
総説

細胞内クロライドイオンによる癌細胞機能制御メカニズム

宮崎 裕明*

京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学

Cytosolic Cl⁻ Regulates Fundamental Functions in Cancer Cells

Hiroaki Miyazaki

Department of Molecular Cell Physiology,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

抄録

一般に、Na⁺、K⁺やCa²⁺といった陽イオンの細胞内濃度変化は、神経興奮、神経伝達物質の放出、筋の興奮・収縮など様々な細胞機能に重要な役割を果たしていることが知られている。一方、陰イオンの細胞内における生理的な役割については、ほとんど着目されていなかった。しかし、細胞内の主要な陰イオンであるCl⁻は、生理的な条件下でも変化していることが明らかになっており、何らかの生理機能を有していることが想定されていた。そこで我々は、細胞内に最も多く存在する陰イオンであるCl⁻に着目し、細胞内Cl⁻が細胞機能に与える影響について検討を行っている。その結果、様々な細胞機能制御に細胞内Cl⁻が関与している事が明らかになった。本稿では、これまでに我々が明らかにした細胞内Cl⁻の生理機能のうち、細胞内Cl⁻が癌細胞の増殖、細胞接着や細胞運動能に与える影響について紹介する。

キーワード：細胞内Cl⁻濃度，細胞周期進行制御，細胞増殖，細胞接着。

Abstract

In general, it is known that changes in intracellular concentrations of cations such as Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ play an important role in various cellular functions such as neuronal excitation, release of neurotransmitters, and contraction of muscles. On the other hand, little attention has been paid to the physiological role of anions in cells. Recently, it has been clarified that intracellular concentration of Cl⁻, which is the most abundant anion in the cell, is changing even under physiological conditions. However, physiological roles of intracellular Cl⁻ remain unclear. Therefore, we focus on physiological functions of the intracellular Cl⁻ and we attempt to investigate the influence of intracellular Cl⁻ on cellular function. As a result, it became clear that intracellular Cl⁻ is involved in regulation of various cellular functions. In this review, we introduce our recent studies about effects of intracellular Cl⁻ on cancer cell proliferation and cell adhesion.

平成30年1月25日受付 平成30年2月8日受理

*連絡先 宮崎裕明 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上路梶井町465番地
hmiyazak@koto.kpu-m.ac.jp

Key Words: Intracellular Cl^- concentration, Cell cycle regulation, Cell proliferation, Cell adhesion.

はじめに

体液中の主要な電解質は、ナトリウムイオン (Na^+) とクロライドイオン (Cl^-) であり、それらと共に少量のカリウムイオン (K^+) や2価イオンであるカルシウムイオン (Ca^{2+})、マグネシウムイオン (Mg^{2+}) などが含まれている。しかし、細胞内の電解質組成は細胞外液と大きく異なっている。細胞内では、 Na^+ と K^+ の濃度比が逆転しており、 Ca^{2+} はごくわずかしか含まれていない。細胞内外の Na^+ と K^+ 濃度差が、細胞の様々な生理活性を支える膜電位の発生や神経・筋肉の興奮性を生み出す要因となっている。また非常に低く抑えられている細胞内 Ca^{2+} 濃度

は、外部からの刺激に対する細胞内セカンドメッセンジャーとして Ca^{2+} が機能することに寄与している。また、 Ca^{2+} や Mg^{2+} は、酵素活性の維持にも関与している。このように、陽イオンには様々な生理的役割を果たしていることが知られている。一方、陰イオンの細胞内における生理的役割については、ほとんど着目されていなかった。そこで我々は、細胞内に最も多く存在する陰イオンである Cl^- に着目し、細胞内 Cl^- が細胞機能に与える影響について検討を行っている。近年の我々の研究結果から、低浸透圧刺激によって引き起こされる調節性細胞容積減少時に細胞内 Cl^- 濃度が低下すること¹⁾、その Cl^- 濃度減少が腎遠位尿管細胞における経上皮

