

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 2 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590332

研究課題名（和文）NHE3-CFTR イオン輸送複合体の機能異常による粘膜病変の分子病態

研究課題名（英文）Molecular pathogenesis of the mucosal lesion due to the dysfunction of NHE3-CFTR transportsome

研究代表者

近藤 孝晴（KONDO TAKAHARU）

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：20135388

研究成果の概要（和文）：消化管や気道などの粘膜上皮の生体防御機構が正常に働くためには、粘膜を覆う管腔内液の pH が中性～アルカリ性に保たれている必要がある。本研究では、CFTR と NHE3 という二つの分子を中心とする複合体が、重炭酸イオン（ HCO_3^- ）輸送に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、 HCO_3^- 輸送メカニズムを統合的に解析するために、各輸送担体によるイオン輸送を数式化し、シミュレーションモデルを作成した。

研究成果の概要（英文）：For the defense mechanisms of gastrointestinal and respiratory mucosa to work properly, pH of the luminal fluid must be kept neutral~alkaline. The present study demonstrated that the cell membrane transportsome containing CFTR and NHE3 plays a key role in transmucosal HCO_3^- secretion. A mathematical model of HCO_3^- secretion was constructed using MATLAB/Simulink. The kinetic model of each ion channel/transporter/pump was mounted in the basolateral and apical membranes of the model cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：CFTR・NHE3・ HCO_3^- 分泌・SLC26A6・膵導管細胞・嚢胞性線維症・
粘膜上皮・コンピュータシミュレーション

1. 研究開始当初の背景

管腔臓器において繊毛運動や免疫という粘膜防御機構が維持されるためには、管腔内液（粘液）の pH と水分含量が正常に保たれなければならない。これに中心的な役割を果たしているのが CFTR（cystic fibrosis transmembrane conductance regulator）による HCO_3^- 分泌である。CFTR は管腔膜に発現する cAMP 依存性陰イオンチャネルである。重度

の遺伝子変異により機能が消失すると、粘稠な液が管腔を閉塞し、膵機能不全、胎便性イレウス、難治性呼吸器感染などの多彩な病態を示す嚢胞性線維症（cystic fibrosis）が発症する。また、軽度の変異や多型の組み合わせによる中等度の機能障害は慢性膵炎の危険因子となる。しかし、嚢胞性線維症や慢性膵炎患者の膵液は、アルカリ度が低くなることとまらず酸性に傾くことがある。この現象は、

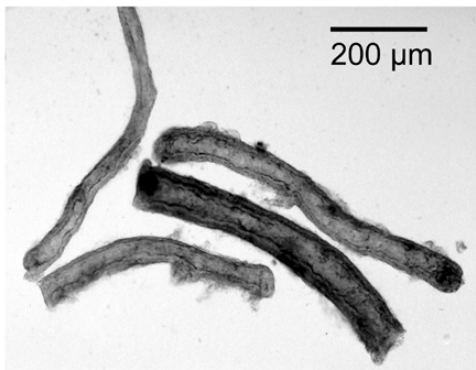
CFTR 機能不全による HCO_3^- 分泌の低下だけでは説明できず、 H^+ が管腔内へ分泌されていることを示す。この H^+ 分泌のメカニズムとして可能性が高いのは、管腔膜に局在する Na^+/H^+ exchanger の isoform 3 (NHE3) である。

2. 研究の目的

消化管や気道などの粘膜上皮を覆う管腔内液の酸性化は、十二指腸潰瘍、気管支喘息、嚢胞性線維症などの病態生理の根本にある現象である。上皮細胞の管腔膜では、CFTR、NHE3 をはじめとする $\text{HCO}_3^-/\text{H}^+$ 輸送体、調節分子が複合体を形成していることが分かってきた。複合体として正常に機能することにより、管腔内液の pH と粘稠度が最適な状態に保たれると考えられているが、*in vivo* に近い条件での機能的な解析はされていない。本研究の目的は、複合体の中心分子である CFTR の遺伝子変異/多型、あるいは外的ストレスによって、複合体による $\text{HCO}_3^-/\text{H}^+$ 輸送の調節機能が失われ、病的な H^+ 分泌が起こる機能連鎖の仕組みを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) マウス、ラット、モルモットの膵臓から直径~100 μm の小葉間膵管を単離した。

