

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2008年 3月 10日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 姚 建 
所属機関名： 山梨大学医学部
所属部署： 医学部・分子情報伝達学講座 職名： 准教授
所在地： 山梨県中央市下河東1110
電話： 055-273-8074 内線： _____

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

薬物性腎障害におけるギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションの役割

3. 成果の概要（100字程度）

薬物性腎組織傷害とその修復には、様々なメディエーターや接着分子を介した複雑な細胞間相互作用が寄与することが知られている。今回、我々は培養細胞モデルにおいて、aminoglycosidesが引き起こした腎尿細管細胞毒性におけるギャップ結合の役割について検討した。研究の結果から、ギャップ結合がaminoglycosidesによる腎尿細管上皮細胞傷害において極めて重要な役割を担うということが初めて示唆された。

※発表論文等

1. 姚 建、北村 正敬：Connexin43、腎と透析（特集：これだけは知っておきたい分子腎臓学）、63(4)、11-14、2007 (review)
2. Yao J, Zhu Y, Morioka T, Oite T, Kitamura M: Pathophysiological roles of gap junction in glomerular mesangial cells. J Membr Biol 217:123-130, 2007
3. Yao J, Zhu Y, Sun W, Sawada N, Hiramatsu N, Takeda M, and Kitamura M: Irsgladine maleate potentiates the effects of nitric oxide on activation of cAMP signaling pathways and suppression of mesangial cell mitogenesis. Br J Pharmacol 151:457-466, 2007
4. Wan Yi-gang, Sun W, Zhang J, Li M, Ruan J, Wang Y, Shimizu F: Nephritic model induced by anti-Thy-1 monoclonal antibody and its application to study on Chinese materia medica. China Journal of Chinese Materia Medica 32(6):461-465, 2007

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 姚 建 職名： 准教授
所属機関： 山梨大学 部署： 医学部・分子情報伝達学講座
中国側研究者氏名： 万毅剛 職名： 副主任醫師
所属機関： 南京大学医学院 部署： 鼓楼病院・漢方医学科

薬物性腎傷害におけるギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションの役割—

日本側研究代表者	姚 建
日 本 研 究 機 関	山梨大学医学部准教授
中国側研究代表者	万毅剛
中 国 研 究 機 関	南京大学医学院副教授

要旨：

薬物性腎組織傷害とその修復には、様々なメディエーターや接着分子を介した複雑な細胞間相互作用が寄与することが知られている。しかし、隣接する腎細胞でシグナル分子の直接的なやり取りを司るギャップ結合の役割は、まだ十分に解明されていない。今回、我々は培養細胞モデルにおいて、aminoglycosidesが引き起こした腎尿細管細胞毒性におけるギャップ結合の役割について検討した。2種類の腎尿細管上皮細胞株、NRK52EおよびLLC-PK1は、全く異なるギャップ結合の機能を有していた。NRK52E細胞にはギャップ結合構成蛋白であるconnexin43 (Cx43)が高発現し、正常な細胞間コミュニケーションが認められた。他方、LLC-PK1細胞では、Cx43が発現しておらず、ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションが認められなかった。Aminoglycoside系の抗生物質G418およびhygromycinによる細胞傷害は、LLC-PK1細胞に比して、正常なギャップ結合能を持つNRK52E細胞では、より高度に引き起された。この現象は、ギャップ結合阻害によって有意に抑制された。LLC-PK1細胞にCx43を強制発現させると、薬剤による細胞傷害が増強した。以上の結果から、ギャップ結合がaminoglycosidesによる腎尿細管上皮細胞傷害において極めて重要な役割を担うということが示唆された。

Key Words 薬物性腎傷害, ギャップ結合, 細胞間コミュニケーション, 尿細管上皮細胞, コネクシン43

緒言：

薬剤の代謝、排泄、再吸収には腎臓が重要な役割を担っている。治療薬として利用されている薬剤の幾つかは、三大薬物性臓器障害のひとつである腎障害を引き起す事が知られている。特に、抗生物質投与による急性尿細管壊死は薬物死亡者数の4分の1に相当する。近年、欧米をはじめとする世界各国で使用される“アリストロキア酸含有中医薬”が、腎不全や癌を引き起こすことから社会問題となっているが、その作用機序は十分に解明されてはおらず、有効な治療方法も制限されている。

