパクの一つであるアンカータンパクと呼ばれるタンパク群に属する MAGI-1 の同定に成功していた⁽²⁰⁾。本研究では、Kir4.1 と MAGI-1 の相互作用を担う分子機構の解明を試みた。

Kir4.1 の PDZ-binding motif は PKA によるリン酸化を受けうる配列上にあったことから、*in vitro* における PKA による PDZ-binding motif のリン酸化を、PKA の特異的阻害薬である H89 作用の有無で比較した。HEK293T 細胞にお

いて Kir4.1 チャンネルを発現させ、特異的抗体を用いた定量比較にて、cAMP アナログ刺激下と H89 添加下でチャンネルのリン酸化状態を検討した。

2. 2 基底膜側 K⁺ チャンネル/MAGI-1 相互作用の個体レベルでの検討

2. 2. 1 食塩負荷の相互作用に対する影響

尿細管でのイオン輸送は腸管からの吸収量に対応して変化することが知られており⁽⁶⁾、経口イオン負荷量の違いによりチャンネル/MAGI-1 相互作用が変化する事を推測していた。本研究では、Na⁺ の経腸的負荷変化を加えた個体を用い、尿細管におけるチャンネル/MAGI-1 の発現量と相互作用の変化を解析した。

8 週齢ラットを各群 4 匹づつ、低食塩 (0.3% NaCl) の普通食と高食塩食 (8% NaCl) で、2 週間飼育し (high-salt)、飼育後、腎臓からの蛋白を抽出した。抽出した蛋白を用いて、両個体群における MAGI-1・チャンネル相互作用を免疫沈降法にて比較した。

2. 2. 2 ミネラルコルチコイド負荷の相互作用に対する影響

臨床的にミネラルコルチコイドの過剰作用により低カリウム血症が認められることから、ミネラルコルチコイド作用により基底膜側 K⁺-recycling が抑制されることが推定され、ミネラルコルチコイド負荷による尿細管におけるチャンネル/MAGI-1 の発現量と相互作用の変化を解析した。

8 週齢ラットを各群 3 匹づつ、高食塩食 (8% NaCl) で飼育することにより、個体由来のミネラルコルチコイドを抑制し、その後一群にはアルドステロン、他群は溶媒のみを持続皮下注射し、各々ミネラルコルチコイド負荷有、無状態に 1 週間維持し、1 週間後に両個体群における MAGI-1・チャンネル相互作用を免疫沈降法にて比較した。

2. 3 リン酸化をつかさどるキナーゼの同定

Kir4.1 の PDZ-binding motif のリン酸化状態が基底膜側 K⁺ チャンネル/MAGI-1 相互作用を制御することが *in vitro* における PKA によるリン酸化促進実験の結果から示唆されたが⁽²⁰⁾、*in vivo* で PDZ-binding motif のリン酸化を促すキナーゼは不明であり、その同定を試みた。ミネラルコルチコイド負荷状態の個体を基底膜側 K⁺-recycling 抑制状態のモデルとして用い各種キナーゼの発現量の変化の解明を試みた。

8 週齢ラットを各群 3 匹づつ、高食塩食 (8% NaCl) で飼

育し、その後一群にはアルドステロン、他群は溶媒のみを持続皮下注射し、1 週間後、腎臓からの RNA を抽出しマイクロアレイを施行した。

2. 4 管腔側 K⁺ チャンネルとアンカータンパクの相互作用の解明

従来の研究で MAGI-1 のスプライス変異体が遠位曲尿細管の管腔側に発現していることを解明していた⁽²⁰⁾。この変異体は基底膜側と同様に管腔側チャンネル・輸送体のアンカータンパクとして機能している可能性が推定され、この MAGI-1 スプライス変異体と管腔側チャンネル・輸送体の相互作用を解析した。

抗 MAGI-1 抗体を用いて腎臓抽出タンパクに対して免疫沈降を行い、管腔側 K⁺ チャンネルが MAGI-1 と共沈されるか検討した。更に、管腔側 K⁺ チャンネルを構成する subunits である Kir1.1、SUR2b または CFTR と MAGI-1 の相互作用をタンパク質相互作用実験系で検討した。MAGI-1 の各ドメインを用いた GST fusion protein により、Kir1.1、SUR2b または CFTR の GFP fusion protein に対する GST pull down assay を施行し、タンパク質間の相互作用を検討した。

2. 5 Kir4.1 の遺伝子変異による病態の解明

小脳を含む中枢神経系の興奮異常・聴覚を含む内耳機能異常・尿細管機能異常に基づく電解質ホメオスタシス異常を来す疾患である EAST 症候群を呈する症例の原因遺伝子として Kir4.1 が同定され、Kir4.1 のアミノ酸コード異常に基づくことが近年明らかにされた^(2,11)。アミノ酸コード異常が Kir4.1 の機能異常を来し、EAST 症候群の臨床症状を呈することが判明したが^(10,22)、アミノ酸コード異常が尿細管細胞での Kir4.1 の機能異常を来すメカニズムは十分に検討されていなかった。本研究では、アミノ酸コード異常が Kir4.1 の尿細管細胞における発現に与える影響に関して検討した。

報告された EAST 症候群 Kir4.1 遺伝子変異を導入した変異体を作製し、MDCK 細胞を尿細管モデル細胞として用い、その尿細管細胞における細胞内局在を検討した。

2. 6 尿細管イオン輸送制御に起因する病態の診断

2. 6. 1 原発性アルドステロン症の診断法に関する検討

遠位曲尿細管におけるイオン再吸収制御異常の結果として認められる異常の一つに高血圧症がある⁽⁵⁾。ミネラル

コルチコイド作用の過剰状態が病因と考えられている原発性アルドステロン症の診断法では、副腎静脈サンプリング (AVS) が診断過程でのゴールドスタンダードと考えられているが、AVS における ACTH 負荷刺激の必要性の有無に関して見解がわかれていた。そこで、本研究では、AVS における ACTH 負荷刺激の必要性に関して臨床症例を用いて検討した。

原発性アルドステロン症と診断された 10 症例に対して、ACTH 負荷前・後(極低量 0.1 µg と標準量 250 µg)の両側同時 AVS を施行し、各 AVS による診断結果を比較した。

2. 6. 2 腎血管性高血圧症の診断法に関する検討

レニンアンジオテンシン系の活性過剰により、ミネラルコルチコイド作用の過剰状態を来し、遠位尿細管における Na⁺ 再吸収が亢進し、循環血漿量が増大し、その結果として高血圧症を来す病態として腎血管性高血圧症が判明している⁽⁹⁾。血流障害を来すような腎血管病変に対しては、カテーテルを用いた経皮経管腎動脈再建術 (PTRA) が有効であることが報告されている一方で、腎血管病変では血流障害を来さない病変も多く、血流障害を来さない病変と血流障害を来す病変を適切に判別する方法が必要であった。そこで、腎血管病変で最も頻度が高く臨床的に適切な診断が必要とされる動脈硬化性腎臓脈狭窄症 (ARAS) 症例を用いて、その血行動態指標と治療後の降圧の関連を検討し、ARAS において治療効果が期待出来る血行動態の解明を試みた。

片側性 ARAS 34 症例に対して、ステント留置 PTRA を施行し、各種血行動態指標と血行再建術後の全身血圧の降下の関連を検討した。

3. 研究結果

3. 1 基底膜側 K⁺ チャネルのリン酸化制御

HEK293T 細胞を用いた培養細胞系に発現させた Kir4.1 を用いた検討で、Kir4.1/MAGI-1 相互作用が PKA 刺激により阻害され、PKA 特異的阻害薬である H89 により促進することが判明した (Fig. 2a)。Kir4.1 のカルボキシル末端を用いた更なる検討により、Kir4.1 の PDZ-binding motif がリン酸化され、このリン酸化が H89 により阻害され、PDZ-binding motif のセリン残基に点変異を導入することによりリン酸化が認められなくなったことから、Kir4.1 の PKA は Kir4.1 の PDZ-binding motif にリン酸化を誘導す

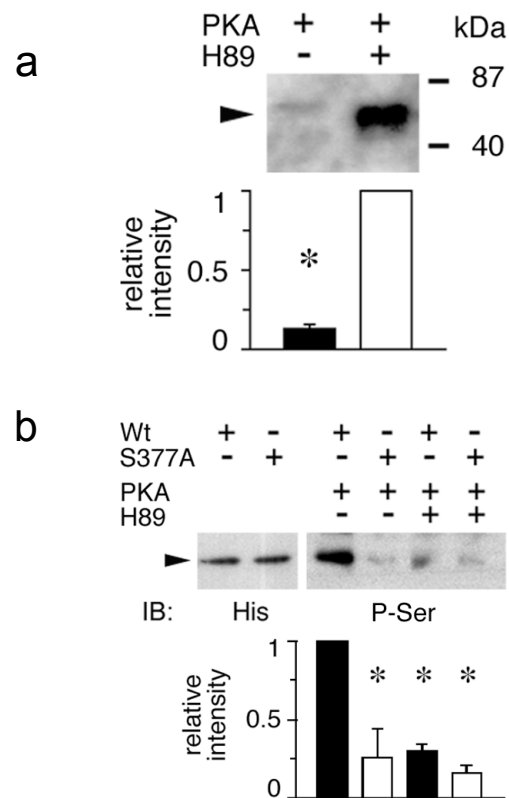


Fig. 2. (a) Disruption of MAGI-1a/Kir4.1 interaction by activation of PKA. Panel shows the representative results of immunoprecipitation. The conditions of incubation are indicated above the panel. The disruption was impeded by H89, a PKA-specific inhibitor. PKA, incubation with cAMP cocktail; H89, inhibition by H89. Bar graph shows the relative intensity of the coprecipitated Kir4.1 with PKA stimulation as compared with coinhibition by H89 (n=3; *P<0.01).

(b) Phosphorylation of serine residue in PDZ-binding motif of Kir4.1. Ni-NTA Agarose-precipitated poly-histidine tagged CT81 segment of Kir4.1 expressed in HEK293T cells was detected by antibodies indicated below the panel. His, anti-polyHistidine antibody; P-Serine, anti-phosphoserine antibody. Sequence of segments and condition of treatments are indicated above the panels. WT, wild-type; S377A, mutant with serine377 to alanine; PKA, stimulation with cAMP cocktail; H89, inhibition by H89. Representative immunoblots are shown in upper panels and relative intensity is summarized in bar graph (mean ± SD, n=4, *P<0.01 compared with WT/PKA+/H89-).

ると推察された (Fig. 2b)⁽²⁰⁾。

3. 2 経口食塩負荷による Kir4.1・MAGI-1a 相互作用の変化

ウェスタンブロットを用いた発現量の検討で、普通食低食塩 (0.3% NaCl) (コントロール) または高食塩食 (8% NaCl) (食塩負荷) で 2 週間飼育したラットにおいて、食塩負荷群ではコントロール群に比較し、腎内での Kir4.1 の発現量が少ない傾向が認められたが、発現量の差は軽度であり有意差は認めなかった。これに対して、同量の MAGI-1 を免疫沈降する抗 MAGI-1 抗体により抗 MAGI-1 抗体により免疫沈降される Kir4.1 の量は、コントロール群に比較し食塩負荷群で有意に多かった (Fig. 3)⁽²⁰⁾。

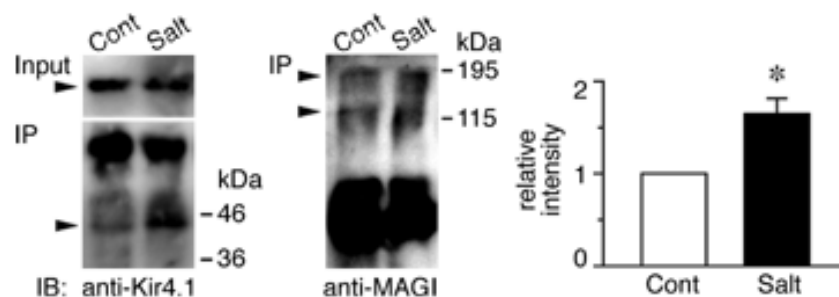


Fig. 3. Increased intrarenal MAGI-1/Kir4.1 interaction by NaCl-load. Left and middle panels show representative results of immunoblotting. More Kir4.1 was coprecipitated with MAGI-1 in the kidney of the NaCl-loaded group than the control group, although nearly same amount of Kir4.1 is expressed in both (left panels). The antibody used for coprecipitation precipitated a same amount of MAGI-1 in the control and salt-loaded groups (middle panel). Bar graph shows the relative intensity of the coprecipitated Kir4.1 in the salt-loaded group to that in the control group (n=4; *P<0.01). Cont, control group; Salt, salt-loaded group.

Table 1. Kinases that showed more than 2 times increase by aldosterone-stimulation

	Log10 ratio	P
Endothelial-specific receptor tyrosine kinase (Tek)	0.40	0.001
Maternal embryonic leucine zipper kinase (Melk)	0.39	0.000
Kinase-like domain containing soluble guanylyl cyclase (ksGC)	0.38	0.000
Death-associated kinase 2 (Dapk2)	0.36	0.000
Mitogen activated protein kinase kinase kinase 11	0.35	0.017
Polo-like kinase isoform	0.33	0.000
Serine/threonine-protein kinase WNK4	0.33	0.056
Membrane associated tyrosine/threonine 1 (Pkmyt1)	0.31	0.000

3. 3 腎遠位尿管基底膜側 K⁺ チャネルのリン酸化を担うキナーゼの同定

高食塩食飼育下で、アルドステロン負荷群と非負荷群 (コントロール) において、各種キナーゼの腎臓での発現量を、whole kidney RNA を用いたマイクロアレイで解析した。マイクロアレイでスクリーニングしたキナーゼ中で、アルドステロン負荷群において非負荷群より 2 倍以上の mRNA の増加が見られたキナーゼは 8 個であった (Table 1)。

いずれのキナーゼも mRNA での増加が多くとも 2.5 倍程度であり、また、WNK4 をのぞき腎遠位尿管での機能的発現が報告されていないタンパク質であった。また、

腎遠位尿細管での機能的発現が唯一報告されている WNK4 に関しては、アルドステロン負荷群と非負荷群での差が $P = 0.0056$ と統計学的な有意差を認めなかった。

3. 4 管腔側 K^+ チャネルと MAGI-1 の相互作用

MAGI-1 のスプライス変異体が腎遠位尿細管管腔側に発現していることを従来の研究で解明しており、この変異体を含めた腎内発現型 MAGI-1 を認識できる抗 MAGI-1 抗体と抗 Kir1.1 抗体を用いて、MAGI-1 と Kir1.1 の腎臓内での発現分布を検討し、MAGI-1 と Kir1.1 の遠位尿細管管腔側での共発現を認めた (Fig. 4a)。更に、免疫沈降法を用いた MAGI-1 と Kir1.1 の相互作用の検討にて、抗 MAGI-1 抗体により Kir1.1 が MAGI-1 と共沈されたことから (Fig. 4b)、腎遠位尿細管管腔側において MAGI-1 が Kir1.1 を含む管腔側 K^+ チャネルのアンカータンパクとして機能している可能性が示唆された。

MAGI-1 が相互作用する管腔側 K^+ チャネルのサブユ

ニットを明らかにするため、MAGI-1 の各領域を含む GST fusion protein とアミノ末端に GFP をマーカーとしてタグした Kir1.1 を用いて、MAGI-1 と Kir1.1 の *in vitro* 相互作用を GST pull down assay にて検討したが、MAGI-1 と Kir1.1 の相互作用は認められなかった (Fig. 4c)。一方で MAGI-1 の全領域を含む GST fusion protein とアミノ末端に GFP をマーカーとしてタグした SUR2b と CFTR を用いた GST pull down assay による検討では、MAGI-1 と SUR2b の相互作用は認められなかったが、MAGI-1 は CFTR カルボキシル端と相互作用することが確認できた。CFTR カルボキシル端には、いわゆる PDZ-binding motif が存在したことから、CFTR カルボキシル端は MAGI-1 の PDZ 領域と相互作用することが推定された。そこで、更に、MAGI-1 の各 PDZ 領域を含む各種 GST fusion protein を用いて、CFTR との相互作用を確認した。この結果、CFTR は MAGI-1 の PDZ5 領域と相互作用することを明らかにできた (data not shown)。

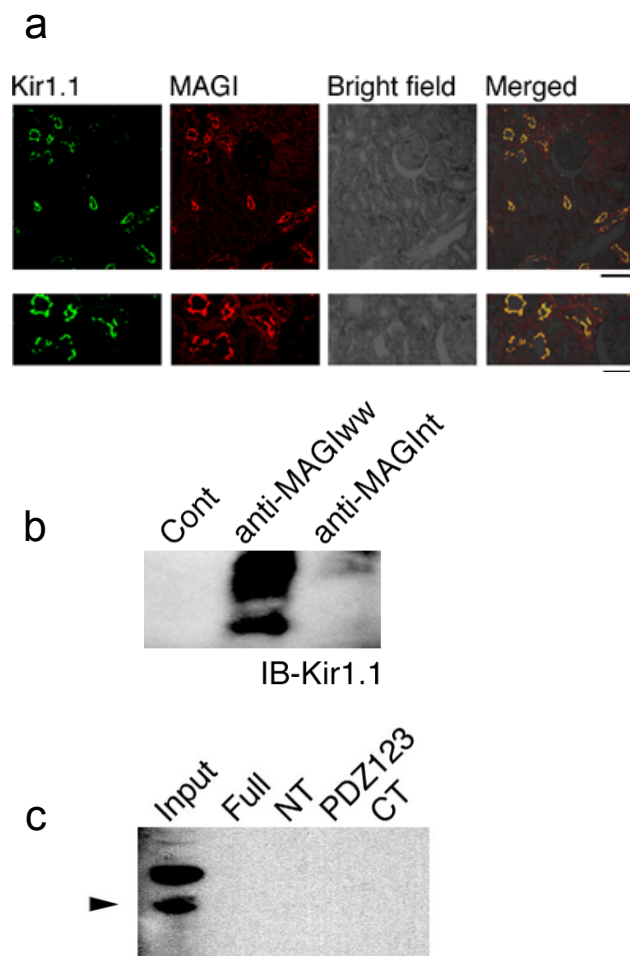


Fig. 4. (a) Co-expression of MAGI-1/Kir1.1 in DCT. Coimmunostaining of rat kidney with anti-Kir1.1 antibody (green) and anti-MAGI-1 antibody (red). Kir1.1 was colocalized with MAGI-1 on the apical side of DCT. Scale bar: 50 μ m.

(b) Intrarenal interaction of Kir1.1 with MAGI-1. Immunoprecipitation of Kir1.1 by with MAGI-1 short. Immunoprecipitants of by the anti-MAGIww antibody, which recognizes both MAGI-1 short and MAGI-1 long, contained Kir1.1. However, those by the anti-MAGInt, which recognizes only MAGI-1 long, did not contain Kir1.1. Cont: pre-immune rabbit IgG.

(c) Interaction of Kir1.1 with the apical-type-isoform of MAGI-1. GST pull-down of GFP-Kir1.1 by GST-fusion constructs of several MAGI-1 (MAGI-1 short: the apical-type-isoform of MAGI-1) domains. All GST-fusion constructs of MAGI-1 domains that contains either full-length (Full), amino-terminal two WW domains (NT), first three PDZ domains (PDZ123), or carboxyl-terminal portion that contains PDZ 4 and 5 (CT), did not interact with Kir1.1.

3. 5 Kir4.1 の遺伝子異常によるチャネルの機能発現異常の解明

EAST 症候群を呈する家系において変異が報告されている Kir4.1 遺伝子変異 (R66P, G77R, C140R, T164I, A167V, R199X, R297C) に関して、アミノ末端に GFP をマーカーとしてタグした各 mutant を作製し、培養細胞系におけるその細胞内局在発現を観察した。

腎尿細管由来の培養細胞系であり、培養条件下でも極性を維持することが判明している MDCK 細胞上において、野生型 Kir4.1 は basolateral 側にクラスター形成して分布した。これに対して、G77R、C140R、A167V、R199X 変異体は細胞質内に均一に分布し、細胞表面へ発現する傾向を認めなかった。R66P、T164I、R297C 変異体は野生型と類似の発現を呈し、basolateral 側にクラスター形成して分布した (Fig. 5)。

以上の実験結果より、R66P、T164I、R297C 変異体は野生型と同様に basolateral 側へ発現し、G77R、C140R、A167V、R199X 変異体は basolateral 側へ発現しない可能性が示唆された。A167V 以外の変異体は非極性細胞への強制発現実験にて、極性細胞で basolateral 側への発現

を呈さないものはチャネル活性を呈さず、発現を認めるものはチャネル活性を呈するが、pH 感受性が亢進し生理的 pH でチャネル活性を認めないことが報告されていた。A167V の非極性細胞における細胞表面への発現を確認するために、ビオチンにて細胞表面上のタンパク質を特異的にラベルする方法にて、HEK293T 細胞の細胞膜表面への発現を確認した (Fig. 6)。この結果、A167V 変異体が野生型と同様に非極性細胞において膜表面への発現が可能なが確認された。

3. 6. 1 原発性アルドステロン症の診断における負荷の必要性の検討

全 10 症例において両側同時 AVS を施行し、下大静脈と副腎静脈のサンプル間でのコルチゾール値比較から副腎静脈からのサンプル採取であることが確認された。コルチゾール値に対するアルドステロン値の比 (PAC/PFC) に基づいたアルドステロン過剰分泌側の診断においては、非過剰分泌側でアルドステロン分泌が抑制され PAC/PFC が下大静脈よりも値が小さく (< 1) なることが診断の一つの目安となるが、生理的 maximum 副腎皮質刺激に相当する極少量負荷後により負荷前と比較し、3 例での基準値 (1) を跨

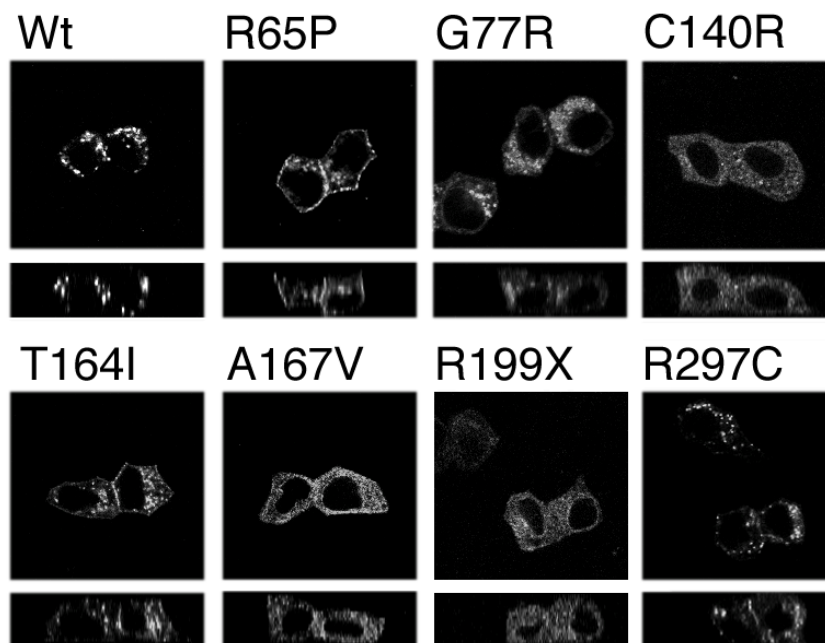


Fig. 5. Intracellular localization of the Kir4.1 mutants that cause the EAST syndrome. Localization of Kir4.1 mutants (indicated at the top of panels) in MDCK cells. Each mutant was GFP tagged on its amino-terminus and observed by confocal microscope. In MDCK cells, R65P, T164I, and R297C mutants as well as wild-type Kir4.1 (Wt) mostly distributed on lateral surface of cells, but G77R, C140R, A167V, and R199X mutant showed diffuse cytoplasmic distribution.

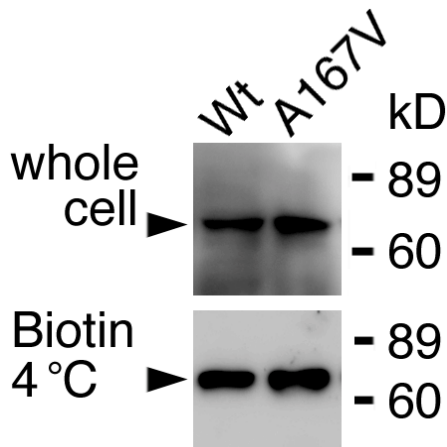


Fig. 6. Cell surface expression of A167V Kir4.1 mutant. Kir4.1 Channels (indicated at the top of panels) were surface-biotinylated for 20 min at 4°C. Nearly same amount of each mutant was expressed in HEK293T cells (upper panel) and cell-surface biotinylated (lower panel).

Table 2. The AV/IVC of A/C

Case		Basal	Low-dose	Standard-dose
1	R/L	1.83/0.93	6.28/2.81	4.84/2.54
2	R/L	18.5/0.69	7.08/1.06	8.79/1.06
3	R/L	5.26/2.47	0.85/2.10	0.85/5.63
4	R/L	1.52/2.87	1.42/3.37	2.44/5.70
5	R/L	27.0/4.07	6.54/2.66	3.39/5.42
6	R/L	25.6/0.68	22.7/0.55	9.29/0.77
7	R/L	11.5/0.30	15.2/0.06	3.60/0.13
8	R/L	24.1/0.79	2.75/0.44	19.2/0.43
9	R/L	5.87/0.23	1.60/0.14	2.79/0.19
10	R/L	0.11/10.8	0.07/1.63	0.11/2.53

AV, adrenal vein; IVC, inferior vena cava; A/C plasma aldosterone concentration (ng/dL)/plasma cortisol concentration (mg/dL); R, right adrenal vein; L, left adrenal vein.

い変化を認めた (**Table 2**)。一例 (症例 No. 1) では負荷後に抑制が消失し、二例 (症例 No. 2, 3) では負荷後に抑制が認められた。負荷量の多少による抑制状態の変化は全例で認めなかった⁽¹⁹⁾。

3. 6. 2 ARAS において血行再建による治療効果を反映する血行動態指標の解明

全 34 症例の片側性 ARAS においてステント留置 PTRAs を施行し、各種血行動態指標と血行再建術後の全身血圧の降下の関連を検討した。

血行動態指標の指標として、狭窄部より遠位と狭窄部より近位 (preBP) の血圧差 (pressure gradient: PG)、血圧差を狭窄部近位血圧で割った値 (PG/preBP) の各血圧相における値を用い、これらとを測定し血行再建術後の有効性の関連の検討では、各血圧相において PG/preBP の方が PG よりも有効性との関連が強く、収縮期 PG/preBP が最も強い関連を示した。更に、血行再建術後の有効性と PG/preBP の ROC 解析でも、ROC 曲線下面積は拡張期 PG/preBP が 0.794、拡張期 PG が 0.775、収縮期 PG/preBP が 0.764、拡張期 PG が 0.749 と拡張期 PG/preBP が最も大きい値を示した (**Fig. 7**)⁽¹⁸⁾。

4. 考 察

従来の研究で、①PDZ-binding motif が遠位尿細管基底膜側 K⁺ チャネルの機能的局在を規定するシグナルであること⁽¹⁵⁾、②PDZ-binding motif の認識因子としてアンカータンパク MAGI-1 が機能すること⁽²⁰⁾、③アンカータンパクが基底膜側 K⁺ チャネルの細胞内局在を規定する因子である可能性の解明⁽¹⁴⁾に成功していた。

本研究では、更に、①PDZ-binding motif がリン酸化による制御を受け、リン酸化により遠位尿細管基底膜側 K⁺ チャネルとアンカータンパクの相互作用が阻害されること、②チャネル・アンカータンパク相互作用が経口食塩負荷により増強され、ミネラルコルチコイド負荷により抑制されること、③管腔側 K⁺ チャネルも基底膜側 K⁺ チャネルと同様にアンカータンパクにより細胞内局在を規定されていること、を明らかにできた。管腔側アンカータンパクに関しては、アミノ末端部を特異的に認識する抗 MAGI-1 抗体では遠位尿細管管腔側での免疫染色を認めなかったことも確認しており⁽²⁰⁾、遠位尿細管管腔側ではアミノ末端部が短い MAGI-1 変異体が管腔側 K⁺ チャネルのアンカータンパクとして機能している可能性が推定される。MAGI-1 変異体の同一細胞内での局在の違いに関しては、これら変異体の違いが基底膜側に発現する変異体が管腔側に発現する変異体よりも長いアミノ末端部を有する

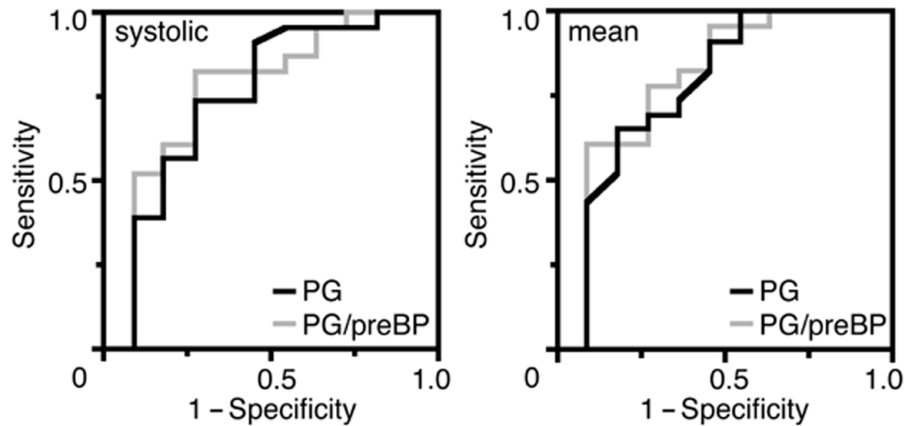


Fig. 7. ROC for the angioplasty outcome. Variables in the systolic (left panel) and mean phases (right panel) are analyzed by ROC curve for the systemic BP reduction after angioplasty. Black and gray lines show analysis of PG and PG/preBP, respectively. PG, trans-stenotic pressure gradient; preBP, pre-stenotic arterial blood pressure.

