

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 13 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790306

研究課題名（和文） 腸管におけるアクアポリンの役割およびその発現機構の解明

研究課題名（英文） The role of aquaporin in the intestine in water transport

研究代表者

五十嵐 信智（IKARASHI NOBUTOMO）

星薬科大学・助教

研究者番号：40409363

研究成果の概要（和文）：

本研究では、腸管での水の輸送を劇的に変化させる瀉下剤をツールとして用いて、大腸におけるアクアポリン 3（AQP3）の機能とその発現制御機構の解明を試みた。本研究の結果から、大腸の AQP3 の発現量や機能の変化が便の水分量を変動させる極めて重要な因子であることが明らかとなった。今後、大腸 AQP3 をターゲットとした新たな瀉下剤や止瀉剤の開発が可能になるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the role of aquaporin-3 (AQP3) in the intestine in water transport. In this study, it has been revealed that the fecal water content in the colon is controlled by the transport of water from the luminal side to the vascular side, which is mediated by AQP3. Thus, new laxatives and antidiarrheals targeting intestinal AQP3 may be developed in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：アクアポリン、下痢、便秘、大腸、下剤

1. 研究開始当初の背景

食の欧米化や高齢者の増加、心因的ストレスの増加などにより、近年、便秘症の患者が急増している。便秘症の患者には瀉下剤による治療が行われているが、その治療効果は十分なものとはいえず、特に、女性では約 50% が便秘症で苦しんでいるとされている。また、便秘症を放置しておくことで大腸癌や結腸癌のリスクが増大することが知られており、便秘症に対して、これまでにない新しい対策を講じることが急務となっている。さらに最近では、緩和ケアを目的としてモルヒネなどのオピオイドを服用している患者が増加してい

るが、服用患者のほぼ 100% に便秘が認められる。このような場合においても、種々の瀉下剤が用いられているが、依然、患者の QOL は低く、新規メカニズムを有する瀉下剤の開発が切望されている。

近年、体内の水の輸送にアクアポリン（AQP）が重要な役割を担っていることが明らかになってきた。AQP は浸透圧勾配により、水やグリセリンを選択的に透過させる水チャンネルであり、ヒトにおいて AQP0 から AQP12 までの 13 種類が様々な臓器に発現することが知られている。腸管には多数の AQP ファミリーの発現が認められており、少なく

とも AQP1、AQP2、AQP3、AQP4、AQP7、AQP8、AQP9、AQP10 の 8 種類の存在が知られている。しかしながら、腸管における AQP を介した水の輸送については、ほとんど解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、便の水分量を最終的にコントロールしている大腸に着目し、大腸に最も優位に発現している AQP3 の水の輸送における役割について、便の水分量を劇的に変化させる瀉下剤をツールとして用いて解析を行った。

3. 研究の方法

(1) MgSO₄ の瀉下作用における大腸 AQP3 の役割

ラットに MgSO₄ を経口投与し、経時的に糞中水分量を測定した。また、大腸を摘出し、浸透圧調節関連遺伝子 sodium myo-inositol transporter (SMIT) の mRNA 発現量および AQP3 のタンパク質発現量を解析した。

HT-29 細胞に MgSO₄、NaCl、種々のマグネシウム塩あるいは硫酸塩を添加し、AQP3 の発現量を解析した。さらに、MgSO₄ を添加した際の細胞内 Mg 濃度、アデニル酸シクラーゼ (AC) 活性、プロテインキナーゼ A (PKA) 活性、cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化の程度を調べた。

(2) ビサコジルの瀉下作用における大腸 AQP3 の役割

ラットにビサコジルを経口投与し、経時的に糞中水分量を測定した。また、大腸を摘出し、AQP3 のタンパク質発現量を解析した。さらに、大腸の炎症性サイトカインの発現量、マクロファージの活性化の程度およびプロスタグランジン E₂ (PGE₂) 濃度を調べた。

Raw264.7 細胞にビサコジルを添加し、培地中 TNF α 濃度および PGE₂ 濃度を測定した。

HT-29 細胞にビサコジル、TNF α あるいは PGE₂ を添加し、AQP3 の発現量を解析した。

ラットにインドメタシンを腹腔内投与した後、ビサコジルを経口投与した際の糞中水分量、大腸 AQP3 のタンパク質発現量および PGE₂ 濃度を調べた。

(3) AQP3 活性化阻害剤の大腸での水の輸送に及ぼす影響

ラットに HgCl₂ あるいは CuSO₄ を直腸内投与し、糞中水分量、大腸における SMIT の mRNA 発現量および AQP3 のタンパク質発現量を解析した。