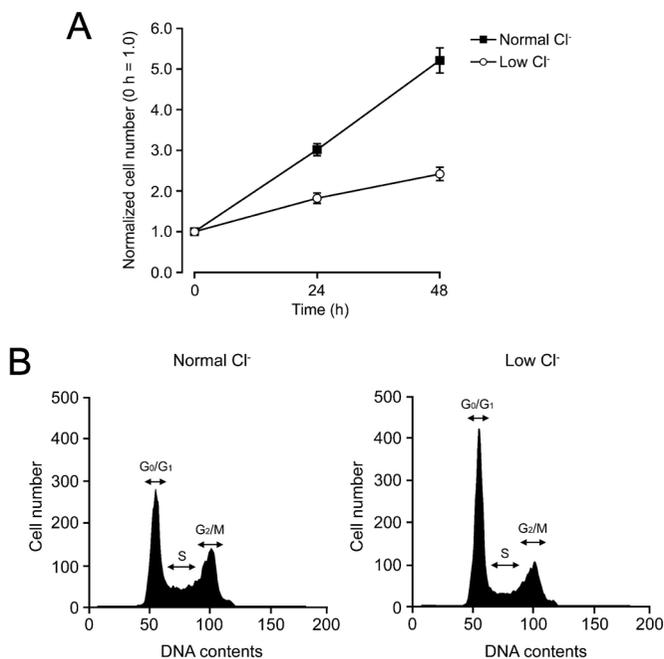


図1

A) 通常培地 (Normal Cl^- : Cl^- 121.8 mM) と低 Cl^- 培地 (Low Cl^- : Cl^- 6.1 mM) 中において MKN28 細胞を培養した際の 48 時間までの細胞数変化

B) 通常培地 (Normal Cl^-) と低 Cl^- (Low Cl^-) 培地中において MKN28 細胞を 48 時間培養した際の核内 DNA 量のヒストグラム (細胞周期解析結果) (文献9) より転載)

Na⁺輸送を制御すること²⁾³⁾が明らかになった。また神経細胞では、Cl⁻輸送体の局所的発現による細胞内Cl⁻濃度勾配形成が微小管の重合を制御することで神経突起伸長に重要な役割を果たしていた⁴⁾⁷⁾。以上のように、細胞内Cl⁻は様々な細胞の生理機能に対する細胞内シグナルとして重要な働きをしていると考えられる。また、近年、Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体などCl⁻輸送体の活性・発現が癌の悪性度に伴って変化することが示されたことから⁸⁾、Cl⁻輸送体の発現・活性調節を介した細胞内Cl⁻濃度変化が、細胞増殖の調節シグナルとして機能している可能性が強く示唆されている。そこで我々は、細胞内Cl⁻が癌細胞の増殖、細胞接着や細胞運動能に対する影響について検討を行った。本稿では、その詳細について紹介する。

細胞内Cl⁻による細胞周期・増殖の制御

細胞内Cl⁻が癌細胞の増殖に関与するかを検討するため、人為的に細胞内Cl⁻濃度を低下さ

せた状態を作りだし、細胞増殖に対する影響を確認した。胃癌由来細胞株であるMKN28を、Cl⁻をNO₃⁻で置換し細胞内Cl⁻濃度を低下させた培地 (Low Cl⁻: 6.1 mM) 中で48時間培養し、細胞内Cl⁻濃度を強制的に低下させると、細胞増殖は通常の培地 (Normal Cl⁻: 121.8 mM) で培養した細胞に比べて抑制された (図1A)。また、フローサイトメーターの測定結果から得られたヒストグラムから、低Cl⁻環境下 (Low Cl⁻) で培養を行った細胞では、通常の培地 (Normal Cl⁻) で培養した細胞に比べ、細胞周期のG1期に存在する細胞が増加していることが明らかになった (図1B)。以上のことから、低Cl⁻濃度環境下では、細胞周期のG1期からS期の進行が遅延を受けている可能性が示唆された。G1-S期の進行は主にp53-pRbカスケードにより調節を受けていることが知られている (図2A)。そこで、低Cl⁻環境下で培養したMKN28細胞においてp53-pRbカスケードに関与する調節因子の発現および活性について変化が起きているかについて