ことから、このアミノ末端部の特異的配列が基底膜側への局在を規定している可能性が考えられる⁽³⁾。

食塩負荷により MAGI-1 と基底膜側カリウムチャネルの相互作用が増強することが本研究にて示されたが、食塩負荷により個体のミネラルコルチコイド分泌が制御されることが推定されることから(食塩負荷により分泌抑制、塩分不足にて分泌促進)、食塩負荷下では、遠位尿細管におけるミネラルコルチコイド作用が抑制され、ミネラルコルチコイドにより誘導される SGK1 等のキナーゼの作用が低下し、PDZ-binding motif が非リン酸化状態となり、MAGI-1 との相互作用が増強した可能性が推定される⁽⁴⁾。

マイクロアレイ法の結果では、ミネラルコルチコイド負荷では尿細管に発現している各種キナーゼの発現量に変化を認めなかったことから、キナーゼの発現量の調節を介してではなく、活性を介して PDZ-binding motif のリン酸化状態を制御している可能性が考えられる⁽²³⁾。

本研究では、以上の基礎的研究に加え臨床的側面からの、高血圧疾患に対する治療法のアプローチも行った。原発性アルドステロン症は副腎皮質からのホルモン自律分泌により、アルドステロンが過剰に作用することに起因する疾患と考えられ、その加療に際してホルモン自律分泌側を的確に診断することが必要である。極度のストレス等の生理的な刺激は、本研究で検討した極低量負荷後と同程度の血中 ACTH 濃度上昇を来たしうることが報告されており⁽⁸⁾、極低量負荷が AVS におけるアルドステロン過剰分泌側の診断に影響する可能性を示した本研究に

より、負荷を行わない AVS による診断はホルモン自律分泌側を的確に診断しえない可能性を示したと考えられる。

腎血管性高血圧症に対する治療法に関する検討では、ARAS の治療指針として一般に用いられている PG 値よりも PG/preBP 値が有用である可能性を提示した⁽¹⁸⁾。従来の研究結果と本研究結果から、ARAS に対して、以下の診断・治療計画を提示することができると考えられる^(13,17)。
①年齢と腎機能に基づき、難治性高血圧疾患から ARAS が疑われる疾患を抽出、②抽出した疾患を対象に CTA または MRA 検査にて腎動脈を評価、③画像所見上狭窄病変の最小径が 3 mm 未満の症例をカテーテル検査、④狭窄病変の圧格差を測定し PG/preBP>0.15 の病変に対してステント留置 PTRR にて血行再建を行う。

以上のように、基礎研究的な検討では尿細管 K⁺ 輸送を司る K⁺ チャネルの機能局在機構の解明とその破綻に基づく疾患の病態を解明し、臨床的な検討では尿細管 K⁺ 輸送に制御される体液量調整の異常に基づく疾患である二次性高血圧の主因の一つである原発性アルドステロン症と腎血管性高血圧症の診断において診断法のよりの確な適応方法を示唆することで、「生体における K⁺ 輸送とその制御機構」解明による疾患の治療に貢献することが出来たと考えられる。

5. 今後の課題

ミネラルコルチコイドを含むシグナル伝達系による細胞内リン酸化経路の制御が、遠位尿細管 K⁺ チャネルの局

在過程を介して、腎臓における K^+ 輸送を制御することを提示できたが、リン酸化経路を生体で担う因子は未同定である。マイクロアレイ法の結果からはキナーゼ類の発現量調節を介さず、活性調節を介してリン酸化状態を制御していることが推定され、今後、細胞外シグナルにより活性制御を受ける腎臓尿細管内のキナーゼを活性測定により、解明してゆく必要がある。腎臓尿細管内で *in vivo* に機能しているキナーゼを同定することにより、このキナーゼを直接制御することによる生体 K^+ 輸送制御が可能となると考えられる。また、アンカータンパクへ K^+ チャネルを輸送する細胞内輸送経路も未同定であり、この同定も進める必要がある。ノックアウトマウス等を用いた個体レベルでの研究も、アンカー蛋白 MAGI-1 が実際に生体で如何に機能しているかの解明に有用であり、遺伝子改変動物を用いた研究へ発展させる予定である。

文 献

- Alvarez de la Rosa D, Coric T, Todorovic N, Shao D, Wang T, and Canessa CM. Distribution and regulation of expression of serum- and glucocorticoid-induced kinase-1 in the rat kidney. *J Physiol*. 551: 455-466, 2003.
- Bockenhauer D, Feather S, Stanescu HC, Bandulik S, Zdebek AA, Reichold M, Tobin J, Lieberer E, Sterner C, Landoure G, Arora R, Sirimanna T, Thompson D, Cross JH, van't Hoff W, Al Masri O, Tullus K, Yeung S, Anikster Y, Klootwijk E, Hubank M, Dillon MJ, Heitzmann D, Arcos-Burgos M, Knepper MA, Dobbie A, Gahl WA, Warth R, Sheridan E, and Kleta R. Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N Engl J Med*. 360: 1960-1970, 2009.
- Fanning AS, and Anderson JM. Protein modules as organizers of membranestructure. *Curr Opin Cell Biol*. 11: 432-439, 1999.
- Giebisch G. Renal potassium channels: function, regulation, and structure. *Kidney Int* 60: 436-445, 2001.
- Lifton RP, Gharavi AG, and Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104: 545-556, 2001.
- Lin DH, Sterling H, and Wang WH. The protein tyrosine kinase-dependent pathway mediates the effect of K intake on renal K secretion. *Physiology (Bethesda)*. 20: 140-146, 2005.
- Meneton P, Loffing J, and Warnock DG. Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*. 287: F593-601, 2004.
- Oelkers W. The role of high- and low-dose corticotropin tests in the diagnosis of secondary adrenal insufficiency. *Eur J Endocrinol*. 139: 567-570, 1998.
- Safian RD, and Textor SC. Renal-artery stenosis. *N Engl J Med* 344: 431-442, 2001.
- Sala-Rabanal M, Kucheryavykh LY, Skatchkov SN, Eaton MJ, and Nichols CG. Molecular mechanisms of EAST/SeSAME syndrome mutations in Kir4.1 (KCNJ10). *J Biol Chem*. 285: 36040-36048, 2010.
- Scholl UI, Choi M, Liu T, Ramaekers VT, Hausler MG, Grimmer J, Tobe SW, Farhi A, Nelson-Williams C, and Lifton RP. Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 5842-5847, 2009.
- Tanemoto M. Regulatory mechanism of " K^+ -recycling" for Na^+ -reabsorption in renal tubules. *Clin Exp Nephrol*. 11: 1-6, 2007.
- Tanemoto M, Abe M, Uruno A, Abe T, and Ito S. Angiographic index for angioplasty-treatable atheromatous renal artery stenosis. *Hypertens Res*. 31: 881-5, 2008.
- Tanemoto M, Abe T, and Ito S. PDZ-binding and di-hydrophobic motifs regulate distribution of Kir4.1 channels in renal cells. *J Am Soc Nephrol*. 16: 2608-2614, 2005.
- Tanemoto M, Abe T, Onogawa T, and Ito S. PDZ binding motif-dependent localization of K^+ channel on the basolateral side in distal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F1148-1153, 2004.
- Tanemoto M, Kittaka N, Inanobe A, and Kurachi Y. In vivo formation of a proton-sensitive K^+ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J*

- Physiol* 525: 587-592, 2000.
17. Tanemoto M, Saitoh H, Satoh F, Satoh H, Abe T, and Ito S. Predictors of undiagnosed renal artery stenosis among Japanese patients with risk factors of atherosclerosis. *Hypertens Res* 28: 237-242, 2005.
 18. Tanemoto M, Suzuki T, Abe M, Abe T, and Ito S. Hemodynamic Index of Atheromatous Renal Artery Stenosis for Angioplasty. *Clin J Am Soc Nephrol*. 4: 651-655, 2009.
 19. Tanemoto M, Suzuki T, Abe M, Abe T, and Ito S. Physiologic variance of corticotropin affects diagnosis in adrenal vein sampling. *Eur J Endocrinol*. 160: 459-463, 2009.
 20. Tanemoto M, Toyohara T, Abe T, and Ito S. MAGI-1a functions as a scaffolding protein for the distal renal tubular basolateral K⁺ channels. *J Biol Chem*. 283: 12241-12247, 2008.
 21. Tanemoto M, Vanoye CG, Dong K, Welch R, Abe T, Hebert SC, and Xu JZ. Rat homolog of sulfonylurea receptor 2B determines glibenclamide sensitivity of ROMK2 in *Xenopus laevis* oocyte. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F659-666, 2000.
 22. Tang X, Hang D, Sand A, and Kofuji P. Variable loss of Kir4.1 channel function in SeSAME syndrome mutations. *Biochem* 399: 537-541, 2010.
 23. Vitari AC, Deak M, Morrice NA, and Alessi DR. The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J*. 391: 17-24, 2005.

Mechanism for Functional Expression of the Distal Renal Tubular K⁺ Channels

Masayuki Tanemoto¹, Sadayoshi Ito²

¹Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine

²Division of Nephrology, Hypertension & Endocrinology, Department of Medicine,
Tohoku University Hospital

Summary

【Back ground and objectives】 Recent genetic analysis has revealed that the Na⁺ reabsorption in the distal convoluted tubules (DCT) participates in the systemic ion homeostasis. Composing the K⁺ recycling pathway for Na⁺ reabsorption in DCT, distal tubular K⁺ channels are principal components for the ion homeostasis. Hypertension, which reflects a state of Na⁺ overload, is one of the conditions caused by derangement in the ion homeostasis. Because hypertension is one of the chief burdens of the healthcare system, clarification of the regulatory mechanism for the distal tubular K⁺ channels is expected to contribute to the healthcare system.

In the previous studies, we identified the components of the distal tubular K⁺ channels; members of the Membrane Associated Guanylate Kinase (MAGUK) family, Membrane Associate Guanylate kinase with Inverted domain structure 1 (MAGI-1), function as scaffolding proteins for the K⁺ channels. In this study, we aimed to identify the regulatory mechanism for MAGI-1 to scaffold the K⁺ channels, because the scaffolding is considered to be indispensable for the functional expression of the K⁺ recycling pathway in DCT.

【Methods and Results】 *In vitro* analysis using HEK293T cells indicated that the basolateral K⁺ channels/MAGI-1 interaction was disturbed by phosphorylation of the serine residue of the PDZ-binding motif of Kir4.1, a subunit of the basolateral K⁺ channels. *In vivo* analysis using the anti-MAGI-1 specific antibody revealed the intra-renal basolateral K⁺ channels/MAGI-1 interaction was increased under a sodium-loading condition, which is expected to reduce plasma mineralocorticoid concentration. Microarray analysis between the rats with and without continuous injection of mineralocorticoid revealed that mineralocorticoid did not change the amount of the expression in the kinases usually expressed in the kidney. *In vitro* analysis expressing Kir4.1 mutants in MDCK cells, a cell-line derived from renal distal tubules, revealed disease-causing mechanisms for the EAST syndrome. R65P, A164I and R297C, the mutants reported to be inactive at physiological pH, could be expressed on the basolateral side, whereas G77R, C140R, A167V and R199X showed diffuse intracellular distribution. In A167V, disturbed transport of Kir4.1 to MAGI-1 caused diffuse intracellular distribution. Immunohistochemical analysis using antibodies that specifically recognize isoforms of MAGI-1 revealed that a variant of MAGI-1 (MAGI-1a-short) would scaffold the apical K⁺ channels in DCT.

【Conclusions】 MAGI-1 isoforms participated in the functional expression of the K⁺ channels in DCT: the amino-terminal longer one for the basolateral K⁺ channels and the amino-terminal shorter one for the apical K⁺ channels. Disruption in the process of the K⁺ channels/MAGI-1 interaction, which was regulated by the phosphorylation of the interacting domains of the K⁺ channels, caused tubulopathy in one lineage of the EAST syndrome. Mineralocorticoid possibly regulates the interaction by regulating the activity of the kinases expressed in DCT, such as SGK1 and WNK4. Regulation of these kinases could be a new target for hypertension treatment.

腎尿細管の K^+ 分泌と K^+ チャネル

河原 克雅¹, 安岡 有紀子¹, 福田 英一¹, 岡本 浩嗣²

¹北里大学医学部生理学, ²北里大学医学部麻酔科学

概要 腎臓は尿中に過剰な Na^+ , K^+ , 水を排出し、細胞外液の量・血漿浸透圧・電解質バランスを保持している。近位尿細管管腔膜には代償的 K^+ 分泌路(管腔内溶液の再吸収が大きいので、net の K^+ 分泌はない)、側底膜には Na^+ , K^+ ATPase と連動して機能する ATP 依存性 K^+ チャネルの存在が知られているが、分子レベルで同定されていない。一方、pH 感受性-2 孔 K^+ チャネルとして知られている TASK2 は、近位尿細管に高発現し、 HCO_3^- 再吸収や細胞容積調節に寄与していると考えられている。

【研究成果】 実験1. TASK2 KO マウスの作製プロトコールと経過(2009-11 年)。われわれは、German Gene Trap Consortium(GGTC) (ドイツ)から TASK2 KO マウス ES 細胞を購入し(2009.1.20 入手)、TASK2 KO マウス(ホモ)を作製した。TASK2 KO マウスはゲノムタイピングの後、5 週齢から観察したが、観察開始時既に小さく、観察期間中は、同じように成長した。

実験2. TASK2 mRNA の腎ネフロン内局在の解析。TASK2 mRNA の発現は、PCT、PST(腎皮質浅層)に多く発現し、mTAL、CCD(皮質深層)には発現していなかった。なお、酸負荷条件においてもドットの増加は見られず(PCT、PST)、新たな発現誘導もなかった(mTAL、CCD)。

実験3. TASK2 KO マウスの血液・尿解析。TASK2 KO マウスは、標準飼育下で pH、 HCO_3^- が有意に低く、代謝性アシドーシスを示した。しかし、尿 pH の値は WT と差はなかった。経口酸負荷によるアシドーシス誘導後、TASK2 KO マウス、WT マウス共に尿の pH は低下した。Na、K、Cl、Ca、アンモニアの尿中排泄に関して、KO と WT マウスに有意な違いはなかった。

1. 背景・研究目的

腎臓は尿中に過剰な Na^+ , K^+ , 水を排出し、細胞外液の量・血漿浸透圧・電解質バランスを保持している¹⁻³⁾。近位尿細管管腔膜には代償的 K^+ 分泌路(管腔内溶液の再吸収が大きいので、net の K^+ 分泌はない)^{4,5)}、側底膜には Na^+ , K^+ ATPase と連動して機能する ATP 依存性 K^+ チャネルの存在が知られているが^{5,6)}、分子レベルで同定されていない。一方、pH 感受性-2 孔 K^+ チャネルとして知られている TASK2 は、近位尿細管に高発現し、 HCO_3^- 再吸収^{7,8)} や細胞容積調節⁹⁾ に寄与していると考えられている。

われわれは、German Gene Trap Consortium(GGTC) (ドイツ)から TASK2 KO マウス ES 細胞を購入し

(2009.1.20 入手)、TASK2 KO マウス(ホモ)を作製し、生体内における生理機能(TASK2 欠落機能)を調べることにした。

2. 研究計画・方法

実験1. TASK2 ノックアウト(KO)マウスの作製

GGTC より TASK2 genetrapped ES 細胞を購入し、マウス胚盤胞に注入、TASK2 KO マウスを作製した。現在、北里大学医学部遺伝子高次機能センターで飼育、繁殖を行っている。

実験2. TASK2 mRNA の腎ネフロン内局在の解析

腎臓の TASK2 mRNA の局在を、高感度 in situ hybridization 法により解析した。

マウスは C57BL/6J の標準飼育、acidosis 誘導(2% sucrose 溶液(+0.28 M NH₄Cl))を用いた。

実験3. TASK2 KO マウス血液・尿の解析(標準飼育下および acidosis 誘導後)

a) TASK2 KO マウスおよび同腹の WT マウスの標準飼育下における尿・血液成分の解析を行った。尿は、マウスを代謝ケージに入れ、24時間尿を採取した。血液はイソフルレン麻酔下で頸動脈より採血した。

b) TASK2 KO マウスに 2% sucrose 溶液(+0.28 M NH₄Cl)を6日間飲水させ acidosis を誘導した。尿は、マウスを代謝ケージに入れ、1、3、6日目の24時間尿を採取した。血液は6日目に採血した。尿・血液は pH、電解質、クレアチニン、アルドステロン等を調べた。

3. 結果

実験1. TASK2 KO マウスの作製プロトコールと経過 (2009, 2010 年)

TASK2 KO マウスは ES 細胞からマウスへの作製に着手しキメラマウスを得た(2009 年)。2010 年前半、ヘテロ KO マウスの誕生に成功した。ヘテロ KO マウス同士の交配により、2010 年後半にホモ KO マウスが誕生し(図 1)、

KO マウスの生理機能を解析出来るようになった。しかし現時点においてホモ KO マウス同士の交配では子孫が得られていない。

ES 細胞は 129sv と C57BL/6 由来であったため、C57BL/6J と交配しバッククロスを行い F5 世代まで進んでいる。

TASK2 KO マウスはゲノムタイピングの後、5 週齢から観察したが、観察開始時既に小さく(体重比 15% 減)、観察期間中(5-11 週齢)は、同じように成長した(図 2)。

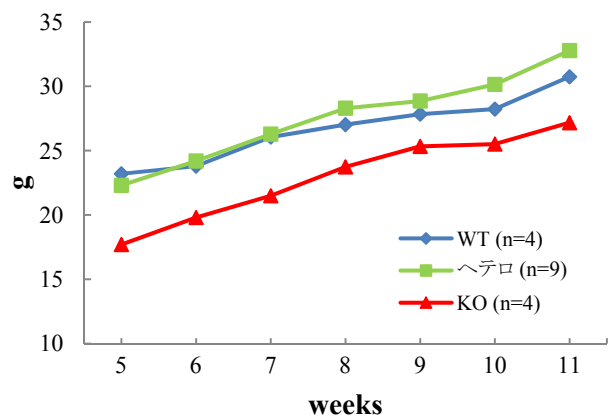


図 2. 体重の変化

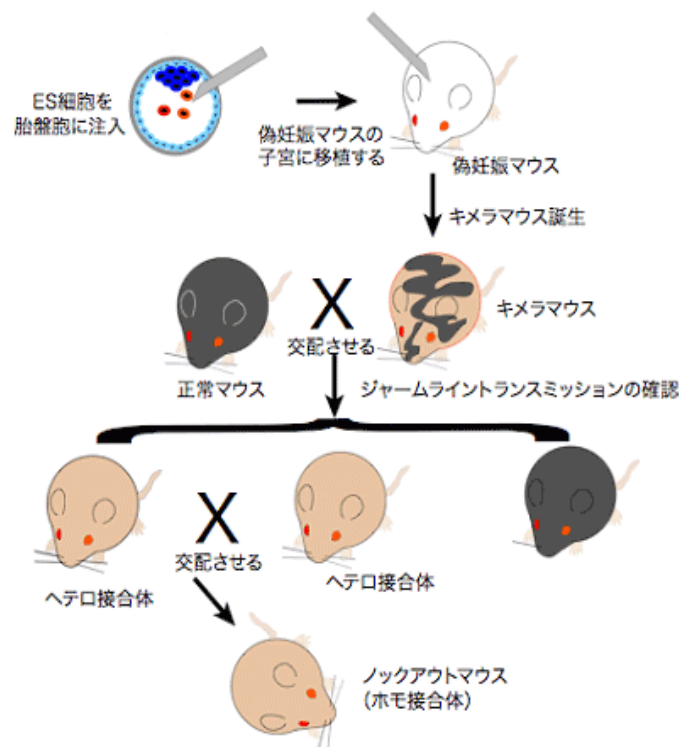


図 1. TASK2 KO マウスの作製プロトコールと経過 (2009, 2010 年)

実験2. TASK2 mRNA の局在の解析の結果

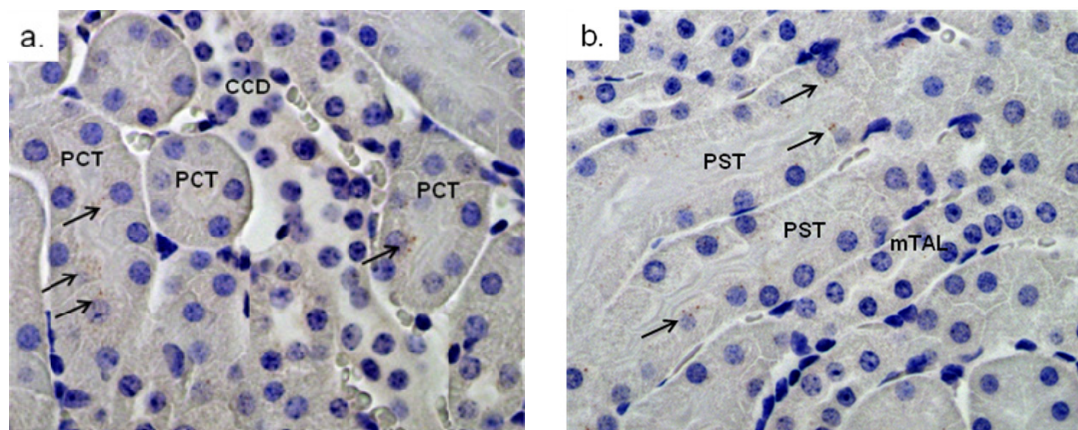


図3. マウス(WT)におけるTASK2 mRNAの局在(in situ hybridization)。a. 皮質浅層、b. 皮質深層。TASK2 mRNAの発現は、小さなドット(矢印)で示されている。PCT、PST に多く発現し、mTAL、CCD には発現していない。PCT: 近位曲尿細管、PST: 近位直尿細管、mTAL: 髓質太い上行脚、CCD: 皮質集合管。なお、酸負荷条件においてもドットの増加は見られず(PCT, PST)、新たな発現誘導もなかった(mTAL, CCD) (Data not shown)。

表 1. TASK2 WT/KO 血液データ 1

	WT/KO	Water	2% sucrose 溶液+0.28 M NH ₄ Cl
酸負荷日数(日)		0	6
匹数	WT	5	3
	KO	6	3
pH	WT	7.38 ± 0.01	7.35 ± 0.01 ns.
	KO	7.23 ± 0.01	7.20 ± 0.01 ns.
		※※	※※
pCO ₂ (mmHg)	WT	32.5 ± 1.1	29.1 ± 0.9
	KO	38.1 ± 2.7	37.9 ± 4.2
HCO ₃ ⁻ (mM)	WT	18.8 ± 0.9	15.6 ± 0.6
	KO	15.4 ± 1.0	14.3 ± 1.8
		※	

※ $p < 0.05$, ※※ $p < 0.005$

実験3. TASK2 KO マウスの解析

標準飼育下の TASK2 KO マウスは、血漿 pH、HCO₃⁻ が有意に低く、acidosis 状態を示していた(表1, 2, 3)。しかし、尿 pH の値は WT と有意な差はなかった(表 4)。

代謝性 acidosis 誘導後、TASK2 KO マウス、WT マウス

共に尿の pH は低下した。尿 Na、K、Cl、Ca、アンモニア排泄量に関しては、KO と WT マウス間に有意な差はなかった(表 4)。

表 2. TASK2 WT/KO 血液データ 2 (血漿電解質)

	WT/KO	Water	2 % sucrose 溶液+0.28 M NH ₄ Cl	
酸負荷日数(日)		0	6	
匹数	WT	5	3	
	KO	6	3	
Na ⁺ (mM)	WT	144.4 ± 0.8	146.3 ± 0.3	
	KO	144.7 ± 0.6	147.0 ± 1.2	
K ⁺ (mM)	WT	4.2 ± 0.3	3.5 ± 0.1	
	KO	4.3 ± 0.1	3.8 ± 0.1	#
Cl ⁻ (mM)	WT	120.8 ± 0.8	125.3 ± 0.3	#
	KO	125.2 ± 1.2	129.3 ± 2.3	
Pi (mg/dl)	WT	5.7 ± 0.1	6.1 ± 0.5	
	KO	7.2 ± 0.2	7.7 ± 0.6	
Ca ²⁺ (mg/dl)	WT	7.8 ± 0.2	7.7 ± 0.2	
	KO	7.7 ± 0.3	7.7 ± 0.3	
血漿浸透圧	WT	323.6 ± 1.2	323.3 ± 0.7	
	KO	324.5 ± 1.7	331.3 ± 1.3	#

WT vs. KO ※ $p < 0.05$, ※※ $p < 0.005$, 0 day vs. 6 days # $p < 0.05$

表 3. TASK2 KO 血液データ 3

	WT/KO	Water	2 % sucrose 溶液+0.28 M NH ₄ Cl	
酸負荷日数(日)		0	6	
匹数	WT	6	4	
	KO	5	4	
Aldosterone (pg/ml)	WT	324 ± 44	435 ± 61	
	KO	331 ± 78	688 ± 106	#
creatinine (mg/dl)	WT	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.01	#
	KO	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	

0 day vs. 6 days # $p < 0.05$

表 4. TASK2 WT/KO 尿データ

酸負荷日数(日)	WT/KO	2 % sucrose 溶液+0.28 M NH ₄ Cl			
		0	1	3	6
匹数	WT	5	4	4	4
	KO	6	4	4	4
pH	WT	6.55 ± 0.08	6.22 ± 0.06	5.84 ± 0.06	5.82 ± 0.05
	KO	6.59 ± 0.11	6.08 ± 0.01	5.80 ± 0.04	5.78 ± 0.03
飲水量 (ml)	WT	5.1 ± 0.5	3.3 ± 0.3	4.5 ± 0.3	5.2 ± 0.3
	KO	4.0 ± 0.3	4.1 ± 0.5	4.0 ± 0.1	4.9 ± 0.4
尿量 (ml)	WT	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.4	1.3 ± 0.2
	KO	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.1
尿浸透圧 (mOsm/kgH ₂ O)	WT	3100 ± 126	3623 ± 444	4175 ± 346	3932 ± 183
	KO	3243 ± 303	3530 ± 320	4252 ± 320	4127 ± 109
Na ⁺ 排泄量 (umol/day)	WT	189.3 ± 15.0	282.2 ± 37.7	254.1 ± 67.9	316.1 ± 41.9
	KO	152.9 ± 17.2	252.8 ± 34.4	219.7 ± 48.3	238.9 ± 33.4
K ⁺ 排泄量 (umol/day)	WT	383.2 ± 20.6	483.4 ± 79.9	411.9 ± 117.9	500.8 ± 75.0
	KO	285.6 ± 21.2	411.4 ± 59.3	334.7 ± 75.0	371.5 ± 55.6
Cl ⁻ 排泄量 (umol/day)	WT	391.1 ± 19.2	711.8 ± 89.1	959.0 ± 265.7	1183.2 ± 110.1
	KO	307.1 ± 24.9	723.6 ± 118.4	862.5 ± 152.9	962.3 ± 101.5
HCO ₃ ⁻ 排泄量 (umol/day)	WT	0.55 ± 0.10	0.33 ± 0.15	0.13 ± 0.05	0.13 ± 0.03
	KO	0.30 ± 0.06	0.18 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.10 ± 0
アンモニア排泄量 (mg/day)	WT	0.68 ± 0.06	3.15 ± 0.27	12.31 ± 3.68	14.10 ± 1.02
	KO	0.52 ± 0.05	5.53 ± 1.20	12.01 ± 1.54	12.00 ± 1.47
カルシウム排泄量 (mg/day)	WT	0.84 ± 0.08	0.76 ± 0.19	1.03 ± 0.21	1.21 ± 0.07
	KO	0.84 ± 0.13	0.80 ± 0.10	0.94 ± 0.17	1.21 ± 0.09
P 排泄量 (mg/day)	WT	29.4 ± 3.5			
	KO	29.0 ± 3.1			

4. 考 察

TASK2 (2孔-2回膜貫通型K⁺チャネル)は、pH感受性K⁺チャネルで、機能欠損により尿細管性アシドーシスが引き起こされる^{7,8)}。ドイツGGTCから購入したTASK2 KO ESクローン細胞を使って、TASK2 KOマウス(ホモ)を実験供与すべく準備してきた。現在、第一世代が生まれ、実験に必要な第二世代の繁殖を計画している。そのうちの一部を本研究計画に間に合わせるべく使用した。一方、対照実験用のマウスをバッククロス(5世代)で作製している。

予備実験の結果を総括すると、KOマウス(ホモ)は、1)標準食飼育で約15%低体重。2)標準食飼育(>5週齢)で代謝性アシドーシスを示したが、経口NH₄Cl負荷でアシドーシスの増悪は認められなかった。3)KOマウス(ホモ)の尿中へのHCO₃⁻喪失は、WTと比べ多くなく、酸負荷により減少した。以上の結果より、TASK2 KOマウス(ホモ)は、軽度な近位尿細管性アシドーシスを示すが、遠位部尿細管の酸分泌能は代償性に機能していることが伺えた。

5. 今後の展望

腎のK⁺分泌能と水・酸塩基調節能を包括的に理解するため、バソプレシンV1a受容体(V1aR)ならびにステロイドホルモン受容体(GR, MR)の正しい理解が欠かせない(H21年度報告)。今後は、TASK2 KOマウスならびにV1aR KOマウスを使った代謝ケージの実験(尿・血漿電解質の解析)と腎尿細管の当該遺伝子・蛋白発現(*In situ* hybridization, Western blotting)を関連させて、本研究テーマを進展させる。

現在遂行途中の研究を着実に展開させることにより、腎臓のK⁺分泌能と水・酸塩基調節能に関する新たな知見を集積し、腎機能の理解を深めることが可能になる。これらの結果、塩分摂取と水バランスの健全な知識が一般に普及し、QOLの高い体液管理が可能になると期待される。

文 献

1. Giebisch G. Renal potassium channels: an overview. *Kidney Int.* 1995; 48: 1004-1009.
2. Palmer LG, Frindt G. Regulation of apical K channels in

rat cortical collecting tubule during changes in dietary K intake. *Am J Physiol.* 1999; 277: F805-F812.

3. Kawahara K. 腎尿細管細胞の細胞特性I- 水・電解質の輸送. *日本腎臓学会誌.* 2008; 50: 561-655.
4. Kawahara K. Ba²⁺-sensitive potassium permeability of the apical membrane in newt kidney proximal tubule. *J Membr Biol.* 1985; 88(3): 283-92.
5. Kawahara K, Hunter M, Giebisch G. Potassium channels in Necturus proximal tubule. *Am J Physiol.* 1987; 253: F488-94.
6. Tsuchiya K, Wang W, Giebisch G, Welling PA. ATP is a coupling modulator of parallel Na, K-ATPase-K-channel activity in the renal proximal tubule. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 1992; 89: 6418-22.
7. Warth R, Barrière H, Meneton P, Bloch M, Thomas J, Tauc M, Heitzmann D, Romeo E, Verrey F, Mengual R, Guy N, Bendahhou S, Lesage F, Poujeol P, Barhanin J. Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K⁺ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 8215-20. Epub 2004 May 12.
8. Morton MJ, Abohamed A, Sivaprasadarao A, Hunter M. pH sensing in the two-pore domain K⁺ channel, TASK2. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 2005; 102: 16102-16106.
9. Barriere H, Belfodil R, Rubera I, Tauc M, Lesage F, Poujeol C, Guy N, Barhanin J, Poujeol P. Role of TASK2 potassium channels regarding volume regulation in primary cultures of mouse proximal tubules. *J Gen Physiol.* 2003; 122: 177-90. Epub 2003 Jul 14. Figure Legends

Publication

Kobayashi M, Yasuoka Y, Sato Y, Zhou M, Abe H, Kawahara K, Okamoto H. Upregulation of calbindin D28k in the late distal tubules in the potassium-loaded adrenalectomized mouse kidney. *Clin Exp Nephrol.* 2011 Feb 24. [Epub ahead of print]

The Salt Science Research Foundation (No.0635, 0727)

Presentations

1. Yasuoka Y, Kobayashi M, Sato Y, Nonoguchi H, Tanoue A, Kawahara K. Dislocation of mouse collecting duct aquaporin-2 by metabolic acidosis: role of vasopressin V1a receptor. Renal Week 2010, SA-PO2115, Colorado.
2. Fukuda H, Kawahara K. Prostaglandin E2-EP4 Axis Maintains the Expression of COX-2 in Mouse Macula Densa Cell Line (NE-MD) 第 88 回日本生理学会大会. (2011 年 3 月, 誌上開催)
3. Critical role of vasopressin V2R-AQP2 axis in the collecting duct by V1aR knockout mice. バソプレシン V1a 受容体 (V1aR) KO マウスにおける腎集合管 V2R-AQP2 軸. 安岡有紀子, 小林瑞佳, 佐藤雄一, 野々口博史, 田上昭人, 河原克雅. 日本腎臓学会誌. 53: 395, 2011
4. 福田英一, 河原克雅 プロスタグランジン E2-EP4 シグナルはマウスマクラデンサ細胞株 (NE-MD) の COX-2 発現を維持する. 第 41 回日本腎臓学会東部学術大会. (2011 年 10 月, 東京)

K⁺ Secretion through K⁺ Channels along the Kidney Nephron

Katsumasa Kawahara, Yukiko Yasuoka, Hidekazu Fukuda, Hirotsugu Okamoto

Departments of Physiology and Anesthesiology, Kitasato University School of Medicine

Summary

The mouse kidney plays important roles in the body acid-base balance as well as potassium (K) homeostasis, especially in response to dietary acid (0.28 M NH₄Cl) intake. In order to investigate whether pH-sensitive two-pore potassium channel (TASK2) may play an important role in maintaining acid-base homeostasis, we purchased the TASK2 genetrapped ES cell from German Gene Trap Consortium (GGTC) and developed TASK2 knockout (KO) mice (homo). It is known that TASK2 is expressed in the kidney proximal tubule and may be responsible for HCO₃⁻ reabsorption. In the present study we have determined whether TASK2 WT/KO mice maintain plasma pH by reabsorbing HCO₃⁻ from the glomerular filtrate and decreasing the urinary pH. By using a high sensitive in situ hybridization (HS-ISH) method, we found that TASK2 mRNA, counted as dots in approximately 1 μm diameter, was expressed in proximal convoluted/straight tubules (PCT/PST) in the cortex, but NOT in the medullary thick ascending limb of Henle's loop (MTAL) or the cortical collecting duct (CCD). No expression was observed in the region of the inner medulla. TASK2 KO mice (5-11 wk) seemed to be normal, but small in weight (▲15%). Plasma pH showed week acidosis in KO mice fed normal chow. No further decrease in pH was observed during a 6-d period of acid-loading. These results suggest that although TASK2 KO mice have low ability of HCO₃⁻ reabsorption in kidney, distal nephron may in part compensate acid-base balance, at least, under the acid-loading.