薬物性腎組織障害とその修復には、様々なメディエーターや接着分子を介した複雑な細胞間相互作用が寄与することが知られている。しかし、隣接する細胞間でシグナル分子の直接的なやり取りを司るギャップ結合の腎組織障害における役割は、まだ十分に解明されていない。ギャップ結合は細胞間結合様式の一つであり、細胞膜に形成されることで、細胞間シグナル伝達に直接関与している。ギャップ結合を構成する半チャンネルをコネクソンといい、コネクソンはコネキシン蛋白によって構成されている。ギャップ結合の機能としては分子量 1.2kDa 以下の細胞内シグナル伝達物質を隣接する細胞へ直接輸送することが可能で、細胞の分化・増殖を制御し、ホメオスタシスを維持している[1-3]。最近、腫瘍細胞において、コネキシン蛋白の発現減少ならびにギャップ結合の機能低下が、薬剤耐性獲得に寄与することが報告された[4]。さらに、腫瘍細胞において発現が低下したコネキシン分子を遺伝子導入することで、人為的にギャップ結合を形成させ、一部の細胞に抗癌剤を投与するのみで、その効果を腫瘍細胞集団全体に行き渡らせるという新しい治療戦略、bystander Effect (傍観者効果)が注目されてきている[5]。これらの事実から、薬剤投与

による細胞死においてギャップ結合が重要な役割を担うことが示唆され、薬物性腎尿細管傷害においてもギャップ結合が関与している可能性は高い。そこで、本研究では腎障害を引き起こす薬物がギャップ結合を通じて、広範囲に細胞傷害を及ぼすとの仮説を立て、薬物による急性尿細管壊死発症におけるギャップ結合の果たす役割を培養細胞モデルで検討した。

方法：

1) 細胞培養

ラット腎尿細管上皮細胞株NRK52E細胞(以下NRK細胞)およびブタ腎尿細管上皮細胞株LLC-PK1は、5% fetal bovine serum (FBS)を含むD-MEM/F-12培地を用いて培養した。

2) ギャップ結合機能の測定 (Dye transfer assay)

腎尿細管上皮細胞を培養し、マイクロインジェクションした蛍光色素 (Lucifer Yellow) の隣接細胞への拡散により、機能的ギャップ結合の有無を評価した[6]。

3) 細胞傷害の測定

薬剤投与による細胞傷害はCell Counting Kit-8(同仁化学)を用いて評価した。細胞内脱水素酵素により生成される、水溶性ホルマザンの450 nmの吸光度を直接測定することにより、生細胞数を測定した。

4) Western blotting 法

培養細胞の蛋白を抽出し、SDS・PAGEにて分離し、PVDF membraneへ転写した後、一次、二次抗体を反応させ、化学発光法を用いて検出した[6]。

5) 免疫蛍光染色

培養細胞におけるコネクシン43 (Cx43) の局在を蛍光抗体法により検索した[6]。

6) LLC-PK1へのCx43遺伝子の導入

LLC-PK1細胞にリポフェクションにてCx43遺伝子を導入し、G418選択によりCx43発現細胞株を制作した。

結果：

1) 尿細管細胞におけるギャップ結合構成蛋白の発現と機能

Dye transfer assayにより、NRK細胞、LLC-PK1細胞における機能的なギャップ結合の有無を検討した。1つのNRK細胞およびLLC-PK1細胞に蛍光色素Lucifer Yellow (LY) を注入し蛍光色素の周囲の細胞への拡散を観察した。(図1A)。また、ギャップ結合構成蛋白であるCx43がNRK細胞において存在することを、蛍光抗体法を用いて明らかにした。他方、もう一つの腎尿細管由来の細胞であるLLC-PK1細胞では、Cx43は存在せず、機能的なギャップ結合も認められなかった。