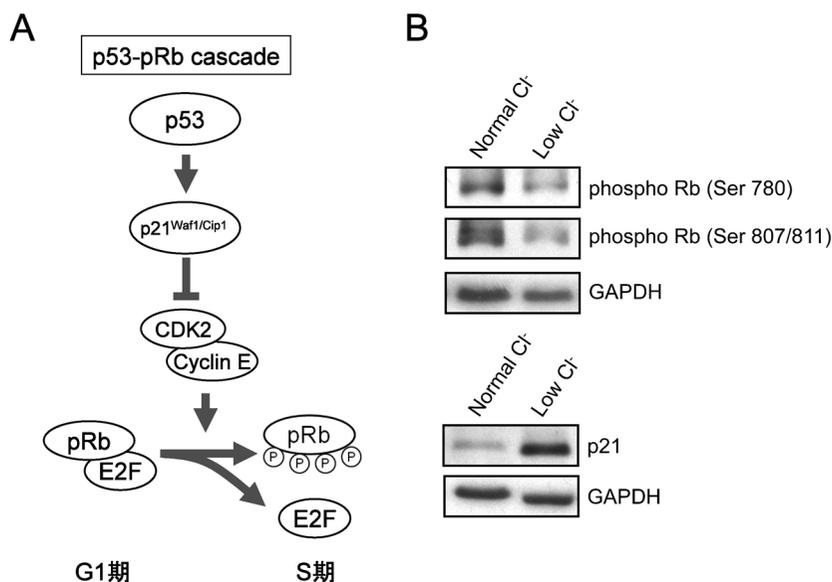


図2

A) G1期からS期への細胞周期進行をコントロールするp53-pRbシグナルカスケード

B) 通常培地 (Normal Cl⁻) と低Cl⁻ (Low Cl⁻) 培地中においてMKN28細胞を48時間培養した際の、Rbタンパクのリン酸化レベルおよびp21タンパクの発現レベル

検討を行った。まず、細胞周期のG1期からS期への進行に必須の転写因子E2Fの活性制御に関与しているpRbについて調べた。pRbはE2Fとの複合体を形成するが、pRbと結合しているE2Fは転写因子活性を持たない。pRbはリン酸化が亢進するとE2Fとの結合が弱まり、その結果E2Fが解離することで転写因子活性が回復し、S期への進行が亢進する(図2A)。MKN28を低Cl⁻環境下で培養を行うと、pRbのリン酸化レベルが有意に減少した(図2B)。次いで、CDKの活性抑制効果を介してpRbのリン酸化を抑制するp21の発現量を確認した。MKN28を低Cl⁻環境下で培養を行うと、p21の発現量は有意に増加した(図2B)。一般的に、p21の発現量はp53転写因子によって調節されることが知られているため、p53の発現レベルおよび活性化レベルにつ

いて検討を行った。低Cl⁻環境下においてMKN28におけるp53の発現量を確認したが、有意な変化は認められなかった。また、p53の活性化の指標となるSer 15残基のリン酸化についても検証を行ったが、低Cl⁻環境下において有意な変化は認められなかった。以上の結果から、細胞内Cl⁻はp53非依存的にp21の発現レベルを調節することで細胞増殖を制御している可能性が強く示唆された⁹⁾。

p53非依存的なp21の活性化に、MAPキナーゼ(MAPKs)の関与が示唆されていたことから¹⁰⁾、低Cl⁻環境がMAPKs(ERK, p38, JNK)の活性化に影響を与えるかについて検討を行った。低Cl⁻培地中で培養したMKN28細胞では、ERK, p38, JNKのすべてにおいてリン酸化レベルが亢進し、活性化が認められた。そこで、こ

