

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25年 5月28日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590201

研究課題名（和文） TRPチャネルによる大腸イオン分泌異常機構の電気生理学的解明

研究課題名（英文） Electrophysiological analysis of colonic ion secretion mechanism by TRP channels

研究代表者

清水 貴浩（TAKAHIRO SHIMIZU）

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・准教授

研究者番号：40353437

研究成果の概要（和文）：ワサビなどの香辛料は、東洋医学では健胃薬として用いられていることから、大腸機能への関与が示唆されてきている。本研究において、ワサビの辛味主成分であるアリルイソチオシアネート（AITC）がラットおよびマウス大腸粘膜からのCl⁻分泌を引き起こすメカニズムにTRPA1チャネルが関与するのかについて検討した。その結果、AITCはPGE₂遊離を介してクリプト細胞のCl⁻分泌を誘導するが、このAITCの作用にはTRPA1チャネルは寄与していない可能性が考えられた。本研究により大腸粘膜におけるAITCの新規作用機構が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Since spices such as wasabi are used as stomach medicines in Oriental medicine, they are suggested to regulate colonic functions. In the present study, we investigated the mechanism that aryl isothiocyanates (AITC), which are a main pungent component of wasabi, triggers Cl⁻ secretion in colonic mucosa isolated from mice and rats. As a result, we demonstrated that AITC caused Cl⁻ secretion via PGE₂ production in colonic mucosa and that TRPA1 channel may not be a key molecule in the AITC-induced Cl⁻ secretion in the colon. This study proposes a novel mechanism of AITC action in the colon.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子細胞生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：大腸、下痢、Cl⁻分泌、イオンチャネル、Transient receptor potential (TRP)

1. 研究開始当初の背景

大腸は、食物残渣から電解質を吸収することで消化物の水分バランスを調節する役割をもっている。何らかの要因で大腸管腔へのCl⁻分泌が亢進すると、この水分バランスが

崩れ、分泌性下痢が生じる。これまでに当研究室では、大腸粘膜を用いたイオン輸送実験により分泌性下痢のメカニズムを解析し、細胞外シグナルとしてプロスタグランジンE₂およびトロンボキサンA₂が、細胞内シグナルと

してcAMPおよびCa²⁺が関与していることを明らかにしている (Sakai et al., J. Physiol. 1997; Horikawa et al., J. Physiol. 2005)。

東洋医学において、辛味、苦味、芳香を有する香辛料が消化管機能を亢進すると考えられており、それら香辛料は健胃薬として用いられている。一方で、刺激の強い香辛料を過量摂取すると下痢になることが知られている。このように香辛料が消化管機能を調節していることは明らかであるにもかかわらず、消化管機能の香辛料による調節メカニズムはほとんど知られていない。

また近年、ワサビの辛味主成分であるアリルイソチオシアネート (AITC) を受容する蛋白質として Transient receptor potential A1 (TRPA1) 非選択性カチオンチャンネルが報告されてきている (Jordt et al., Nature 2004)。TRPA1 チャンネルは大腸においても発現が確認されている (Penuelas et al., Eur J Pharmacol. 2007; Nozawa et al., PNAS 2009) が、大腸粘膜のイオン輸送における TRPA1 チャンネルの役割については明らかになっていない。

このような研究背景から、AITC による大腸イオン分泌調節に TRPA1 チャンネルが関与している可能性が考えられたため、本研究を立案した。

2. 研究の目的

ワサビの辛味主成分であるAITCは、主に感覚神経に発現しているTRPA1 チャンネルのアゴニストであることが知られている。最近、大腸におけるTRPA1 チャンネルの発現が報告されただけでなく、我々が予備的に行った大腸粘膜のイオン輸送実験において、AITCを粘膜側あるいは漿膜側に投与すると、Cl⁻分泌が生じることが明らかとなっている。したがって本研究では、大腸粘膜においてAITCが誘発するCl⁻分泌のシグナルメカニズムを、TRPA1 チャンネルに着目しながら電気生理学的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸標本の作製