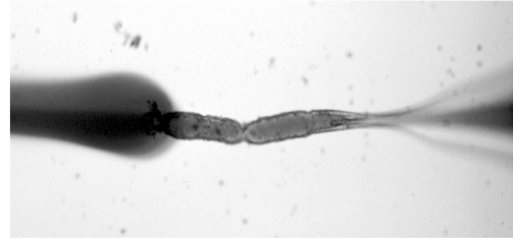


(2) 単離した膵管を一昼夜培養すると両端が自然に閉じて、内腔が導管細胞上皮に囲まれた閉鎖腔となる。管腔を micropuncture して細胞膜透過性の無い pH 感受性蛍光色素 BCECF-dextran を管腔内に注入し、管腔内 pH を測定した。



また、管腔の容積変化 (fluid secretion) を同時に測定することにより、net の HCO_3^- 分泌を算出した。

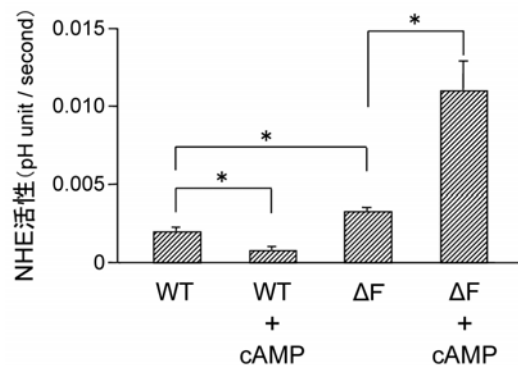
(3) 管腔を microperfusion して表層とは別個に灌流し、BCECF-AM を用いて細胞内 pH を測定した。



4. 研究成果

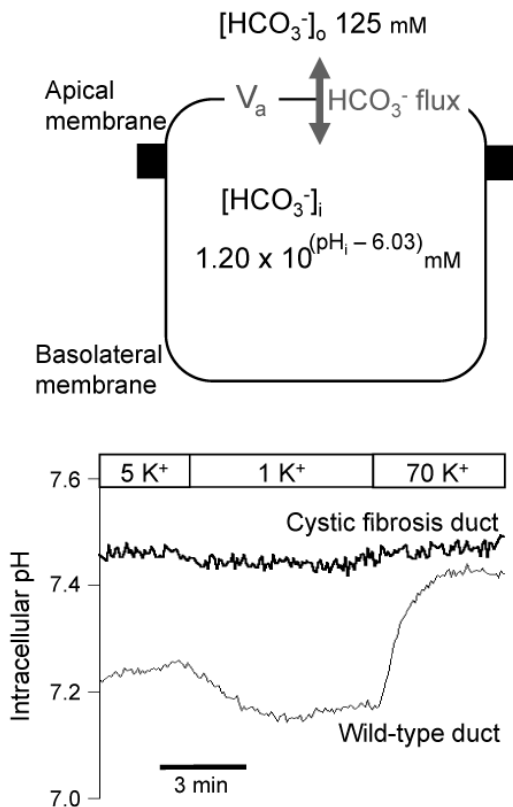
研究の主な成果

(1) 嚢胞性線維症のモデル動物である ΔF マウスの膵臓から小膵管を単離して $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ 輸送を測定した。単離膵管を $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 緩衝液 (pH 7.4) で 37°C で表層灌流すると、cAMP 最大刺激下の溶液分泌は、 ΔF マウスの単離膵管では完全に消失していた。また、管腔を micropuncture して管腔内 pH を測定したところ、コントロールでは 8.0 前後であったのに対し、 ΔF マウスの膵管では 7.0 以下に酸性化していた。管腔を microperfusion して細胞内 pH を測定し、管腔膜の Na^+/H^+ exchange (NHE) 活性を比較した。 ΔF マウスの膵管では NHE 活性が高く、cAMP の投与によって活性が増強された (下図)。