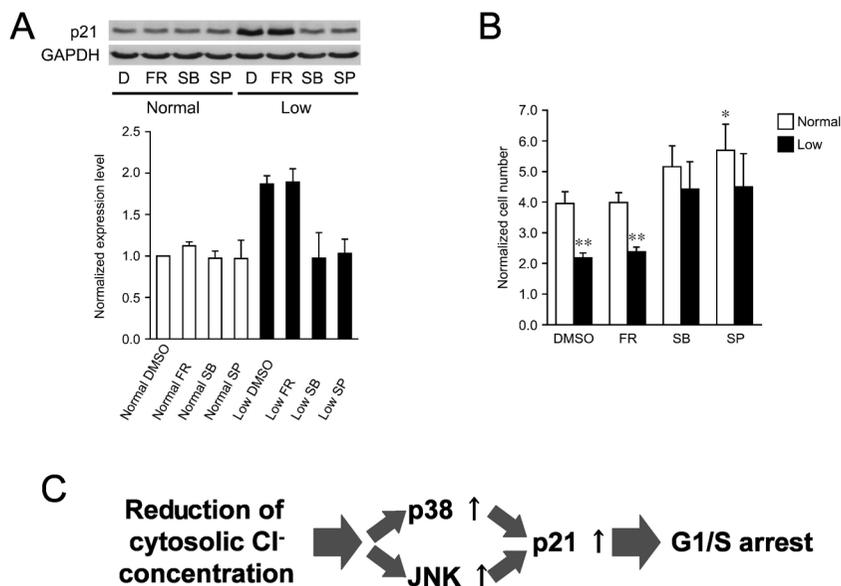


図3

- A) 通常培地 (Normal Cl⁻) と低Cl⁻ (Low Cl⁻) 培地中においてMKN28細胞を48時間培養した際のp21タンパク発現に対するMAPK阻害薬 (FR (FR180204: ERK inhibitor) (25 μM), SB (SB202980: p38 inhibitor) (10 μM), SP (SP600125: JNK inhibitor) (1 μM)) の影響 (文献11)より転載)
- B) 通常培地 (Normal Cl⁻) と低Cl⁻ (Low Cl⁻) 培地中においてMKN28細胞を48時間培養した際の細胞増殖 (細胞数) に対するMAPK阻害薬 (FR: ERK阻害薬, SB: p38阻害薬, SP: JNK阻害薬) の影響
- C) MKN28細胞における細胞内Cl⁻濃度低下時のG1期からS期にかけての細胞周期進行抑制メカニズム

の低Cl⁻環境によるMAPKsの活性化が、p21の発現亢進に参与しているかを検証するため、ERK, p38, JNKに特異的な阻害剤 (FR180204: ERK inhibitor (25 μM), SB202980: p38 inhibitor (10 μM), SP600125: JNK inhibitor (1 μM)) をMKN28細胞に投与した後、低Cl⁻環境下で培養を行い、p21の発現レベルに対する影響を確認した。その結果、p38とJNK阻害剤を処理したMKN28細胞では、低Cl⁻環境下におけるp21の発現亢進 (図3A) や細胞増殖抑制効果がほぼ消失した (図3B)。以上の結果から、細胞内Cl⁻の低下は、p38あるいはJNKの活性化を介してp21の発現レベルを上昇させることで細胞増殖を抑制している可能性が示唆された (図3C)¹¹⁾。

細胞内Cl⁻による癌細胞接着因子発現調節および細胞運動への影響

一般に、癌細胞が原発巣にのみとどまっている早期癌においては、手術による切除および適切な抗癌剤の使用により徐々に治癒率は改善されつつある。ところが、癌細胞が原発巣から移動し、転移巣を形成したのちの治療は現在においても非常に困難を極める。しかし、なぜ原発巣から細胞が離脱し、転移先の組織において再接着するのか、細胞の接着能・浸潤能変化メカ