実験に用いた大腸は、SDラットあるいはC57BL/6 マウス (WT) およびTRPA1 ノックアウトマウス (TRPA1-KO) からの急性単離により得た。大腸粘膜標本は、単離した大腸から筋層を剥がして作製した。大腸腺は、SDラットから大腸を摘出後反転し、Ca²⁺-free溶液中で振動させることで単離した。

(2) 短絡電流の測定

短絡電流 (Isc) は、短絡電流測定装置 (CEZ-9100、日本光電) を用いた Ussing

chamber 法により測定した。

(3) エンザイム・イムノアッセイ

短絡電流測定において、AITC投与後のバッファー中に放出されたPGE₂、TXB₂、PGF_{2α}などエイコサノイドの定量は、エンザイム・イムノアッセイキットを用いた波長 405nmの吸光度測定により行った。

(4) ホールセルパッチクランプ法

単離大腸クリプト細胞におけるホールセル記録は、Axopatch 200B 増幅器 (Molecular Devices) を用いて行った。パッチ電極として、約 3MΩの抵抗を示すガラス電極を用いた。クリプト細胞のホールセル電流は電圧固定法により、静止膜電位は電流固定法により測定した。データの取得・解析のソフトウェアとして pClamp10 (Molecular Devices) を用いた。

(5) 免疫組織染色

輪切りにした大腸を、Tissue-Tek OTC Compound (Sakura Finetechnical) で固定し、-80℃で凍結後クライオスタットを用いてスライスした。作製した凍結切片は氷冷メタノールで固定し、0.3% Triton X-100 を含む3%ヤギ血清希釈バッファーで透過処理を行った。3%BSA 溶液によりブロッキングした後、150 倍希釈した一次抗体と 4℃で一晩反応させた。Alexa Fluor 488 が結合した二次抗体は 500 倍希釈し、暗所で1時間反応させた。免疫蛍光染色像は、Zeiss LSM 510 レーザー共焦点顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) ラット大腸粘膜におけるAITC誘導性Isc上昇

大腸粘膜において、漿膜側へのAITCの添加が一過性のIsc上昇および膜コンダクタンスの増加を生じることを確認した。AITCのIsc上昇に対する濃度依存性を検討したところ、EC₅₀は 28.4μMであった。このIsc上昇は、漿膜側へのNa⁺、K⁺、2Cl⁻共輸送体の阻害剤であるフロセミドの投与や溶液中のCl⁻を除去することにより有意に抑制されたことから、AITCが大腸粘膜からのCl⁻分泌を引き起こすことが明らかとなった。

(2) AITCによるIsc上昇における神経系の関与

神経活動を抑制するフグ毒のテトロドトキシン存在下においてもAITCの作用は変化しなかった。また、神経層が含まれている粘膜下層を剥ぎ取った大腸粘膜標本においても、AITCはコントロールと同様のIsc上昇を引き起こした。これらの結果から、AITCは

粘膜下層ではなく、大腸粘膜に直接作用して Isc 上昇を引き起こす可能性が示唆された。

(3) AITCはシクロオキシゲナーゼ代謝物を介してCl⁻分泌を引き起こす

これまでに大腸のCl⁻分泌を引き起こす細胞外シグナルとしてアラキドン酸代謝物が知られていることから、シクロオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼ、シトクロムP450の各阻害剤の効果を検討したところ、AITC誘導性Isc上昇はシクロオキシゲナーゼ阻害剤であるindomethacinにより抑制されることが明らかとなった。次にどのシクロオキシゲナーゼ代謝物が関与しているのかについて検討するため、PGE₂受容体アンタゴニスト、TXA₂合成酵素阻害剤およびPGF_{2α}受容体アンタゴニストを用いた。その結果、PGE₂受容体(EP4)アンタゴニストであるGW627368Xが、AITCによるIsc上昇を顕著に抑制した。これらの結果から、AITCの漿膜側投与により産生されたPGE₂が主なメディエーターとして大腸クリプト細胞に作用することで、Cl⁻分泌を誘導していることが示唆された。