カリウム過剰摂取によるインスリン抵抗性改善作用とその作用機序の解明 についての研究

佐藤 博亮, 工藤 明宏, 平井 裕之, 渡辺 毅

福島県立医科大学腎臓高血圧糖尿病内分泌代謝内科学講座

概要 【目的】高食塩摂食が、高血圧ばかりでなくインスリン抵抗性を増悪させることが知られているが、カリウム過剰摂取により、この高血圧やインスリン抵抗性が改善することが明らかにされている。この機序として、酸化ストレスの抑制に関与している可能性が示唆されている。インスリン抵抗性の発症機序には複数の因子が関与していると考えられ、多種のアディポカインや酸化ストレスが複雑に関与していることが推測される。しかしながら、カリウム摂取による糖代謝に及ぼす影響に関して、まだ十分に解明されておらず、またインスリン抵抗性の発症と密接に関係しているアディポカインとの関連について明らかにされていない。本研究は、カリウム摂取におけるインスリン感受性への影響を検討した。

【方法】8週齢、雄、Wistar ラットを1)通常餌群、2)通常餌+8% KCl 群、3)高脂肪餌群、4)高脂肪餌+8% KCl 群の4群に分け、4週間飼育した。インスリン感受性は正常血糖高インスリンクランプ検査にて評価した。正常血糖・高インスリン・クランプ検査後に採取した骨格筋、脂肪組織、肝臓を用いて、インスリン・シグナルを、ウェスタンブロット解析にて検討した。

【結果】通常餌群において、4週間のカリウム摂取の有無により、体重および空腹時血糖値に有意な差は認めなかったが、高脂肪餌群において、空腹時インスリン値の低下を認めた ($P < 0.05$)。また、正常血糖高インスリンクランプ検査にて、通常餌群において、カリウム摂取の有無により、全身のインスリン感受性を示す GIR、末梢組織でのインスリン感受性を示す IS-GDR、肝臓でのインスリン感受性を示す clamp HGO、脂肪組織でのインスリン感受性を示す clamp FFA に有意な変化は認めなかった。一方、高脂肪餌群において、カリウム摂取により、GIR、IS-GDR、clamp FFA が、それぞれ約 30% の増加 ($P < 0.05$)、約 35% の増加 ($P < 0.05$)、約 30% の減少 ($P < 0.05$) を認め、clamp HGO は、約 27% 減少を認めた。高脂肪食群において、カリウム摂取は、骨格筋と脂肪組織で、IRS-1 と Akt のリン酸化の有意な増加、肝臓で、IRS-2 と Akt のリン酸化の有意な増加を認めた。これらの結果は、正常血糖・高インスリン・クランプ検査と一致して、高脂肪餌によるインスリン抵抗性状態では、カリウム摂取により、インスリン抵抗性が改善することが示唆された。また、血漿レニン活性の低下、血漿アンジオテンシン II の低下、脂肪組織での酸化ストレスの抑制、血中アディポネクチン値の上昇を認めた。

【結論】正常耐糖能状態では、カリウム摂取はインスリン感受性に影響を及ぼさなかったが、高脂肪負荷によるインスリン抵抗性状態では、カリウム摂取により、脂肪組織での酸化ストレスの抑制、アディポネクチンの上昇により、インスリン抵抗性改善作用を明らかにした。肥満状態では、カリウム摂取は、抗糖尿病作用を有する可能性が示唆された。

1. 研究の背景と目的

わが国の2型糖尿病患者は、増加傾向を示し、医療上の問題のみにとどまらず、社会的な問題となりつつある。糖尿病の最大の問題は、網膜症や腎症などの細小血管障害や虚血性心疾患や脳血管障害などの大血管障害を

引き起こすことである。細小血管障害は、血糖コントロールや罹病期間と相関するが、虚血性心疾患などの大血管障害は、必ずしも血糖コントロールや罹病期間と相関しないことが報告されている⁽¹³⁾。しかし、インスリン抵抗性改善薬であるビッグアナイド系薬剤により、虚血性心疾患などの

大血管障害が有意に抑制され⁽¹²⁾、糖尿病性大血管障害の発症・進展とインスリン抵抗性は深く関連していると考えられる。さらにインスリン抵抗性は、2型糖尿病ばかりでなく、高血圧、脂質異常症などのメタボリック・シンドロームの原因となることも広く知られており⁽⁹⁾、いかにインスリン抵抗性を改善させるかが、21世紀の糖尿病治療戦略にとって、重要な問題である。

インスリン抵抗性は、骨格筋、脂肪組織、肝臓などの糖代謝におけるインスリン標的臓器におけるインスリン・シグナル伝達の障害ということが知られている⁽⁸⁾。インスリン抵抗性状態では、骨格筋では糖取り込みが低下し、肝臓では糖新生の抑制が减弱し、脂肪組織では遊離脂肪酸の分泌が亢進する。近年、これら個々の臓器のインスリン・シグナル伝達の障害以外に、脂肪分泌される TNF α ⁽³⁾、アディポネクチン⁽¹¹⁾、レジスチン⁽¹⁰⁾などがアディポカインや酸化ストレス⁽¹⁾がインスリン抵抗性に重要な役割を果たすことが数多く報告されているが、まだ十分に解明されていない。

一方、高食塩摂食が、高血圧ばかりでなくインスリン抵抗性を増悪させることが知られているが⁽²⁾、カリウム過剰摂取により、この高血圧やインスリン抵抗性が改善することが明らかにされている⁽⁷⁾。この機序として、酸化ストレスの抑制に関与している可能性が示唆されている。インスリン抵抗性の発症機序には複数の因子が関与していると考えられ、多種のアディポカインや酸化ストレスが複雑に関与していることが推測される。しかしながら、カリウム過剰摂取による糖代謝に及ぼす影響に関して、まだ十分に解明されておらず、またインスリン抵抗性の発症と密接に関係しているアディポカインとの関連についても明らかにされていない。

本研究は、カリウム過剰摂取におけるインスリン感受性への影響を解明するために、正常モデル(Wistar ラット)及び肥満糖尿病モデルラット(高脂肪食負荷 wistar ラット)を用いて、カリウム過剰摂取(8% KCL を混餌)により、正常耐糖能状態とインスリン抵抗性状態におけるカリウム過剰摂取によるインスリン感受性に及ぼされる変化を検討し、筋肉、脂肪組織、肝臓でのインスリン抵抗性の改善作用を明らかにした。

2. 研究方法

I. 動物モデル実験

8週齢、雄、Wistar ラットを Charles River Laboratory から購入し、NIH ガイドラインと福島県立医科大学実験動物規定に従って飼育及び実験を施行した。1) 通常餌群、2) 通常餌+8% KCl 群、3) 高脂肪食群、4) 高脂肪食+8% KCl 群の4群に分けて4週間飼育した。それぞれの餌で飼育4週間後、正常血糖・高インスリン・クランプ実験にてインスリン感受性を評価した。正常血糖・高インスリン・クランプ実験を行なう7日前に、右総頸静脈に2本マイクロカテーテル(インスリン注入用とグルコース注入用)、内頸動脈に1本マイクロカテーテル(採血用)を挿入し、皮下トンネルを通し、両側肩甲骨の間から、体外に露出させた。正常血糖・高インスリン・クランプ実験は、約12時間絶食後に施行した。**Figure 1** に示す方法で施行した。D-[3-³H] glucose を120分持続静注することにより、空腹時における肝臓での糖新生を評価した。さらに、速効型ヒトインスリン(25 mU/kg/min)と D-[3-³H] glucose を持続静注し、他方の静脈カテーテルから、血糖値が150 mg/dl で定常状態を保つ様に10分間隔で血糖値を測定しながら、50% グルコース投与速度を調節し持続静注した。通常、実験開始、約90分後にグルコース注入速度が一定になり、この状態を20分以上維持した後、動脈カテーテルより、得られた血液から、末梢での糖利用率を測定し、糖代謝におけるインスリンの重要な標的臓器である肝臓、骨格筋、脂肪組織での各々のインスリン感受性の変化を評価した。

II. 血液試料の測定

血漿インスリン値は、rat insulin ELAISA kit (CRYSTAL CHEM Inc)、血清アディポネクチン値は、mouse/rat adiponectin ELAISA kit (B-Bridge International Inc)、血漿遊離脂肪酸は、NEFA (和光純薬)を用い測定した。血漿レニン活性、血漿アルドステロン、アンジオテンシン I、アンジオテンシン II は、SRL 株式会社に測定を依頼した。

III. ウェスタンブロット解析

正常血糖高インスリンクランプ実験終了後に採取した骨格筋、脂肪組織、肝臓から蛋白を抽出し、SDS-PAGE 電気泳動し、PVDF 膜に転写した。Akt リン酸化抗体 (Ser473) (Cell Signaling Technology)、Akt 抗体 (Cell Signaling Technology)、IRS-1 抗体 (Santa Cruz)、IRS-2 抗体 (Santa Cruz) を用いてウェスタンブロット解析を施行した。

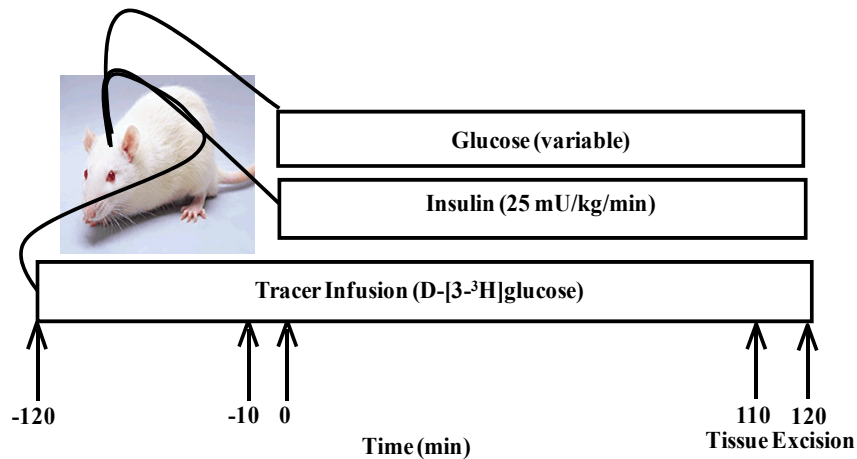


Figure 1. Schematic of euglycemic-hyperinsulinemic clamp experiment protocol. Muscle insulin sensitivity: $ISGDR = GDR - \text{basal HGO}$. Hepatic insulin sensitivity: $\text{clamp HGO} = GDR - GIR$. Adipose tissue insulin sensitivity: clamp circulating FFAs.

また、正常血糖高インスリンクランプ実験終了後に採取した骨格筋、脂肪組織、肝臓から抽出した蛋白を P-ty-100 抗体 (Cell Signaling Technology) で免疫沈降し、SDS-PAGE 電気泳動し、PVDF 膜に転写し、IRS-1 抗体 (Santa Cruz)、IRS-2 抗体 (Santa Cruz) を用いてウェスタンブロット解析を施行した。

IV. Quantitative real-time RT-PCR

正常血糖高インスリンクランプ実験終了後に採取した脂肪組織から、TRIzol (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。1 μg の total RNA から iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) を用いて、cDNA に reverse transcribed した。NADPH oxidase subunits (p67^{phox}, p47^{phox}, p22^{phox}) mRNA 発現定量をした。それぞれに対する特異的なプライマー、FastStart DNA Master SYBR Green I (Rche Diagnostics) を用いて Light Cycler にて測定した。

V. 統計学的解析

各データは、t-test を用いて比較検討した。P<0.05 であるデータが統計学的有意差を有するものとみなした。全てのデータは、平均±標準偏差で示した。

3. 研究結果

I. カリウム摂取が、体重、血清カリウム値、空腹時血糖値、空腹時インスリン値に及ぼす影響

通常餌群において、4 週間のカリウム摂取の有無により、体重に有意な差は認めなかった (Table 1)。4 週間の 60% 高脂肪負荷餌により、体重は $438.5 \pm 7.3 \text{ g}$ から 476.4 ± 8.4

g と有意に増加し (P<0.05)、カリウム摂取により、体重は、 $476.4 \pm 8.4 \text{ g}$ から $448.4 \pm 13.6 \text{ g}$ と有意に減少した (P<0.05)。

血清カリウム値は、通常餌群及び高脂肪餌群の両群において、カリウム摂取により、有意な変化を認めなかった (Table 1)。

12 時間絶食後の空腹時血糖値は、通常餌群において、4 週間のカリウム摂取の有無により、有意な差は認められなかった (Table 1)。4 週間の 60% 高脂肪負荷餌により、空腹時血糖値及び空腹時インスリン値の上昇が認められ (P<0.05)、インスリン抵抗性のモデルであることが確認された (Table 1)。この高脂肪餌群において、カリウム摂取により、空腹時血糖値の有意な低下は認めなかったが低下傾向を示し、空腹時インスリン値の有意な低下を認め (P<0.05)、カリウム摂取により、インスリン抵抗性状態では、インスリン抵抗性改善作用の可能性が示唆された。

II. カリウム摂取が、インスリン感受性に及ぼす影響

糖代謝におけるインスリンの標的臓器におけるインスリン感受性を検討するために、正常血糖高インスリンクランプ実験を施行した。

Figure 2A に示すように、全身のインスリン感受性を示す Glucose Infusion Rate (GIR) は、通常餌群において、4 週間のカリウム摂取の有無により、有意な変化を認めず、全身のインスリン感受性に影響を及ぼさなかった。4 週間の 60% 高脂肪餌により、GIR は約 35% 有意に減少し (P<0.01)、全身のインスリン抵抗性モデルであることが確

認された。高脂肪餌群において、カリウム摂取により、GIRは、約 30% 有意に増加し(P<0.05)、全身のインスリン感受性の改善が示唆された。

Figure 2B に示すように、末梢組織でのインスリン感受

性を示す Insulin-Stimulated Glucose Disposal Rate (IS-GDR=GDR-basal Hepatic Glucose Output (bHGO))は、通常餌群において、4 週間のカリウム摂取により、有意な変化を認めず、末梢組織でのインスリン感受性に影響を

Table 1. Animal Characteristics

KCl (%)	Normal Chow Diet		High Fat diet	
	0	8	0	8
Number	8	8	8	8
Body weight (g)	438.5 ± 7.3	432.3 ± 4.4	476.4 ± 8.4**	448.4 ± 13.6**
Serum K level (mEq/l)	4.62 ± 0.19	4.42 ± 0.61	4.35 ± 0.33	4.52 ± 0.22
Fasting Glucose levels (mg/dl)	130.9 ± 2.5	126.6 ± 3.0	148.3 ± 5.6**	143.9 ± 9.9
Fasting Insulin levels (ng/ml)	5.2 ± 0.8	5.0 ± 0.9	8.4 ± 1.1**	6.4 ± 0.9**
Clamp				
Glucose (mg/dl)	149.4 ± 0.7	150.9 ± 1.3	149.5 ± 1.5	152.4 ± 0.6

** : P<0.05

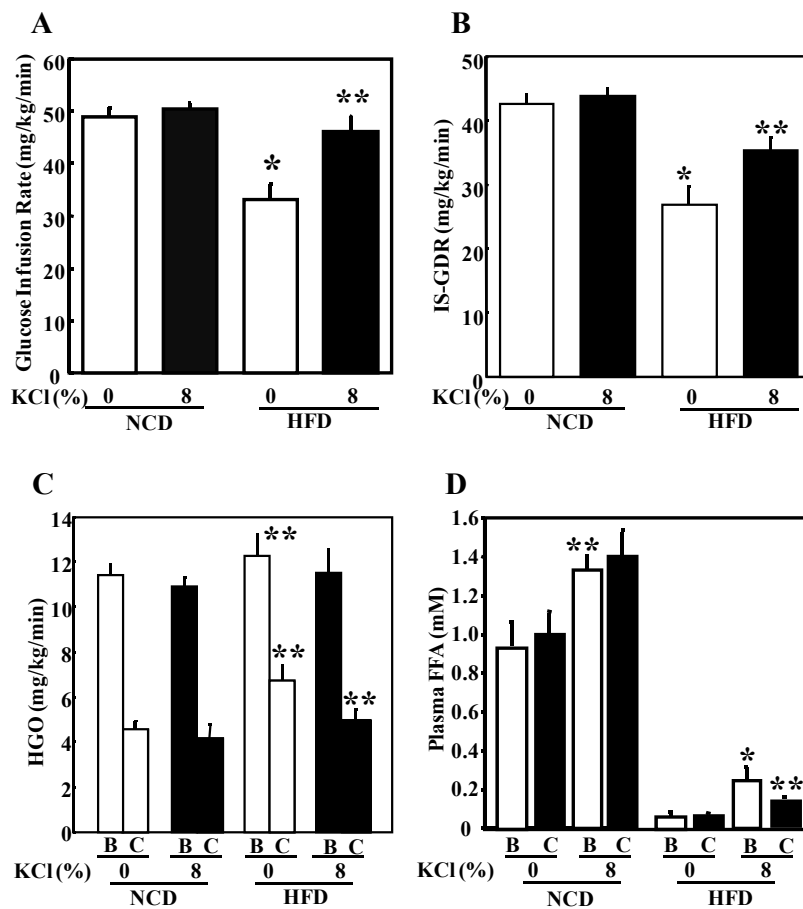


Figure 2. Glucose infusion rate, IS-GDR, HGO, and FFA levels during euglycemic-hyperinsulinemic clamp studies. NCD: Normal Chow Diet. HFD: High Fat Diet. B: Basal State. C: Clamp state. *: P<0.01. **: P<0.05.

及ぼさなかった。また、4 週間の 60% 高脂肪餌により、IS-GDR は約 40% 有意に減少し ($P < 0.01$)、末梢組織でのインスリン抵抗性モデルであることを確認した。この高脂肪餌群において、カリウム摂取により、IS-GDR は、約 35% 有意に増加し ($P < 0.05$)、末梢組織のインスリン抵抗性の改善作用が示唆された。

Figure 2C に示すように、空腹時における肝臓の糖産生を示す basal HGO は、通常餌群において、4 週間のカリウム摂取の有無により、有意な変化を認めず、空腹時での肝糖産生に影響を及ぼさなかった。また、4 週間の 60% 高脂肪餌により、basal HGO は、約 15% 有意に増加し ($P < 0.05$)、空腹時において肝糖産生の亢進を確認した。この高脂肪餌群において、カリウム摂取により、basal HGO の変化を認めず、空腹時の肝糖産生に影響を及ぼさなかった。次に肝臓でのインスリン感受性を示す clamp HGO は、通常餌群において、4 週間のカリウム摂取の有無により、有意な変化を認めず、肝臓でのインスリン感受性に影響を及ぼさなかった。また、4 週間の 60% 高脂肪負荷餌により、clamp HGO は約 55% 有意に増加し ($P < 0.05$)、高脂肪餌による肝臓でのインスリン抵抗性モデルであることを確認した。この高脂肪餌群において、カリウム摂取により、clamp HGO は、約 27% 有意に減少し、肝臓でのインスリン抵抗性改善作用が示唆された。

Figure 2D に示すように、主として脂肪組織でのインスリン感受性を示す clamp FFA は、通常餌群において、4 週間のカリウム摂取により、有意な変化を認めず、脂肪組織におけるインスリン感受性に影響を及ぼさなかった。また、4 週間の 60% 高脂肪負荷餌により、clamp FFA は約 3 倍と有意に増加し ($P < 0.01$)、高脂肪負荷により、脂肪組織でのインスリン抵抗性モデルであることを確認した。この高脂肪餌群において、カリウム摂取により、clamp FFA は、約 30% 有意に減少し ($P < 0.05$)、脂肪組織でのインスリン抵抗性改善作用が示唆された。

Ⅲ. カリウム摂取が、インスリン・シグナル伝達に及ぼす影響

カリウム過剰摂取におけるインスリン感受性の影響を細胞内情報伝達系について検討した。

骨格筋におけるインスリン・シグナル伝達に関して検討した。通常餌群において、カリウム摂取の有無により IRS-1 蛋白質及び IRS-1 チロシンリン酸化に変化を認めなかつ

た (**Figure 3A**)。高脂肪餌群において、カリウム摂取により、IRS-1 蛋白質量に変化を認めなかったが、IRS-1 チロシンリン酸化は、有意に約 33% 増加した (**Figure 3A**: $P < 0.05$)。さらにその下流である Akt も同様に、通常餌群においては、カリウム摂取の有無により Akt 蛋白質及び Akt セリンリン酸化に変化を認めなかった (**Figure 4A**)。高脂肪餌群において、カリウム摂取により、Akt 蛋白質量に変化を認めなかったが、Akt セリンリン酸化が有意に約 90% 増加した (**Figure 4A**: $P < 0.01$)。この結果より、正常血糖高インスリン・クランプ検査と一致して、高脂肪負荷によるインスリン抵抗性状態では、カリウム過剰摂取により、骨格筋において、インスリン・シグナル伝達の改善によりインスリン抵抗性が改善することが示唆された。

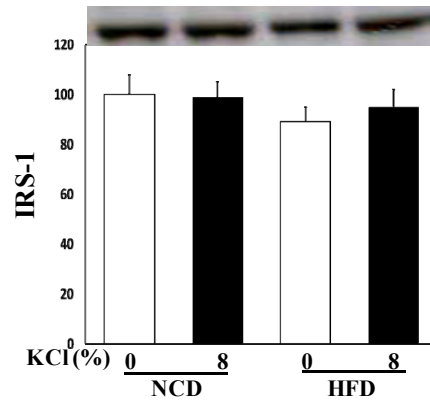
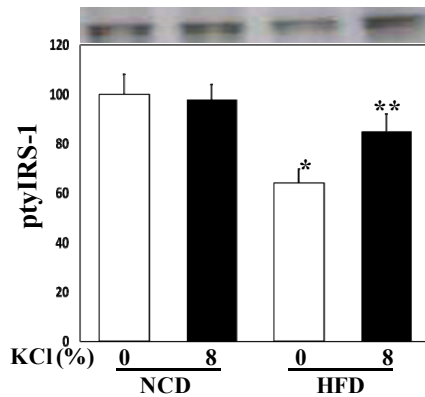
脂肪組織におけるインスリン・シグナル伝達に関して検討した。通常餌群において、カリウム摂取により、IRS-1 蛋白質及び IRS-1 チロシンリン酸化に有意な変化を認めなかった (**Figure 3B**)。高脂肪餌群において、カリウム摂取により、IRS-1 蛋白質量に変化を認めなかったが、IRS-1 チロシンリン酸化は、約 23% 有意に増加した (**Figure 3B**: $P < 0.05$)。さらにその下流である Akt も同様に、通常餌群においては、カリウム摂取により、Akt 蛋白質及び Akt セリンリン酸化に有意な変化を認めなかった (**Figure 4B**)。高脂肪餌群において、カリウム摂取により、Akt 蛋白質量に有意な変化を認めなかったが、Akt セリンリン酸化が有意に約 60% 増加した (**Figure 4B**: $P < 0.01$)。この結果より、正常血糖・高インスリン・クランプ検査と一致して、高脂肪食によるインスリン抵抗性状態では、カリウム過剰摂取により、脂肪組織において、インスリン・シグナル伝達の改善によりインスリン抵抗性が改善することが示唆された。

肝臓におけるインスリン・シグナル伝達に関して検討した。通常餌群において、カリウム過剰摂取により、IRS-1 蛋白質及び IRS-1 のチロシンリン酸化に変化は認められなかった (**Figure 3C**)。高脂肪餌群において、カリウム摂取により、IRS-1 蛋白質量及び IRS-1 のチロシンリン酸化は、有意な増加を認めなかった (**Figure 3C**)。その下流である Akt に関しては、通常餌群において、カリウム摂取により、Akt 蛋白質量及び Akt セリンリン酸化に有意な変化を認めなかった (**Figure 4C**)。高脂肪餌群において、カリウム摂取により、Akt 蛋白質量は有意な変化を認めなかったが、Akt セリンリン酸化が有意に約 40% 増加し (**Figure 4C**:

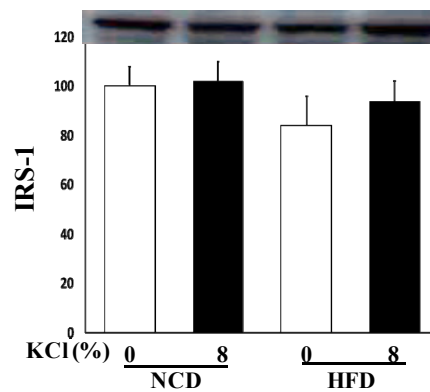
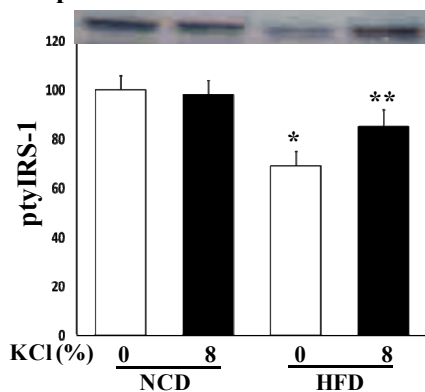
P<0.01)、インスリン・シグナル伝達の亢進の可能性が示唆された。そこで、肝臓において、もう一つの重要な Akt の上流にあるインスリン・シグナル伝達因子である IRS-2 について検討した。Figure 5 に示すように、通常餌群において、カリウム摂取により、IRS-2 蛋白量及び IRS-2 チロシンリン酸化に有意な変化を認めなかった。高脂肪食群において、カリウム摂取により、IRS-2 蛋白量に有意な変化

を認めなかったが、IRS-2 チロシンリン酸化は、有意に約 20% 増加した (P<0.05)。この結果より、正常血糖・高インスリン・クランプ検査と一致して、高脂肪餌によるインスリン抵抗性状態では、カリウム摂取により、脂肪組織において、IRS-2⇒Akt を介したインスリン・シグナル伝達の改善によりインスリン抵抗性が改善することが示唆された。

A. Skeletal muscle



B. Adipose tissue



C. Liver

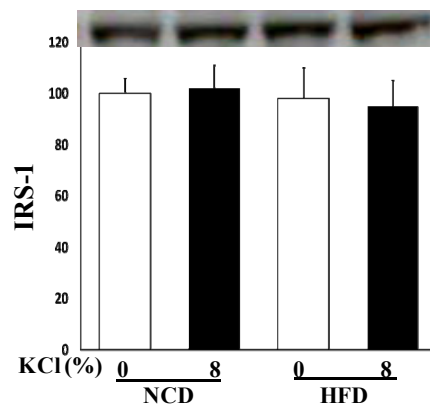
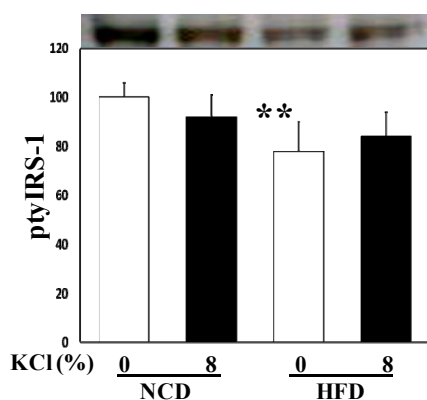
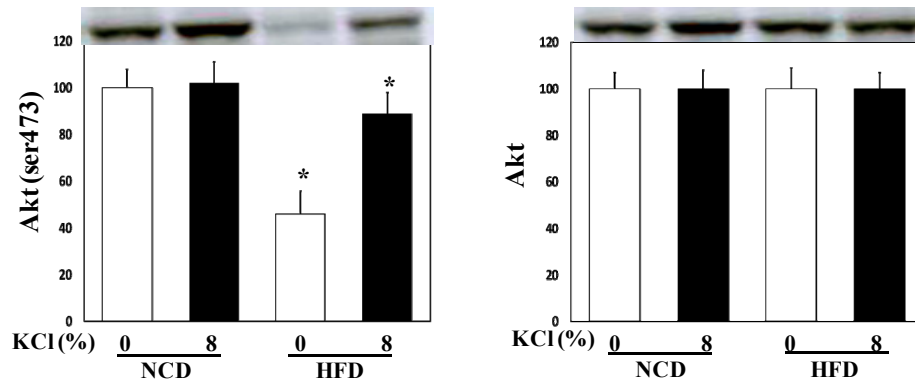
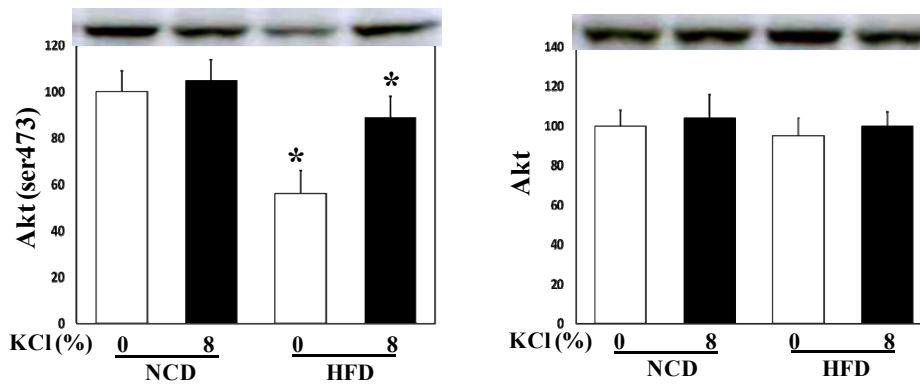


Figure 3. Effect of potassium on tyrosine phosphorylation of IRS-1 (pTy-IRS-1) in skeletal muscle, adipose tissue, and liver. NCD: Normal Chow Diet. HFD: High Fat Diet. **: P<0.05. *: P<0.01

A. Skeletal muscle



B. Adipose tissue



C. Liver

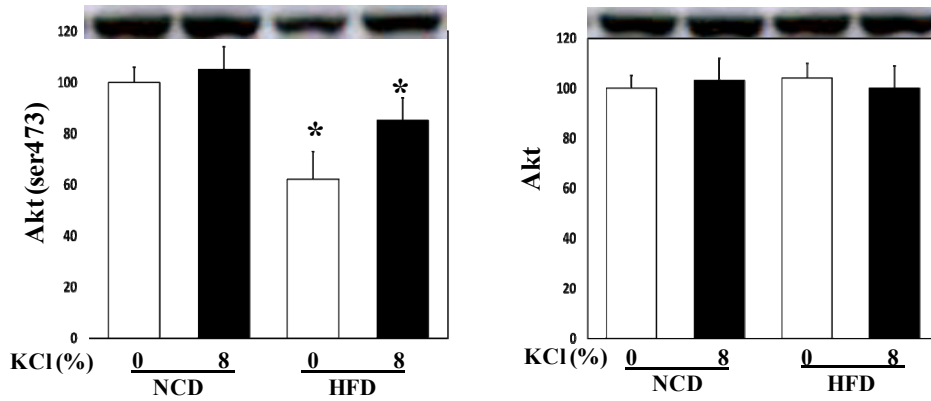


Figure 4. Effect of potassium intake on tyrosine phosphorylation of Akt (Ser 473) in skeletal muscle, adipose tissue, and liver. NCD: Normal Chow Diet. HFD: High Fat Diet. **: P<0.05. *: P<0.01.

