

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590303

研究課題名（和文） 粘膜上皮の重炭酸イオン・炭酸ガス輸送の障害による疾病の分子病態と治療法の研究

研究課題名（英文） Pathophysiology of mucosal lesion caused by defects of epithelial HCO_3^- - CO_2 transport

研究代表者

近藤 孝晴 (KONDO TAKAHARU)

名古屋大学・総合保健体育科学センター・教授

研究者番号：20135388

研究成果の概要：

最も重要な消化液である膵液はアルカリ性（pHが8以上）であり、アルカリ性の本体である重炭酸イオン（ HCO_3^- ）は膵管の上皮細胞から分泌される。小動物の膵管を用いて、粘膜上皮の HCO_3^- 輸送機構を解析した。CFTRとSLC26A6という二つの分子が、 HCO_3^- 輸送に中心的な役割を果たしていることがわかった。ヒトのように特にアルカリ性の強い膵液の分泌では、CFTRが HCO_3^- チャンネルとして働くことがわかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：粘膜上皮、膵管、重炭酸イオン、CFTR

1. 研究開始当初の背景

管腔臓器の粘膜防御機構は生命維持に不可欠である。粘膜防御機構は多くの因子からなるが、粘膜上皮細胞を介する重炭酸イオンと炭酸ガス（ HCO_3^- - CO_2 ）の輸送は、その中で最も基本的かつ重要な因子である。 HCO_3^- - CO_2 系は細胞内および細胞外（粘液内）のpH緩衝のほとんどを担い、 HCO_3^- 分泌（能動輸送）は水チャンネル（aquaporin: AQP）を介する水の輸送を引き起こす。これにより、粘液のpH、

水分含量が正常に保たれ、粘稠になりすぎることなく、繊毛運動や免疫機構が正常に働く。粘膜上皮膜の HCO_3^- 輸送が障害される代表的な疾病が嚢胞線維症（cystic fibrosis）である。CFTR（cystic fibrosis transmembrane conductance regulator）を原因遺伝子とし、白人に多い。CFTRは、上皮膜細胞の管腔膜に発現するcAMP依存性陰イオンチャンネルである。CFTR機能が低下すると、 HCO_3^- 分泌が障害されるため粘稠な液が管腔を閉塞し、膵外分泌機能低下、難治性呼吸器感染をはじめ多彩

な病態を引き起こす。粘膜上皮の HCO_3^- - CO_2 輸送が障害される病態は、cystic fibrosis 以外にも多い。難治性疾患である慢性膵炎とび慢性汎細気管支炎の発症機序にはいまだ不明な点が多いが、一部の患者では、CFTR 遺伝子変異/多型が発症に関与する。当研究室は、慢性膵炎患者の一部に CFTR 機能の低下（汗中 Cl^- 濃度の高値が高い）がみられ、CFTR の多型が発症に関与することを明らかにした。気管支喘息の発作時には、気道内液の pH が酸性に傾く。*Helicobacter pylori* 感染は十二指腸粘膜の HCO_3^- 分泌を抑制し、粘膜 pH が低下するので *Helicobacter pylori* の活動はさらに活発になる。本研究は、粘膜上皮の HCO_3^- - CO_2 輸送の障害と疾病との関連を解析し、新しい治療法を開発することを目的とする。 HCO_3^- - CO_2 輸送は、細胞生理学的な手法による解析が他のイオンに比べ難しいが、分子生物学的な解析の助けによって、CFTR 陰イオンチャンネル、SLC26 陰イオン交換輸送体、carbonic anhydrase が key molecule であり膜輸送複合体（トランスポートソーム）を形成していることがわかってきた。本研究では、各粘膜上皮の実験モデルおよび疾病モデルを用いて、 HCO_3^- - CO_2 輸送分子の機能異常と疾病発症との関連を明らかにし、それぞれの key molecule の modulator が新しい治療法となりうるか否かを検討する。