(4) AITC刺激によりPGE₂が産生遊離される

粘膜下層を剥がした大腸粘膜において、AITCが実際にどのシクロオキシゲナーゼ代謝物を遊離するのかについて検討するために、エンザイム・イムノアッセイ法を用いて、エイコサノイド(PGE₂、PGF_{2α}、TXA₂)の定量を行った。AITCを漿膜側、粘膜側のいずれに投与しても、漿膜側へのPGE₂、PGF_{2α}およびTXA₂の遊離量が有意に増加した。この中でもPGE₂の産生量が顕著に大きかった。

(5) AITC誘導性Cl⁻分泌におけるTRPA1チャンネル阻害剤の効果

TRPA1チャンネルがAITCにより生じるCl⁻分泌に寄与しているかを検討するため、TRPA1チャンネル阻害剤であるHC-030031を用いた。粘膜下層を剥がした大腸粘膜において、HC-030031を粘膜側および漿膜側のどちらに投与しても、AITCにより生じるIsc上昇は有意に抑制された。またエンザイム・イムノアッセイ法によりPGE₂産生への効果についても検討したところ、AITC処理により遊離されるPGE₂はHC-030031存在下で有意に減少した。これらの結果から、AITC誘導性Cl⁻分泌におけるTRPA1チャンネルの関与が示唆された。

(6) ラット単離大腸腺におけるパッチクランプ解析

AITCがクリプト細胞に作用しているのかを検討するため、ラット単離大腸腺の膜電流に対するAITCおよびPGE₂の効果をパッチクランプホールセル記録法により解析した(図1)。AITCを添加してもTRPA1様のカチオンチ

ヤネル電流だけでなく、Cl⁻電流も観測できなかった。一方、PGE₂処理によりホールセル電流は有意に増加した。電流-電圧関係より、この電流の逆転電位がCl⁻の平衡電位に近いことから、PGE₂により生じた膜電流はCl⁻電流であることが示唆された。これらの結果から、PGE₂はクリプト細胞に作用するが、AITCはクリプト細胞に直接作用してCl⁻分泌を引き起こすのではないことが示唆された。

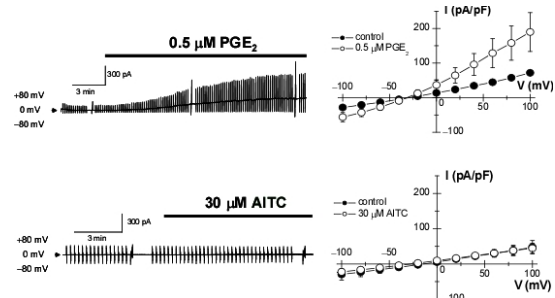


図1. AITCおよびPGE₂投与後のホールセル電流。

(7) AITC誘導性Cl⁻分泌におけるTRPA1チャンネルの寄与

AITCがTRPA1チャンネルを介してCl⁻分泌を生じるのかを検証するため、TRPA1欠損マウスを用いた。TRPA1マウスは岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授・富永真琴先生のご厚意により頂いた。野生型マウスから単離した大腸粘膜において、AITCはラットと同様にPGE₂を介してCl⁻分泌を引き起こすことを確認した。このAITC誘導性Cl⁻分泌はTRPA1阻害剤であるHC-030031により抑制された。次にTRPA1欠損マウスを用いて検討したところ、予想外にも野生型マウスと同様にAITC誘導性Cl⁻分泌が観測された。このCl⁻分泌もHC-030031により抑制された。これらの結果から、AITCはTRPA1以外の分子に作用してCl⁻分泌を生じるものと考えられた。

(8) PGE₂産生細胞の局在

大腸粘膜におけるPGE₂産生細胞の局在を調べるため、PGE₂合成酵素の局在を免疫蛍光染色法により検討した。その結果、mPGES1は粘膜筋板に、mPGES2はクリプト細胞に発現していることが明らかとなった。今後、AITCが作用するPGE₂産生細胞に関する解析を行う予定である。