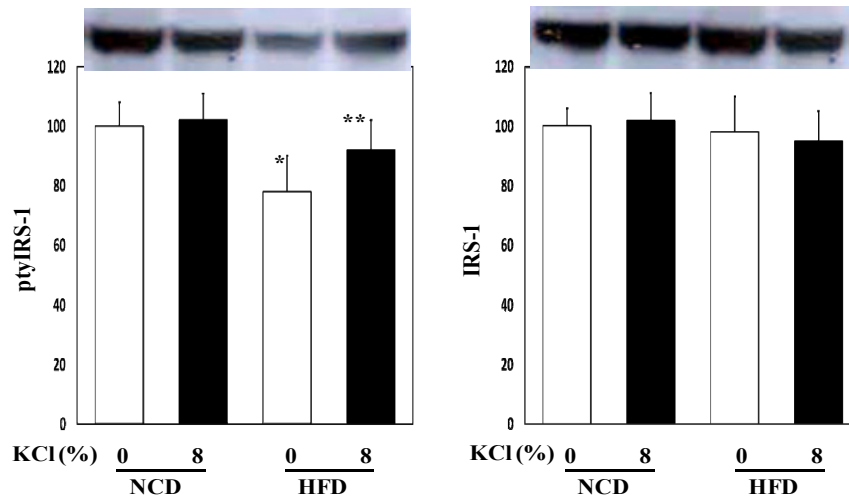


Figure 5. Effect of Potassium intake on tyrosine phosphorylation of IRS-2 (pTy-IRS-2) in liver

IV. カリウム摂取が血清アディポネクチン値に及ぼす影響

次に、インスリン感受性に影響を及ぼすアディポカインの中で、最も重要な働きをすることが知られているアディポネクチンを測定した。Figure 6 に示すように、通常餌群においては、カリウム摂取により、血清アディポネクチン値は有意な変化を認めなかった。高脂肪餌により、血清アディポネクチン値は、通常餌群と比較して約 33% 有意に減少し ($P < 0.01$)、インスリン抵抗性を示す結果と一致した。

高脂肪餌群において、カリウム摂取により、血清アディポネクチン値は、約 30% 有意に増加した ($P < 0.01$)。これら血清アディポネクチン値の結果は、正常血糖高インスリンクランプ実験の結果と一致することから、高脂肪によるインスリン抵抗性状態で、カリウム摂取によるインスリン抵抗性の改善は、脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンの増加が影響している可能性が示唆された。

V. カリウム摂取が、レニン・アンジオテンシン系に及ぼす影響

カリウム摂取により、血清カリウム値に有意な変化を認めなかった (Table 1) が、カリウム代謝に影響を及ぼす血漿アルドステロン値を測定した。通常餌群及び高脂肪餌群において、カリウム摂取により、血漿アルドステロン値に有意な変化を認めなかった (Figure 7A)。しかし、血漿レニン活性値は、通常餌群において、カリウム摂取により、約 40% 有意に低下し (Figure 7B: $P < 0.05$)、高脂肪餌群において、カリウム摂取により、約 30% 有意に低下した (Figure 7B: $P < 0.05$)。さらに、血漿アンジオテンシン I 値

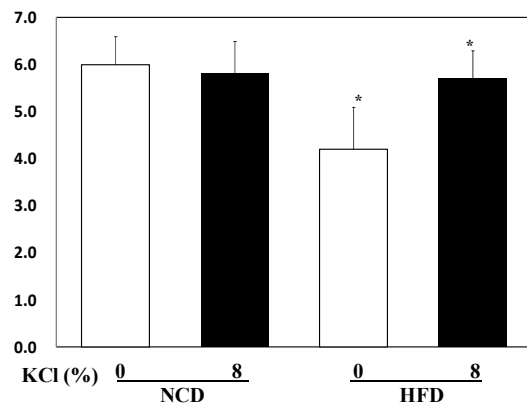


Figure 6. Effect of potassium intake on plasma adiponectin levels. NCD: Normal Chow Diet. HFD: High Fat Diet. **: $P < 0.05$. *: $P < 0.01$.

は、通常餌群及び高脂肪餌群において、カリウム摂取により有意な変化を認めなかった (Figure 7C)。血漿アンジオテンシン II 値は、通常餌群において、カリウム摂取により、有意な変化を認めなかった (Figure 7D)。また、高脂肪餌により、血漿アンジオテンシン II 値が通常餌群と比較して、約 2 倍に有意に増加を認めた (Figure 7D: $P < 0.01$)。高脂肪餌群において、カリウム摂取により、血漿アンジオテンシン II 値が、約 53% 有意に低下した (Figure 7D: $p < 0.01$)。これら血漿アンジオテンシン II 値の結果は、正常血糖高インスリンクランプ実験の結果と一致することから、高脂肪によるインスリン抵抗性状態で、カリウム摂取によるインスリン抵抗性の改善は、アンジオテンシン II が影響している可能性が示唆された。

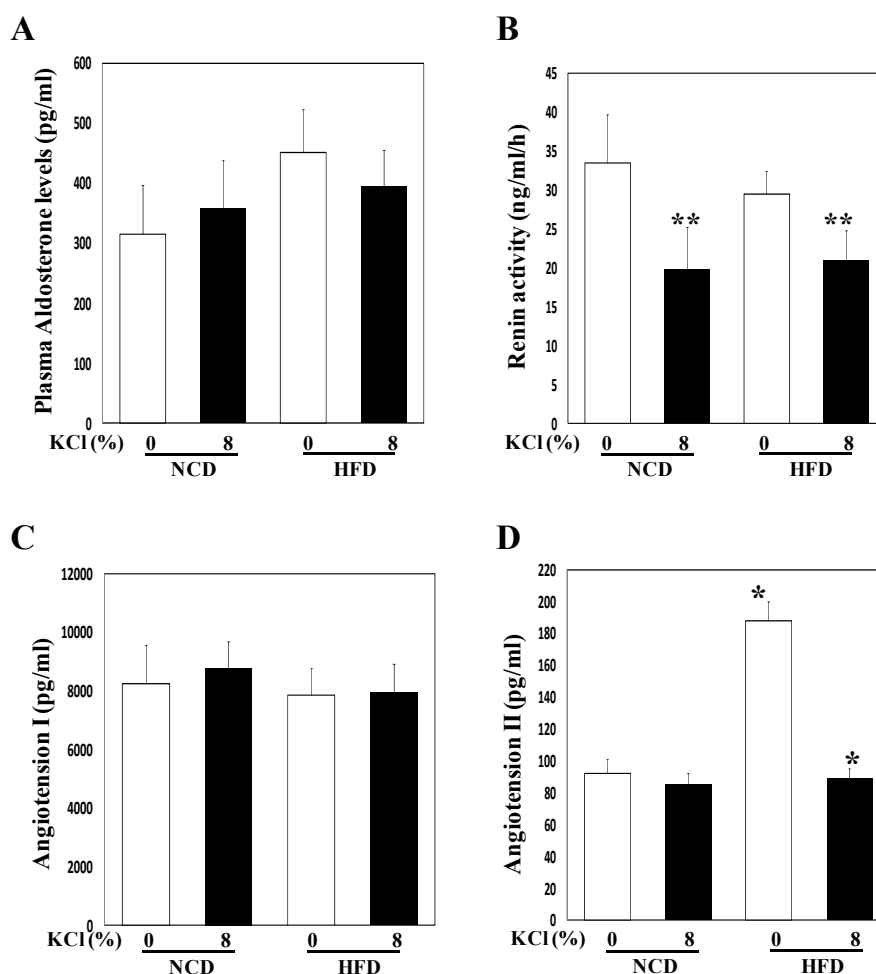


Figure 7. Effect of potassium intake on renin angiotensin system. NCD: Normal Chow Diet. HFD: High Fat Diet. **: $P < 0.05$. *: $P < 0.01$.

VI. カリウム摂取が脂肪組織における酸化ストレスに及ぼす影響

アンジオテンシン II は、酸化ストレスを亢進させインスリン抵抗性を惹起させることが知られている⁽¹⁴⁾。そこで、脂肪組織における NADPH oxidase subunit である p67^{phox}、p47^{phox}、p22^{phox} の mRNA 発現を QRT-real time PCR 法を用いて検討した。p67^{phox} mRNA 発現は、通常餌群において、カリウム摂取により、有意な変化を認めなかった (**Figure 8A**)。また、高脂肪餌により、p67^{phox} mRNA 発現は通常餌群と比較して、約 3.2 倍に有意な増加を認めた (**Figure 8A**: $P < 0.01$)。高脂肪餌群において、カリウム摂取により、p67^{phox} mRNA 発現は、約 56% 有意に低下した (**Figure 8A**: $P < 0.01$)。次に p47^{phox} mRNA 発現は、通常餌群において、カリウム摂取により、有意な変化を認めなかった (**Figure 8B**)。また、高脂肪餌により、p47^{phox} mRNA

発現は通常餌群と比較して、約 5.6 倍に有意な増加を認めた (**Figure 8B**: $P < 0.01$)。高脂肪餌群において、カリウム摂取により、p47^{phox} mRNA 発現は、約 60% 有意に低下した (**Figure 8B**: $P < 0.01$)。最後に、p22^{phox} mRNA 発現は、通常餌群において、カリウム摂取により、有意な変化を認めなかった (**Figure 8C**)。また、高脂肪餌により、p22^{phox} mRNA 発現は通常餌群と比較して、約 3.7 倍に有意な増加を認めた (**Figure 8C**: $P < 0.01$)。高脂肪餌群において、カリウム摂取により、p22^{phox} mRNA 発現は、約 57% 有意に低下した (**Figure 8C**: $P < 0.01$)。これら NADPH oxidase subunit の mRNA 発現は、血漿アンジオテンシン II 値の結果と一致することから、高脂肪によるインスリン抵抗性状態で、カリウム摂取によるインスリン抵抗性の改善は、アンジオテンシン II が影響している可能性が示唆された。

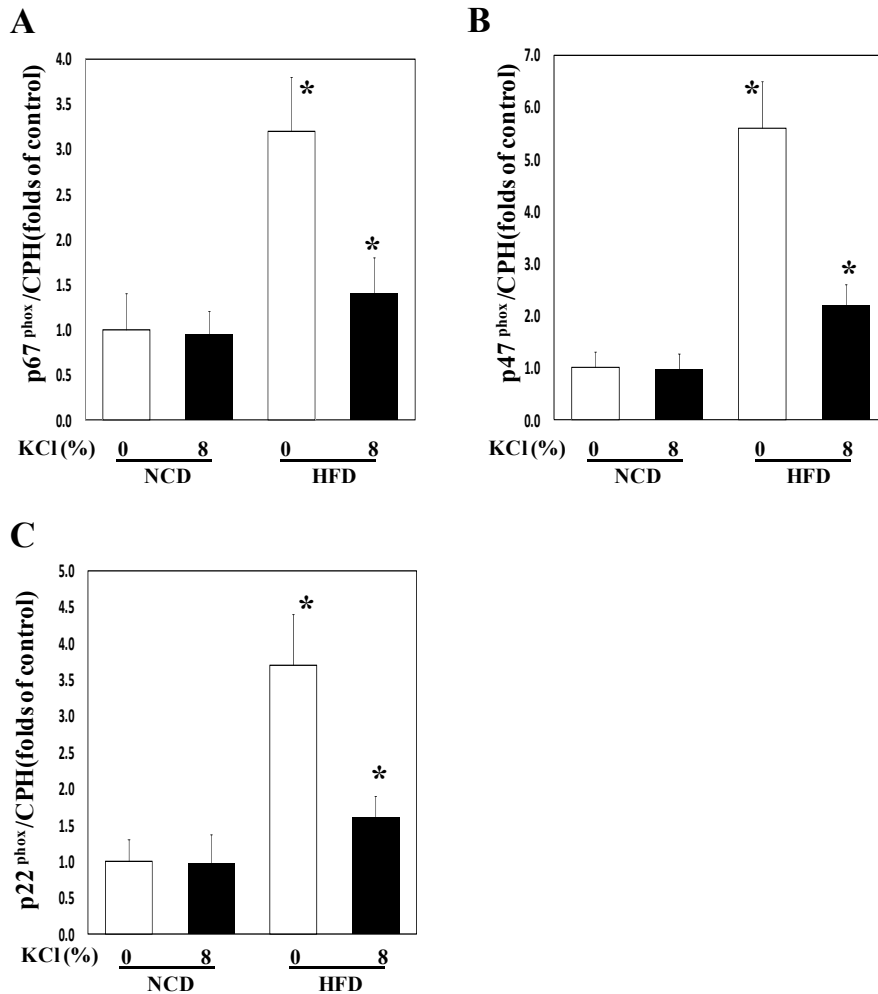


Figure 8. Effect of potassium intake on mRNA expression of NADPH oxidase subunits. NCD: Normal Chow Diet. HFD: High Fat Diet. **: P<0.05. *: P<0.01.

4. 考 察

本研究で、カリウム摂取が、正常耐糖能状態では、インスリン感受性に影響を及ぼさないが、高脂肪負荷によるインスリン抵抗性状態では、カリウム摂取により、筋肉、脂肪組織、肝臓でのインスリン抵抗性を改善することを明らかにした。その機序として、血漿レニン活性の低下、アンジオテンシンⅡの低下により、脂肪組織での酸化ストレスが減少し、アディポネクチン値が上昇が関与している可能性を発見した。

高脂肪負荷は、肝臓、骨格筋、肝臓など全身性にインスリン抵抗性を惹起することが知られている⁽⁵⁾。我々は、高脂肪負荷により、正常血糖高インスリンクランプ実験にて、末梢組織での糖取り込みの低下、脂肪組織での遊離脂肪酸の上昇、肝臓での糖新生の亢進を認め、それに一致して、骨格筋及び脂肪組織で IRS-1、Akt のリン酸化、

肝臓で IRS-2、Akt のインスリン・シグナル伝達の減弱していることを確認した。また、血漿アンジオテンシンⅡ値の上昇、脂肪組織で NADPH oxidase subunit の mRNA 発現が増加し、酸化ストレスが亢進していること、それに伴い血中アディポネクチン値が低下していることを明らかにした。このインスリン抵抗性モデルにおいて、カリウム摂取は、血清カリウム値に影響を認めなかったことより、カリウム排泄が亢進している可能性が考えられた。そこで、血漿アルドステロン値に有意な変化は認められなかった。しかし、血漿レニン活性値の低下、血中アンジオテンシンⅡの低下が認められた。インスリン抵抗性状態では、レニン-アンジオテンシン系が亢進していることが知られている⁽⁶⁾。これらの結果は、インスリン抵抗性状態において、カリウム摂取は、亢進しているレニン-アンジオテンシン系を抑制する可能性が示唆された。さらにレニン-アンジオテンシン

系の亢進は、組織内での酸化ストレスを亢進させ⁽¹⁶⁾、インスリン抵抗性を惹起することが報告されている⁽¹⁵⁾。インスリン抵抗性状態で増加した酸化ストレスを反映する NADPH oxidase の subunits である p67^{phox}、p47^{phox}、p22^{phox} の mRNA 発現は、カリウム摂取により減少した。この結果は、カリウム摂取は、インスリン抵抗性状態で亢進している酸化ストレスを抑制する作用を有することが示唆された。さらに、酸化ストレスは、アディポネクチンの分泌を抑制することが知られている⁽¹⁷⁾。実際に、高脂肪餌群のラットは、正常餌群のラットと比較して、血中アディポネクチン値が低下していた。しかし、カリウム摂取により、血中アディポネクチン値の上昇が認められた。アディポネクチンは、肝臓、骨格筋、脂肪細胞でのインスリン抵抗性を改善させることが知られていることから^(4,11)、カリウム摂取による血中アディポネクチン値の上昇が、肝臓、骨格筋、脂肪組織でのインスリン抵抗性を改善した主要因と推測される。

一方、正常耐糖能の状態では、アンジオテンシンⅡの上昇、酸化ストレスの亢進、血中アディポネクチン値の低下が認められず、さらに、カリウム摂取によって、それらが変化しなかったため、インスリン感受性には影響を及ぼさなかったと推測される。

以上の結果より、カリウム摂取は、正常耐糖能状態ではインスリン感受性に影響を及ぼさないが、メタボリック・シンドロームのようなインスリン抵抗性状態では、カリウム摂取により、レニン・アンジオテンシン系の抑制、酸化ストレスの抑制、アディポネクチンの上昇により、インスリン抵抗性を改善することが示唆された。この機序でのインスリン抵抗性改善効果は、単に糖尿病の発症抑制ばかりでなく、心血管疾患や脳血管疾患などの抗動脈硬化作用も期待される。さらに、現在問題となっているメタボリック・シンドロームの治療薬の開発にも貢献できる可能性が期待される。

5. 今後の展望

これまでの研究において、インスリン抵抗性状態で、カリウム摂取が、酸化ストレスを抑制して、インスリン抵抗性を改善することを明らかにした。しかしながら、カリウム摂取により、アンジオテンシンⅡの抑制、酸化ストレスの抑制に関する詳細な作用機序は、まだ不明である。これを明らかにすることにより、インスリン抵抗性の治療薬の開発の

貢献できると考える。そのため、今後は、3T3-L1 adipocytes や C2C12 cells などの培養脂肪細胞や培養筋細胞を用いて、詳細な作用機序を検討する。

文 献

1. Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, and Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 26: 163-176, 2000.
2. Fujita T. Aldosterone in salt-sensitive hypertension and metabolic syndrome. *J Mol Med* 86: 729-734, 2008.
3. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, and Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95: 2409-2415, 1995.
4. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, and Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116: 1784-1792, 2006.
5. Khourshed M, Miles PD, Gao KM, Lee MK, Moossa AR, and Olefsky JM. Metabolic effects of troglitazone on fat-induced insulin resistance in the rat. *Metabolism* 44: 1489-1494, 1995.
6. Leiter LA, and Lewanczuk RZ. Of the renin-angiotensin system and reactive oxygen species Type 2 diabetes and angiotensin II inhibition. *Am J Hypertens* 18: 121-128, 2005.
7. Ogihara T, Asano T, Ando K, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Onishi Y, Fujishiro M, Abe M, Fukushima Y, Kikuchi M, and Fujita T. High-salt diet enhances insulin signaling and induces insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 40: 83-89, 2002.
8. Olefsky JM. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Clin Invest* 106: 467-472, 2000.
9. Ravussin E, and Smith SR. Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 967: 363-378, 2002.
10. Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I,

- and Olefsky JM. Adenovirus-mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J Clin Invest* 114: 224-231, 2004.
11. Satoh H, Nguyen MT, Trujillo M, Imamura T, Usui I, Scherer PE, and Olefsky JM. Adenovirus-mediated adiponectin expression augments skeletal muscle insulin sensitivity in male Wistar rats. *Diabetes* 54: 1304-1313, 2005.
 12. UKPDS. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 352: 854-865, 1998.
 13. UKPDS. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352: 837-853, 1998.
 14. Wei Y, Sowers JR, Nistala R, Gong H, Uptergrove GM, Clark SE, Morris EM, Szary N, Manrique C, and Stump CS. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 281: 35137-35146, 2006.
 15. Wei Y, Whaley-Connell AT, Chen K, Habibi J, Uptergrove GM, Clark SE, Stump CS, Ferrario CM, and Sowers JR. NADPH oxidase contributes to vascular inflammation, insulin resistance, and remodeling in the transgenic (mRen2) rat. *Hypertension* 50: 384-391, 2007.
 16. Whaley-Connell A, Govindarajan G, Habibi J, Hayden MR, Cooper SA, Wei Y, Ma L, Qazi M, Link D, Karuparthi PR, Stump C, Ferrario C, and Sowers JR. Angiotensin II-mediated oxidative stress promotes myocardial tissue remodeling in the transgenic (mRen2) 27 Ren2 rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E355-363, 2007.
 17. Xi L, Qian Z, Xu G, Zhou C, and Sun S. Crocetin attenuates palmitate-induced insulin insensitivity and disordered tumor necrosis factor-alpha and adiponectin expression in rat adipocytes. *Br J Pharmacol* 151: 610-617, 2007.

The Mechanisms by which Excessive Potassium Intake Improves Insulin Resistance

Hiroaki Satoh, Akihiro Kudoh, Hiroyuki Hirai, Tsuyoshi Watanabe

Department of Nephrology, Hypertension, Diabetology, Endocrinology, and Metabolism
Fukushima Medical University

Summary

A potassium-depleted diet has been known to lead to insulin resistance, a resistance that was reversed when potassium was resupplied. Currently, no information under other circumstances; however, this mineral appears to have a close association with insulin resistance.

In current studies, we investigated the effect of high potassium diet on insulin sensitivity in high fat (HF) diet fed male Wistar rats, whereby insulin sensitivity was measured directly using the hyperinsulinemic-euglycemic glucose clamp studies (at 25 mU/kg/min insulin infusion rate) after a 12-h fast. Male Wistar rats were fed normal chow diet, or 60% HF diet containing with either 8% potassium-chloride or not, for 4 weeks.

In control animals, in the basal state, HF feeding led to a ~33% increase in body weight, ~30% increase in fasting insulin levels, no change in fasting plasma glucose levels, and ~15% increase in hepatic glucose output (HGO). During the clamp studies, the glucose infusion rate (Ginf) required to maintain euglycemia, and the insulin stimulated glucose disposal rate (ISGDR), were decreased by ~15% and ~19% in the HF diet fed control rats, respectively, and the ability of insulin to suppress HGO was impaired by ~58%, indicating an insulin resistant state. The HF containing potassium diet also led to a ~33% increase in body weight. In the basal state, HF containing potassium diet fed rats exhibited decreased insulin levels (~20%) but no change in fasting glucose levels compared to the HF diet fed controls. Furthermore, HF containing potassium diet fed rats exhibited decreased plasma renin activity and angiotensin 2 levels but no significant change in plasma aldosterone levels. In the clamp studies, the potassium fed animals exhibited increased Ginf (~30%) and ISGDR (~35%) and decreased HGO (~27%) compared to the HF fed controls. Consistent with the clamp data, the insulin-stimulated phosphorylation of Akt was significantly enhanced in liver and skeletal muscle.

These results indicate that high potassium diet improves the insulin resistance by decreasing plasma renin activity and angiotensin II levels.

In conclusion, high potassium diet has beneficial effects on whole body insulin sensitivity in an insulin resistant state.

膵β細胞におけるKvチャネルによるインスリン分泌制御機構の解明

出崎 克也¹, 加計 正文², 矢田 俊彦¹

¹自治医科大学医学部, ²自治医科大学さいたま医療センター

概要 【研究目的】 生体の血中グルコース濃度は、血糖調節ホルモンによって厳密にコントロールされており、この血糖調節の破綻は糖尿病を来し重篤な合併症を引き起こす。唯一の血糖低下ホルモンであるインスリンは、血中グルコース濃度に応じて膵臓β細胞から分泌される。本研究では、膵β細胞における電位依存性K⁺チャネル(Kvチャネル)を介した新規インスリン分泌制御機構を解明し、その細胞生理学的意義、システム生理学的意義を明らかにすることを目的とする。

【研究方法】 雄性 Wistar および自然発症2型糖尿病 Goto-Kakizaki (GK)ラットからコラゲナーゼ法により膵ランゲルハンス島(膵島)を分離し、膵島インスリン分泌をELISA法にて測定した。ラット膵島におけるKvチャネルの発現をRT-PCR法および免疫組織化学により検討した。ラット単一β細胞の細胞内Ca²⁺([Ca²⁺]_i)をfura-2蛍光画像解析法により測定し、パッチクランプ法によりβ細胞Kvチャネル電流を測定した。

【研究結果】 消化管ホルモンのグレリンは、グルコース誘発インスリン分泌を抑制し、β細胞のKv電流を促進しグルコース刺激による[Ca²⁺]_i上昇を抑制した。Kv2.1チャネルブロッカー存在下では、グレリンによるインスリン分泌抑制作用およびKv電流活性化作用、[Ca²⁺]_i抑制作用が消失した。2型糖尿病GKラットは、正常Wistarラットと比較して膵島Kv2.1の発現やβ細胞Kvチャネル電流が増強していた。Kv2.1チャネルブロッカーは、GKラットβ細胞におけるグルコース刺激による[Ca²⁺]_i上昇を増加させ、分離膵島からのグルコース誘発インスリン分泌を促進した。

【考察】 β細胞のカリウムイオン透過性分子であるKvチャネルは、グルコースおよびホルモンセンサー情報を統合するキー分子として機能していることが示唆される。グルコース刺激下でのK_{ATP}チャネル閉鎖によるβ細胞の脱分極に対して、Kvチャネルの活性化は細胞膜を再分極させることで活動電位を抑制し、電位依存性Ca²⁺チャネルを介したCa²⁺流入およびインスリン分泌を抑制すると考えられる。また、β細胞におけるKv2.1チャネル発現・機能亢進が2型糖尿病におけるインスリン分泌不全に関与する可能性が示された。

1. 研究目的

生体の血中グルコース濃度は、血糖調節ホルモンによって厳密にコントロールされており、この血糖調節の破綻は糖尿病を来し重篤な合併症を引き起こす。唯一の血糖低下ホルモンであるインスリンは、血中グルコース濃度に応じて膵臓β細胞から分泌される。この機序として、グルコース代謝で産生されるATPによるATP感受性K⁺チャネル(K_{ATP}チャネル)の閉鎖がβ細胞の脱分極をきたし、電位依存性Ca²⁺チャネルを介した細胞内Ca²⁺濃度上昇がインスリン分泌を惹起するという機序(K_{ATP}チャネル依存

性経路)が広く受け入れられている(Fig. 1 青枠)。しかし、K_{ATP}チャネル遺伝子欠損動物の解析等から、K_{ATP}チャネル依存性経路のみでは生理的インスリン分泌機構を説明することはできず、異なるインスリン分泌制御機構が強く示唆されているがその機構は未同定である。

申請者らは、β細胞における新規カリウムイオン輸送分子として電位依存性K⁺チャネル(Kvチャネル)が機能しており、全身代謝調節に極めて重要なホルモンであるグレリンが、Kvチャネルの活性化を介してインスリン分泌を抑制的に制御していることを発見している(Diabetes 53:

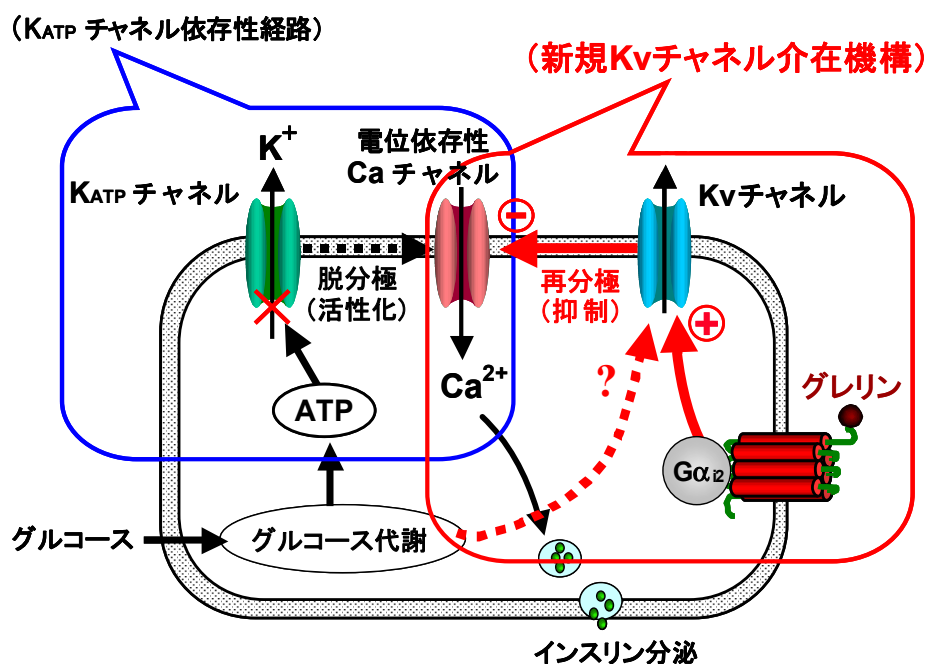


Fig. 1. Putative Kv channel-mediated regulation of glucose-induced insulin release in pancreatic islet β -cell. Blue frame shows ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channel-dependent pathway for insulin secretion. Closure of K_{ATP} channels by increases in ATP/ADP ratio following glucose metabolism induces membrane depolarization and increase in cytosolic Ca^{2+} concentrations via voltage-dependent Ca^{2+} channels, leading to insulin secretion in β -cells. Red frame shows novel K_{ATP} channel-independent regulation of the insulin secretion. Ghrelin activates β -cell GHS-R that is coupled with PTX-sensitive heterotrimeric G-protein $G\alpha_{12}$, attenuates membrane excitability via activation of voltage-dependent K^+ channels, and consequently suppresses Ca^{2+} influx and insulin release.

3142-3151, 2004; *Diabetes* 55: 3486-3493, 2006; *Diabetes* 56: 2319-2327, 2007)。

本研究では、分子生理学的解析によって膵 β 細胞における Kv チャンネルを介した新たなインスリン分泌制御機構 (Fig. 1 赤枠) を解明し、その細胞生理学的意義、システム生理学的意義を明らかにすることを目的とする。

2. 研究方法

2.1 インスリン分泌測定

雄性 Wistar ラットまたは自然発症2型糖尿病からコラゲナーゼ法により膵ランゲルハンス島 (膵島) を分離し、低グルコース (2.8 mM) または高グルコース (8.3 mM) 条件下での膵島インスリン分泌を ELISA 法にて測定した。

2.2 膵島 mRNA 発現解析

コラゲナーゼ処理によって得られたラット膵島から mRNA を抽出し、RT-PCR 法にて遺伝子発現を検出した。

また、real-time PCR 法にて mRNA 発現量を定量的に検討した。

2.3 膵 β 細胞 Kv チャンネルの免疫染色

ラット膵臓の組織切片を作製し、Kv2.1 の発現を免疫組織化学的に検討した。さらに、抗インスリン抗体を用いた二重染色を行い、膵 β 細胞における Kv2.1 チャンネル分子の局在を検討した。また、単離膵 β 細胞における Kv2.1 の発現を免疫細胞化学的に観察した。

2.4 ラット β 細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 測定

単離したラット β 細胞に Ca^{2+} 感受性蛍光色素の fura-2/AM を負荷し、蛍光倒立顕微鏡下で β 細胞内 Ca^{2+} 動態をリアルタイム蛍光画像解析により測定した。 $[Ca^{2+}]_i$ は、340 nm および 380 nm の励起による 510 nm の蛍光強度比 (F340/F380) で表示した。

2.5 ラット β 細胞の Kv チャンネル電流測定

K_{ATP} チャンネル阻害剤の Tolbutamide (0.1 mM) 存在下で、

ナスタチン穿孔パッチクランプ法またはホールセルパッチクランプ法によりラットβ細胞の全細胞電流を測定した。

3. 研究結果

3.1 ラット膵島インスリン分泌に対するKvチャンネルブロッカーの効果(Fig. 2)

ラットからコラゲナーゼ処理によって分離した膵島を用いて、インスリン分泌に対する各種Kvチャンネルブロッカーの効果を検討した。その結果、Kv2.1チャンネルブロッカーのStromatoxin(ScTx; 100 nM)は高グルコース(8.3 mM)刺激による膵島インスリン分泌を促進した。さらに、別のKv2.1チャンネルブロッカーであるguangxitoxin-1E(GxTx; 30 nM)も8.3 mMグルコース刺激による膵島インスリン分泌を有意に促進した。一方、Kv1.3チャンネルブロッカーのMargatoxin(MgTx; 100 nM)は膵島インスリン分泌に対して無効であった。低グルコース(2.8 mM)条件下での基礎インスリン分泌に関しては、これらのKvチャンネルブロッカーは影響しなかった。

3.2 ラット膵β細胞におけるKv2.1チャンネルの発現(Fig. 3)

コラゲナーゼ処理によって得たラット分離膵島からmRNAを抽出し、RT-PCR法にて遺伝子発現を検討した結果、膵島におけるKv2.1の遺伝子発現を検出した。さらに、ラット膵臓より単離した膵島細胞を用いてKvチャンネルの発現を免疫細胞化学的に検討し、β細胞におけるKv2.1チャンネルの発現を確認した。

3.3 ラットβ細胞Kvチャンネル電流に対するKvチャンネルブロッカーの効果(Fig. 4)

パッチクランプ法によりK_{ATP}チャンネル阻害剤のTolbutamide(0.1 mM)存在下でラットβ細胞の全細胞電流を測定したところ、電位依存性の外向き電流が観察された。この電流は、非選択的KvチャンネルブロッカーのTetraethylammonium(TEA; 10 mM)によってほぼ完全に抑制されたことから、Kvチャンネル電流であることが確認された。さらに、このKvチャンネル電流はKv2.1チャンネルブロッカーであるStromatoxin(ScTx; 100 nM)によって強く抑制されたことから、β細胞ではKv2.1チャンネルが機能的に発現していることが明らかになった。

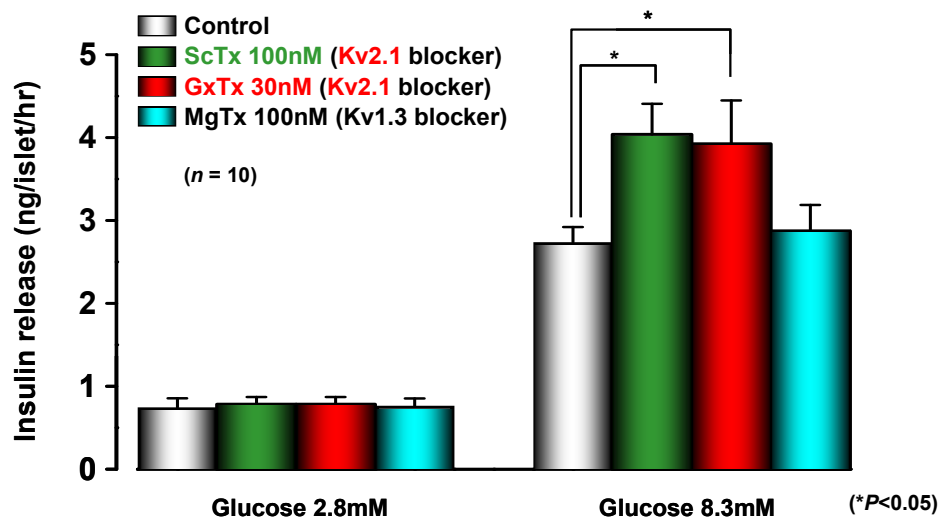
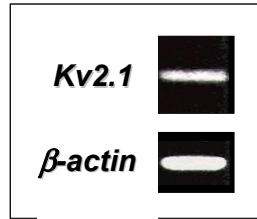


Fig. 2. Enhancement of glucose-induced insulin release in rat islets by Kv2.1 channel blockers. Groups of 12-15 islets were incubated for 1 hr at 37°C in HKRB with 2.8 mM glucose for stabilization, followed by test incubation for 1 hr in HKRB with 2.8 or 8.3 mM glucose. In the presence of stromatoxin (ScTx, 100 nM) or guangxitoxin-1E (GxTx, 30 nM), inhibitor of the Kv2.1 channel, glucose (8.3 mM)-induced insulin release was significantly potentiated. The basal insulin release at 2.8 mM glucose was not altered by these Kv channel blockers. In contrast, margatoxin (MgTx, 100 nM), a Kv1.3 channel blocker, affected insulin release neither at stimulated nor at basal glucose.