2. 研究の目的

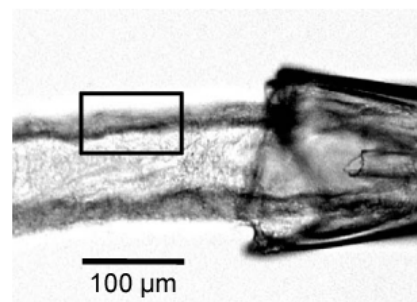
膵管、十二指腸、気道粘膜上皮に共通する障害を引き起こす疾病モデルを用いて、 HCO_3^- - CO_2 輸送分子の機能異常と疾病発症との関連を明らかにする。各臓器に共通する分子病態と臓器特異的な分子病態を明らかにする。 HCO_3^- - CO_2 輸送分子の modulator が管腔内溶液（粘液）の pH をアルカリ化させ水分量を増やすかどうかを調べる。効果が見られた modulator は、難治性疾患である慢性膵炎やび慢性汎細気管支炎、common disease である気管支喘息や消化性潰瘍の新しい治療法の有力な候補となる。

ヒトの膵液は 140 mM 以上もの高濃度の HCO_3^- を含む。膵導管細胞の管腔膜には、SLC26 ファミリーに属する SLC26A6 Cl^- - HCO_3^- 交換輸送体と CFTR が存在することがわかっているが、これらの分子がどのように協調して高濃度の HCO_3^- 輸送を実現しているかは明らかではない。 HCO_3^- 分泌は CFTR の活性に依存するが、CFTR の HCO_3^- 透過性は Cl^- に比べて低いため、膵 HCO_3^- 分泌における CFTR の役割は不明であった。本研究では、まず、slc26a6 のノックアウトマウスを用いて、膵導管細胞の HCO_3^- 輸送における SLC26A6 Cl^- - HCO_3^- 交換輸送体の役割を検討した。マウスの膵液の HCO_3^- 濃度は

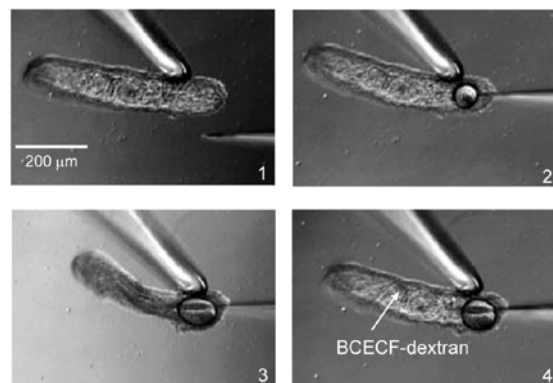
最高でも 40~50 mM であり、ヒトの膵臓の良い実験モデルとは言えない。そこで、膵液の HCO_3^- 濃度がヒトと同程度に高いモルモットの単離膵管を実験モデルとして用いて、管腔膜を介する HCO_3^- 輸送の分子メカニズムを解析した。

3. 研究の方法

- (1) マウスの純粋膵液を麻酔下に採取した。
- (2) 膵臓を collagenase で処理した後、直径 100~150 μm の小葉間膵管を単離した。
- (3) 単離膵管を、倒立顕微鏡のステージ上で HCO_3^- - CO_2 緩衝液で 37°C で表層灌流し、管腔容積の変化率から溶液分泌（fluid secretion）速度を求めた。
- (4) 単離膵管の管腔を下図のように microperfusion し、pH 感受性蛍光色素 BCECF を負荷して細胞内 pH を測定した。膵管は一層の上皮膜組織である。管腔灌流液、表層灌流液とも右→左に流しているため、それぞれの灌流液のコンタミネーションはほとんど無い。下図のように関心領域を設定すると、10 個ほどの細胞の平均値を測定していることになる。