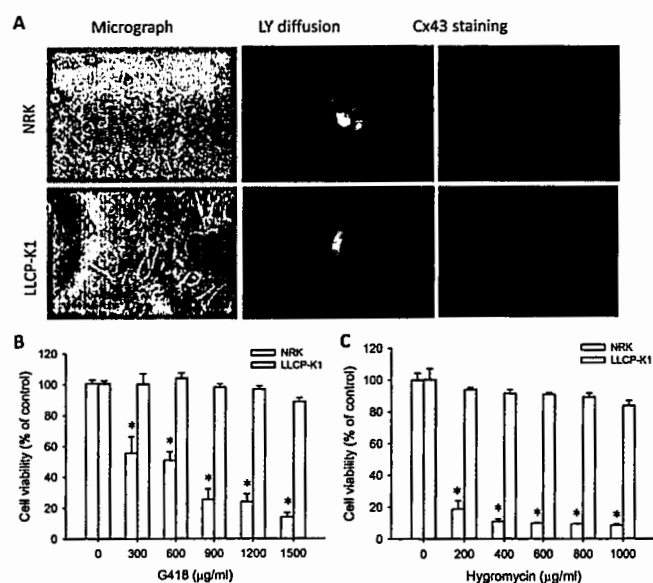


Figure 1. Differences between NRK and LLC-PK1 cells in gap junctional intercellular communication and in response to drug-induced lethality. (A) Micrographic analysis of dye coupled cells and immunofluorescent staining of Cx43. NRK and LLC-PK1 cells were confluent cultured. Lucifer Yellow (LY) was pressure-injected into a single cell (arrow). Diffusion of LY into adjacent cells was recorded. Magnification, X320. Expression of Cx43 was evaluated by staining the cells with an anti-Cx43 antibody. Magnification, X400. (B and C) NRK or LLC-PK1 cells in confluent culture in 96-well plates were exposed to various concentrations of G418 or hygromycin for 48 h. The cell viability was evaluated by cell counting kit. Data are expressed as percentage of living cells against the untreated control. *P<0.01 versus LLC-PK1 cells treated with respective G418 and untreated control.

2) 尿細管細胞に対する抗生物質の毒性作用

培養腎尿細管上皮細胞に細胞毒性を誘導する抗生物質 G418 および hygromycin を添加し、48 時間後、Cell Counting Kit-8 を用い、生細胞数を測定した。図 1 B に示すように、NRK 細胞において、G418 および hygromycin の濃度依存的に生細胞数が減少した。しかし、LLC-PK1 細胞は、NRK 細胞において顕著な傷害を引き起す濃度の G418 ならびに hygromycin を添加した場合においても、有意な生細胞数の低下は認められなかった。これらの結果から、NRK 細胞と LLC-PK1 細胞の特徴的な性質の違いである Cx43 の発現、すなわち機能的ギャップ結合の有無が薬剤による細胞傷害に関与する可能性を考え、さらに検討を行なう事とした。