以上の結果から、AITCは大腸粘膜のPGE₂産生細胞に作用し、産生されたPGE₂がクリプト細胞のEP4受容体に作用して、Cl⁻分泌を引き起こすことが示唆された。またこのAITCの作用にはTRPA1チャンネルが寄与していない可能性が考えられた(図2)。AITCがPGE₂を産生するメカニズムについては今後の検討課題である。

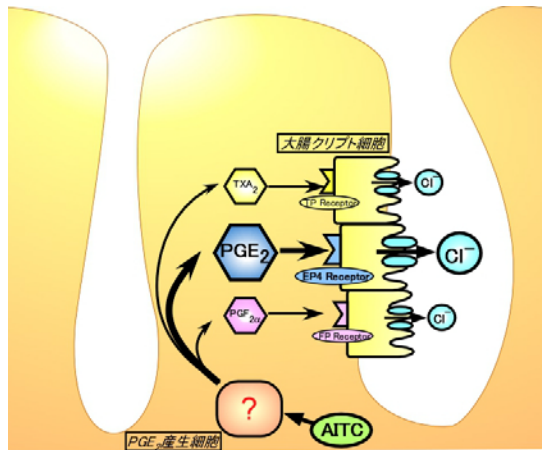


図2. 大腸粘膜におけるAITC誘導性Cl⁻分泌メカニズム

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8件)

1. Fujii T., Minagawa T., Shimizu T., Takeguchi N. & Sakai H. (2012) Inhibition of ecto-ATPase activity by curcumin in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Journal of Physiological Science* 62, 53-58. DOI: 10.1007/s12576-011-0176-5, 査読有
2. Fujita K., Fujii T., Shimizu T., Takeguchi N. & Sakai H. (2012) Role of cholesterol in functional association between K⁺-Cl⁻ cotransporter-3a and Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424, 136-140. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.089, 査読有
3. Ando-Akatsuka Y., Shimizu T., Numata T. & Okada Y. (2012) Involvements of the ABC protein ABCF2 and α -actinin-4 in regulation of cell volume and anion channels in human epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 227, 3498-3510. DOI: 10.1002/jcp.24050, 査読有
4. Hasegawa Y., Shimizu T., Takahashi N. & Okada Y. (2012) The apoptotic volume decrease is an upstream event of MAP kinase activation during staurosporine-induced apoptosis in HeLa cells. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 9363-9379. DOI: 10.3390/ijms13079363, 査読有
5. Shimizu T., Higuchi T., Fujii T., Nilius B. & Sakai H. (2011) Bimodal effect of alkalization on the polycystin transient receptor potential channel, PKD2L1. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 461, 507-513. DOI:

10.1007/s00424-011-0934-5, 査読有

6. Shimizu T. (2010) A new player in apoptosis triggered with anti-cancer drugs: the volume-sensitive outwardly-rectifying Cl⁻ channel. *Cancer Biology & Therapy* 9, 1-3. [Commentary], URL: <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.9.11.11992>, 査読有
7. Shibuya K, Fukuoka J, Fujii T, Shimoda E, Shimizu T., Sakai H, Tsukada K (2010) Increase in ouabain-sensitive K⁺-ATPase activity in hepatocellular carcinoma by overexpression of Na⁺, K⁺-ATPase α 3-isoform. *The European Journal of Pharmacology* 638:42-6. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.04.029, 査読有
8. Fujii T., Fujita K., Shimizu T., Takeguchi N. & Sakai H. (2010) The NH₂-terminus of K⁺-Cl⁻ cotransporter 3a is essential for up-regulation of Na⁺,K⁺-ATPase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399, 683-687. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.165084, 査読有

[学会発表] (計29件)