ニズムに関しては未だ不明な点が多く残っている。癌細胞においては、原発巣周辺では癌細胞の高い代謝活性により二酸化炭素分圧 (pCO₂) が高い状態となっていることが想定される、一方、癌の転移先として多くの報告がある肺では、肺胞上皮を介したガス交換によりpCO₂が低下する。ヒトの赤血球細胞では、クロライドシフトと呼ばれる現象が知られている。末梢組織の毛細血管においては、高いpCO₂により赤血球内では炭酸脱水酵素 (Carbonic anhydrase: CA) とAnion Exchanger (AE) の働きによりCl⁻が細胞内へ輸送される。しかし、肺胞ではpCO₂が低いため、その逆の反応が起こり、細胞内から細胞外へとCl⁻が交換輸送される。このように、赤血球では細胞内Cl⁻濃度が末梢組織中の毛細血管と肺胞の毛細血管中において細胞内のCl⁻濃度が逆方向に変化していると考えられる¹²⁾。癌細胞においても、原発巣周辺では癌細胞の高い代謝活性によりpCO₂が高く、転移巣では低い状態となっていることが想定されるため、原発巣と転移巣ではCl⁻濃度が逆に変化していると考えることが出来る (図4)。従って、原発巣と転移巣における細胞内Cl⁻濃度の変化が細胞の接着・脱接着を制御し癌転移を引き起こされている可能性が想定された。そこで細胞内Cl⁻濃度

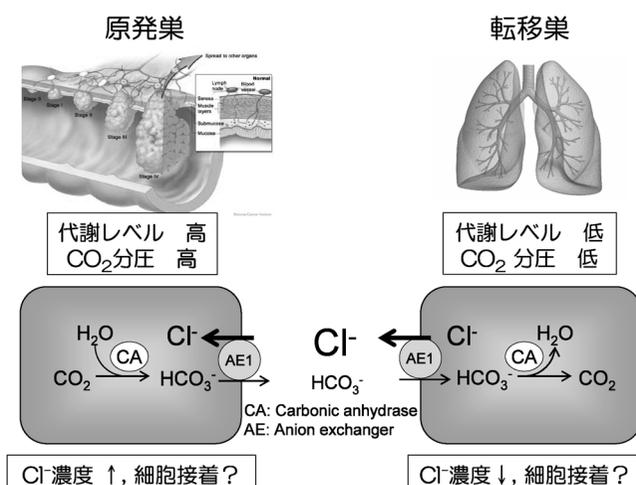


図4

癌細胞におけるクロライドシフト (CA: Carbonic anhydrase, AE: Anion Exchanger)

の変化が、細胞接着因子の発現に影響を与えるかについて検討を行った。

最初に、細胞内Cl⁻が癌転移に関わる細胞接着因子の発現や細胞の細胞外基質への接着能に与える影響について検討を行った。まず、上皮細胞に特異的に発現し、細胞間接着に関与しているE-cadherin¹³⁾の発現に与える影響について検討した。低Cl⁻培地で培養したMKN28細胞では、E-cadherinの発現が通常培地で培養した細胞よりも有意に減少していた。また、細胞内Cl⁻が細胞と細胞外基質との間の接着に関与しているintegrinの発現に与える影響についても検討を行った。その結果、コラーゲンへの結合に関わっている $\alpha 2$ -integrin¹⁴⁾の発現が、低Cl⁻培地で培養した細胞で減少した。また、コラーゲン type Iをコートしたプレートへの細胞の接着能

についても評価を行ったが、低Cl⁻培地中ではコラーゲンへの細胞接着能が有意に低下していた。以上のことから、細胞内のCl⁻濃度が変化することによって癌細胞の細胞間接着や細胞外基質との間の接着能に大きく影響を与えることが明らかになった。

では、細胞内Cl⁻濃度の変化は、どのように細胞に感受され、細胞増殖、細胞接着能や接着因子の発現を変化させているのだろうか。Srcチロシンキナーゼは、細胞増殖や細胞接着・運動などを制御するキーエンザイムとして機能しており¹⁵⁾、癌細胞では発現の亢進や活性化が起きている¹⁶⁾。そのため、SrcチロシンキナーゼをコードするSRC遺伝子は癌原遺伝子として、細胞の癌化に強く関与していることが知られている。そこで、細胞内Cl⁻がSrcチロシンキナーゼ