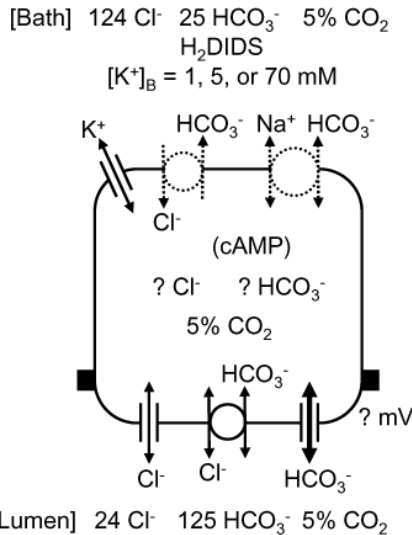
- (5) 単離膵管の管腔を下図のように micropuncture し、細胞膜透過性の無い pH 感受性蛍光色素 BCECF-dextran を注入して管腔内 pH を測定した。管腔内容積の経時的変化を同時にモニターすることによって、net の HCO_3^- 分泌および（溶液分泌が等張と仮定する） Cl^- 分泌速度を求めることができる。



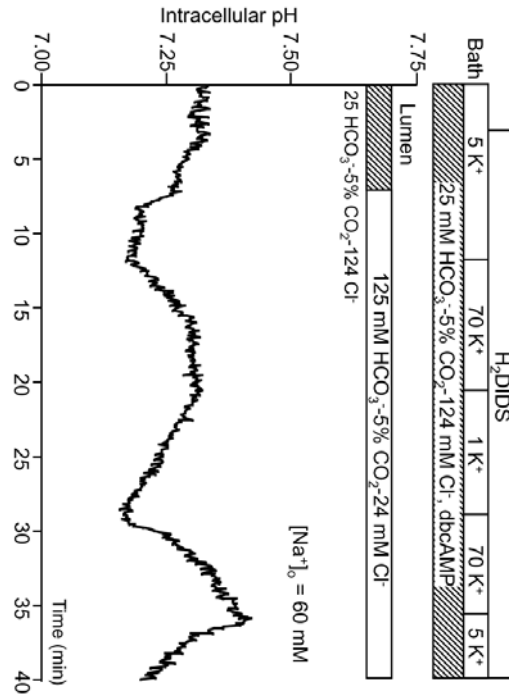
4. 研究成果

(1) slc26a6 のノックアウトマウスの純粋腓液を麻酔下に採取したところ、セクレチン刺激下の分泌量と HCO_3^- 濃度 (約 40 mM) はコントロールと差は無かった。単離した小葉間腓管の管腔内への腓液分泌量にも差は見られなかった。しかし、単離腓管の管腔を microperfusion して細胞内 pH を測定し、管腔膜の Cl^- - HCO_3^- 交換活性を測定したところ、細胞外 $\text{Cl}^- \rightleftharpoons$ 細胞内 HCO_3^- 交換方向 (HCO_3^- 分泌方向) の活性が優位に低下していた。細胞内 $\text{Cl}^- \rightleftharpoons$ 細胞外 HCO_3^- 交換方向 (HCO_3^- 吸収方向) の活性は逆に増加していた。この結果は、SLC26A6 が腓導管細胞管腔膜の主要な Cl^- - HCO_3^- 交換輸送体であることを示している。SLC26A6 がノックダウンされた場合には、CFTR あるいは SLC26A3 (DRA, CLD) が HCO_3^- 輸送機能を代償したと考えられる。強制発現系における検討では、SLC26A6 と SLC26A3 は起電性の輸送体であり、それぞれ、1 $\text{Cl}^- \rightleftharpoons$ 2 HCO_3^- 交換、2 $\text{Cl}^- \rightleftharpoons$ 1 HCO_3^- 交換を担うという報告が見られる。本研究の実験結果は、腓導管細胞でも SLC26A6 が 1 $\text{Cl}^- \rightleftharpoons$ 2 HCO_3^- 交換を担っていることを示唆している。

(2) モルモットの腓臓から単離した小葉間腓管を用いて細胞内 pH を測定し、人為的な電位変化による引き起こされる管腔膜を介する HCO_3^- 輸送速度を測定した。実験は、下図のように、管腔を高 HCO_3^- 溶液 (125 mM) で灌流し、基底側膜を介する HCO_3^- 輸送を H_2DIDS を用いて抑制した条件で行った。