1. 清水貴浩, 高橋祐太, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: ヒト大腸癌細胞のトロンボキサンA₂誘導性細胞増殖におけるKv7.1K⁺チャネルの役割. 第90回日本生理学会大会, 2013, 3, 27-29, 東京.
2. 樋口大河, 清水貴浩, 藤井拓人, 竹口紀晃, Nilius Bernd, 酒井秀紀: 温度上昇によるTRPP3チャネル機能の変化. 第90回日本生理学会大会, 2013, 3, 27-29, 東京.
3. 清水貴浩, 家原貴大, 佐藤かお里, 藤井拓人, 竹口紀晃, 岡田泰伸, 酒井秀紀: TMEM16FはCa²⁺賦活化アニオンチャネルである. 生理学研究所研究会「粘膜防御における上皮膜輸送の役割とその破綻による疾病発症メカニズム」, 2012, 11, 30-2012, 12, 1, 岡崎.
4. 藤田恭輔, 清水貴浩, 藤井拓人, 竹口紀晃, Ursula Seidler, 酒井秀紀: マウス胃酸分泌細胞における細胞防御Cl⁻チャネルの分子実体の探索. 生理学研究所研究会「粘膜防御における上皮膜輸送の役割とその破綻による疾病発症メカニズム」, 2012, 11, 30-2012, 12, 1, 岡崎.
5. 二谷章大, 藤田恭輔, 藤井拓人, 清水貴浩, 竹口紀晃, 酒井秀紀: 胃酸のCl⁻分泌実体としてのSLC26A9の可能性. 日本薬学会北陸支部第124回例会, 2012, 11, 18, 富山.
6. 江口悠樹, 清水貴浩, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: TMC4チャネルの電気生理学的解析. 日本薬学会北陸支部第124