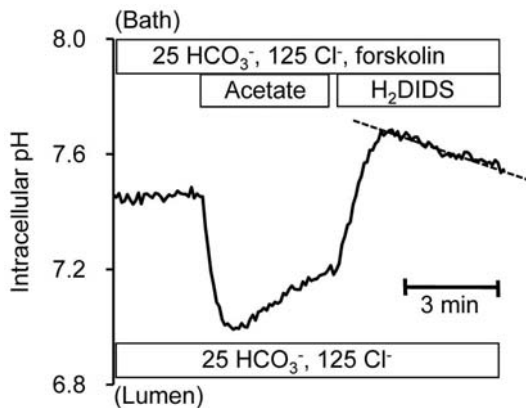
上皮膜組織の管腔膜では、CFTR と NHE が複合体として機能することにより、管腔内液の pH を最適な状態に保っていると考えられた。

(2) 表層を 25 mM HCO_3^- -124 mM Cl^- -5% CO_2 溶液で、管腔内を 125 mM HCO_3^- -24 mM Cl^- -5% CO_2 溶液で灌流し、表層灌流液の K^+ 濃度を変えることにより、膜電位を変化させた。basolateral membrane を介する HCO_3^- 輸送を阻害した条件では、細胞内 pH の変化は、apical membrane を介する起電性 HCO_3^- 輸送を表わす。 ΔF マウスの膵臓から単離した膵管では、apical membrane を介する起電性 HCO_3^- 輸送が消失していた (下図)。



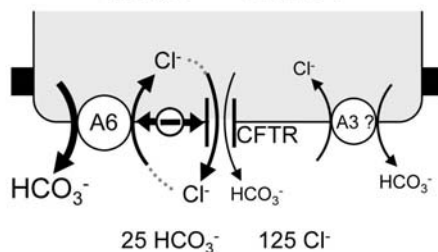
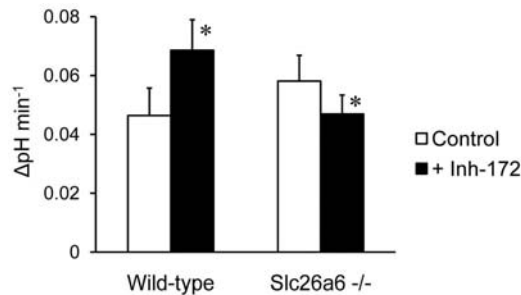
この結果は、管腔（腽液中）の HCO_3^- 濃度が高い生理的条件下では、CFTR が HCO_3^- チャンネルとして機能していること、嚢胞性線維症では CFTR を介する HCO_3^- 輸送が失われていることを示している。

(3) 強制発現系を用いた研究により、SLC26A6 Cl^- - HCO_3^- exchanger の活性は CFTR に依存し、両者は協調して HCO_3^- 輸送を担うとされている。Slc26a6 ノックアウトマウスの腽臓から単離した小葉間腽管を用いて *in vivo* における機能連関を検討した。細胞内 pH を測定し、アルカリ負荷後の管腔内 Cl^- に依存する HCO_3^- 分泌 (Cl^- - HCO_3^- exchange) を測定した (下図)。



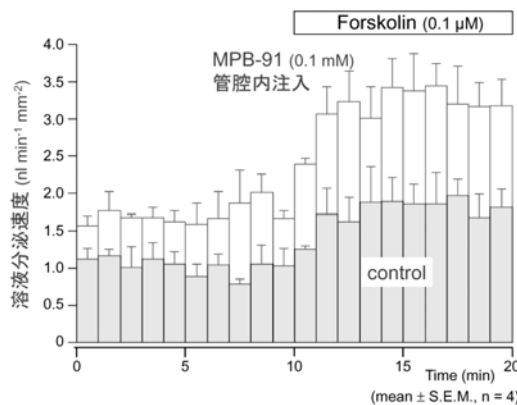
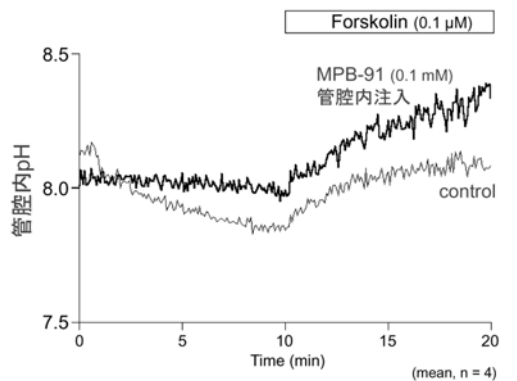
ワイルドタイプ(+/+)腽管では、cAMP 刺激下の Cl^- 依存性 HCO_3^- 分泌は、CFTRinh-172