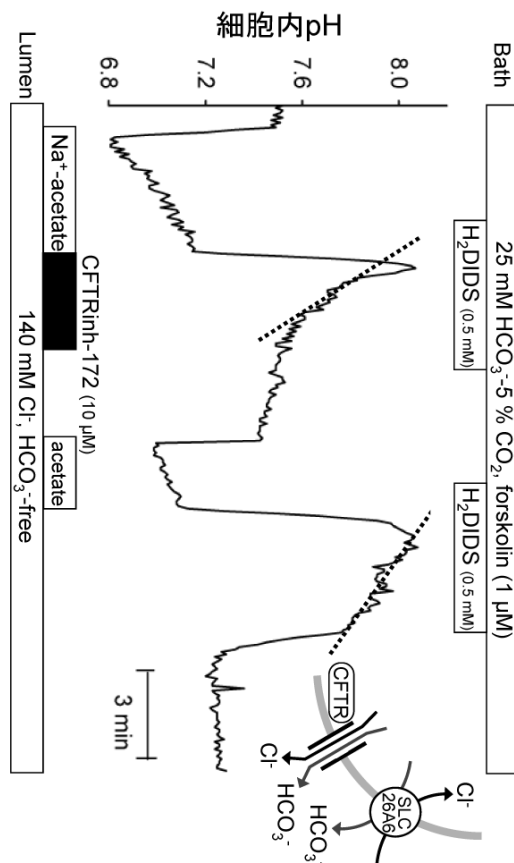
表層灌流液の K^+ 濃度を 5 mM から 70 mM に上げて脱分極させると細胞内 pH は上昇 (HCO_3^- influx) し、 K^+ 濃度を 1 mM に下げて過分極させると細胞内 pH は低下 (HCO_3^- efflux) した。(下のグラフを参照)



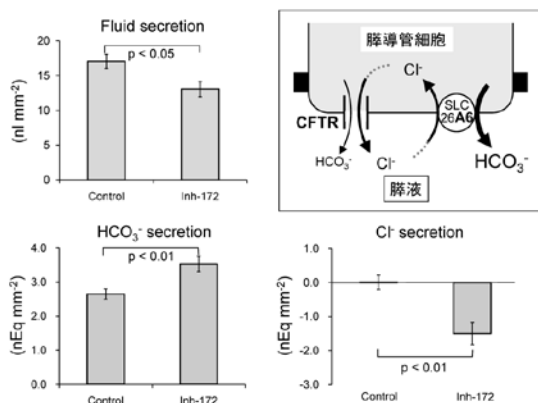
この電位変化による HCO_3^- flux は、 Cl^- と Na^+ に依存せず、管腔灌流液に CFTR 阻害剤 CFTRinh-172 を加えると抑制された。管腔膜の CFTR が HCO_3^- チャネルとして機能することを示している。さらに、細胞内 pH とその変化速度、膜電位、細胞内 buffering capacity から、管腔膜の HCO_3^- 透過性を算出したところ、約 $0.1 \mu\text{m sec}^{-1}$ であった。native な上皮膜の HCO_3^- 透過性の絶対値を測定した初めての報告であろうと思われる。この算出された HCO_3^- 透過性は、モルモット腓導管細胞の HCO_3^- 分泌に必要な理論値 ($0.25 \mu\text{m sec}^{-1}$) に近かった。ヒトやモルモットの腓液は 140 mM に達する高濃度の HCO_3^- を含む。このような条件下の腓導管細胞では、管腔膜の CFTR が HCO_3^- チャネルとして機能することがわかった。