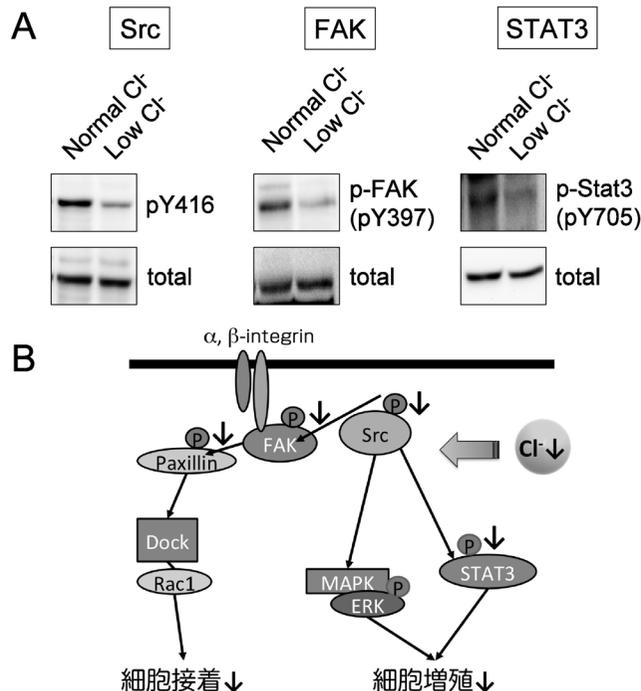


図5

- A) 通常培地 (Normal Cl⁻) と低Cl⁻ (Low Cl⁻) 培地中においてHT-29細胞を48時間培養した際の、Src, FAK, STAT3タンパクのリン酸化レベルに対する影響
- B) HT-29細胞における細胞内Cl⁻濃度低下時のSrcシグナルカスケードを介して細胞増殖・細胞接着に与える影響

の活性化に与える影響について、大腸癌由来細胞株であるHT-29細胞を用いて検討した。Srcチロシンキナーゼは自己リン酸化部位であるpY416のリン酸化によって活性化されることが知られている。このため、細胞内Cl⁻濃度の低下がpY416のリン酸化レベルに与える影響について検討を行った。低Cl⁻環境下で培養を行った細胞では、pY416のリン酸化レベルは有意に減少していた(図5)。また、Srcの細胞接着に対するシグナルカスケードの下流分子であるFAK¹⁷⁾のリン酸化レベルも減少していた(図5)。一方、Srcチロシンキナーゼの細胞増殖に対するシグナルカスケードの下流分子であるERKとSTAT-3¹⁸⁾¹⁹⁾についても検討を行った。ERKのリン酸化は細胞内Cl⁻濃度が減少しても変化しなかった。しかし、Srcチロシンキナーゼの下流分子で細胞増殖に関与するSTAT-3のリン酸化は有意に減少していた(図5A)。従って、細胞内Cl⁻はSrcチロシンキナーゼの活性を制御し、Srcシグナルカスケードを介して細胞増殖や細胞接着