(CFTR の阻害剤) を加えると増強された。一方、Slc26a6(-/-)腽管では、CFTRinh-172 を加えると逆に Cl^- 依存性 HCO_3^- 分泌が減少した (下図)。



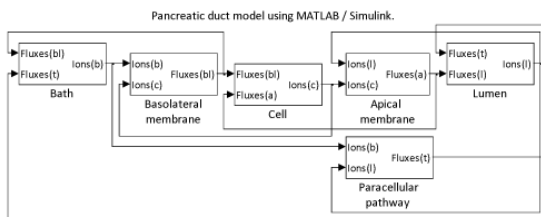
末梢の腽管では、腺房からの Cl^- 分泌によって管腔内の Cl^- 濃度が高く、導管細胞内の Cl^- 濃度は比較的高い。CFTR の HCO_3^- 透過性は Cl^- に比べて小さいため、この条件では、導管細胞管腔膜上の CFTR は HCO_3^- よりも Cl^- を多く分泌してしまうが、SLC26A6 による Cl^- - HCO_3^- exchanger が代償していると考えられる。

(4) モルモットの単離腽管管腔内に CFTR 刺激剤である MPB-91 を注入して、管腔内 pH と溶液分泌に及ぼす影響を解析した (下図)。

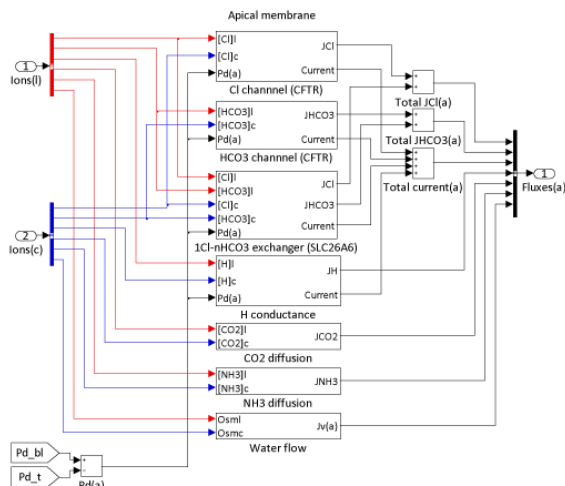


管腔内に 125 mM HCO_3^- -24 mM Cl^- -5% CO_2 溶液 (pH: ~8.2) を注入して、測定を開始した。コントロールでは徐々に管腔内 pH が低下したが、MPB-91 を注入した膵管では pH が 8 前後に保たれた。adenylate cyclase を活性化する forskolin を加えると、両者とも管腔内 pH が上昇し、fluid secretion が増加した。膵液中の HCO_3^- 濃度が高い生理的条件下では、CFTR が HCO_3^- チャネルとして機能していることを支持している。

(5) 膵導管細胞の HCO_3^- 分泌メカニズムを明らかにするために、細胞膜上の各輸送担体 (CFTR、NHE3、SLC26A6 を含む) によるイオン輸送を数式化し、シミュレーションモデルを作成した。ソフトウェアには MATLAB/Simulink を使い、各輸送担体の輸送速度式は、電気化学的勾配と回路網熱力学を用いて導出した。解離定数、反応速度定数などは、モルモット単離膵管の管腔灌流実験をシミュレーションし、実験値と比較して決定した。この定数を用いて、イオンと水の輸送によって管腔 (膵液中) のイオン組成が変化する分泌モデルを作成した。細胞モデルは、下図のようにブロック線図で表わされる