A. RT-PCR



B. Immunohistochemistry

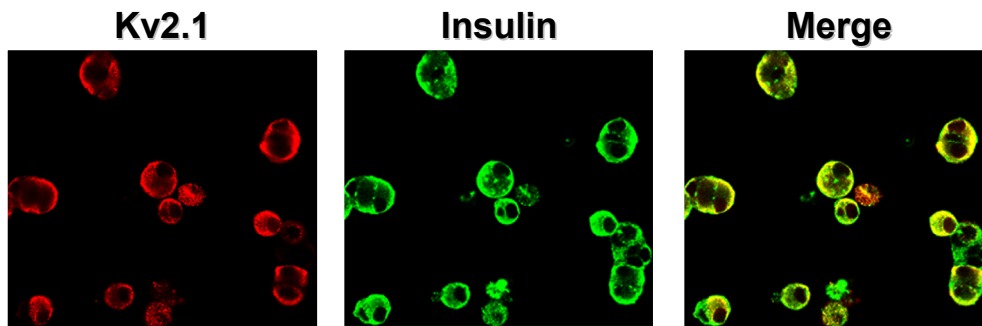


Fig. 3. Expression of Kv2.1 channels in rat islet β -cells. (A) RT-PCR analysis shows mRNA expression of Kv2.1 channels in rat isolated islets. (B) Rat dispersed islet cells fixed in PFA were incubated with anti-insulin antibody and anti-Kv2.1 antibody. Immunofluorescence for Kv2.1 (red) and insulin (green) was observed by confocal microscopy.

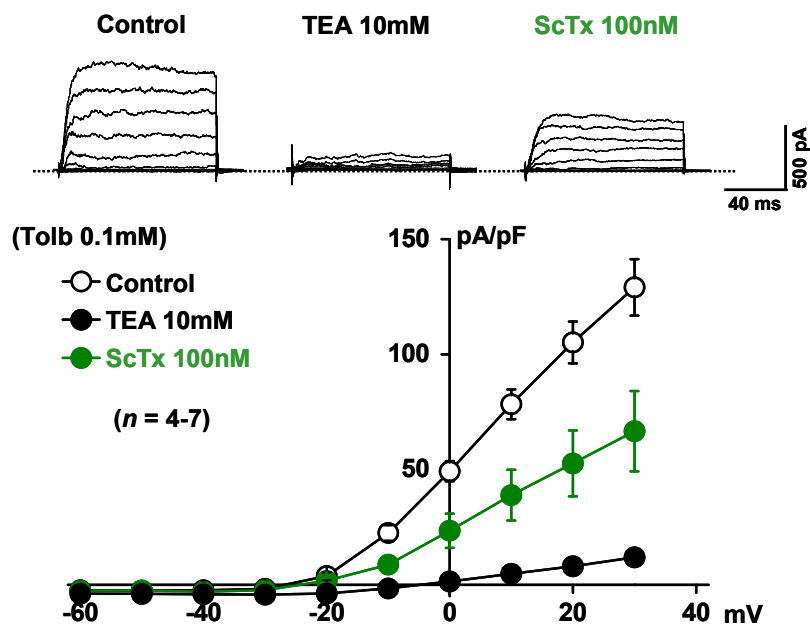


Fig. 4. Kv2.1 channel blocker ScTx attenuated Kv channel currents in rat β -cells. Current traces evoked by a series of step pulses between -60 and +30 mV from the holding potential of -70 mV were displayed in perforated whole-cell clamp mode. Tolbutamide (0.1 mM), a specific blocker of the K_{ATP} channels, was present in perfused solution throughout the experiments. The channel current was largely inhibited by a non-specific Kv channel blocker tetraethylammonium (TEA). Moreover, a Kv2.1 channel blocker ScTx (100 nM) markedly attenuated Kv currents in β -cells, indicating functional expression of ScTx-sensitive Kv2.1 channels in β -cells.

3. 4 ラットβ細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に対するKvチャンネルブロッカーの効果(Fig. 5, Fig. 6)

ラットβ細胞に Ca^{2+} 感受性蛍光色素のfura-2/AMを負荷し、細胞内 Ca^{2+} 動態をfura-2 蛍光画像解析により検討した。Kv2.1チャンネルブロッカーのScTx(100 nM)は高グルコース(8.3 mM)条件下においてβ細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を増加した。一方、低グルコース(2.8 mM)条件下では、ScTx

はβ細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に影響しなかった。さらに、高KCl(25 mM)投与による脱分極刺激によって生じるβ細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対してScTx(100 nM)は無効であった。

3. 5 グレリンによるラットβ細胞Kv2.1チャンネルの活性化(Fig. 7, Fig. 8)

パッチクランプ法によりβ細胞の細胞膜電位に対するグレリンの効果を検討した結果、グレリンはグルコース刺激

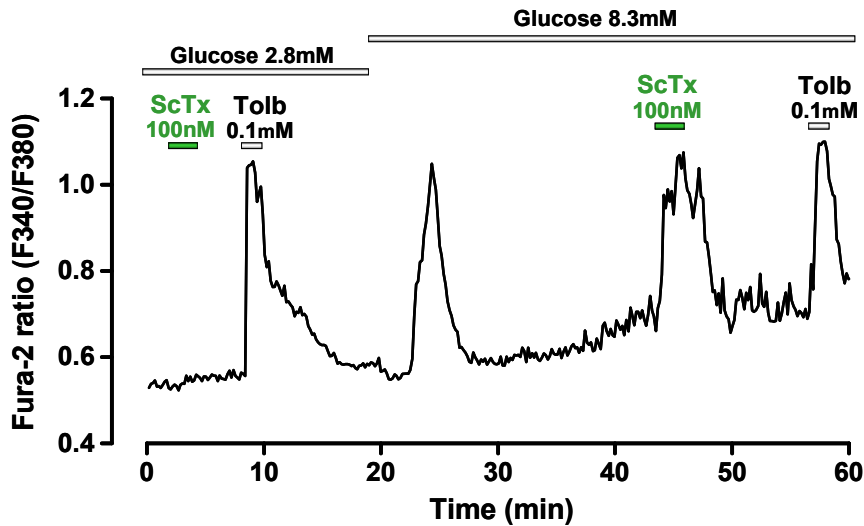


Fig. 5. Potentiation of glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in rat β -cells by Kv2.1 channel blocker ScTx. ScTx potentiated glucose (8.3 mM)-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases in rat single β -cells, whereas basal $[Ca^{2+}]_i$ levels at 2.8 mM glucose were not affected by this channel blocker. In contrast, K_{ATP} channel blocker tolbutamide (Tolb; 0.1 mM) evoked large $[Ca^{2+}]_i$ increases under any glucose conditions.

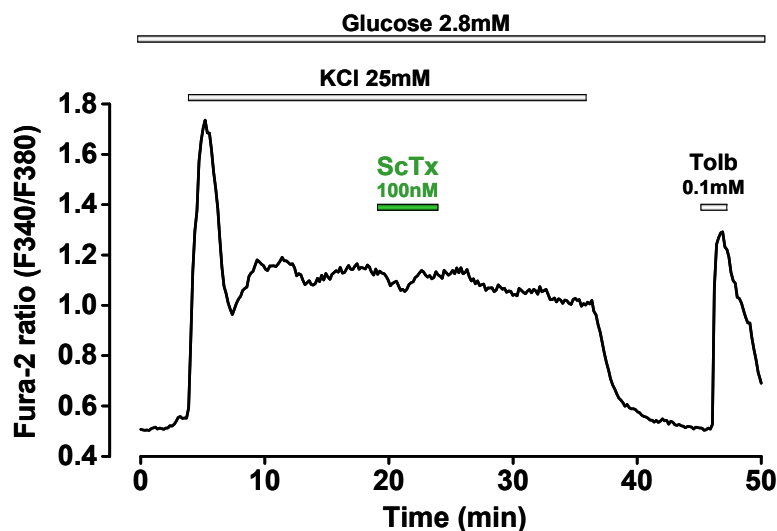


Fig. 6. ScTx did not potentiate high K^+ -induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in rat β -cells. Under low glucose conditions at 2.8 mM, high KCl (25 mM) evoked large $[Ca^{2+}]_i$ increases in rat single β -cell. Kv2.1 channel blocker ScTx did not potentiate high KCl-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases.

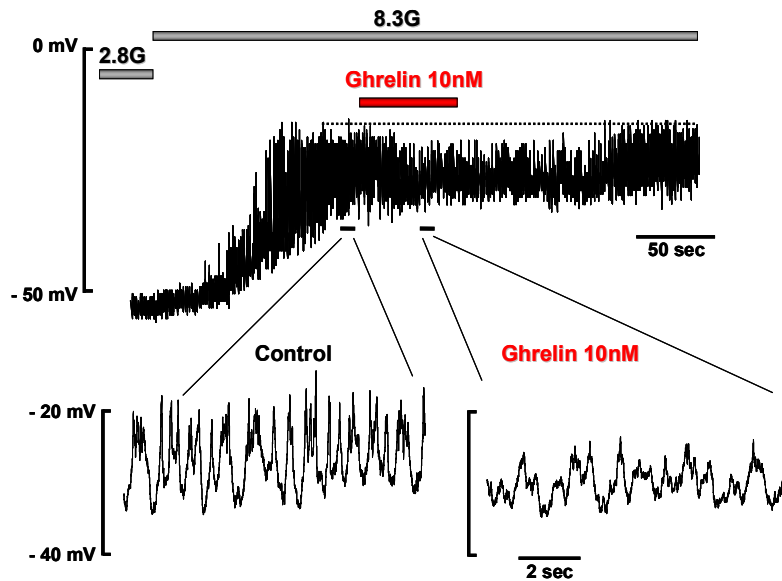


Fig. 7. Ghrelin attenuates glucose-elicited action potential firing in rat β -cells. *Upper panel:* After establishing a perforated whole-cell clamp in HKRB solution containing 2.8 mM glucose, membrane potentials in β -cells were continuously monitored in current-clamp mode. Glucose (8.3 mM) elicited membrane depolarization associated with subsequent action potential firings and ghrelin attenuated the firing in a reversible manner in a β -cell. *Lower panels:* Action potential profiles in specified periods at upper traces were shown in an expanded time scale. The results are representative of three cells.

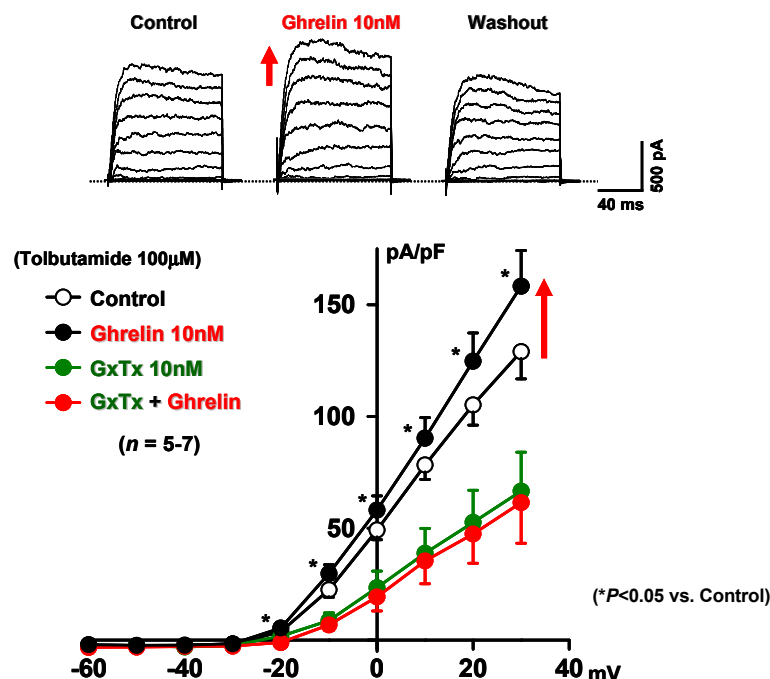


Fig. 8. Ghrelin activates GxTx-sensitive Kv2.1 channels in rat β -cells. Current traces evoked by a series of step pulses between -60 and +30 mV from the holding potential of -70 mV were displayed in perforated whole-cell clamp mode. Tolbutamide (100 μ M), a specific blocker of the K_{ATP} channels, was present in perfused solution throughout the experiments. In the presence of tolbutamide, the residual voltage-dependent outward Kv channel currents evoked by depolarizing pulses were significantly increased by ghrelin. Kv2.1 channel blocker guangxitoxin-1E (GxTx) strongly attenuated Kv channel currents in β -cells. In the presence of GxTx, ghrelin did not enhance the Kv channel currents in β -cells.

によって生じるβ細胞の活動電位を抑制した。さらに、グレリンはβ細胞のKvチャネル電流を増強した。このKvチャネル電流は、選択的Kv2.1チャネルブロッカーであるGuangxitoxin-1E(GxTx; 10 nM)によって抑制され、GxTx(10 nM)存在下ではグレリンによるKvチャネル電流活性化作用が消失した。

3.6 グレリンによるインスリン分泌抑制におけるKv2.1チャネルの関与(Fig. 9)

ラットからコラゲナーゼ処理によって分離した膵島を用いて、グルコース誘発インスリン分泌を測定した。選択的Kv2.1チャネルブロッカーのGxTx(10 nM)は、高グルコース(8.3 mM)刺激による膵島インスリン分泌を促進したが、低グルコース(2.8 mM)条件下での基礎インスリン分泌に関してはGxTxは影響しなかった。グレリン(10 nM)は、高グルコース(8.3 mM)刺激による膵島インスリン分泌を有意に抑制した。一方、GxTx存在下ではグレリンによるグルコース誘発インスリン分泌抑制が観察されなかった。

3.7 グレリンによるKvチャネル調節機構(Fig. 10)

野生型C57/BL6マウスでは、グレリンは8.3mMグルコース刺激による膵島インスリン分泌を抑制するが、グレリン受容体GHS-Rの遺伝子欠損(GHS-R KO)マウスではグレリンは膵島インスリン分泌を抑制しなかった。このとき、膵島インスリン含量は野生型とKOで同程度であった。また、野生型マウスではグレリンは8.3 mMグルコース刺激によるβ細胞 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を有意に抑制したが、GHS-R KOマウスでは抑制作用は認められなかった。以上より、グレリンがβ細胞のGHS-Rを介してインスリン分泌を抑制することが示された。

グレリンのβ細胞シグナル伝達を検討した結果、グレリンはラット膵島のサイクリックAMP(cAMP)産生を抑制した。cAMPアナログのdibutyryl-cAMPやプロテインキナーゼA(PKA)活性化剤の6-Phe-cAMP存在下では、グレリンによるKvチャネル活性化およびインスリン分泌抑制が消失した。また、6-Phe-cAMPはβ細胞のKvチャネル電流を抑制した。

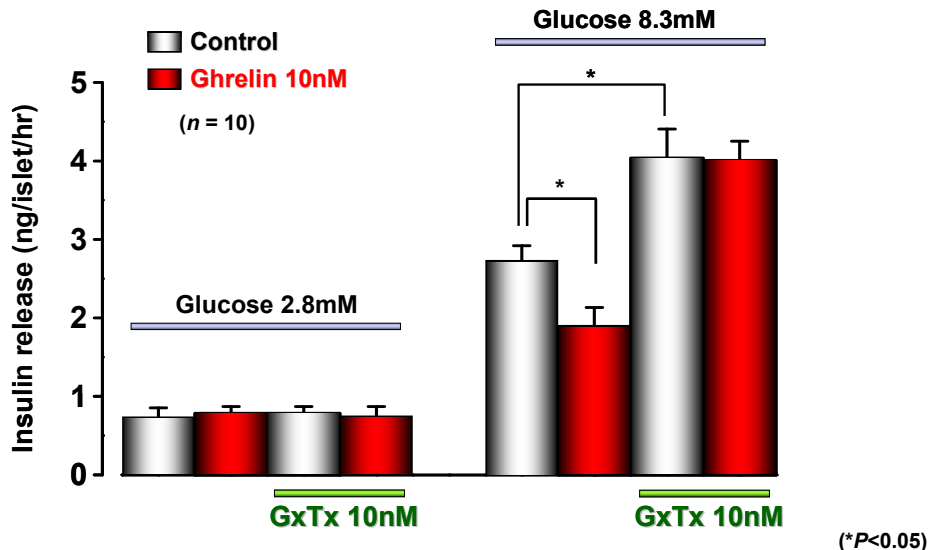


Fig. 9. Ghrelin fail to attenuate glucose-induced insulin release in the presence of Kv2.1 channel blocker GxTx. Groups of 10-15 islets were incubated for 1 hr at 37°C in HKRB with 2.8 mM glucose for stabilization, followed by test incubation for 1 hr in HKRB with 2.8 or 8.3 mM glucose. In the presence of guangxitoxin-1E (GxTx, 10 nM), a inhibitor of the Kv2.1 channel, glucose (8.3 mM)-induced insulin release was significantly potentiated. The basal insulin release at 2.8 mM glucose was not altered by this Kv2.1 channel blocker. ghrelin attenuated 8.3 mM glucose-induced insulin release. In the presence of GxTx, ghrelin failed to attenuate glucose-induced insulin release.

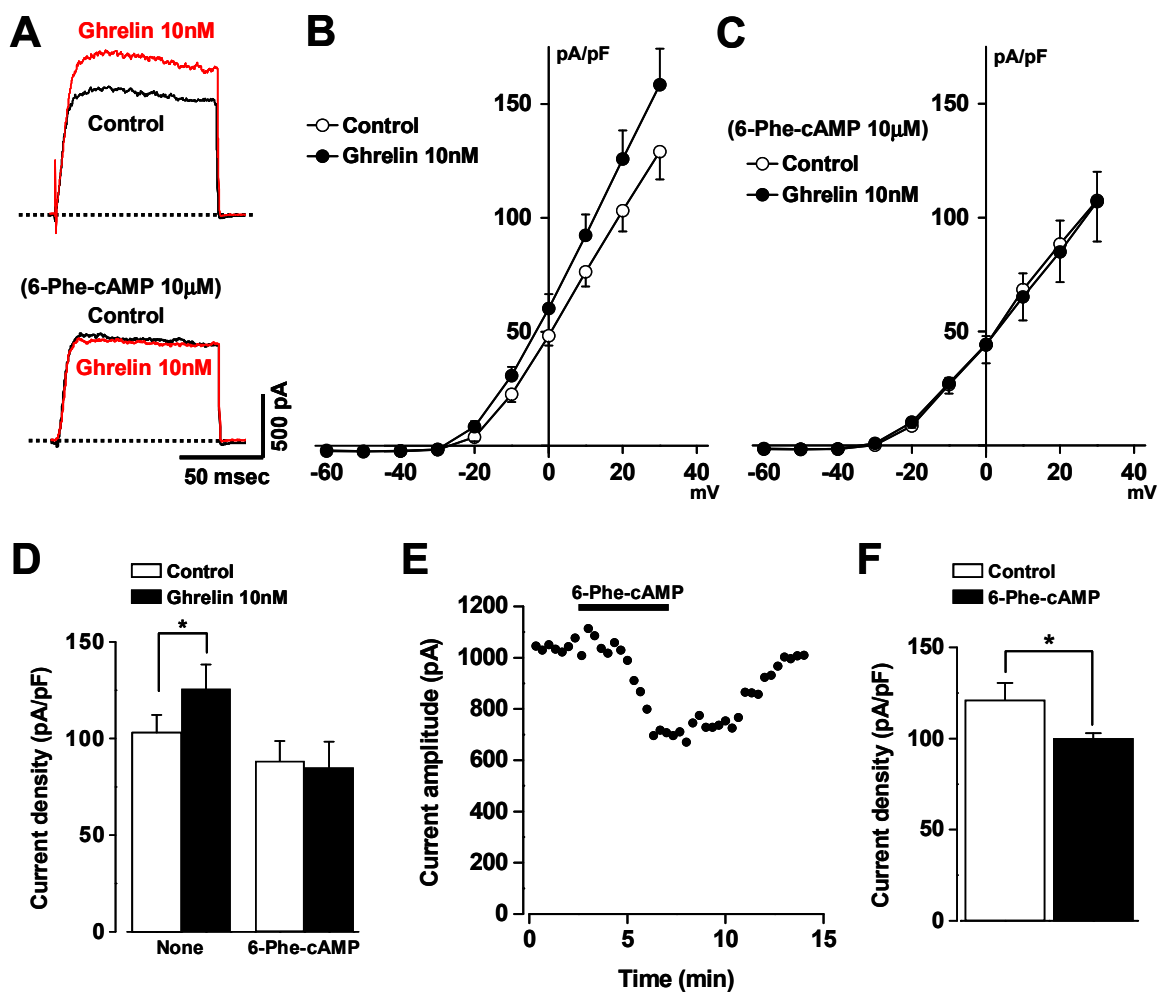


Fig. 10. Ghrelin enhances Kv channel currents in rat islet β -cells via PKA-dependent signaling pathway. (A) Current traces evoked by a step pulse to +20 mV from a holding potential of -70 mV were measured in a single β -cell under perforated whole-cell clamp mode. Data were recorded in the presence of 8.3 mM glucose and 100 μ M tolbutamide (control; black trace) and during exposure to 10 nM ghrelin (red trace). (B) Current levels measured at the end of test pulses were plotted as a current density (pA/pF) against membrane potentials in β -cells ($n=8$). (C) Ghrelin failed to potentiate Kv channel currents in the presence of 6-Phe-cAMP ($n=7$). (D) Peak amplitudes of current density at +20 mV of a membrane potential. Ghrelin (10 nM) induced significant increase in the Kv channel currents, which was not observed in the presence of 6-Phe-cAMP. ($n=7-8$). (E and F) 6-Phe-cAMP (10 μ M) significantly decreased peak amplitude of the Kv channel current density in β -cells ($n=5$).

3. 8 糖尿病態における Kv チャネル機能変化 (Fig. 11 – Fig. 14)

抗 Kv チャネル抗体を用いて膵臓切片における Kv チャネル分子の発現を免疫組織化学的に検討した結果、膵島特異的な Kv2.1 チャネル分子の発現が観察された。一方、膵外分泌細胞には Kv2.1 の発現は見られなかった。さらに抗インスリン抗体を用いた二重染色の結果、Kv2.1

チャネル分子がインスリン産生膵 β 細胞に特異的に発現していることが明らかになった。

インスリン分泌不全を呈する自然発症 2 型糖尿病 Goto-Kakizaki (GK) ラットにおける Kv2.1 の発現を免疫組織化学的に検討した結果、GK ラットでは正常 Wistar ラットと比較して β 細胞 Kv2.1 の発現が増大していた。また、GK ラットでは膵島 Kv2.1 の mRNA 発現が増大していた。一

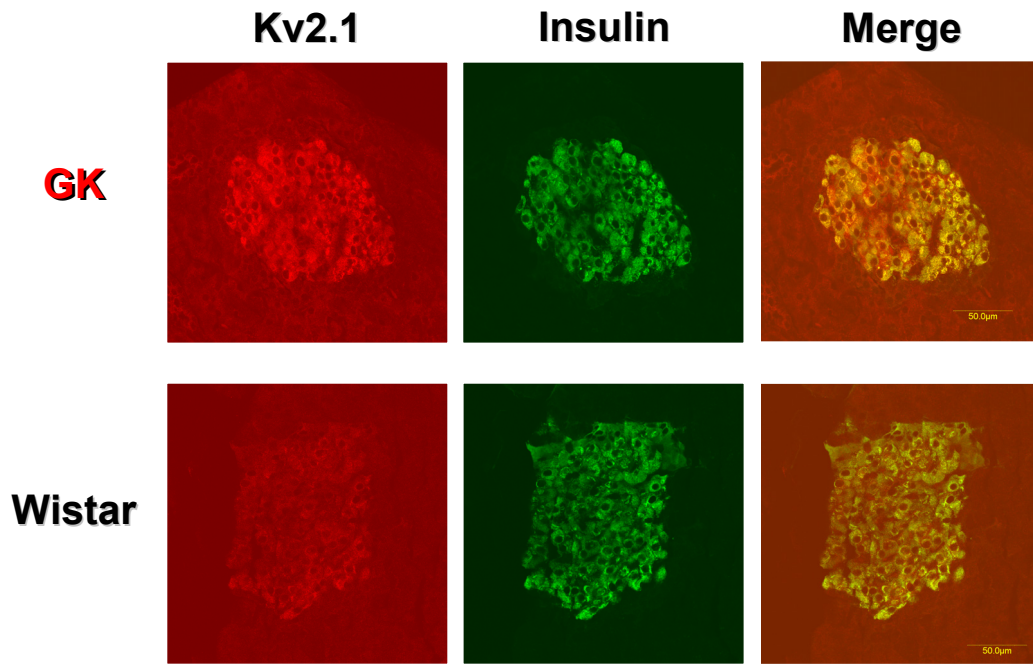


Fig. 11. Enhanced expression of Kv2.1 channels in diabetic GK rat β -cells. Rat pancreatic sections fixed in PFA were incubated with anti-insulin antibody and anti-Kv2.1 antibody. Immunofluorescence for Kv2.1 (red) and insulin (green) was observed by confocal microscopy. Immunohistochemical analysis reveals expression of Kv2.1 channels in insulin-containing islet β -cells, but not in exocrine part. Kv2.1 immunofluorescence intensity in diabetic GK rats was stronger than that in age-matched normal Wistar rats.

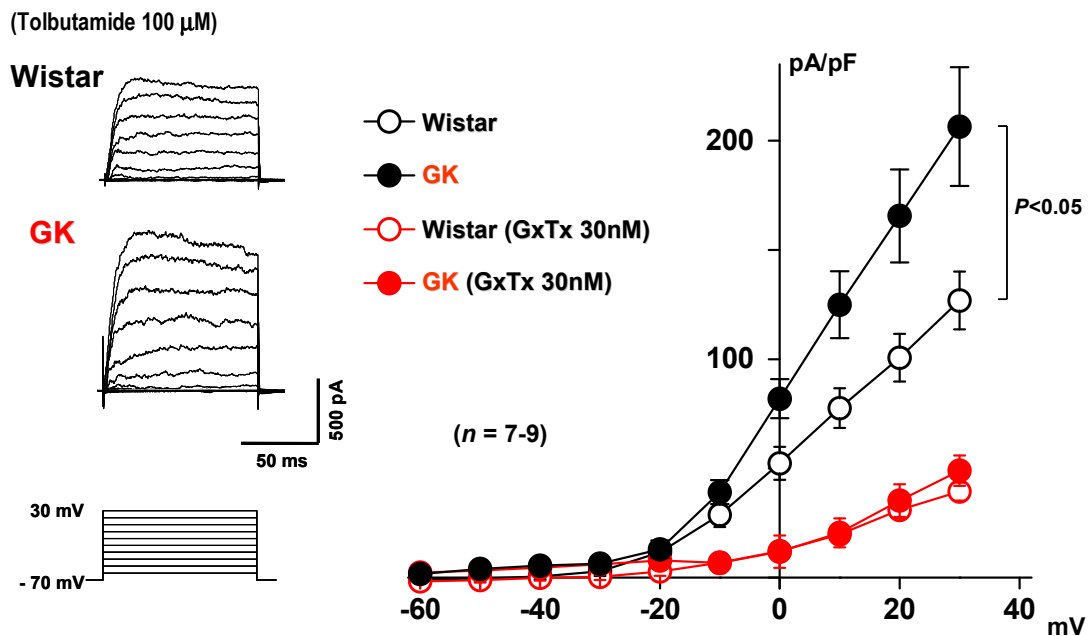


Fig. 12. Excessive activity of Kv2.1 channels in GK rat β -cells. Kv channel current density in β -cells in GK rats was significantly larger than those in normal Wistar rats. A Kv2.1 channel blocker GxTx markedly attenuated channel currents, and the remaining currents in the presence of the toxin were identical between normal and diabetic rats, indicating that excessive activities of GxTx-sensitive Kv channel currents in diabetic β -cells.

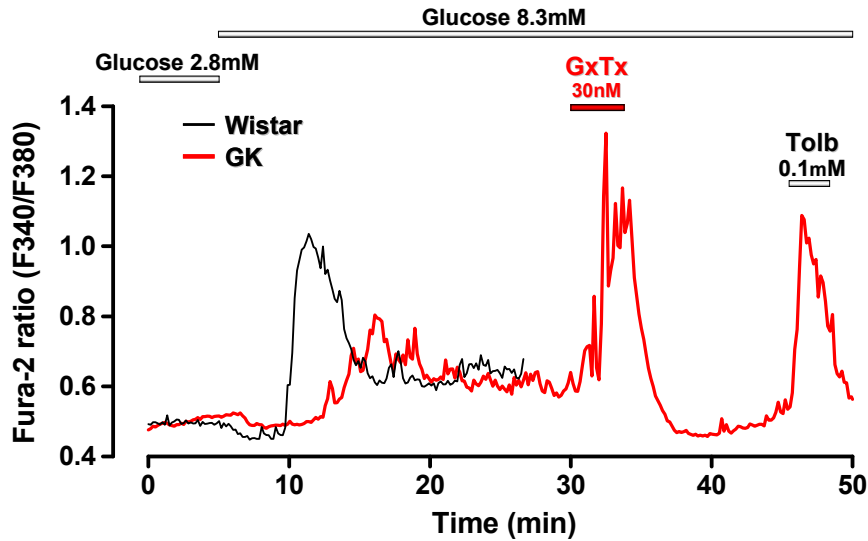


Fig. 13. Potentiation of glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in GK rat β -cells by Kv2.1 channel blocker GxTx. In diabetic GK rat β -cell, 8.3 mM glucose-evoked $[Ca^{2+}]_i$ increases was impaired. GxTx potentiated the impaired glucose (8.3 mM)-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases in GK rat single β -cells.

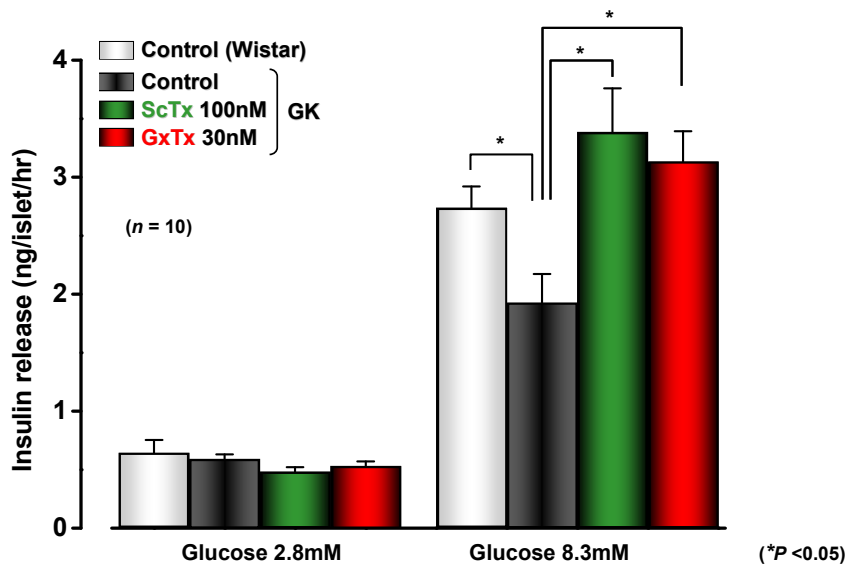


Fig. 14. Potentiation of glucose-induced insulin release in GK rat islets by Kv2.1 channel blockers. Groups of 10 islets were incubated for 1 hr at 37°C in HKRB with 2.8 mM glucose for stabilization, followed by test incubation for 1 hr in HKRB with 2.8 or 8.3 mM glucose. Diabetic GK rat is characterized by impairment of glucose-induced insulin secretion. In the presence of ScTx (100 nM) or GxTx (30 nM), inhibitors of the Kv2.1 channel, glucose (8.3 mM)-induced insulin release was significantly potentiated.