(3) モルモットの単離腓管を用いて、SLC26A6 による Cl^- - HCO_3^- 交換輸送と CFTR の機能連関を解析した。表層を HCO_3^- - CO_2 緩衝液で、管腔内を HCO_3^- を含まない HEPES 緩衝液 (140 mM Cl^-) で灌流し、acetate pulse (20 mM) により腓導管細胞にアルカリ (HCO_3^-) 負荷した。表層灌流液に H_2DIDS を加えて基底側膜を介する HCO_3^- efflux を阻害しておけば、細胞内 pH の変化 (低下) を測定することにより管腔膜を介する Cl^- 依存性の HCO_3^- efflux (HCO_3^- 分泌) を経時的に観察することができる。実験は、forskolin (1 μM) を用いて cyclic AMP によって最大刺激された条件で行った。CFTR 阻害剤としては、CFTRinh-172 を 10 μM の濃度で用いた。管腔内灌流液に CFTRinh-172 を加えると、アルカリ (HCO_3^-) 負荷後の管腔膜を介する Cl^- 依存性の HCO_3^- 分

泌が促進された（下図）。



次に、単離膵管の管腔内を BCECF-dextran を含む HEPES 緩衝液（140 mM Cl⁻、HCO₃⁻を含まない）で満たし、表層を forskolin を含む HCO₃⁻-CO₂ 緩衝液で灌流して、HCO₃⁻ 分泌および Cl⁻ 分泌速度に対する CFTRinh-172 の効果を解析した（下図）。



CFTRinh-172 を管腔内に投与すると、溶液分泌は有意に減少したが、HCO₃⁻ 分泌が増加した。溶液分泌が常に等張と仮定して net の Cl⁻ flux を算出すると、コントロールでは Cl⁻ flux はほぼゼロであったが、CFTRinh-172 を

投与した場合は Cl⁻ の吸収が起こっていることがわかった。

膵液中の HCO₃⁻ は、腺房に近い細い膵管（介在部～小葉内～小葉間膵管の細い部分）から主に分泌されると考えられており、免疫組織学的検討により、この部位の膵管の管腔膜に CFTR と SLC26A6 が共存すると報告されている。本研究は、生理学的に SLC26A6 が膵導管細胞管腔膜における主要な Cl⁻-HCO₃⁻ 交換輸送体であることを示した。さらに、高濃度の HCO₃⁻ を分泌するモルモット単離小葉間膵管を用いて、CFTR と SLC26A6 の機能連関を検討した。cAMP 刺激下に CFTR を阻害すると、管腔膜を介する Cl⁻ 依存性の HCO₃⁻ 分泌と Cl⁻-HCO₃⁻ 交換輸送活性はともに増強された。末梢の膵管では、腺房からの Cl⁻ 分泌によって管腔内の Cl⁻ 濃度が高いと推定され、この状態では導管細胞内の Cl⁻ 濃度は比較的高い。CFTR の HCO₃⁻ 透過性は Cl⁻ に比べて小さい（0.2～0.5）ため、この条件では、管腔膜上の CFTR は HCO₃⁻ よりも Cl⁻ を多く分泌してしまうが、SLC26A6 による Cl⁻-HCO₃⁻ 交換輸送が代償していると考えられる。HCO₃⁻ 分泌によって管腔内（膵液中）の HCO₃⁻ 濃度が高くなる（Cl⁻ 濃度は低くなる）と、管腔膜の CFTR が HCO₃⁻ チャネルとして機能し、HCO₃⁻ 分泌の主要なルートになることがわかった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 7 件）

1. Stewart AK, Yamamoto A, Nakakuki M, Kondo T, Alper SL, Ishiguro H. Functional coupling of apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange with CFTR in stimulated HCO₃⁻ secretion by guinea pig interlobular pancreatic duct. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009 [Epub ahead of print]. 査読有り
2. Ishiguro H, Steward MC, Naruse S, Ko SB, Goto H, Case RM, Kondo T, Yamamoto A. CFTR functions as a bicarbonate channel in pancreatic duct cells. J Gen Physiol 2009; 133(3): 315-26. 査読有り
3. 中莖 みゆき、石黒 洋、代田桂一、山本明子、洪 繁、後藤秀実、藤木理代、近藤孝晴、遠藤 彰、成瀬 達 汗中クロライド濃度の簡便な測定法の開発 膵臓 2008; 23(4): 486-493. 査読有り
4. 石黒 洋、山本明子、近藤 孝晴 ΔF マウスと slc26a6 null マウスを用いた膵 HCO₃⁻ 分泌機構の解析 2008; 23(1): 25-30. 査読有り