下図に apical membrane のモデルを示す。



K^+ チャネル、NBC1 Na^+ - HCO_3^- cotransporter、CFTR、SLC26A6 の透過係数を上げ、AE2 Cl^- - HCO_3^- exchanger の透過係数を下げることにより、140 mM の HCO_3^- を含む 2.8 nl/min mm^2 (単位上皮膜面積当たり) の膵液分泌を再現することができた。CFTR アニオンチャネルの $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ 透過性比を、1.0、0.4 (標準

モデル)、あるいは 0.1 とすると、膵液の HCO_3^- 濃度はそれぞれ 144、140、126 mM、膵液分泌速度は 3.8、2.8、1.5 nl/min mm^2 であった。

国内外における位置づけとインパクト

最近、CFTR、SLC26 アニオン輸送体の HCO_3^- 輸送機能の生理学的特性についてかなり明らかになってきた。しかし、そのほとんどは強制発現系を用いた研究である。本研究は、小動物の膵臓から単離した小膵管を、管腔構造を保ったまま標本として用いて、極性のある HCO_3^- 輸送を解析しており、国内外から高い評価を得ている。

今後の展望

嚢胞性線維症は、繰り返す気道感染、膵外分泌機能不全による消化栄養不良を起こす難病である。嚢胞性線維症は、白人では最も多い遺伝性疾患であるが、日本人には稀である。患者の平均生存期間は約 18 年と予後不良である。名古屋大学総合保健体育科学センター (大学院医学系研究科) 健康栄養医学研究室は、全国の医療施設から依頼を受け、嚢胞性線維症患者の CFTR 遺伝子変異の検索、および汗中 Cl^- 濃度の測定による CFTR チャネル機能の評価を行っている。CFTR 遺伝子は、人種によって変異のスペクトルが大きく異なり、白人の遺伝子変異がわが国の患者に見つかることはほとんどない。日本人の患者で検出される遺伝子変異は、機能障害が確認されていない変異がほとんどである。また、変異 CFTR の Cl^- チャネル機能と HCO_3^- 輸送機能は必ずしも一致しないことが知られている。当研究室では、同定された変異 CFTR の細胞膜発現、*in vitro* におけるチャネル機能および HCO_3^- 輸送機能の解析を計画している。わが国の嚢胞性線維症患者に多い CFTR 遺伝子変異の種類と変異 CFTR の機能低下のメカニズムが明らかになれば、効果的な治療薬の開発に繋がる。

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 11 件)

- ① Structure and function of the pancreas in the polycystic kidney rat. Yi L, Naruse S, Furuya S, Yamamoto A, Nakakuki M, Nagao S, Yoshihara D, Ko SB, Wei M, Kondo T, Ishiguro H. *Pancreas* (in press). (査読あり、2012 年) DOI: 10.1097/MPA.0b013e31824c12f9
- ② Physiology and pathophysiology of bicarbonate secretion by pancreatic duct epithelium. Ishiguro H, Yamamoto A, Nakakuki M, Yi L, Ishiguro M, Yamaguchi M, Kondo S, Mochimaru Y. *Nagoya J Med Sci* 74: 1-18, 2012. (査読あり、2012 年)