方、ATP感受性 K^+ チャンネルサブユニットKir6.2および電位依存性 K^+ チャンネルKCNQ1の膵島発現レベルは、GKラットとWistarラットで同程度であった。

β 細胞Kvチャンネル活性を電気生理学的に検討した結

果、GKラットでは β 細胞Kvチャンネル電流が増強しており、Kv2.1チャンネルブロッカーのGxTx存在下では、GKラット β 細胞Kvチャンネル電流の増強が観察されなかった。Kv2.1チャンネルブロッカーは、GKラット β 細胞におけるグ

ルコース刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を増加させ、分離膵島からのグルコース誘発インスリン分泌を促進した。

4. 考察

本研究で、ラット膵島における Kv2.1 チャンネルの遺伝子発現および β 細胞におけるタンパク局在発現を確認した。 β 細胞の電位依存性 Kv チャンネル電流が Kv2.1 チャンネルブロッカーの GxTx によって抑制され、さらにグルコース誘発膵島インスリン分泌が GxTx によって促進されたことから、ラット β 細胞では Kv2.1 チャンネルが機能的に発現しインスリン分泌を抑制制御していることが明らかになった。グルコース刺激下での K_{ATP} チャンネル閉鎖による β 細胞の脱分極に対して、Kv2.1 チャンネルの活性化は細胞膜を再分極させることで活動電位を抑制し、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入およびインスリン分泌を抑制すると考えられる。このことは、Kv2.1 チャンネルブロッカーが低グルコース条件下の膵島インスリン分泌に影響しなかったことから支持される。

グレリンは、 β 細胞の Kv チャンネル電流を増大しグルコース誘発インスリン分泌を抑制するが、GxTx 存在下ではこれらグレリン作用が消失したことから、グレリンは GxTx 感受性の Kv2.1 チャンネルの活性化を介して細胞膜の再分極を促し電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入およびインスリン分泌を抑制すると考えられる。また、グレリンによる Kv チャンネル電流の活性化には cAMP-PKA 経路の抑制が介在すると考えられる。

以上より、 β 細胞のカリウムイオン透過性分子である Kv2.1 チャンネルは、グルコースおよびホルモンセンサー情報を統合するキー分子として機能していることが明らかになった。また、 β 細胞における Kv2.1 チャンネル発現・機能亢進が2型糖尿病におけるインスリン分泌不全に関与する可能性が示唆された。

5. 今後の展望

インスリン分泌制御に関しては、これまで K_{ATP} チャンネル依存性経路以外の機序が想定されているが現象論に留まっており、その分子実体の解明が待たれている。本研究で明らかになった Kv チャンネルを介したインスリン分泌制御

は、糖代謝の学術的理解を深めるものであり、今後、Kv チャンネル発現機能と糖尿病の発症・進行との関連についての詳細な解析により、糖尿病の最大原因である β 細胞グルコースセンシングのセットポイント変調機構の解明が期待される。また、 β 細胞 Kv チャンネルの阻害薬はインスリン分泌促進効果が期待され、糖尿病の新規治療薬の開発基盤になることが期待される。

文献

- Dezaki K., Hosoda H., Kakei M., Hashiguchi S., Watanabe M., Kangawa K., Yada T.: Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca^{2+} signaling in β -cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes* 53: 3142-3151 (2004).
- Dezaki K., Sone H., Koizumi M., Nakata M., Kakei M., Nagai H., Hosoda H., Kangawa K., Yada T.: Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance *Diabetes* 55: 3486-3493 (2006).
- Dezaki K., Kakei M., Yada T.: Ghrelin uses $\text{G}\alpha_{12}$ and activates voltage-dependent K^{+} channels to attenuate glucose-induced Ca^{2+} signaling and insulin release in islet β -cells: Novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes* 56: 2319-2327 (2007).
- Dezaki K., Sone H., Yada T.: Ghrelin is a physiological regulator of insulin release in pancreatic islets and glucose homeostasis. *Pharmacol. Ther.* 118: 239-249 (2008).
- Yoshida M., Dezaki K., Yamato S., Aoki A., Sugawara H., Toyoshima H., Ishikawa S., Kawakami M., Nakata M., Yada T., Kakei M.: Regulation of voltage-gated K^{+} channels by glucose metabolism in pancreatic β -cells. *FEBS Lett.* 583: 2225-2230 (2009).
- Yoshida M., Nakata M., Yamato S., Dezaki K., Sugawara H., Ishikawa S., Kawakami M., Yada T., Kakei M.: Voltage-dependent metabolic regulation of Kv2.1 channels in pancreatic β -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396: 304-309 (2010)

Physiological Role of Kv Channels in the Insulin Secretion from Islet β -Cells

Katsuya Dezaki¹, Masafumi Kakei², Toshihiko Yada¹

¹Department of Physiology, Jichi Medical University, Tochigi, Japan

²Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan

Summary

Background and Aims: In pancreatic β -cells, activation of delayed rectifier K^+ (Kv) channels might repolarize cells and attenuate glucose-stimulated action potentials to suppress insulin secretion. Among Kv channel families, Kv2.1 is reportedly expressed in islet β -cells as the major component of Kv currents in rodents. In this study, we aimed to elucidate the physiological role of Kv2.1 channels for insulin secretion and the possible involvement of Kv2.1 channels in the ghrelin-operated β -cell signaling pathway.

Materials and Methods: Islets of Langerhans were isolated from age-matched male Wistar and diabetic GK rats by collagenase digestion. In rat single β -cells, cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was measured by fura-2 microfluorometry, while membrane potentials and whole cell currents were measured in the presence of tolbutamide by nystatin-perforated patch-clamp technique. Insulin release from rat isolated islets was determined by ELISA.

Results: Kv2.1 channel blockers strongly attenuated Kv channel currents and potentiated the glucose-induced insulin release in β -cells. Exposure of cells to ghrelin attenuated the glucose-induced action potential firing by rapidly repolarizing the membrane and shortening the duration of bursting in a reversible manner. Voltage-dependent outward Kv channel currents evoked by depolarizing pulses were significantly increased by ghrelin in a cAMP signaling-dependent manner. In the presence of the channel blocker, ghrelin did not affect the Kv channel currents and insulin release. The Kv2.1 immunofluorescence intensity in the islets of diabetic GK rats was stronger than that in normal Wistar rats. Kv2.1 channel blocker-sensitive Kv channel current density in β -cells was larger in GK rats. Blockade of Kv2.1 channels potentiated the glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases and insulin release in β -cells of diabetic GK rats.

Conclusion: Kv2.1 channels may physiologically limit glucose-induced Ca^{2+} entry to suppress insulin secretion in β -cells. Ghrelin may attenuate membrane excitability via activation of Kv2.1 channels. Enhanced expression and excessive activity of Kv2.1 channel may be causally related to impaired insulin secretion in diabetic rats. Blockade of this channel can promote insulin release, providing a potential therapeutic tool to treat type 2 diabetes.

電位依存性及びカルシウム活性化カリウムチャネルの多様な生理機能と病態的意義

大矢 進¹, 今泉 祐治¹, 佐々木 昌一², Iain A. Greenwood³

¹名古屋市立大学大学院薬学研究科, ²名古屋市立大学医学研究科,

³ロンドン大学基礎科学科

概要 カリウムチャネルは、筋収縮、神経伝達物質遊離、ホルモン分泌、細胞増殖等の多様な生理機能において重要な役割を果たしている。カリウムチャネルの機能破綻は、循環器、神経系、免疫系疾患、癌のような様々な疾患と密接に結びついており、関連する疾患治療薬に対する分子標的として注目されている。本研究の目的は、循環器、泌尿器、生殖器、免疫系分野の研究者と連携することにより、多様な生理機能を制御するカリウムチャネルの発現、活性調節の生理学的意義と病態生理学的意義を明らかにすることである。

1. マウス妊娠子宮平滑筋における ERG 型電位依存性カリウムチャネル機能発現調節とその生理学的意義の解明

マウス非妊娠子宮平滑筋における ERG チャネルサブタイプ及び機能修飾サブユニット KCNE の発現を検討したところ、ERG1a と KCNE2 が高発現していた。ERG 型電位依存性カリウムチャネルは、子宮平滑筋細胞の静止膜電位の維持に寄与し、妊娠後期における自発性収縮反応や頻度の増大に ERG1 チャネル活性の消失が寄与していることが示唆された。本研究成果は、陣痛誘発、促進の目的で ERG チャネル阻害薬が、切迫早産の治療に ERG チャネル開口薬が有効である可能性を提示した。

2. 膵 β 細胞における新規大コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネル BKβ₂ サブユニットのクローニングと機能解析

哺乳類膵臓 β 細胞由来 BKβ₂ サブユニット(KCNMB2)を単離した際、新規スプライズバリエント BKβ_{2b} を同定した。BKβ_{2b} は、BKβ_{2a} とは異なり BK 電流を不活性化する特性を有していなかった。また、BKβ_{2b} は、2型糖尿病患者において発現増大しており、糖尿病の発症に関与する可能性が示された。

3. 中コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネル K_{Ca}3.1 活性・発現調節と T リンパ球での役割

リンパ組織から単離した K_{Ca}3.1 N 末端欠損変異体(K_{Ca}3.1b)が、機能型 K_{Ca}3.1a の膜移行を阻害し、機能不全体として働くことを明らかにした。また、K_{Ca}3.1b は、マウス胸腺細胞において、免疫応答の減弱に寄与することを示唆した。さらに、化学物質オキサゾロン誘発性接触過敏症(DTH)モデルにおいて、K_{Ca}3.1 発現調節の病態的意義を明らかにするとともに、K_{Ca}3.1 阻害薬が接触過敏症治療薬として有効である可能性を提示した。

4. 前立腺肥大症における新規創薬標的分子としての中コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネルの可能性ー間質性前立腺肥大症モデルラットを用いた検討ー

前立腺間質肥大症モデルの肥大した移植泌尿生殖洞において、間質領域特異的に K_{Ca}3.1 発現増大が観察された。また、前立腺間質肥大症モデルに対する K_{Ca}3.1 阻害薬 TRAM-34 の *in vivo* 投与により、間質領域における増殖性細胞数は顕著に減少し、移植泌尿生殖洞重量が濃度依存的に抑制された。K_{Ca}3.1 阻害薬が間質性前立腺肥大症の新規治療薬として有効である可能性を提示した。

1. 研究目的

カリウムチャンネルは、筋収縮、神経伝達物質遊離、ホルモン分泌、細胞増殖等の多様な生理機能において重要な役割を果たしている。カリウムチャンネルの機能破綻は、循環器、神経系、免疫系疾患、癌のような様々な疾患と密接に結びついており、関連する疾患治療薬に対する分子標的として注目されている¹⁾⁻⁷⁾。興奮性細胞では、カリウムチャンネル活性化は、細胞膜興奮性の低下と細胞内カルシウム濃度減少を引き起こす。一方、非興奮性細胞では、カリウムチャンネル活性化は、細胞増殖またはアポトーシスを促進する。

本研究の目的は、循環器、泌尿器、免疫系分野の研究者と連携することにより、多様な生理機能を制御するカリウムチャンネルの発現、活性調節の生理学的意義と病態生理学的意義を明らかにすることである。

プロジェクト研究期間(平成 20-22 年度)において、①マウス妊娠子宮平滑筋における ERG 型電位依存性カリウムチャンネル機能発現調節とその生理学的意義の解明、②膈β細胞における新規大コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャンネル BK β_2 のクローニングと機能解析、③中コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャンネル K $_{Ca}$ 3.1 活性・発現調節とTリンパ球における役割、④前立腺肥大症における新規創薬標的分子としての中コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャンネルの可能性—間質性前立腺肥大症モデルラットを用いた検討—について以下の研究成果を挙げた。

2. 研究方法

2.1 RNA 抽出、cDNA 合成、RT-PCR

学内の動物実験委員会において承認された実験計画に従い、動物、ヒト組織をホモジナイザーにより粉碎した後、RNA を抽出した。また、逆転写反応プロトコールに従い、ReverTraAceTM(東洋紡)とオリゴdTプライマー(Invitrogen)を用いて cDNA を合成した。PCR 増幅装置として GeneAmp2702 (Applied Biosystems)、Taq DNA polymerase として AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) を用いた。目的産物の DNA 配列を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)、キャピラリーシーケンサー (3100 Avest Genetic Analyzer, Applied Biosystems) を用いて解析した。

2.2 リアルタイム PCR 実験

PCR 検出システム (ABI 7000, PE Biosystems)、Power SYBR Green PCR MasterMix (Applied BioSystems) を用いて定量的 PCR 実験を行った⁸⁾⁻¹¹⁾。単一 PCR 産物が生成していることを「解離曲線」にて確認した。また、PCR プライマーによる PCR 反応増幅効率については、用いたすべてのプライマーに対して「検量線」を作成し、増幅効率に有意差がないことを確認した。β-アクチン転写物の発現量を内在性標準として、対象となる転写物の発現量をβ-アクチンに対する比として算出した。それぞれ 2 サンプルずつ測定し、その平均値を 1 例とした。本研究で用いた PCR プライマーの配列情報については省略した。

2.3 ウェスタンブロッティング法

各種組織より膜タンパクを抽出したタンパク試料 (20-50 μg/lane) を SDS-PAGE (10.0%) により分画化し、PVDF 膜 (GE Healthcare) に転写した。PVDF 膜は 1% BSA を添加した PBS/0.1% Tween20 (Tween-PBS) で 4°C、一晩ブロッキングした。Tween-PBS で希釈した抗 ERG1、KCNE2 抗体 (Alomone Labs) に浸して 4°C、一晩インキュベートし、Tween-PBS で 5 分間、4 回洗浄した。次に、抗ウサギ IgG-HRP 標識抗体 (Chemicon) で 1 時間インキュベートし、同様に洗浄した。ECL Advance Western Blotting kit (Amersham Biosciences)、Image Reader (LAS 1000, FUJIFILM) を用いて可視化した。

2.4 収縮測定法

非妊娠及び妊娠期の子宮を摘出し、下端を固定し、上端をトランスデューサーへつなぎ、Kreb's-HEPES 溶液で満たしたマグヌス装置に懸垂した。詳細な実験方法については、引用文献 8 を参照。

2.5 電気生理実験

コラゲナーゼ処理にて、マウス子宮平滑筋細胞を調製した。単離平滑筋細胞の膜電流測定には、ホールセルパッチクランプ法を用いた。データ解析法や実験溶液については、引用文献 8 を参照。また、ラット膈β細胞株 RINm5F 細胞株、哺乳類由来大コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャンネル α サブユニット、β2 サブユニット発現 HEK293 細胞株における細胞培養、電流測定については、引用文献 9 を参照。

2.6 細胞・組織免疫染色

T 細胞の細胞免疫染色では、一次抗体として抗 CD3 抗

体(Santa Cruz Biotechnology)、抗 $K_{Ca}3.1$ 抗体(Alomone Labs & Abcam)を使用し、二次抗体としてそれぞれ Alexa Fluor 488 抗ラット IgG 抗体、Alexa Fluor 405 抗ウサギ抗体により二重染色した。また、CFP または YFP 融合 $K_{Ca}3.1$ バリエーションを作成した。蛍光シグナルの可視化解析は、共焦点レーザー顕微鏡(A1, ニコン)を用いて行った¹⁰⁾。ラット移植生殖洞組織の組織免疫染色では、抗 $K_{Ca}3.1$ 抗体や抗 PCNA 抗体(PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen 核内増殖抗原)を一次抗体として使用した。詳細な実験方法については、引用文献 11 を参照。

2.7 T 細胞における膜電位感受性色素を利用した膜電位変化の測定

耳介リンパ性細胞から単離した T 細胞における $K_{Ca}3.1$ 活性は、膜電位感受性色素 DiBAC₄(3) を細胞に取り込ませ、イオノマイシンと $K_{Ca}3.1$ 活性化薬 DCEBIO により $K_{Ca}3.1$ を最大限に活性化した後、 $K_{Ca}3.1$ 阻害薬 TRAM-34 を投与した際の蛍光強度変化(脱分極反応)により評価した。プロトコールの最後に 80 mM 高カリウム溶液を外液に投与した際の最大脱分極反応を 1.0 として TRAM-34 の効果を数値化した¹⁰⁾。

2.8 フローサイトメーターによる CD4/CD8 サブセットの測定と MTT 法による細胞増殖の測定

コンカナバリン A 処理したマウス胸腺細胞における CD4、CD8 発現は、FITC ラベルした CD4 と PE ラベルした CD8 を用いて FACSscan flow cytometer (BD LSR, Becton-Dickinson) により測定し、CellQuest ソフトウェア (Becton-Dickinson) により解析した¹⁰⁾。また、細胞増殖は、MTT 法を用い、マルチウェルプレートリーダー Multiscan JX (ThermoElectron) にて測定した¹⁰⁾。

2.9 オキサゾロン誘発性接触過敏症(DTH)モデルマウスの作成

オキサゾロン誘発性接触過敏症モデルマウスの作成は、Cavey らの報告¹²⁾ を参考にして行った。オキサゾロンアセトン溶液(0.5% オキサゾロン) 100 μ l を腹部に塗布し(感作)し、7 日後に同様の溶液を耳介に塗布し(惹起)、24 時間後に DTH を発症していることを耳介肥厚の計測により確認した。

2.10 前立腺間質肥大症モデルラットの作成

前立腺間質肥大症モデルラットについては、引用文献 11 に従って作成した。雄性ラット胎児から泌尿生殖洞を切

除し、6 週齢雄性ラットのの前立腺上に移植した。移植 4 週間後に摘出し、実験に用いた。

3. 研究結果及び考察

3.1 マウス妊娠子宮平滑筋における ERG 型電位依存性カリウムチャンネル機能発現調節機構とその生理学的意義の解明

3.1.1 マウス子宮平滑筋における ERG1 及び KCNE 遺伝子発現解析と妊娠によるそれらの発現変化

ERG1 (HERG) カリウムチャンネルは、心筋活動電位の再分極相に寄与しており、不整脈の発生や関連疾患と密接な関係がある。大矢らは、これまでラット胃平滑筋や門脈平滑筋細胞にこのカリウムチャンネルが機能発現することを明らかにした^{13),14)}。空腸、食道、胆嚢平滑筋においても ERG1 が機能発現し、静止張力の維持や自発的収縮頻度の調節に寄与することが報告されている¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。

マウス子宮平滑筋における ERG チャンネルサブタイプ (ERG1, 2, 3) 及び機能修飾サブユニット KCNE (KCNE1-5) の mRNA 発現について、リアルタイム PCR 法にて解析したところ、ERG1a と KCNE2, 4 が比較的高発現していた。また、妊娠後 0, 7, 14, 19 日 (0 DP, 7 DP, 14 DP, 19 DP) 及び出産 2 日後 (2 PP) における ERG1a, KCNE2, KCNE4 の mRNA 発現を同様に検討したところ、ERG1a 発現は、いずれの時期においてもほとんど変化しないのに対して、KCNE2, KCNE4 発現は、妊娠後期に向かって有意に増大した。特に、KCNE2 発現については、14 DP では約 60 倍、19 DP では約 400 倍増大した。次に、タンパク質発現変化について検討したところ、上記と同様に、ERG1a 発現は、妊娠期を通して変化しなかったが、KCNE2 発現は、14 DP, 19 DP において有意かつ顕著に増大した (Fig. 1)。以上より、妊娠後期における KCNE2 発現の爆発的な上昇が、カリウムチャンネル活性に何らかの影響を与える可能性が示唆された。

3.1.2 マウス非妊娠子宮平滑筋の自発性収縮反応に対する ERG 阻害薬の作用

非妊娠子宮において観察される自発性収縮反応が観察される。この条件下、ERG1 阻害薬 dofetilide (1 μ M)、E4031 (1 μ M)、rBe-KM (100 nM) を投与したところ、いずれの薬物も自発性収縮強度、頻度ともに増大させ、the

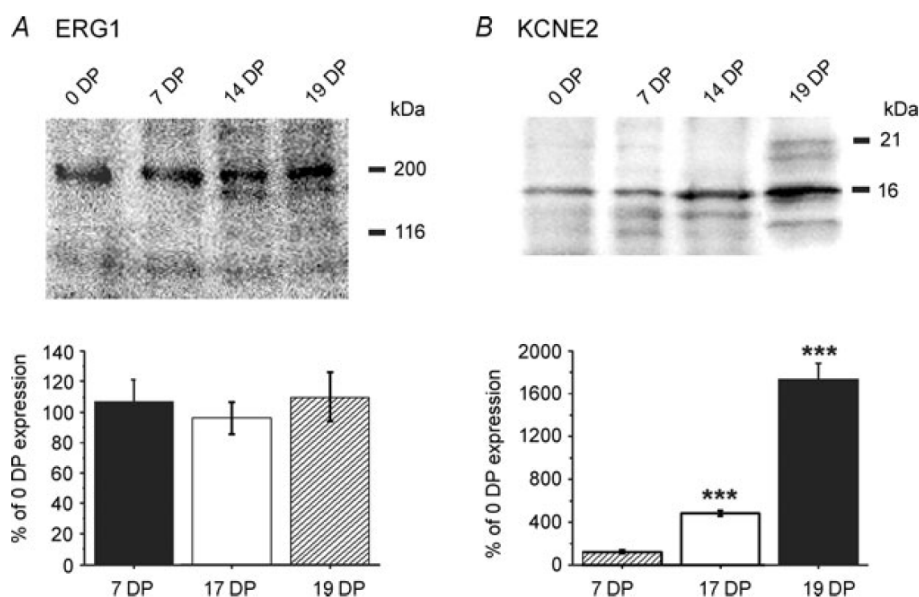


Figure 1. ERG1 and KCNE protein expressions in uterus of the pregnant mice. The membrane fraction extracted from uterus of each stage were immunoblotted with anti-ERG1 (A) and anti-KCNE2 (B) antibodies (at 1 : 200). Molecular mass standards are shown in kilodaltons at the right side of the panels. Lower panels show the mean level of expression ($n=3$ and 4) normalized to the level of expression in non-pregnant tissues (0 DP). Significance at $P<0.005$ is shown as ***. To confirm that equal amounts of protein were loaded in each lane, the blots were stained with 0.2% Ponceau S after the transfer.

mean increase in the integral of tension (MIT)は有意に増大した(Fig. 2)。

3. 1. 3 マウス非妊娠子宮平滑筋の自発性収縮反応に対するERG活性化薬の作用

Fig. 2と同様な実験条件において、ERG1活性化薬NS1643(10 μ M)を投与したところ、阻害薬に対する反応とは逆に、自発性収縮反応強度の減少と頻度の減少が観察され(Fig. 3B)、MITは有意に減少した(Fig. 3C)。

3. 1. 4 マウス妊娠子宮平滑筋の自発性収縮反応に対するERG阻害薬及び活性化薬の作用

次に、マウス妊娠後期(19 DP)において観察される自発性収縮反応に対するERG1阻害薬とERG1活性化薬の作用を検討したところ(Fig. 4)、いずれの薬物もFig. 2やFig. 3で観察された有意な効果を示さなかった(Fig. 4D)。

3. 1. 5 マウス非妊娠、妊娠子宮平滑筋細胞において観察されるERGチャンネル電流の比較

dofetilide(1 μ M)感受性ERGチャンネル電流成分を測定し、非妊娠子宮平滑筋細胞と妊娠後期(19 DP)子宮平滑筋細胞とで比較したところ、非妊娠子宮群では、妊娠子宮

群と比べて、有意に大きな電流成分が観察され、収縮測定実験の結果と一致した。

3. 1. 6 まとめ

本研究において、マウス子宮平滑筋細胞にERG1チャンネルが機能発現することを明らかにした。ERG1チャンネルは、他の電位依存性カリウムチャンネルやカルシウム活性化カリウムチャンネルと同様に子宮平滑筋細胞の静止膜電位の維持に寄与すると考えられる。

妊娠後期においては、ERG1チャンネル活性の消失が観察され、ERG阻害薬、活性化薬に対する収縮反応の変化がほとんど消失した。妊娠後期において、ERG1の修飾サブユニットのKCNE2が爆発的に増大したことから、KCNE2発現増大がERGチャンネル活性の消失と関連していると思われるが、詳細な分子機構については今後のさらなる研究が必要である。

本研究成果は、陣痛誘発、促進の目的でERGチャンネル阻害薬が、切迫早産の治療にERGチャンネル開口薬が有効である可能性を提示した。

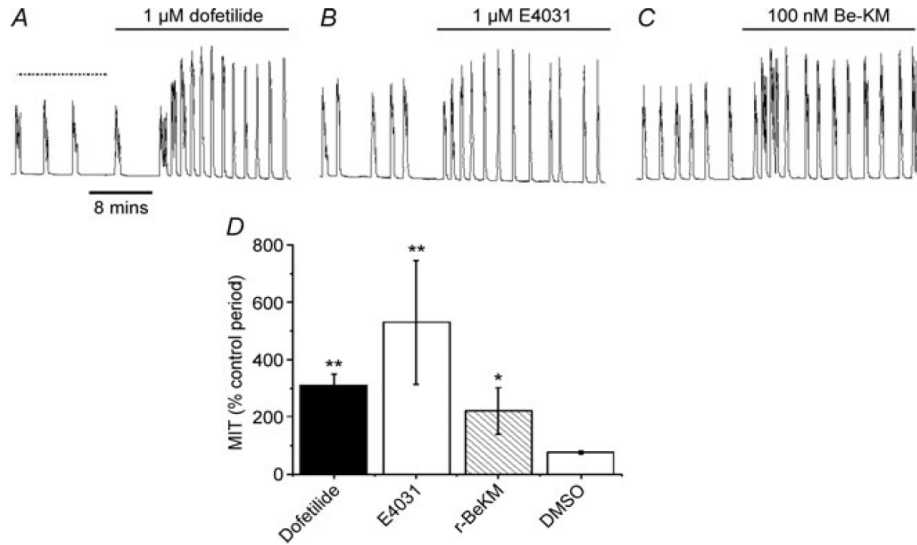


Figure 2. Effect of ERG channel inhibitors on *in vitro* spontaneous contractile activity in myometrial tissue from non-pregnant mice. Representative traces for the effect of 1 μM dofetilide (A), 1 μM E4031 (B) and 100 nM rBe-KM (C) on the spontaneous contractile activity of uterine preparations (taken from non-pregnant mice at the time of oestrous) *in vitro*. Increases in isometric tension are shown as upward deflections. D shows the mean increase in the integral of tension (MIT) produced by each of the ERG blockers ($n=5-28$) and the vehicle (DMSO) normalized to the control period that is indicated as a dashed line in A. Error bars denote the S.E.M. * and ** indicate significant difference from DMSO at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively.

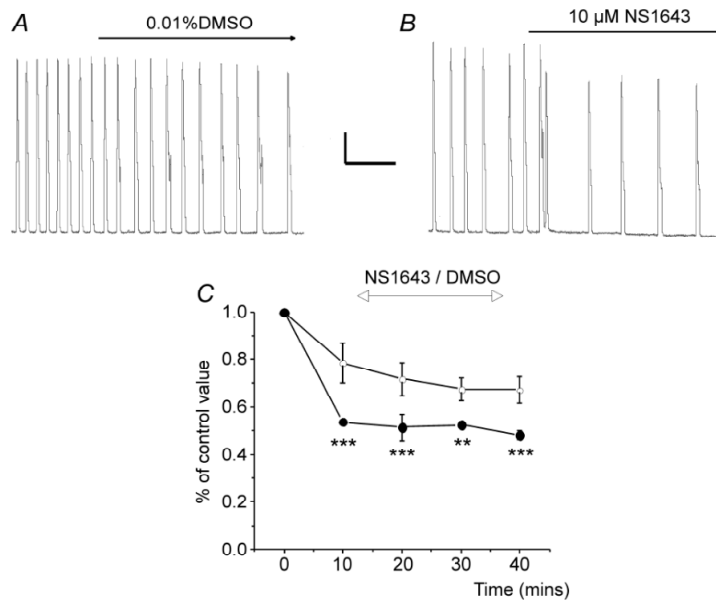


Figure 3. Effect of ERG channel activation on spontaneous contractions. A and B show the effect of DMSO or 10 μM NS1643, respectively, on spontaneous contractility in non-pregnant uterine tissues. Scale bars represent 2 mN and 8 min. C shows the MIT as a % of the control period over time for tissues bathed in DMSO (○) or NS1643 (●). Each point is the mean of 5–13 experiments with error bars denoting S.E.M. ** and *** indicate significant difference from DMSO at $p<0.01$ and $p<0.005$, respectively.

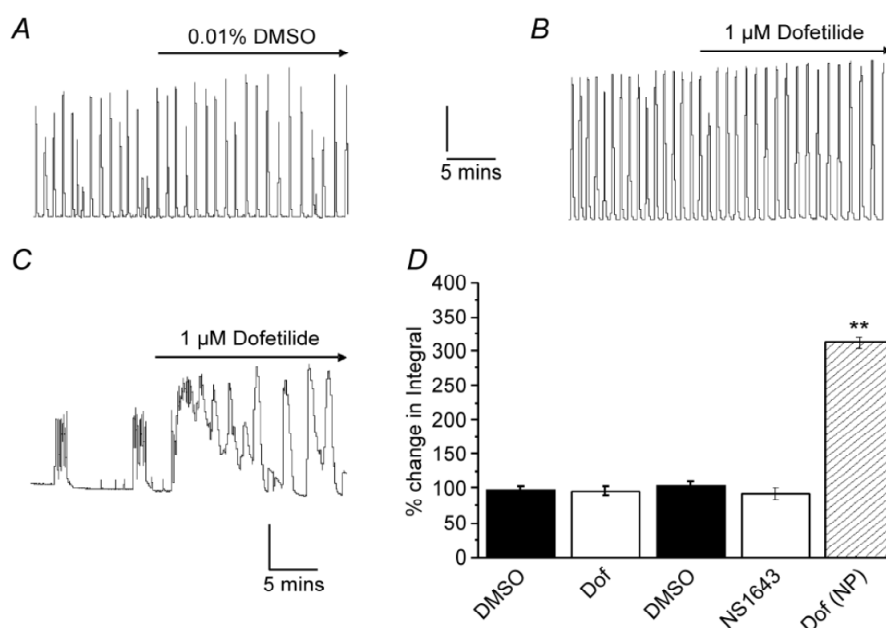


Figure 4. ERG channel modulators are ineffective in uterus from pregnant mice. *A* and *B* are representations of the lack of effect of dofetilide or vehicle control on the spontaneous contractions generated by uterine segments from late pregnant mice (19 DP). *C* shows a contemporaneous experiment with dofetilide on a segment of uterus from an animal that was mated but which did not conceive. *D*, mean effect of 0.01% DMSO, 1 μ M dofetilide (dof) or 10 μ M NS1643 (ERG activator) on the uterine contractile activity of pregnant animals. Hatched bar shows the mean effect of dofetilide in 3 mated non-pregnant controls. ** indicates significant difference from DMSO at $p < 0.005$. Vertical scale is 2 mN.