5. Matsuno T, Ito Y, Ohashi T, Morise M, Takeda N, Shimokata K, Imaizumi K, Kume H, Hasegawa Y. Dual pathway activated by tert-butyl hydroperoxide in human airway anion secretion. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 327(2): 453-64. 査読有り
6. Ishiguro H, Steward M, Naruse S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and SLC26 transporters in HCO_3^- secretion by pancreatic duct cells. *Sheng Li Xue Bao-Acta Physiologica Sinica (Chinese Journal of Physiology)* 2007; 59(4): 465-76. 査読有り
7. Ishiguro H, Namkung W, Yamamoto A, Wang Z, Worrell RT, Xu J, Lee MG, Soleimani M. Effect of Slc26a6 deletion on apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger activity and cAMP-stimulated bicarbonate secretion in pancreatic duct. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292(1): G447-55. 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

1. Yamamoto A, Ishiguro H, Kondo T. Regulatory interaction of the apical Na^+-H^+ exchange in HCO_3^- secretion in mouse pancreatic duct cells. 16th United European Gastroenterology Week (Vienna) 2008/10/22
2. 石黒 洋、二口祥子、藤木理代 膵導管におけるグルコース吸収機構 ワークショップ「栄養素吸収輸送システムに関する研究の進歩」 第 50 回日本消化器病学会大会 (東京) 2008/10/4
3. 石黒 洋、二口祥子、藤木理代 単離膵導管におけるグルコース吸収が膵液分泌に与える影響 ワークショップ「膵内・外分泌機能の基礎と臨床：相互相関をめぐって」 第 39 回日本膵臓学会大会 (横浜) 2008/07/31
4. 石黒 洋、山本明子、近藤孝晴 slc26a6 ノックアウトマウスから単離した小葉間膵管の重炭酸イオン輸送 第 85 回日本生理学会大会 (東京) 2008/3/25
5. Yamamoto A, Ishiguro H, Ko SB, Naruse S, Kondo T. Interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and Na^+-H^+ exchange in mouse pancreatic ducts. *Asian Pacific Digestive Week 2007 (Kobe)* 2007/10/19
6. Ishiguro H. Role of SLC26A6 in ductal

HCO_3^- secretion. Symposium "Frontiers in Exocrine Pancreatic Physiology and Pathophysiology". European Pancreatic Club 2007 (Newcastle-Gateshead) 2007/7/7

7. 石黒 洋、山本明子、近藤孝晴 ΔF マウスおよび Slc26a6 ノックアウトマウスから単離した小葉間膵管の重炭酸イオン輸送 ワークショップ「膵研究モデルの作成、選択、適用」 第 38 回日本膵臓学会大会 (福岡) 2007/6/29

[図書] (計 2 件)

1. 大槻 眞、成瀬 達、近藤孝晴、石黒 洋、山本明子、洪 繁、他 膵嚢胞線維症の診療の手引き アークメディア (東京) 2008 74 ページ
2. 石黒洋、近藤孝晴、山本明子、成瀬達 CFTR の機能異常と慢性膵炎 *Annual Review 消化器* 2007(中外医学社) 2007, 213-219.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 孝晴 (KONDO TAKAHARU)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・教授
研究者番号：20135388

(2) 研究分担者

石黒 洋 (ISHIGURO HIROSHI)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・准教授
研究者番号：90303651

山本 明子 (YAMAMOTO AKIKO)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・助教
研究者番号：60402385

洪 繁 (KO SHIGERU)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90402578

久米 裕昭 (KUME HIROAKI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：50303631

研究協力者

秋葉 保忠 (AKIBA YASUTADA)
UCLA Los Angeles