- http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya_j_med_sci/7412/7412.html
- ③ SLC26 anion exchangers of guinea pig pancreatic duct: molecular cloning and functional characterization. Stewart AK, Shmukler BE, Vandorpe DH, Reimold F, Heneghan JF, Nakakuki M, Akhavein A, Ko SB, Ishiguro H, Alper SL. *Am J Physiol Cell Physiol* 301:C289-303, 2011. (査読あり、2011年8月) DOI: 10.1152/ajpcell.00089.2011
- ④ Effects of CFTR gene silencing by siRNA or the luminal application of a CFTR activator on fluid secretion from guinea-pig pancreatic duct cells. Ko SB, Yamamoto A, Azuma S, Song H, Kamimura K, Nakakuki M, Gray MA, Becq F, Ishiguro H, Goto H. *Biochem Biophys Res Commun* 410:904-9, 2011. (査読あり 2011年7月15日) DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.093
- ⑤ Microperfusion and micropuncture analysis of ductal secretion. Ishiguro H, Steward MC, Yamamoto A. In: *The Pancreapedia Exocrine Pancreas Knowledge Base 2011. University of Michigan Library*. (査読あり、2011年5月6日) DOI: 10.3998/panc.2011.16
- ⑥ Corticosteroids correct aberrant CFTR localization in the duct and regenerate acinar cells in autoimmune pancreatitis. Ko SB, Mizuno N, Yatabe Y, Yoshikawa T, Ishiguro H, Yamamoto A, Azuma S, Naruse S, Yamao K, Muallem S, Goto H. *Gastroenterology* 138:1988-96, 2010. (査読あり、2010年5月) DOI: 10.1053/j.gastro.2010.01.001
- ⑦ CFTR functions as a bicarbonate channel in pancreatic duct cells. Ishiguro H, Steward MC, Naruse S, Ko SB, Goto H, Case RM, Kondo T, Yamamoto A. *J Gen Physiol* 133:315-26, 2009. (査読あり、2009年2月9日) DOI: 10.1085/jgp.200810122
- ⑧ Functional coupling of apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange with CFTR in stimulated HCO₃⁻ secretion by guinea pig interlobular pancreatic duct. Stewart AK, Yamamoto A, Nakakuki M, Kondo T, Alper SL, Ishiguro H. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296:G1307-17, 2009. (査読あり、2009年6月) DOI: 10.1152/ajpgi.90697.2008
- ⑨ Molecular and cellular regulation of pancreatic duct cell function. Steward MC, Ishiguro H. *Curr Opin Gastroenterol* 25:447-53, 2009. (査読あり 2009年9月) DOI: 10.1097/MOG.0b013e32832e06ce
- ⑩ Effects of Slc26a6 deletion and CFTR inhibition on HCO₃⁻ secretion by mouse pancreatic duct. Song Y, Ishiguro H, Yamamoto A, Jin CX, Kondo T. *J Med Invest* 56 Suppl:332-5, 2009. (査読あり、2009年12月) DOI: 10.2152/jmi.56.332
- ⑪ Apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger stoichiometry in the modeling of HCO₃⁻ transport by pancreatic duct epithelium. Yamaguchi M, Ishiguro H, Steward M, Sohma Y, Yamamoto A, Shimouchi A, Kondo T. *J Med Invest* 56 Suppl:325-8, 2009. (査読あり、2009年12月) DOI: 10.2152/jmi.56.325
- [学会発表] (計5件)
- ① Role of basolateral Cl⁻-HCO₃⁻ exchange in HCO₃⁻ secretion in a computational model of electrolyte transport by pancreatic duct epithelium. Yamaguchi M, Steward MC, Yamamoto A, Sohma Y, Ko SB, Kondo T, Ishiguro H. *The Physiological Society (Oxford)* (2011年7月13日)
- ② Pancreatic duct dysfunction and pancreatitis. Ishiguro H. *Gordon Research Conferences; Salivary Glands & Exocrine Biology* (Galveston), (2011年2月9日)
- ③ Molecular and cellular regulation of pancreatic duct function. Ishiguro H, Ko SB, Yamamoto A. Symposium "Chronic Pancreatitis: Pathogenesis to Treatment", *Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society* (Fukuoka), (2010年7月12日)
- ④ 膵導管細胞管腔膜のNa⁺-H⁺ exchangerによる膵液酸性化と膵障害 山本明子、石黒洋、近藤孝晴 シンポジウム「慢性膵炎の基礎研究における最近の進歩—新しい診断と治療法の開発に向けての展望—」第40回日本膵臓学会大会(東京)(2009年7月31日)
- ⑤ Interaction between CFTR Cl⁻ channel and SLC26a6 anion exchangers. Ishiguro H, Song Y, Kondo T, Yamamoto A. Basic Science Symposium, *The 41st meeting of The European Pancreatic Club* (Szeged), (2009年7月2日)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
近藤 孝晴 (KONDO TAKAHARU)
中部大学・生命健康科学部・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・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・

准教授

研究者番号：60402385