3. 2 腭 β 細胞における新規大コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャンネル BK β_2 サブユニットのクローニングと機能解析

ラット腭 β 細胞株 RINm5F 及びマウス、ヒト、ラット膵臓由来 cDNA から BK β_2 をクローニングしたところ、フレームシフトにより C 末端領域を欠損するプライスバリエント BK β_{2b} が得られた。BK β_{2b} を BK α サブユニットと共発現させたところ、BK β_{2a} では、BK チャンネル電流を不活性化したにもかかわらず、BK β_{2b} を共発現させたときには、BK チャンネル電流の不活性化は観察されなかった (**Fig. 5**)。また、2型糖尿病患者において、BK β_{2b} 発現は亢進していた (**Fig. 6**)⁹。

さらに、BK β_{2a} 、BK β_{2b} をそれぞれ YFP 標識し、細胞分布を検討したところ、BK β_{2a} は細胞膜に局在していたのに対して、BK β_{2b} は細胞内に一様に分布していた。

以上より、BK β_{2b} は、BK β_{2a} による BK チャンネル電流不活性化を阻害することにより、BK チャンネルの腭 β 細胞静止膜電位への寄与を上昇させる機能を有している可能性がある。

3. 3 T リンパ球中コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャンネル K $_{Ca}$ 3.1 活性・発現調節と病態

3. 3. 1 中コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャンネル K $_{Ca}$ 3.1 の N 末端欠損体の生理機能の解明

T リンパ球において、カリウムチャンネル活性化は細胞膜の過分極を引き起こし、電位非依存性カルシウムチャンネルの Driving Force (駆動力) を増大させる。したがって、T リンパ球の細胞増殖・分化・死の調節分子としてカリウムチャンネルは重要な役割を果たしている。T リンパ球において、主に機能しているカリウムチャンネルは電位依存性 K $_v$ 1.3 カリウムチャンネルとカルシウム活性化カリウムチャンネル K $_{Ca}$ 3.1 の二つのサブタイプである。我々は、フレームシフトにより、N 末端領域を欠損する K $_{Ca}$ 3.1 の新規プライスバリエントを哺乳類リンパ組織 (ヒトを含む。) からクローニングした¹⁰。N 末端 K $_{Ca}$ 3.1 (K $_{Ca}$ 3.1- Δ N または K $_{Ca}$ 3.1b) は、特にリンパ節に高発現しており (**Fig. 7**)、機能型 K $_{Ca}$ 3.1 (K $_{Ca}$ 3.1a) の細胞膜移行を阻害し (**Fig. 8**)、その結果として機能発現を有意に抑制するドミナントネガティブ体として機能した (**Fig.**

9)¹⁰。

次に、 $K_{Ca}3.1b$ の生理的役割について検討した。マウス胸腺細胞を単離する際にコンカナバリン A (Con-A, 5 $\mu\text{g/ml}$) を添加せずに1時間程度放置すると、 $K_{Ca}3.1b$ 発現が急激に上昇し (Fig. 10)、その後 Con-A を添加して培養 (2 日間) すると細胞増殖が有意に抑制された (Fig. 11A)。 $K_{Ca}3.1$ 阻害薬 TRAM-34 (1 μM) を培地に付加した場合や $K_{Ca}3.1b$ をトランスフェクションにより強制発現させた場合

にも同様な結果が得られた (Figs. 11B, 11C)。一方、フローサイトメーターを用いて、CD4、CD8 発現を解析したところ、 $K_{Ca}3.1b$ 発現増大、 $K_{Ca}3.1$ 活性阻害により、 $CD4^+/CD8^+$ ダブルポジティブ細胞の割合が減少し、 $CD4^+/CD8^-$ ダブルネガティブ細胞の割合が有意に上昇した (Fig. 11D)。

以上は、 $K_{Ca}3.1b$ ($K_{Ca}3.1-\Delta N$) が免疫応答の減弱やストレス適応力の減弱に寄与する可能性を示した。

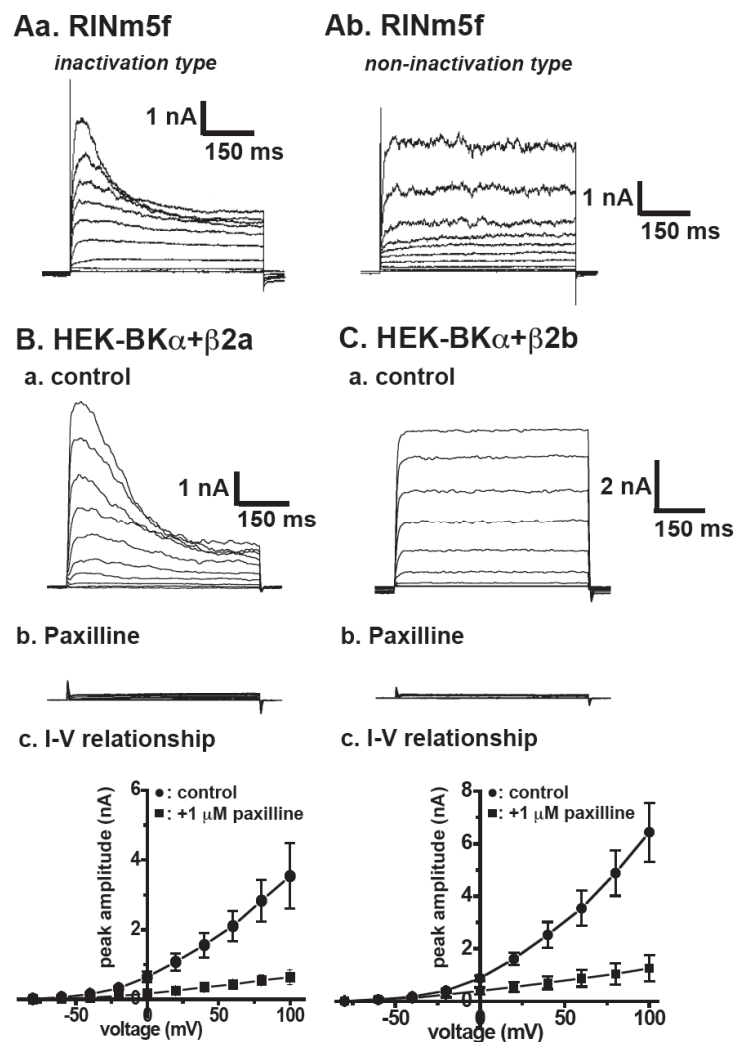


Figure 5. Inactivating and non-inactivating BK currents in RINm5f cells and effects of BK β 2b on BK-channel activity. A: 1 μM paxilline-sensitive BK currents were recorded in RINm5f cells. BK currents were elicited by depolarizing voltage-step to +100 mV from holding potential (-80 mV) with 20-mV increment. Inactivating-type (a) and non-inactivating-type (b) BK currents in RINm5f. B and C: BK currents were recorded in HEK293 cells expressing BK α + BK β 2a (Ba) and BK α + BK β 2b (Ca) using the same pulse protocol. The currents were almost completely suppressed by application of 1 μM paxilline (Bb and Cb). Peak current-voltage relationship in HEK-BK α + BK β 2a (Bc) and HEK-BK α + BK β 2b (Cc) ($n=6$ for each). Results are expressed as means \pm S.E.M.

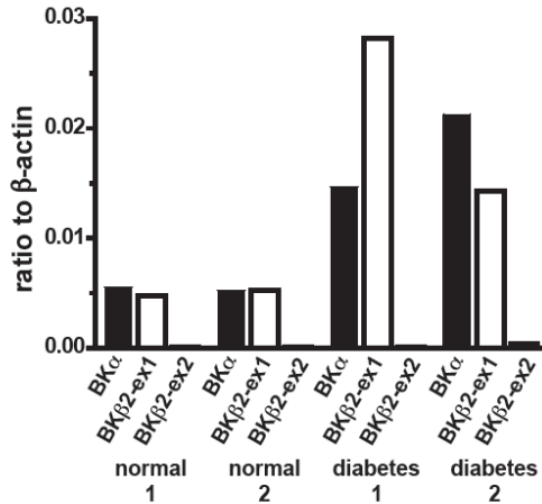


Figure 6. Quantitative, real-time PCR analysis of expression of BK channel α - and β -subunits in pancreas tissues from diabetes mellitus patients. Values are shown for steady state transcripts relative to an internal standard, β -actin in the same preparation. Results are expressed as means of triplicate replications. Primers specific for BK α and BK β 1 - 4 subunits amplify PCR fragments of respective BK-channel subtypes, and primers for 'BK β 2-ex1' and 'BK β 2-ex2' amplify PCR fragments from BK β 2a + BK β 2b and BK β 2a alone, respectively.

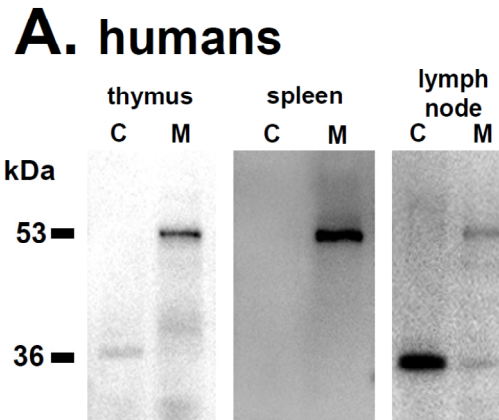


Figure 7. K_{Ca}3.1 protein expressions in lymph node (mesenteric) of humans (A). Protein fractions from cytosol (C) and plasma membrane (M) were probed by immunoblotting with anti-K_{Ca}3.1-C antibody. Molecular mass standards are shown in kilodaltons on the *left side* of the panels.

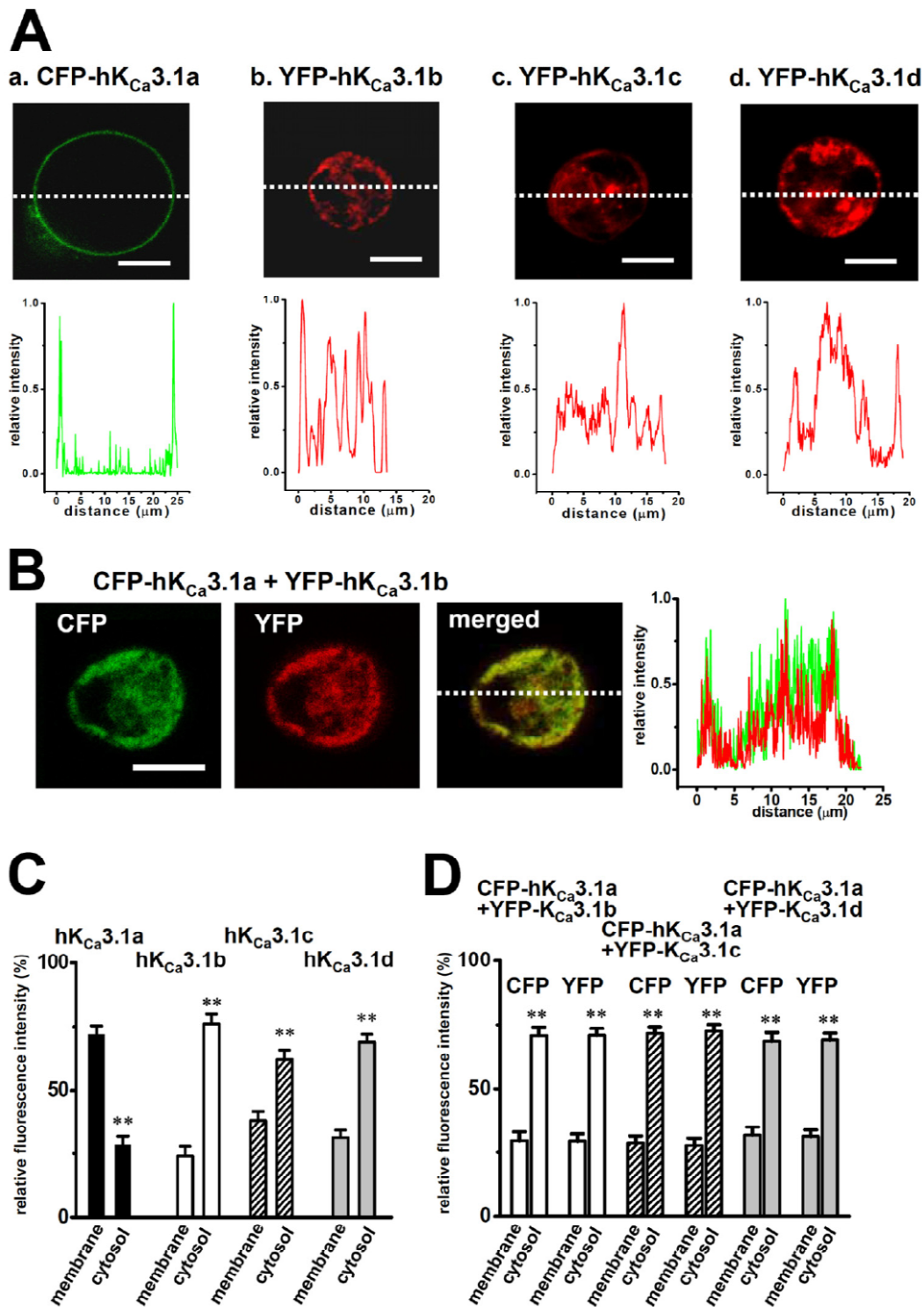


Figure 8. Cellular distribution of human K_{Ca}3.1 in HEK293 cells. *A*, CFP-tagged hK_{Ca}3.1a-transfected HEK293 cells, CFP image (*upper panel*) and the profile on the *dotted line* (*lower panel*) are shown in *green* (*panel a*). In YFP-tagged hK_{Ca}3.1b/c/d-transfected HEK293 cells, YFP image (*upper panel*) and the profile of relative intensity (*lower panel*) are shown in *red*. *B*, CFP-tagged hK_{Ca}3.1a and YFP-tagged hK_{Ca}3.1b-cotransfected HEK293 cells, CFP (*upper, left*) and YFP (*upper, right*) images are shown in *green* and *red*, respectively, and the merged image (*lower, left*) and the profiles on the *dotted line* (*lower, right*) of CFP and YFP as *yellow*. Bar, 20 μ m. *C*, summarized data from *A*. *D*, summarized data from *B*. Data are expressed as the means \pm S.E. **, $p < 0.01$ versus plasma membrane fractions.

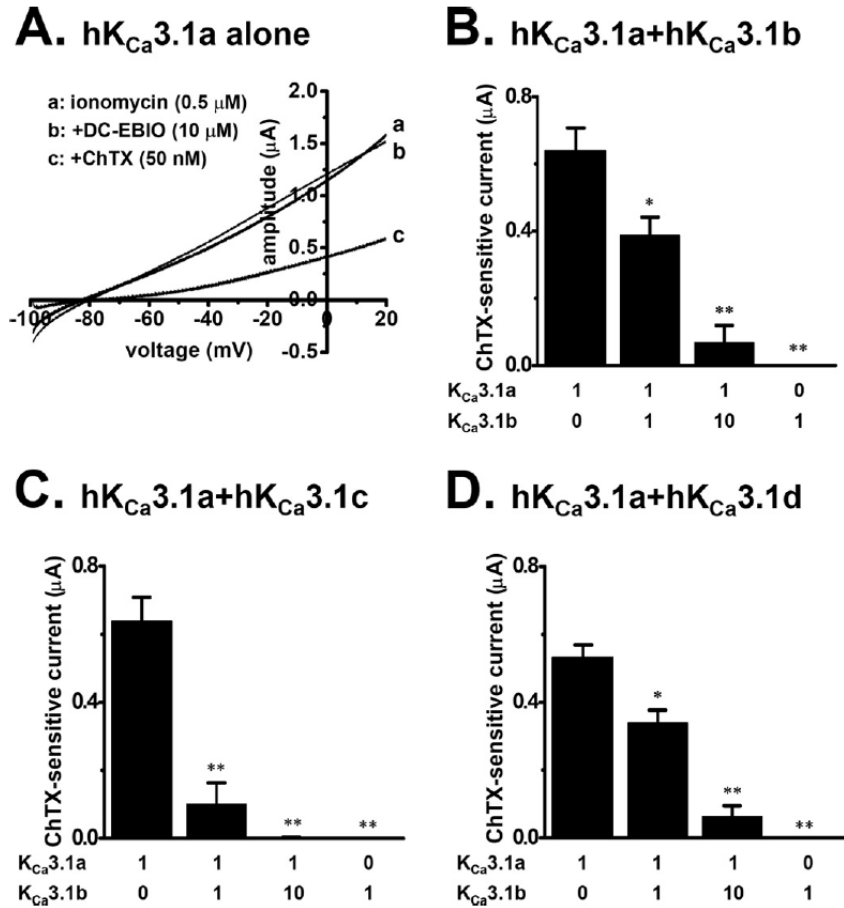


Figure 9. Dominant-negative inhibition of IK_{Ca} currents by hK_{Ca}3.1 spliced variants in the *Xenopus* oocyte expression system. Human K_{Ca}3.1 spliced variants were expressed in *Xenopus* oocytes by injection of the corresponding cRNA. *A*, representative traces from oocytes injected with the cRNA for hK_{Ca}3.1a. Ionomycin- and DC-EBIO-activated and ChTX-inhibited currents were studied by two-electrode voltage clamp. Current to voltage relations were derived by voltage ramp protocols under physiological conditions. *B–D*, co-expression of hK_{Ca}3.1b (*B*), hK_{Ca}3.1c (*C*), and hK_{Ca}3.1d (*D*) with hK_{Ca}3.1a largely reduced hK_{Ca}3.1a-induced IK_{Ca} currents. Current amplitudes were measured at -30 mV. Oocytes were injected with the cRNA for hK_{Ca}3.1a and hK_{Ca}3.1b/c/d at 1:0, 1:1, 1:10, and 0:1 ratios as indicated. Means \pm S.E. of current amplitudes from 3 to 8 oocytes for each condition. *, **, $p < 0.05, 0.01$, significantly different as determined by Tukey's test.

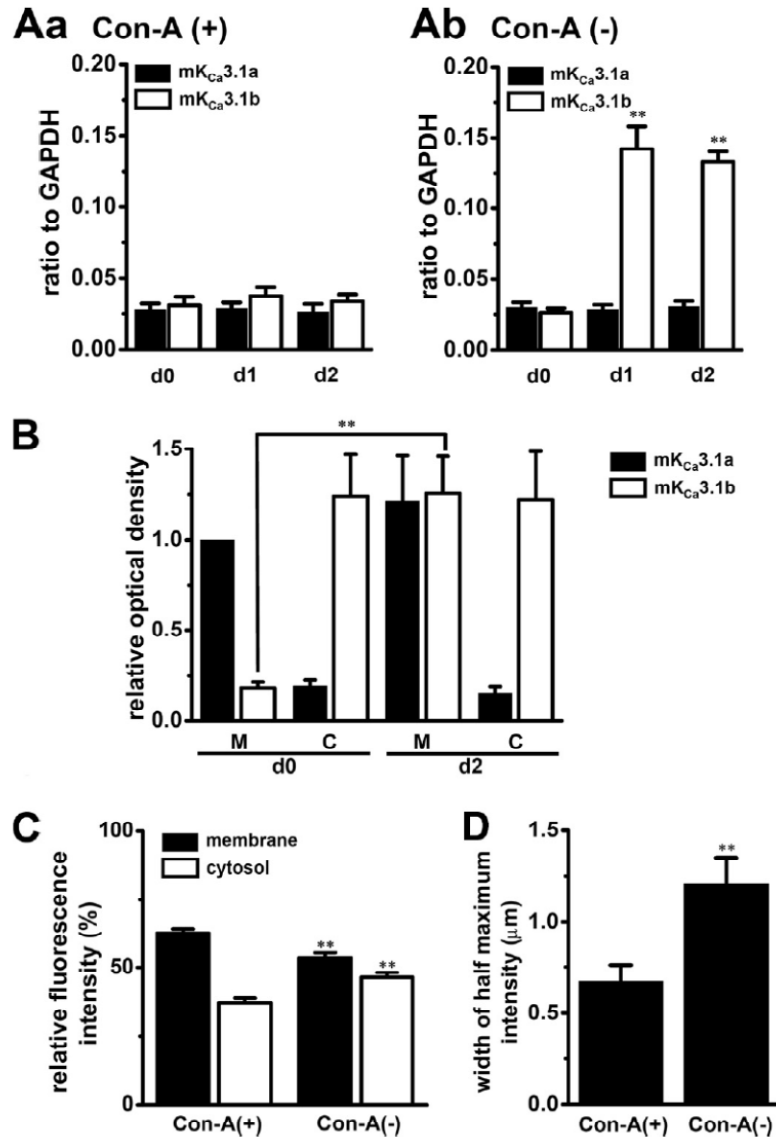


Figure 10. Gene and protein expressions and cellular distribution of mK_{Ca}3.1 in Con-A(+) and Con-A(-) thymocytes. Quantitative real time PCR analysis of K_{Ca}3.1 spliced variant expressions in Con-A(+) (A, panel a) and Con-A(-) (A, panel b) thymocytes at day 0 (d0), day 1 (d1), and day 2 (d2). Values are shown for steady state transcripts relative to GAPDH in the same preparation. Results are expressed as the means \pm S.E. ($n=5$). **, $p<0.01$ versus Con-A(+). B, K_{Ca}3.1 protein expressions in Con-A(-) thymocytes at d0 and d2. Protein fractions from plasma membrane (M) and cytosol (C) were probed by immunoblotting with anti-K_{Ca}3.1-C antibody. Summarized results were obtained as the optical density of each band signal relative to that of mK_{Ca}3.1a band signal in plasma membrane fraction at d0 ($n=5$ for each). **, $p<0.01$ versus d0. C, summarized data of cellular distribution of K_{Ca}3.1 in Con-A(+) and Con-A(-) thymocytes. Data are expressed as the means \pm S.E. ($n=16$ for each). **, $p<0.01$ versus Con-A(+).

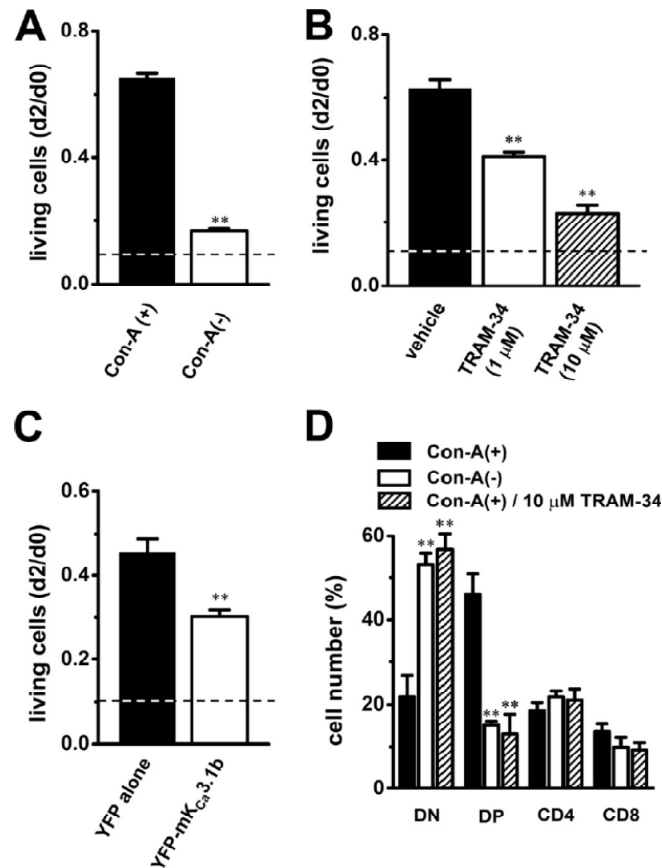


Figure 11. Effects of $mK_{Ca}3.1b$ overexpression and IK_{Ca} current blockade on cell growth and CD4/CD8 phenotype expression in mouse thymocytes. Cell viability at d2 was evaluated by MTT cell proliferation assay. Value of living cells was expressed as the absorption spectra of the formed formazans and was calculated relative to that in thymocytes at d0. *A*, value of living cells in Con-A(-) thymocytes (*open column*) at d2 was compared with that in Con-A(+) thymocytes (*solid column*) ($n=6$ for each). **, $p<0.01$ versus Con-A(+). *B*, value of living cells in Con-A(+) thymocytes treated with 1 μ M (*open column*) and 10 μ M (*hatched column*) TRAM-34 at d2 was compared with that in Con-A(+) thymocytes treated with vehicle (0.1% DMSO) ($n=6$ for each). **, $p<0.01$ versus vehicle. *C*, value of living cells in Con-A(+) thymocytes transfected with YFP- $mK_{Ca}3.1b$ (*open column*) at d2 was compared with that in Con-A(+) transfected with YFP alone (*solid column*) ($n=4$ for each). **, $p<0.01$ versus YFP alone. *Dashed lines* show value of living cells in thymocytes cultured in the absence of Con-A. *D*, reduced numbers of CD4(+)CD8(+) double-positive (*DP*) thymocyte populations in Con-A(+) and Con-A(+) treated with TRAM-34. Thymocytes were stained for CD4 and CD8 and examined by flow cytometry. The *bar graph* summarized each subset from separate ($n=5$ for each) experiments as follows: CD4(-)CD8(-) double -negative (*DN*), CD4(+)CD8(+) double-positive (*DP*), CD4(+)CD8(-) single-positive (*CD4*), and CD4(-)CD8(+) single-positive (*CD8*). **, $p<0.01$ versus Con-A(+)

3. 3. 2 接触過敏症モデルマウスの耳介リンパ節重量増大(T細胞増殖亢進)と耳介リンパ節由来T細胞における $K_{Ca}3.1$ 活性・発現調節

オキサゾロン誘発接触過敏症モデルマウスの耳介肥厚に $K_{Ca}3.1$ 阻害薬が奏功することが最近報告された¹⁸⁾。本研究では、DTHモデルにおける耳介リンパ節重量増大に

着目し、耳介リンパ節Tリンパ球増殖における $K_{Ca}3.1$ の役割について検討した。リンパ節に存在するナイーブT細胞やCD4陽性T細胞では、マウスだけでなく、ヒトにおいても $K_{Ca}3.1$ が機能発現していることが知られている。

リアルタイムPCR法により、 $K_{Ca}3.1$ 発現を検討したところ、DTHモデルの耳介リンパ節において有意な発現増大が

観察された。また、ウェスタンブロット法により、K_{Ca}3.1 タンパク発現を検討したところ、同様の発現増大が観察された。次に、耳介リンパ節から単離した T 細胞を用いて、K_{Ca}3.1 活性が上昇しているかどうかを検討した。膜電位感受性色素 DiBAC₄(3) を用いて、各群の耳介リンパ節から単離した T 細胞の膜電位に及ぼす K_{Ca}3.1 阻害薬の効果を検討したところ、DTH 群の耳介リンパ節から単離した T 細胞において有意な脱分極反応が観察され、コントロール群ではほとんどそれが観察されなかった。以上より、DTH モデルの耳介リンパ節 T 細胞において、K_{Ca}3.1 発現上昇により、細胞膜が過分極し、細胞内への Ca²⁺ 流入が増大することにより、T 細胞の増殖が促進され、耳介リンパ節重量が増大していることが示唆された。

3. 3. 3 K_{Ca}3.1 転写制御の分子機構解明

これまで、K_{Ca}3.1 の転写活性化因子として activator protein-1 (AP-1) と転写抑制因子として RE-1 Silencing Transcription factor (REST) が報告されている^{19,20}。AP-1 は、Fos と Jun のヘテロダイマーによって構成されている²¹。また、Fos 及び Jun は、それぞれ c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2 及び c-Jun、JunB、JunD という異なる分子群により構成されている。

DTH モデル耳介リンパ節における REST 及び AP-1 構成分子群の発現について、リアルタイム PCR 法及びウェスタンブロット法により解析したところ、REST の発現が有意に減少していた。T 細胞における K_{Ca}3.1 発現調節の機序として AP-1 発現増大のみが報告されていた。したがって、本研究により得られた知見は、T 細胞の K_{Ca}3.1 発現調節に REST が関与する可能性を示したはじめての結果である。

3. 3. 4 K_{Ca}3.1 阻害薬による DTH 症状の抑制と K_{Ca}3.1 活性・発現調節

次に、DTH モデルの耳介リンパ節由来 T 細胞の増殖に対する K_{Ca}3.1 阻害薬の効果について検討した。惹起直前に TRAM-34 を皮下注射 (10 mg/kg, s.c.) したところ、耳介肥厚がデキサメタゾンやタクロリムスを投与したときと同程度抑制されるとともに、耳介リンパ節重量、耳介リンパ節における K_{Ca}3.1 活性・発現が有意に減少した。また、REST もこれと同期して、コントロール群と同様なレベルまで発現が有意に増大した。T 細胞では、K_{Ca}3.1 阻害によりサイトカイン産生が抑制されることが報告されている¹⁶。また、冠

血管平滑筋細胞では、K_{Ca}3.1 阻害により、REST 発現が増大し、K_{Ca}3.1 発現が減少することが報告されている²²。K_{Ca}3.1、REST の発現調節については、さらなる検討が必要である。

3. 3. 5 まとめ

本研究において、化学物質誘発性接触過敏症 (IV 型アレルギー) モデルマウスの耳介リンパ節における T 細胞増殖において K_{Ca}3.1 活性・発現増大が寄与することを明らかにした。T 細胞以外の細胞でも、K_{Ca}3.1 の機能・発現調節分子がいくつか発見されており²³⁻²⁷、K_{Ca}3.1 発現調節のより詳細な分子機構解明については今後のさらなる研究が必要である。本研究成果は、K_{Ca}3.1 が接触過敏症をはじめとするアレルギー疾患の治療標的分子として非常に有望である可能性を提示した。

3. 4 前立腺肥大症における新規創薬標的分子としての中コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネルの可能性—間質性前立腺肥大症モデルラットを用いた検討—

3. 4. 1 前立腺間質性肥大症モデルラットにおける中コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネル発現解析

泌尿生殖洞移植 4 週間後に移植泌尿生殖洞と前立腺 (泌尿生殖洞を移植した反対側) を摘出し²⁸、DNA マイクロアレイ法によりカリウムチャネル発現変化を検討したところ、中コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネル K_{Ca}3.1 の発現が 32 倍程度に上昇していた (Fig. 12A)。そこで、リアルタイム PCR 法により、K_{Ca}3.1 転写物の定量解析を行ったところ、移植泌尿生殖洞において、10 倍程度高い K_{Ca}3.1 発現が観察された (Fig. 12B)。ウェスタンブロット解析によるタンパク質発現解析でも同様の結果が得られた (Fig. 12C)。また、組織免疫化学実験では、K_{Ca}3.1 陽性細胞が間質領域においてのみ観察された (Fig. 12D)。K_{Ca}3.1 活性化は、細胞膜を過分極させ、CRAC (Ca²⁺ release activating Ca²⁺) チャネルを介したカルシウムの driving force を増大させる。また、細胞内カルシウム濃度の増大は、K_{Ca}3.1 チャネルを活性化し、このフィードバック機構を促進する。したがって、移植泌尿生殖洞の間質領域における K_{Ca}3.1 発現増大は、前立腺間質性肥大症の重要な因子である可能性が示された。

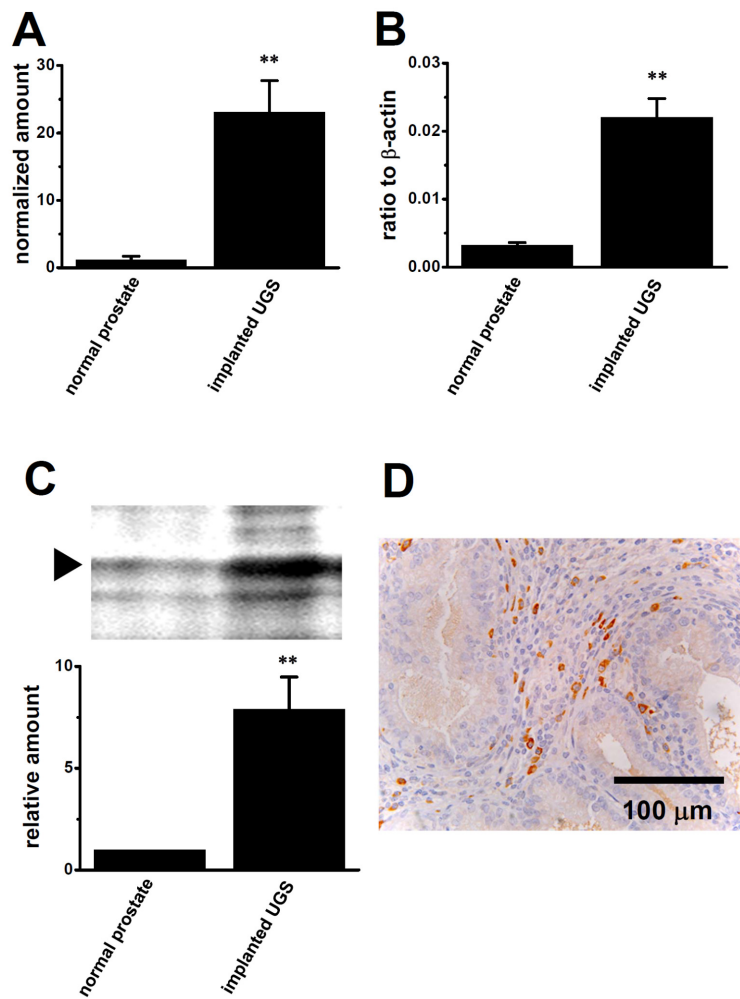


Figure 12. K_{Ca}3.1 transcript and protein expressions in normal prostate and implanted UGS of stromal hyperplasia BPH model rats. A: DNA microarray analysis of K_{Ca}3.1 gene expression. Expression levels express the values in normal host prostate as 1.0. B: Quantitative, real-time PCR analysis of K_{Ca}3.1 gene expression. Values are shown for steady state transcripts relative to β-actin in the same preparation. Results are expressed as the means ± SEM (normal prostate: *n*=8, implanted UGS: *n*=8). **: *p*<0.01 vs. normal prostate. C: K_{Ca}3.1 protein expressions in normal prostate and implanted UGS. Plasma membrane fractions were probed by immunoblotting with anti-K_{Ca}3.1 antibody (upper panel). Lower panel shows the summarized data of densitometric analyses (*n*=4). **: *p*<0.01 vs. normal prostate. D: Immunohistochemical staining of K_{Ca}3.1 expression in stromal compartments of implanted UGS. Brown-stained nuclei were considered ‘positive’.