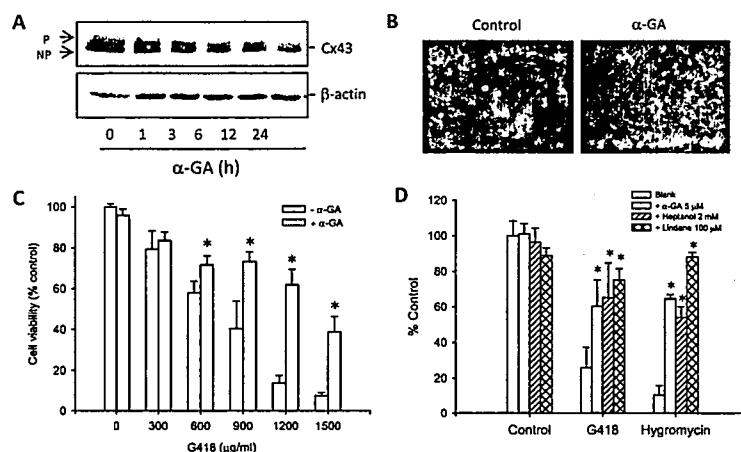


Figure 2. Implication of gap junction (GJ) in propagation and amplification of drug-elicited cytotoxicity. (A and B) Decreased expression of Cx43 by α -GA. (A) NRK cells were treated with α -GA (5 μ M) for the indicated times and cell proteins were extracted and subjected to Western blot analysis by using an anti-Cx43 antibody. Equal loading of protein per lane was verified by reprobing the blot with an anti- α -actin antibody. (B) NRK cells were exposed to α -GA (5 μ M) for 24 h. The cellular expression of Cx43 was evaluated by immunofluorescent staining. Magnification, X200. (C) Attenuation of drug-elicited cytotoxicity in NRK cells by α -GA. NRK cells in confluent culture were exposed to various concentrations of G418 with or without α -GA (5 μ M) for 48 h. (D) Different GJ inhibitors on G418-elicited cytotoxicity. NRK cells were exposed to 1200 μ g/ml G418 or 200 μ g/ml hygromycin in the presence or absence of α -GA (5 μ M), heptanol (2 mM) or lindane (100 μ M) for 48 h. The cytotoxicity was evaluated by using cell counting kit. Data are expressed as percentage of survival cells against untreated control.

3) ギャップ結合機能の阻害による細胞毒性反応の抑制

薬物による細胞毒性におけるギャップ結合の機能を調べるため、ギャップ結合阻害剤 18 α -glycyrrhetic acid (α -GA) を NRK 細胞に添加し、細胞の変化を観察した。はじめに α -GA のギャップ結合阻害能を確認するため、 α -GA 処理を行ったところ、NRK 細胞の細胞間コミュニケーションが速やかに阻害され、色素の拡散が有意に抑制された (data not shown)。次に 24 時間 α -GA 処理後、NRK 細胞におけるコネクシン 43 の発現レベルが顕著に抑制されることを細胞染色および western blot 法を用いて明らかにした (図 2 A, B)。また、 α -GA 存在下では、G418 による細胞毒性が有意に抑制された。他のギャップ結合阻害剤を用いても同様の結果が得られた (図 2 C, D)。

4) LLC-PK1 細胞における Cx43 遺伝子導入による薬物反応性の変化

Aminoglycoside に起因する細胞傷害において、ギャップ結合の機能をさらに検討するため、ギャップ結合を欠損する LLC-PK1 細胞に Cx43 を遺伝子導入し、薬物毒性に対する細胞

反応の変化を観察した。Cx43 を遺伝子導入した LLC-PK1 細胞では細胞を白く縁取る Cx43 fusion 蛋白の局在が見られた (図 3 A)。また Cx43 を導入した細胞を hygromycin で刺激すると、control 細胞に比べ、高い

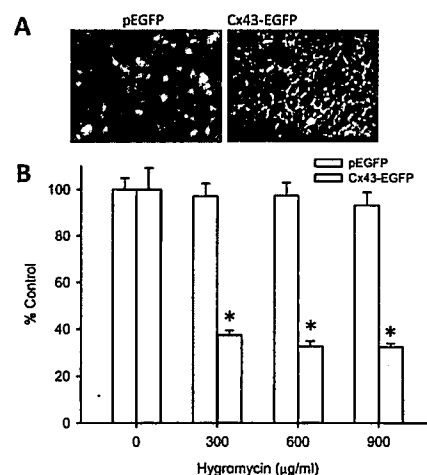


Figure 3. Permanent transfection of LLC-PK1 cells with wild-type Cx43 on hygromycin-elicited cytotoxicity. LLC-PK1 cells were transfected with a vector encoding GFP protein (pEGFP) or Cx43 (Cx43-EGFP) and clones expressing high level of GFP and Cx43 was selected (A), and analyzed for cell response to hygromycin (B). The expression of GFP and Cx43 was shown in A. Note the liner distribution of Cx43-GFP at the regions of cell-to-cell contacts. Magnification, X400. * $P < 0.01$ versus respective control.