- 回例会, 2012, 11, 18, 富山.
7. 清水貴浩, 江口悠樹, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: Transmembrane channel-like protein (TMC) 4 の電気生理学的性質. 第 59 回中部日本生理学会, 2012, 11, 16-17, 岡崎.
 8. 藤田恭輔, 清水貴浩, 藤井拓人, 竹口紀晃, Ursula Seidler, 酒井秀紀: マウス胃酸分泌細胞における SLC26A7 の機能. 第 59 回中部日本生理学会, 2012, 11, 16-17, 岡崎.
 9. Shimizu T., Iehara T., Sato K., Fujii T., Sakai H., and Okada Y.: TMEM16F is an outwardly-rectifying Cl⁻ channel with distinct Ca²⁺ dependency. 2012 International Ion Channel Conference, 2012, 8, 24-27, Jeju, Korea.
 10. 清水貴浩, 藤井拓人, 竹口紀晃, Michel Lazdunski, Eric Lingueglia, 酒井秀紀: Brain Liver Intestine Na⁺ channel (BLINaC) の細胞外カチオン感受性. 第 89 回日本生理学会大会, 2012, 3, 29-31, 松本.
 11. 清水貴浩, 二谷章大, 藤田恭輔, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: SLC26A9 Cl⁻ チャネルの浸透圧感受性. 第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2011, 11, 24-25, 岡山.
 12. 森田彩香, 高橋祐太, 清水貴浩, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: ラット大腸Cl⁻分泌に対するア rilイソチオシアネートの作用機構. 第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2011, 11, 24-25, 岡山.
 13. 清水貴浩, 高橋祐太, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: トロンボキサンA₂により誘導されるヒト大腸癌細胞における Kv7.1 K⁺チャネルの役割. 生理学研究所研究会「上皮細胞の恒常性維持機構におけるイオン・物質輸送の新しい分子生理」, 2011, 11, 21-22, 岡崎.
 14. 清水貴浩, 二谷章大, 藤田恭輔, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: SLC26A9 Cl⁻チャネルの細胞容積変化による調節. 第 58 回中部日本生理学会大会, 2011, 11, 1-2, 福井.
 15. Shimizu T., Iehara T., Sato K., Fujii T., Takeguchi N., Okada Y., and Sakai H.: TMEM16F Cl⁻ channel shows low sensitivity to intracellular Ca²⁺. International Joint Meeting of Cellular and Molecular Physiology in Epithelia, 2011, 7, 30-31, Tokyo.
 16. Fujita K., Shimizu T., Futatsuya A., Fujii T., Takeguchi N., and Sakai H.: Electrophysiological properties of Cl⁻ channels in the basolateral membrane of parietal cells in isolated gastric glands of mice. International Joint Meeting of Cellular and Molecular Physiology in Epithelia, 2011, 7, 30-31, Tokyo.
 17. Higuchi T., Shimizu T., Fujii T., Takeguchi N., Nilius B., and Sakai H.: Bimodal sensitivity of TRPP3 channels to extracellular alkalization. International Joint Meeting of Cellular and Molecular Physiology in Epithelia, 2011, 7, 30-31, Tokyo.
 18. 森田彩香, 高橋祐太, 清水貴浩, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: フサビ成分ア rilイソチオシアネートによるラット大腸Cl⁻分泌の促進メカニズム. 日本薬学会第 131 年会, 2011, 3, 28-31, 静岡.
 19. 清水貴浩, 家原貴大, 佐藤かお里, 藤井拓人, 竹口紀晃, 岡田泰伸, 酒井秀紀: TMEM16F クロライドチャネルの細胞内Ca²⁺感受性. 第 88 回日本生理学会大会, 2011, 3, 28-30, 横浜.
 20. 藤田恭輔, 清水貴浩, 二谷章大, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: マウス胃酸分泌細胞における基底側クロライドチャネルの電気生理学的性質. 第 88 回日本生理学会大会, 2011, 3, 28-30, 横浜.
 21. 樋口大河, 清水貴浩, 藤井拓人, 竹口紀晃, Bernd Nilius, 酒井秀紀: TRPP3 チャネルの細胞外アルカリ感受性における 2 つのメカニズム. 第 88 回日本生理学会大会, 2011, 3, 28-30, 横浜.
 22. 清水貴浩, 樋口大河, 藤井拓人, 竹口紀晃, Bernd Nilius, 酒井秀紀: TRPP3 カチオンチャネルの細胞外 pH による活性調節機構. 日本薬学会第 131 年会, 2011, 3, 28-31, 静岡.
 23. 高橋祐太, 清水貴浩, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: トロンボキサンA₂によるヒト大腸がん細胞Kv7.1 K⁺チャネルのアップレギュレーション. 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2010, 11, 29-30, 富山.
 24. 藤田恭輔, 清水貴浩, 二谷章大, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: マウス胃酸分泌細胞に発現する SLC26Cl⁻チャネルの電気生理学的性質. 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2010, 11, 29-30, 富山.
 25. 家原貴大, 清水貴浩, 藤井拓人, 藤田恭輔, 竹口紀晃, 酒井秀紀: 新規Cl⁻チャネルファミリーに属する TMEM16F の細胞内Ca²⁺感受性. 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2010, 11, 29-30, 富山.
 26. 清水貴浩, 家原貴大, 藤井拓人, 竹口紀晃, 岡田泰伸, 酒井秀紀: TMEM16F の電気生理学的性質. 生理研研究会「極性細

- 胞の病態生理解明に向けた多角的アプローチ」, 2010, 11, 4-5, 岡崎.
27. 清水貴浩, 樋口大河, 藤井拓人, Bernd Nilius, 酒井秀紀: TRPP3 チャネルのアルカリ感受性. 第 57 回中部日本生理学会大会, 2010, 10, 15-16, 豊明.
 28. 清水貴浩, 佐藤かお里, 家原貴大, 藤井拓人, 酒井秀紀, 岡田泰伸: TMEM16 クロライドチャネルファミリーの機能解析. 第 87 回日本生理学会大会, 2010, 5, 19-21, 盛岡.
 29. 藤田恭輔, 清水貴浩, 藤井拓人, 竹口紀晃, 酒井秀紀: 非酵素的に単離したマウス胃腺の酸分泌細胞における塩素イオンの膜電位に対する役割. 第 87 回日本生理学会大会, 2010, 5, 19-21, 盛岡.

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phaphyl/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 貴浩 (TAKAHIRO SHIMIZU)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) ・
准教授

研究者番号: 40353437