に影響を与えている可能性が強く示唆された(図5B)。

おわりに

近年、イオン輸送体と細胞の癌化に関する複数の報告があるが、その作用機序についてはほとんど明らかになっていなかった。我々の研究の結果、細胞内Cl⁻濃度が細胞増殖や細胞接着を制御する因子のひとつであることが示唆された。このことから、細胞内Cl⁻濃度の調節因子として機能しているCl⁻チャネルやCl⁻輸送体が、細胞増殖や癌化に深く関わっていると考えられる。今後、細胞内イオン環境の制御というアプローチから癌の増殖や転移メカニズムのさらなる解明を目指すことにより、癌研究において新たな概念を構築するきっかけが得られるものと信じている。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) Miyazaki H, Shiozaki A, Niisato N, Marunaka Y. Physiological significance of hypotonicity-induced regulatory volume decrease: reduction in intracellular Cl⁻ concentration acting as an intracellular signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F1411-F1417.
- 2) Tanaka S, Miyazaki H, Shiozaki A, Ichikawa D, Otsuji E, Marunaka Y. Cytosolic Cl⁻ Affects the Anticancer Activity of Paclitaxel in the Gastric Cancer Cell Line, MKN28 Cell. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 42: 68-80.
- 3) Marunaka Y, Niisato N, Taruno A, Ohta M, Miyazaki H, Hosogi S, Nakajima K, Kusuzaki K, Ashihara E, Nishio K, Iwasaki Y, Nakahari T, Kubota T. Regulation of epithelial sodium transport via epithelial Na⁺ channel. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011: 978196.
- 4) Nakajima K, Miyazaki H, Niisato N, Marunaka Y. Essential role of NKCC1 in NGF-induced neurite outgrowth. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 359: 604-610.
- 5) Nakajima K, Niisato N, Marunaka Y. Quercetin stimulates NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells via activation of Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter. *Cell Physiol Biochem*. 2011; 28: 147-156.
- 6) Nakajima K, Niisato N, Marunaka Y. Enhancement of tubulin polymerization by Cl⁻-induced blockade of intrinsic GTPase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 425: 225-229.
- 7) Nakajima K, Marunaka Y. Intracellular chloride ion concentration in differentiating neuronal cell and its role in growing neurite. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 479: 338-342.
- 8) Shiozaki A, Miyazaki H, Niisato N, Nakahari T, Iwasaki Y, Itoi H, Ueda Y, Yamagishi H, Marunaka Y. Furosemide, a blocker of Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter, diminishes proliferation of poorly differentiated human gastric cancer cells by affecting G0/G1 state. *J Physiol Sci*. 2006; 56: 401-406.
- 9) Miyazaki H, Shiozaki A, Niisato N, Ohsawa R, Itoi H, Ueda Y, Otsuji E, Yamagishi H, Iwasaki Y, Nakano T, Nakahari T, Marunaka Y. Chloride ions control the G1/S cell-cycle checkpoint by regulating the expression of p21 through a p53-independent pathway in human

- gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 366: 506-512.
- 10) Lee AW, Nambirajan S, Moffat JG. CSF-1 activates MAPK-dependent and p53-independent pathways to induce growth arrest of hormone-dependent human breast cancer cells. *Oncogene.* 1999; 18: 7477-7494.
 - 11) Ohsawa R, Miyazaki H, Niisato N, Shiozaki A, Iwasaki Y, Otsuji E, Marunaka Y. Intracellular chloride regulates cell proliferation through the activation of stress-activated protein kinases in MKN28 human gastric cancer cells. *J Cell Physiol.* 2010; 223: 764-770.
 - 12) Hamasaki N, Okubo K. Band 3 protein: physiology, function and structure. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1996; 42: 1025-1039.
 - 13) Carvalho S, Reis CA, Pinho SS. Cadherins Glycans in Cancer: Sweet Players in a Bitter Process. *Trends Cancer.* 2016; 2: 519-531.
 - 14) Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresch DA. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol.* 2015; 25: 234-240.
 - 15) Aleshin A, Finn RS. SRC: a century of science brought to the clinic. *Neoplasia.* 2010; 12: 599-607.
 - 16) Varkaris A, Katsiampoura AD, Araujo JC, Gallick GE, Corn PG. Src signaling pathways in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2014; 33: 595-606.
 - 17) Kratimenos P, Koutroulis I, Marconi D, Syriopoulou V, Delivoria-Papadopoulos M, Chrousos GP, Theocharis S. Multi-targeted molecular therapeutic approach in aggressive neuroblastoma: the effect of Focal Adhesion Kinase-Src-Paxillin system. *Expert Opin Ther Targets.* 2014; 18: 1395-1406.
 - 18) Kim LC, Song L, Haura EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009; 6: 587-595.
 - 19) Niit M, Hoskin V, Carefoot E, Geletu M, Arulanandam R, Elliott B, Raptis L. Cell-cell and cell-matrix adhesion in survival and metastasis: Stat3 versus Akt. *Biomol Concepts.* 2015; 6: 383-399.