細胞傷害性を示した(図3B)。以上の結果から、ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションは抗生物質による腎上皮細胞傷害に深く関与することが示唆された。

5) アリストロキア酸誘導尿細管細胞死におけるギャップ結合の役割

中薬に含まれるアリストロキア酸は尿細管細胞死を引き起こすことが知られている。この尿細管細胞死におけるギャップ結合の役割を明らかにするため、先の実験と同様にギャップ結合阻害剤処理、Cx43の遺伝子導入実験を行い、アリストロキア酸に対する反応の変化を観察した。ギャップ結合阻害剤a-GA処理では、NRK細胞において、アリストロキア酸の毒性反応に対する有意な変化は認められなかった。同様にLLC-PK1細胞にCx43を遺伝子導入しても、アリストロキア酸による細胞毒性反応は対照群との差が見られなかった (data not shown)。

考察：

我々は、腎臓の近位尿細管上皮細胞由来NRK-52EとLLC-PK1細胞株を用いて、細胞傷害におけるギャップ結合の関与を検討した。ギャップ結合を介する細胞間コミュニケーションが密な細胞では、aminoglycosideによる細胞傷害がより顕著であった。また、ギャップ結合の機能を阻害することで、aminoglycosideによる細胞毒性が抑制された。以上の結果から、ギャップ結合は抗生物質による細胞傷害に深く関与していることが初めて示唆された。

薬物性腎傷害におけるギャップ結合の作用機構は未だ解明されていないが、いくつかの可能性が考えられる。1) 腎傷害を起こす薬物の分子量は1.2 kDa以下であることが多く、ギャップ結合を介して細胞間を広範囲に拡散することが可能。2) ギャップ結合を介したbystander effectによって、細胞傷害性シグナルを隣接する細胞に伝達することが可能。また、ギャップ結合蛋白の発現は薬物耐性蛋白(multidrug resistant protein, MRD)との間に逆相関関係が最近報告され[7]、薬物耐性蛋白に対する調節作用も可能。ギャップ結合の機能を阻害すると、細胞間に薬物及び薬物傷害関連因子の拡散が抑えられ、その結果、細胞が薬物に対する耐性を高め、薬物による傷害が抑えられる。今回の実験で、なぜ漢方薬に含まれるアリストロキア酸による尿細管の細胞死ではギャップ結合による影響が観察されなかったのかは不明である。しかしこのことは、aminoglycosideにより引き起される尿細管傷害とアリストロキア酸によるものでは作用機序がことなることを示唆している。今後、この異なる作用機序についてさらに検討する必要がある。また、in vivo動物モデルを用いた薬物性腎傷害におけるギャップ結合の役割も検討したい。最後に、薬物性腎傷害の発症、進展および修復においてギャップ結合が果たす役割を解明することで、薬物性腎傷害に対する新規治療法の提案ならびに治療戦略の確立が可能であると考えている。

参考文献：

- [1] Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC: Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83 (4):1359-400 (2003).
- [2] Yao J, Zhu Y, Morioka T, Oite T, Kitamura M: Pathophysiological Roles of Gap Junction in Glomerular Mesangial cells. *J Membr Biol* 217 (1-3):123-30 (2007).
- [3] Kumar NM, Gilula NB: The gap junction communication channel. *Cell* 84 (3):381-8 (1996).
- [4] Mesnil M, Crespín S, Avanzo JL, Zaidan-Dagli ML: Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 1719 (1-2):125-45 (2005).
- [5] Little JB: Cellular radiation effects and the bystander response. *Mutat Res* 597 (1-2):113-8 (2006).

- [6] Yao J, Hiramatsu N, Zhu Y, Morioka T, Takeda M, Oite T, Kitamura M: Nitric oxide-mediated regulation of connexin43 expression and gap junctional intercellular communication in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 16 (1):58-67 (2005).
- [7] Sato H, Senba H, Virgona N, Fukumoto K, Ishida T, Hagiwara H, Negishi E, Ueno K, Yamasaki H, Yano T: Connexin 32 potentiates vinblastine-induced cytotoxicity in renal cell carcinoma cells. *Mol Carcinog* 46 (3):215-24 (2007).

注： 本研究は、2007年12月14日「第30回日本分子生物学会」にて口演発表。