3. 4. 2 前立腺間質肥大症モデルラットにおける K_{Ca}3.1 阻害薬 TRAM-34 の細胞増殖抑制効果

移植泌尿生殖洞増殖における K_{Ca}3.1 阻害薬 TRAM-34 の効果を検討するために、移植 7 日目に TRAM-34 を皮下投与し(300, 600, 1200 μg/kg, s.c.)し、その 21 日後に組織重量を測定したところ、移植泌尿生殖洞増殖は、TRAM-34 濃度依存的かつ有意に抑制された (Fig. 13)。

また、増殖性細胞のマーカーである PCNA 陽性細胞を組織免疫染色法により染色したところ、間質領域における PCNA 陽性細胞の割合が濃度依存的に減少した (Fig. 14)。一方、上皮領域では PCNA 陽性細胞の割合はほぼ一定であった (Fig. 14)。TRAM-34 などのカルシウム活性化カリウムチャネル阻害薬は細胞周期の進行を終結又は遅延させることにより細胞増殖を抑制させることが報告さ

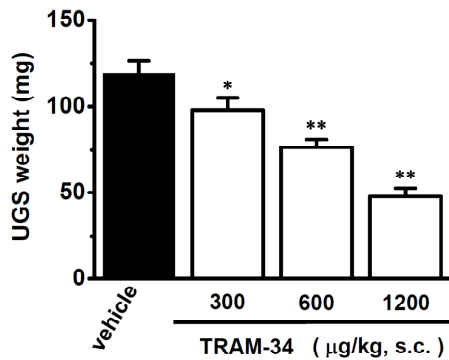


Figure 13. *In vivo* inhibitory effects of TRAM-34 on the growth of implanted UGS in the stromal hyperplasia BPH model. TRAM-34 (300, 600, and 1200 μg/kg) was subcutaneously administered through day 7 to 21 after UGS implantation, and the implanted UGS were weighed on day 22. Results are expressed as the means ± SEM: $n=36$ (vehicle control), $n=26$ (300 μg/kg, s.c.), $n=22$ (600 μg/kg, s.c.) and $n=10$ (1200 μg/kg, s.c.). *, **: $p<0.05$, <0.01 vs. vehicle control.

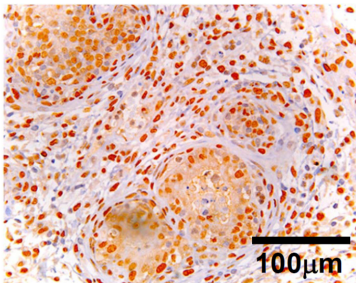
れている^{29,30}).したがって、TRAM-34による増殖性細胞減少の一因として、細胞周期の終結が挙げられる。これを明らかにするためには、フローサイトメーターを用いた細胞周期研究が今後の課題である。

3. 4. 3 前立腺間質肥大症モデルラットにおける $K_{Ca}3.1$ 転写制御因子の発現

$K_{Ca}3.1$ の転写活性化因子 AP-1 (FosとJunのヘテロダイマー)と転写抑制因子 RESTが報告されているため(3. 3. 3 参照)、これらの発現について検討した。

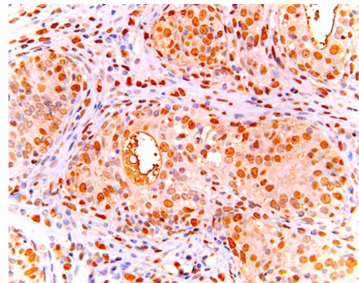
移植泌尿生殖洞(UGS)において、c-Junの有意な発現上昇と RESTの有意な発現減少が観察され、それぞれ $K_{Ca}3.1$ 発現と負の相関、正の相関を示した(Figs. 15B, 15C)。したがって、移植泌尿生殖洞における $K_{Ca}3.1$ 転写調節にはc-JunとRESTが寄与している可能性が示された。c-Jun、RESTはともに、前立腺間質部に発現するタンパク質であることが知られており、間質領域特異的な $K_{Ca}3.1$ 転写促進にはこれらが関与している可能性が考えられる。

A. vehicle



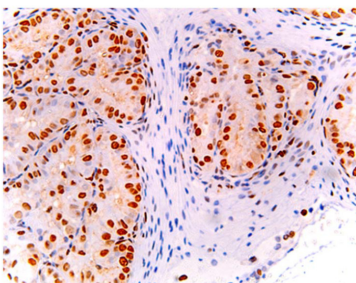
B. TRAM-34

(600 μg/kg, s.c.)



C. TRAM-34

(1200 μg/kg, s.c.)



D

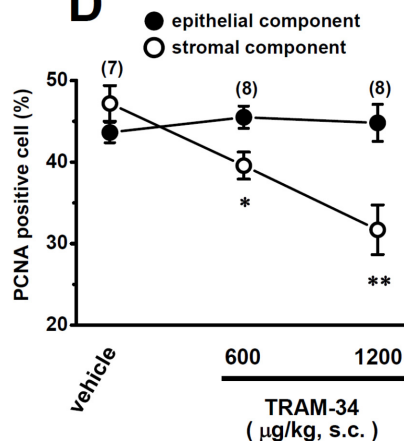
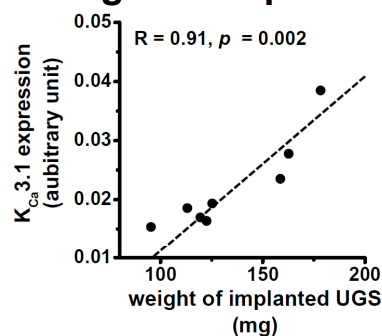
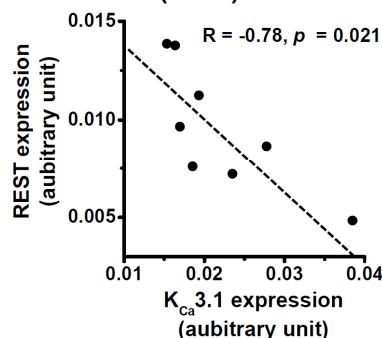


Figure 14. Effects of the proliferation index on TRAM-34 in stromal and epithelial compartments of the stromal hyperplasia BPH model rats. Immunohistochemical staining for PCNA was performed as detailed in ‘Materials and Methods’. A. vehicle control, B. 600 μg/kg, s.c., C. 1200 μg/kg, s.c. D. PCNA-positive epithelial (closed circles) and stromal cells (open circles) were quantified to determine the proliferation index in each group.

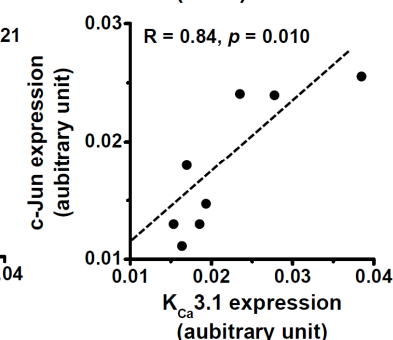
A. weight of implanted UGS



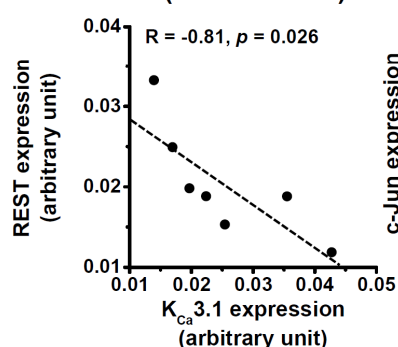
B. REST (UGS)



C. c-Jun (UGS)



D. REST (human BPH)



E. c-Jun (human BPH)

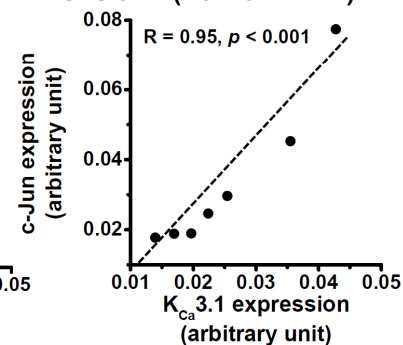


Figure 15. Correlation between $K_{Ca}3.1$ and transcription factor (REST and c-Jun) transcript expressions in implanted UGS and prostate from BPH patients. A: Correlation between wet tissue weight and $K_{Ca}3.1$ transcript expression in implanted UGS. Expression (arbitrary unit) of $K_{Ca}3.1$ transcripts was obtained from the data in Figure 11B ($n=8$). B, C: Correlation between $K_{Ca}3.1$, REST, and c-Jun transcript expressions, Expressions of $K_{Ca}3.1$, REST, and c-Jun transcript expressions in implanted UGS were plotted as $K_{Ca}3.1$ vs. REST and $K_{Ca}3.1$ vs. c-Jun ($n=8$). D, E: Expressions of $K_{Ca}3.1$, REST, and c-Jun transcript expressions in prostate needle-biopsies from BPH patients were obtained from the data in Fig. 15, and were plotted as $K_{Ca}3.1$ vs. REST and $K_{Ca}3.1$ vs. c-Jun ($n=7$). Dotted line shows the best fitting line, and R value shows the correlation coefficient for linear fitting between the variable X-axis and the variable Y-axis.

3. 4. 4 前立腺肥大症患者の前立腺針生検・前立腺組織における $K_{Ca}3.1$ 、c-Jun、REST 発現解析

前立腺肥大症患者の針生検標本における $K_{Ca}3.1$ 、c-Jun、REST の発現をリアルタイム PCR 解析したところ、前立腺間質肥大症モデルラットの移植UGSと同様の結果が得られた (Figs. 16A, 16B)。また、抗 $K_{Ca}3.1$ 抗体を用い

て免疫組織染色したところ、前立腺肥大症の患者の前立腺組織において、強い陽性シグナルが観察された (Fig. 16C)。移植UGSと同様に、c-Jun 有意な発現上昇とRESTの有意な発現減少が観察され、それぞれ $K_{Ca}3.1$ 発現と負の相関、正の相関を示した (Figs. 15D, 15E)。

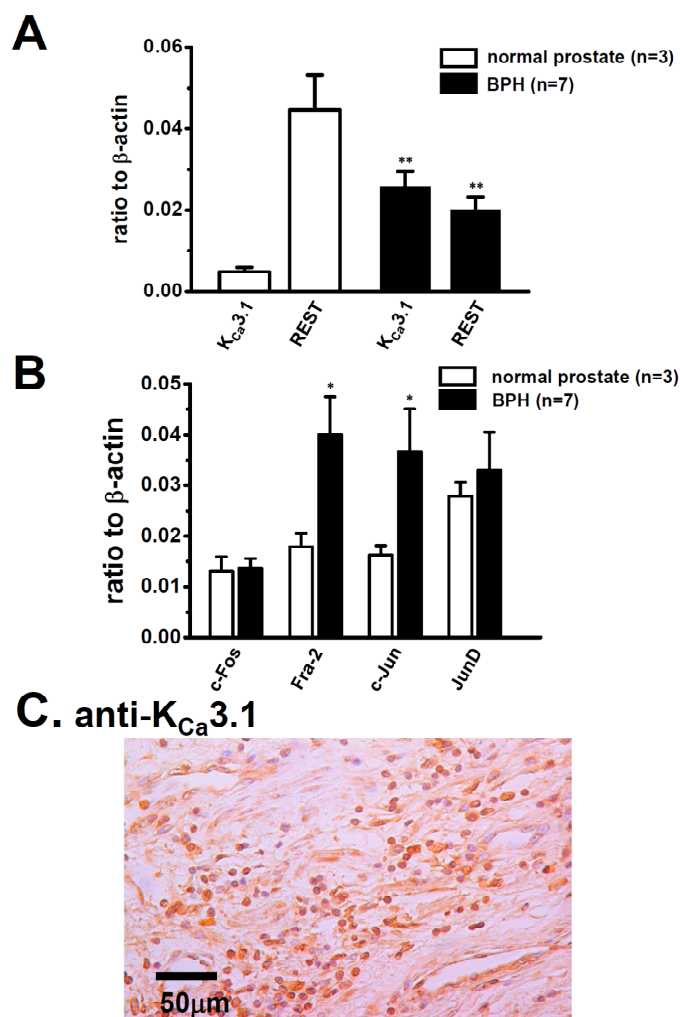


Figure 16. Expression of K_{Ca}3.1, REST, and AP-1 components in human BPH samples. A. Real-time PCR analysis of K_{Ca}3.1 and REST in human normal prostate (*n*=3, open columns) and BPH samples (*n*=7, closed columns). Values are shown for steady state transcripts relative to β-actin in the same preparation. Results are expressed as the means ± SEM. **: *p*<0.01 vs. normal prostate. B. Real-time PCR analysis of AP-1 component transcripts (c-Fos, Fra-2, c-Jun, and JunD) in human normal prostate (*n*=3, open columns) and BPH samples (*n*=7, closed columns). *: *p*<0.05 vs. normal prostate. C. Immunohistochemical analysis of K_{Ca}3.1 expression in human BPH samples. K_{Ca}3.1-positive, brown-stained signals, which are specific for anti-K_{Ca}3.1 antibody from Abnova, are detected in stromal but not in epithelial compartments.

3. 4. 5 まとめ

前立腺肥大症は、高齢男性に最もよくみられる排尿障害の原因となる前立腺の良性腫瘍で、前立腺癌と明らかに異なる良性疾患である。その罹患率は高く、組織学的に 60 歳の男性では 50% 以上に認められ、加齢とともに増加する。代表的な前立腺肥大治療薬として、α1 受容体遮断薬 (α1A 受容体遮断薬のタムスロシンと α1D 受容体遮断薬のナフトピジルなどが臨床応用されている。)、抗アンドロゲン剤が挙げられる³¹⁾。

本研究では、前立腺間質肥大症モデルラットの間質性細胞において、①中コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネル K_{Ca}3.1 発現増大、②細胞膜の過分極、③細胞内カルシウム濃度上昇、というステップにより細胞増殖が促進されるという機構を見出した。また、K_{Ca}3.1 発現増大に転写調節因子 REST、c-Jun が寄与する可能性を見出した。以上より、K_{Ca}3.1 阻害薬は、前立腺肥大症の新規治療薬として有効である可能性がある。

4. 展 望

イオンチャネル創薬の市場は年々大幅に拡大しており、自己免疫疾患・炎症性疾患、代謝・内分泌疾患、骨関連疾患、神経性疾患の他に癌が特に大きな割合を占めている。K⁺チャネルは、細胞容量調整や細胞増殖・分化・死の制御にも重要な役割を果たしており、炎症性疾患、自己免疫疾患の治療標的として期待されている。我々は、本研究課題及び最近の研究成果により、中コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネルがアレルギー性皮膚炎、炎症性腸疾患、前立腺疾患（前立腺肥大症、前立腺癌）の潜在的な治療標的であることを示唆する基礎的知見を挙げている。将来的には、本研究成果を基盤として、広範囲な疾患のイオンチャネル創薬の実現に向けてさらに研究を進展させたい。

本研究助成によるこれまでの研究成果一覧

No. 08C6

Greenwood IA, Yeung SYM, Tribe RM, Ohya S. Loss of functional K⁺ channels encoded by ether-a-go-go-related genes in mouse myometrium prior to labour onset. *J Physiol (Lond)*, 587, 2313-2326 (2009).

Greenwood IA, Ohya S. New tricks for old dogs: KCNQ expression and role in smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 156, 1196-1203 (2009).

No. 09C6

Ohya S, Fujimori T, Kimura T, Yamamura H, Imaizumi Y. Novel spliced variants of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel β_2 subunit in human and rodent pancreas. *J PharmacolSci*, 114, 198-205 (2010).

No. 10C6

Ohya S, Niwa S, Yanagi A, Fukuyo Y, Yamamura H, Imaizumi Y. Involvement of dominant-negative spliced variants of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, K_{Ca}3.1 in immune function of lymphoid cells. *J BiolChem*, 286, 16940-16952 (2011).

Ohya S, Niwa S, Kojima Y, Sasaki S, Sakuragi M, Kohri K, Imaizumi Y. Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, K_{Ca}3.1, as a novel therapeutic target of benign prostatic hyperplasia. *J PharmacolExpTher*, accepted.

引用文献

1. Nelson MT, Quayle JM, *AmJ Physiol*, 268, C799-C822 (1995).
2. Wang HS, MacKinnon D, *J Physiol (Lond)*, 48, 319-335 (1995).
3. Yuan XJ, *Circ Res*, 77, 370-378 (1995).
4. Beeton C, Chandy KG, *Neuroscientist*, 11, 550-562 (2005).
5. Stuhmer W, Alves F, Hartung F, Zientkowska M, Pardo LA, *FEBS Lett*, 580, 2850-2852 (2006)
6. Schönherr R, *J Membr Biol*, 205, 175-184 (2005)
7. Cho H-C, Backx PH, *Potassium Channels in Cardiovascular Biology*, edited by Archer S.L., Rusch NJ, Kluwer Academic, New York, pp 17-34, 2001.
8. Greenwood IA, Yeung SYM, Tribe RM, Ohya S, *J Physiol (Lond)*, 587, 2313-2326 (2009)
9. Ohya S, Fujimori T, Kimura T, Yamamura H, Imaizumi Y, *J PharmacolSci*, 114, 198-205 (2010).
10. Ohya S, Niwa S, Yanagi A, Fukuyo Y, Yamamura H, Imaizumi Y, *J BiolChem*, 286, 16940-16952 (2011).
11. Ohya S, Niwa S, Kojima Y, Sasaki S, Sakuragi M, Kohri K, Imaizumi Y, *J PharmacolExpTher*, accepted.
12. Cavey D, Bouclier M, Burg G, Delamadeleine F, Hensby CN, *Agents and Actions*, 29, 1/2 (1990)
13. Ohya S, Horowitz B, Greenwood IA, *Am J Physiol Cell Physiol*, 283, C866-C877 (2002)
14. Ohya S, Asakura K, Muraki K, Watanabe M, Imaizumi Y, *Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol*, 282, G277-G287 (2002)
15. Farrelly AM, Ro S, Callaghan BP, Khoi MA, Fleming N, Horowitz B, Sanders KM, Keef KD, *Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol*, 284, G883-G895 (2003)
16. Akbarali HI, Thatte H, He XD, Giles WR, Goyal RK, *Am J Physiol Cell Physiol*, 277, C1280-C1290 (1999)
17. Parr E, Pozo MJ, Horowitz B, Nelson MT, Mawe GM, *Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol*, 284, G392-G398 (2003)
18. Pegorato S, Lang M, Dreker T, Kraus J, Hamm S, Meere C, Feurle J, Tasler S, Prutting S, Kraus Z, Visan V,

- Grissmer S, *Bioorg Med ChemLett*, 19, 2299-2304 (2009)
19. Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG, *J BiolChem*, 27, 37137-37149 (2000)
20. Cheong A, Bingham AJ, Li J, Kumar B, Sukumar P, Munsch C, Buckley NJ, Neylon CB, Porter KE, Beech DJ, Wood IC, *Mol Cell*, 20, 45-52 (2005)
21. Jochum W, Passegue E, Wagner EF, *Oncogene*, 20, 2401-2412 (2001)
22. Di L, Srivastava S, Zhdanova O, Ding Y, Li Z, Wulff H, Lafaille M, Skolnik EY, *ProcNatlSciAcad USA*, 107, 1541-1546 (2010)
23. Mucchekehu RW, Harvey BJ, *Steroids*, 74, 212-217 (2009)
24. Sciaccaluga M, Fioretti B, Catacuzzeno L, Pagani F, Bertollini C, Rosito M, Catalano M, D'Alessandro G, Santoro A, Cantore G, Ragozzino D, Castigli E, Franciolini F, Limatola C, *Am J PhysiolCell Physiol*, in press.
25. Fioretti B, Castigli E, Micheli MR, Bova R, Sciaccaluga M, Harper A, Franciolini F, Catacuzzeno L. *Cell PhysiolBiochem*, 18, 47-56 (2006)
26. Peña TL, Chen SH, Konieczny SF, Rane SG. *J BiolChem*, 275, 13677-13682 (2000)
27. Brakemeier S, Kersten A, Eichler I, Grgic I, Zakrzewicz A, Hopp H, Köhler R, Hoyer J, *Cardiovasc Res*, 60, 488-496 (2003)
28. Mori F, Oda N, Sakuragi M, Sakakibara F, Kiniwa M, Miyoshi K, *J Urol*, 181, 890-898 (2009).
29. Wang ZH, Shen B, Yao HL, Jia YC, Ren J, Feng YJ, Wang YZ, *Oncogene*, 26, 5107-5114 (2007)
30. Morimoto T, Ohya S, Hayashi H, Onozaki K, Imaziumi Y, *J PharmacolSci*, 104, 94-98 (2007)
31. Kojima Y, Sasaki S, Shinoura H, Hayashi Y, Tsujimoto G, Kohri K, *Prostate*, 66, 761-767 (2006)

Physiological and Pathophysiological Roles of Voltage-Gated and Ca²⁺-Activated K⁺ Channels

Susumu Ohya¹, Yuji Imaizumi¹, Shoichi Sasaki², Iain A. Greenwood³

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, ²Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University, Japan, ³Division of Basic Medical Sciences, St. George's, University of London, UK

Summary

There is a growing appreciation that ion channels encoded by the *ether-`a-go-go-related* gene family (ERG) have a functional impact in smooth muscle in addition to their accepted role in cardiomyocytes and neurons. In isometric tension studies of non-pregnant myometrium, the ERG channel blockers dofetilide, E4031 and Be-KM1 increased spontaneous contractility and ERG activators inhibited spontaneous contractility. In contrast, neither ERG blockade nor activation had any effect on the inherent contractility in myometrium from late pregnant animals. Moreover, dofetilide-sensitive K⁺ currents with distinctive 'hooked' kinetics were considerably smaller in uterine myocytes from late pregnant compared to non-pregnant animals. Expression of mERG1 isoforms did not alter throughout gestation or upon delivery, but the expression of genes encoding auxiliary subunits (KCNE) were up-regulated considerably. This study provides the first evidence for a regulation of ERG-encoded K⁺ channels as a precursor to late pregnancy physiological activity.

The intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IK_{Ca}/K_{Ca}3.1 is one of the major K⁺ channels in T-lymphocytes, which regulate membrane potential and Ca²⁺ signaling, and are potential molecular targets for pharmacological intervention in autoimmune diseases. We identified novel spliced variants of K_{Ca}3.1 (K_{Ca}3.1b) from the human lymphoid tissues, which were lacking the N-terminal domains of the original K_{Ca}3.1a as a result of alternative splicing events. K_{Ca}3.1b suppressed the localization of K_{Ca}3.1a to the plasma membrane and also IK_{Ca} channel activity of K_{Ca}3.1a in a dominant-negative manner. The N-terminal domain of K_{Ca}3.1 is critical for channel trafficking to the plasma membrane, and that the fine tuning of IK_{Ca} channel activity modulated through alternative splicing events may be related to the control in physiological and pathophysiological conditions in T-lymphocytes. We further suggested that the increase in IK_{Ca} activity might contribute to differentiation of T-lymphocytes in auricle lymph node of delayed-type hypersensitivity (DTH) model and thereby cause inflammatory response of DTH in auricle.

Recently, a new experimental stromal hyperplasia BPH model corresponding to clinical benign prostatic hyperplasia (BPH) has established by Mori *et al.* (2009). We showed that K_{Ca}3.1 genes and proteins were highly expressed in implanted urogenital sinus (UGS), which is similar to human BPH tissues histologically, rather than those in the normal host prostate. In addition, the expression of two transcriptional regulators of K_{Ca}3.1, activator protein-1 (AP-1) and functional repressor element 1-silencing transcription factor (REST) were significantly increased and decreased in implanted UGS, respectively. Immunohistochemical examination showed that positive signals of K_{Ca}3.1 were detected exclusively in the stromal cells, whereas scarcely immunolocalized to the basal cells of the epithelium in implanted UGS. *In vivo* treatment with TRAM-34, a specific K_{Ca}3.1 inhibitor, significantly suppressed the increase in implanted UGS weights with the decrease in stromal cell components. These suggest that K_{Ca}3.1 blockers may be a novel treatment option for patients with BPH.

まとめ

森田 啓之

岐阜大学大学院医学系研究科

担当していただいた 6 名の研究者から実りある研究報告書を提出していただいた。

桑原は、大腸において常在菌により植物繊維から産生される短鎖脂肪酸により K^+ 分泌が誘発されることを示し、高 K^+ 血症の治療としての短鎖脂肪酸投与の可能性を示した。

種本は、MAGI-1 が遠位尿細管細胞の膜裏打ち構造を構成する分子として、尿細管細胞内における K^+ チャネルの機能的局在を規定することを明らかにし、MAGI-1 との相互作用調節による K^+ チャネル機能制御が、 K^+ 輸送機能異常に起因する疾患治療に利用できる可能性を示した。

河原は、近位尿細管に存在し、pH 感受性 2 孔 K^+ チャネルとして知られる TASK2 のノックアウト(KO)マウスを作製し、その機能を調べた。TASK2 KO マウスは、アシドーシスを示したが、尿の pH は WT と差がなかった。経口酸負荷によるアシドーシス誘導後の尿組成も KO と WT で差がなかった。以上の結果から、TASK2 の機能欠損により尿細管アシドーシスが引き起こされるが、その程度は軽微であり、遠位尿細管の酸分泌能は代償されていることが示唆された。

佐藤は、ラットを用いた実験により、高脂肪負荷によるインスリン抵抗性が、 K^+ 摂取により改善されることを示した。この効果には、血漿レニン活性低下、血漿アンジオテンシン II 低下、脂肪組織での酸化ストレス抑制およびアディポネクチン上昇が関与していた。この研究は、 K^+ 摂取による抗糖尿病作用を示唆するもので、新たな糖尿病コントロールとして、注目される。

出崎は、 β 細胞の K_v チャネルが、グルコースおよびホルモンセンサー情報を統合するキー分子として機能していることを示した。グルコース刺激下での KATP チャネル閉鎖による β 細胞の脱分極に対して、 K_v チャネルの活性化は細胞膜を再分極させることで活動電位を抑制し、電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} 流入およびインスリン分泌を抑制すると考えられる。2型糖尿病におけるインスリン分泌不全に、 β 細胞の $K_v2.1$ チャネル過剰発現・機能亢進が関与する可能性を示した。 K^+ チャネルは、筋収縮、神経伝達物質遊離、ホルモン分泌、細胞増殖等の多様な生理機能を担っている。従って、 K^+ チャネルの機能不全は、様々な疾患と結び付いており、疾患治療の分子標的として注目されている。

大矢は、陣痛誘発あるいは切迫流産の治療薬としての ERG チャネル阻害薬および開口薬、2型糖尿病治療薬としての $BK\beta2b$ チャネル阻害薬、接触過敏症および前立腺肥大症治療薬としての $KCa3.1$ チャネル阻害薬等の可能性を示した。

以上にまとめたとおり、各メンバーは、それぞれのサブテーマに沿って大きな研究成果を上げた。プロジェクトリーダーとして「生体における K^+ 輸送とその制御機構」に関して新たな知見を積み重ねられたことに対しメンバー各位に感謝いたします。最後になりましたが、このプロジェクト研究をサポートしていただいたソルト・サイエンス研究財団、ならびにいつも温かい助言を下されたソルト・サイエンス研究財団研究運営審議会の今井研究顧問、岡田委員、菱田委員に感謝いたします。

Conclusion

Hironobu Morita, MD & PhD

Gifu University, Graduate School of Medicine

The principal products achieved by this project are as follows:

Dr. Kuwahara examined the short-chain fatty acids-induced K^+ secretion on colonic epithelium by means of short-circuit current technique using human and rat colon. He found that short-chain fatty acids stimulate mucosa and induced K^+ secretion through both BK and IK channels in crypt of the human and the rat distal colon; these responses were enhanced by high K^+ -diet for two weeks. These data suggest a therapeutic feasibility of short-chain fatty acids for hyperkalemia.

The scaffolding of the K^+ channel is considered to be indispensable for the functional expression of the K^+ recycling pathway in the distal convoluted tubules. Dr. Tanemoto demonstrated that membrane associated guanylate kinase with inverted domain structure 1 (MAGI-1) isoforms participate in this process. The K^+ channel/MAGI-1 interaction is regulated by the phosphorylation of the interacting domains of the K^+ channels. Mineralocorticoid possibly regulates the interaction by regulating the activity of the kinases, such as SGK1 and WNK4. Regulation of these kinases could be a new target for hypertension treatment.

To examine whether pH-sensitive two-pore K^+ channel (TASK2) plays an important role in maintaining acid-base homeostasis, Dr. Kawahara developed TASK2 knockout (KO) mice. Plasma pH of KO mice showed weak acidosis if they fed normal chow. However, no further decrease in pH was observed during a 6-day period of acid-loading. Thus, although TASK2 KO mice have low ability of HCO_3^- reabsorption in the kidney, distal nephron may in part compensate acid-base balance, at least under the acid-loading.

K^+ appears to have a close association with insulin resistance, because K^+ -depleted diet has been known to lead to insulin resistance. In this context, Dr. Satoh examined whether high K^+ -diet can ameliorate insulin resistance. The hyperinsulinemic-euglycemic glucose clamp study demonstrated that high fat-diet induced glucose resistance, which was significantly ameliorated by high K^+ -diet with decreasing plasma renin activity and angiotensin II levels. These data indicate that high K^+ -diet has beneficial effects on whole body insulin sensitivity in an insulin resistant state.

Kv2.1 is expressed in the islet β -cell as the major component of Kv currents, which may repolarize cells and attenuate glucose-stimulated action potentials to suppress insulin secretion. Dr. Dezaki demonstrated that Kv2.1 channels physiologically limit glucose-induced Ca^{2+} entry to suppress insulin secretion in β -cells. Enhanced expression and excessive activity of Kv2.1 channels are causally related to impaired insulin secretion in diabetic rats. Blockade of this channel can promote insulin release, providing a potential therapeutic tool for type 2 diabetics.

K^+ channels play an important role in many physiological events, such as muscle contraction, release of neurotransmitters and hormones, and cell proliferation. Thus, dysfunction of K^+ channels leads to serious consequences. Dr. Ohya examined dysfunction of K^+ channels and related disease. He revealed that ERG,

BK β_{2b} , and K_{Ca}3.1 are causally related to imminent abortion, type 2 diabetes, delayed type hypersensitivity, and benign prostatic hyperplasia.

As summarized above, each member achieved impressive products respectively. I would like to greatly appreciate to them to accumulate new knowledge about K⁺ regulation. I also appreciate to the Salt Science Research Foundation to support this project and grateful to kind advices from the Salt Science Research Foundation Research Opinion Committee: Emeritus Professor Imai, Professor Okada, and Professor Hishida; it was helpful to lead this project to the right direction.

プロジェクト助成研究報告書 (医学)
Project Research Report (Medical Science)

平成24年3月
March, 2012

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団
The Salt Science Research Foundation

〒106-0032 東京都港区六本木7-15-14 塩業ビル
Engyo Bldg. 7-15-14 Roppongi, Minatoku, Tokyo 106-0032, Japan

Tel. 03-3497-5711 Fax. 03-3497-5712
URL <http://www.saltscience.or.jp>

I S B N 9 7 8 - 4 - 9 0 2 1 9 2 - 3 1 - 5