著者プロフィール



宮崎 裕明 Hiroaki Miyazaki

所属・職：京都府立医科大学医学研究科細胞生理学・准教授

略歴：1999年3月 東京大学大学院理学系研究科博士課程 修了

1999年4月 東京大学大学院理学系研究科 研究生

2000年4月 日本学術振興会 特別研究員 (PD)

2002年11月 京都府立医科大学医学部 助教 (細胞生理学)

2010年4月～2012年3月

Mount Desert Island Biological Laboratory 博士研究員

2012年10月 京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学 講師

2015年12月～現職

専門分野：細胞生理学, 比較生理学

- 主な業績：1. Tanaka S, Miyazaki H, Shiozaki A, Ichikawa D, Otsuji E, Marunaka Y. Cytosolic Cl⁻ affects the anticancer activity of paclitaxel in the gastric cancer cell line, MKN28 cell. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 42: 68-80.
2. Marunaka Y, Niisato N, Miyazaki H, Nakajima K, Taruno A, Sun H, Marunaka R, Okui M, Yamamoto T, Kanamura N, Kogiso H, Ikeuchi Y, Kashio M, Hosogi S, Nakahari T. Quercetin is a useful medicinal compound showing various actions including control of blood pressure, neurite elongation and epithelial ion transport. *Current Med Chem*. 2016; 23: 1-12.
3. Hayata H, Miyazaki H, Niisato N, Yokoyama N, Marunaka Y. Lowered extracellular pH is involved in the pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 445: 170-174.
4. Branicky R, Miyazaki H, Strange K, Schafer WR. The voltage-gated anion channels encoded by *clh-3* regulate egg laying in *C. elegans* by modulating motor neuron excitability. *J Neurosci*. 2014; 34: 764-775.
5. Kitagawa M, Niisato N, Shiozaki A, Ohta-Fujimoto M, Hosogi S, Miyazaki H, Ichikawa D, Otsuji E, Marunaka Y. A regulatory role of K⁺-Cl⁻ cotransporter in the cell cycle progression of breast cancer MDA-MB-231 cells. *Arch Biochem Biophys*. 2013; 539: 92-98.
6. Aoi W, Hosogi S, Niisato N, Yokoyama N, Hayata H, Miyazaki H, Kusuzaki K, Fukuda T, Fukui M, Nakamura N, Marunaka Y. Improvement of insulin resistance, blood pressure and interstitial pH in early developmental stage of insulin resistance in OLETF rats by intake of propolis extracts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 432: 650-653.
7. Hosogi S, Miyazaki H, Nakajima K, Ashihara E, Niisato N, Kusuzaki K, Marunaka Y. An inhibitor of Na⁺/H⁺ exchanger (NHE), ethyl-isopropyl amiloride (EIPA), diminishes proliferation of MKN28 human gastric cancer cells by decreasing the cytosolic Cl⁻ concentration via DIDS-sensitive pathways. *Cell Physiol Biochem* 2012; 30: 1241-1253.
8. Miyazaki H, Yamada T, Parton A, Morrison R, Kim S, Beth AH, Strange K. CLC anion channel regulatory phosphorylation and conserved signal transduction domains. *Biophys J*. 2012; 103: 1706-1718.
9. Miyazaki H, Strange K. Differential regulation of a CLC anion channel by SPAK kinase ortholog mediated multisite phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012; 302: C1702-C1712.
10. Falin RA, Miyazaki H, Strange K. *C. elegans* STK39/SPAK ortholog mediated inhibition of CLC anion channel activity is regulated by WNK independent ERK kinase signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011; 300: C624-635.
11. Miyazaki H, Shiozaki A, Niisato N, Ohsawa R, Itoi H, Ueda Y, Yamagishi H, Iwasaki Y, Nakano T, Nakahari T, Marunaka Y. Chloride ions control the G1/S cell-cycle checkpoint by regulating the expression of p21 through a p53-independent pathway in human gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 366: 506-512.
12. Miyazaki H, Shiozaki A, Niisato N, Marunaka Y. Physiological significance of hypotonicity-induced regulatory volume decrease: reduction in intracellular Cl⁻ concentration acting as an intracellular signaling. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292: F1411-F1417.

