

論文内容の要旨

Interleukin-1 β suppresses activity of exogenously transfected ROMK1 K⁺ channel in cultured mouse CCD cells via PKC and CaMKII pathways

(インターロイキン-1 β は培養マウス集合管細胞に遺伝子導入したヒト ROMK1 K⁺チャネル活性を PKC 及び CaMKII を介する経路で抑制する)

(林光, 中村一芳, 真柳平, 鈴木享, 祖父江憲治, 久保川学)

(岩手医学雑誌 69 巻, 4 号 平成 29 年 10 月掲載)

I. 研究目的

腎髄質外層からクローニングされた ROMK1 K⁺チャネルは集合管主細胞管腔側に存在する尿細管腔への主な K⁺分泌路のひとつである。炎症性サイトカインの腎集合管チャネル・輸送体発現に対する抑制的な影響としてマウス腎集合管細胞へ IL-1 β 投与 12 時間後 ROMK1 K⁺チャネル, ENaC, Na⁺-K⁺ATPase の mRNA 発現が各々減少したとの報告がある。一方, サイトカイン IL-1 β が腎臓に存在する K⁺チャネル活性へ及ぼす影響として, ヒト近位尿細管細胞内向き整流性 K⁺チャネル活性を急激に抑制したとの報告がある。腎集合管 ROMK1 K⁺チャネル活性に抑制的に作用する因子として, これまでアラキドン酸, PKC, CaMK II が知られているが, ROMK1 K⁺チャネル活性に対する炎症性サイトカインの影響については未だ不明である。本研究ではサイトカインである IL-1 β が培養マウス腎集合管細胞である (M-1 細胞) へ遺伝子導入したヒト ROMK1 K⁺チャネル活性に及ぼす影響とその機序を明らかにする。

II. 研究対象ならび方法

はじめに, PCR 法にて M-1 細胞における炎症性サイトカイン IL-1 β 受容体である IL-1R1 及び native な ROMK1 K⁺チャネルの mRNA 発現の有無を調べた。次にヒト ROMK1 遺伝子を導入した M-1 細胞を用いて IL-1 β の ROMK1 K⁺チャネル活性に対する影響についてパッチクランプ法を用いて検討した。IL-1 β 投与後の M-1 細胞内 Ca²⁺濃度変化について Fura-2AM を用いて検討を行った。さらに, IL-1 β によるチャネル抑制効果発現におけるシグナル伝達経路に関する検討を行った。

III. 研究結果

1. M-1 細胞に IL-1R1 の mRNA が発現していること, native な ROMK1 K⁺チャネルの発現がないことを確認した.
2. IL-1 β 投与後, M-1 細胞に遺伝子導入したヒト ROMK1 K⁺チャネル活性は急激に低下し, この反応は IL-1 β 受容体拮抗薬である IL-1Ra 前投与にて抑制された.
3. IL-1 β 投与後, M-1 細胞の細胞内 Ca²⁺濃度は一過性に上昇した.
4. PKC 阻害薬である GF109203X 前投与, CaMKII 阻害薬である KN62 の前投与にて IL-1 β による ROMK1 K⁺チャネル活性低下は各々阻害された. 阻害薬単独投与時に M-1 細胞の Ca²⁺濃度は各々変化せず, 続けて投与した IL-1 β により細胞内 Ca²⁺濃度は一過性に上昇した.
5. PLC 阻害薬である neomycin 前投与にて IL-1 β による ROMK1 K⁺チャネル活性低下は阻害された. neomycin 単独投与と続く IL-1 β 投与にて M-1 細胞内 Ca²⁺濃度は変化しなかった.
6. 細胞外液の Ca²⁺を除いた場合にも IL-1 β 投与による ROMK1 K⁺チャネル活性は抑制され, M-1 細胞の細胞内 Ca²⁺濃度は一過性に上昇した. 細胞外 Ca²⁺除去に加えて Ca²⁺-ATPase 阻害剤である thapsigargin 前投与にて細胞内ストア Ca²⁺を除去すると, IL-1 β 投与にて ROMK1 K⁺チャネル活性は変化せず, 細胞内 Ca²⁺濃度は変化しなかった.

IV. 結 語

炎症性サイトカインである IL-1 β は培養マウス腎集合管細胞(M-1 細胞)へ遺伝子導入したヒト ROMK1 K⁺チャネル活性を急激に低下させる. その機序として IL-1 受容体, PIP₂-IP₃系を介した store 由来細胞内 Ca²⁺濃度上昇とそれに続く Ca²⁺依存性 PKC/CaMKII 経路が関与していると考えられた.

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 特任教授 前沢 千早 (医歯薬総合研究所腫瘍生物学研究部門)

副査 教授 齋野 朝幸 (解剖学講座細胞生物学分野)

副査 講師 近藤 ゆき子 (薬理学講座情報伝達医学分野)

本研究は、代表的な炎症性サイトカインである IL-1 β が、マウス腎集合管細胞株 (M-1 細胞) へ遺伝子導入した ROMK1 K⁺チャネルの活性に及ぼす影響とその機序についてパッチクランプ法と蛍光 Ca²⁺イメージング法を用いて検討したものである。

ROMK1 K⁺チャネルは腎集合管主細胞に存在する主な K⁺分泌路であり、様々な炎症性サイトカインの影響を受けることが知られている。本研究において、IL-1 β がM-1細胞へ遺伝子導入したヒトROMK1 K⁺チャネル活性を、IL-1受容体を介した反応で急激に低下させること、その機序としてIL-1受容体、PIP2-IP3系を介したstore由来細胞内Ca²⁺濃度上昇とそれに続くCa²⁺依存性PKC/CaMKII経路が関与していることがはじめて明らかにされた。

試験・試問の結果の要旨

炎症性サイトカイン IL-1 β とそのシグナル伝達経路、ROMK1 K⁺チャネルの特性について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した。

参考論文

- 1) 腫瘍壊死因子- α によるヒト近位尿細管細胞内Ca²⁺濃度上昇のメカニズム検討(内藤雪枝, 他2名と共著).
岩手医誌, 68巻, 5号 (2016)
- 2) Proinflammatory cytokines and potassium channels in the kidney (中村一芳, 他1名と共著).
Mediators of Inflammation, Article ID 362768 P8 (2015)