(4) MgSO₄ とビサコジルとの併用効果

ラットに MgSO₄、ビサコジルあるいはこ

れらを併用経口投与し、糞中水分量、大腸における SMIT の mRNA 発現量および AQP3 のタンパク質発現量を解析した。

4. 研究成果

(1) MgSO₄ の瀉下作用における大腸 AQP3 の役割および AQP3 発現変動メカニズムの解明

浸透圧性下剤 MgSO₄ の瀉下作用における大腸 AQP3 の役割について検討した。まず、ラットに MgSO₄ を経口投与し、糞中水分量の変動と大腸内浸透圧あるいは AQP3 発現量の変動との関係について検討した。その結果、糞中水分量は MgSO₄ 投与により、2 時間目以降有意に増加し、投与 4 時間後から 8 時間後にかけて重度の下痢が発生することがわかった。それに対して、大腸内浸透圧は 2 時間後にはピークに達し、浸透圧の変動パターンと下痢発生のパターンが異なることが明らかとなった (図 1)。このことより、MgSO₄ による瀉下作用は、従来から考えられている腸管内浸透圧の上昇のみでは説明できないことが明らかとなった。一方、大腸 AQP3 のタンパク質発現量は MgSO₄ 投与により経時的に増加し、この変化と下痢発生の経時変化が符合することがわかった (図 1)。以上の結果から、MgSO₄ の瀉下作用が単に浸透圧の変化のみによってもたらされるものではなく、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現増加を伴って、極めて合理的に生じている可能性が示唆された。

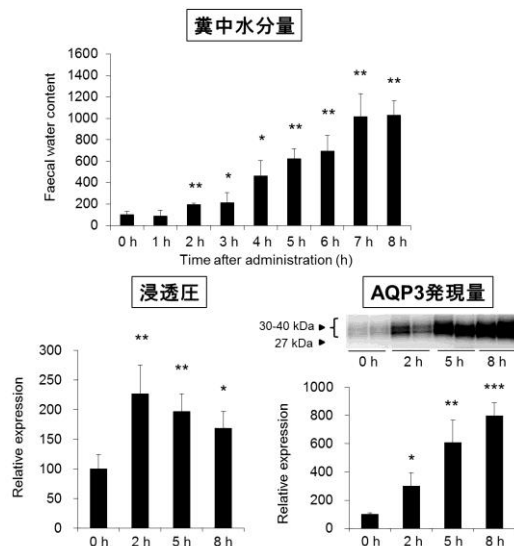


図 1. MgSO₄ 投与による糞中水分量、浸透圧および大腸 AQP3 の発現変化

次に、MgSO₄ による大腸 AQP3 の発現増加メカニズムをヒト結腸癌由来 HT-29 細胞を用いて調べた。MgSO₄ は水溶液中で Mg²⁺ と SO₄²⁻ に解離し、浸透圧を上昇させる。一方、AQP3 は浸透圧の上昇に伴い、発現量が

増加する。そこで、MgSO₄による AQP3 の発現増加が浸透圧の上昇に起因するものであるか否かを浸透圧上昇物質として NaCl を用いて検討した。その結果、MgSO₄ による AQP3 の発現増加は、浸透圧の上昇に起因したものではないことが明らかとなった。

続いて、MgSO₄による AQP3 の発現増加作用が Mg²⁺あるいは SO₄²⁻に起因するものであるか否かについて、種々のマグネシウム塩および硫酸塩を用いて検討した。その結果、MgSO₄による AQP3 の発現増加には SO₄²⁻は関与せず、Mg²⁺のみが重要な役割を担っていることが明らかとなった。

細胞内に取り込まれた Mg は、AC を活性化することが知られている。さらに、AC の活性化は cAMP を増加させ、PKA の活性化を介して核内転写因子 CREB をリン酸化することが知られている。リン酸化された CREB は、AQPs の転写を促進し、発現量を増加させる。そこで、MgSO₄による AQP3 発現増加メカニズムについて、この経路に焦点を絞り検討した。その結果、MgSO₄ は細胞内 Mg 濃度を増加させること、AC および PKA を活性化すること、および CREB のリン酸化を亢進することが明らかとなった。

以上の結果から、MgSO₄は細胞内 Mg 濃度を増加させることにより、AC 活性、PKA 活性および CREB のリン酸化を亢進させ、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 を増加させることが明らかとなった。

(2) ビサコジルの瀉下作用における大腸 AQP3 の役割および AQP3 発現変動メカニズムの解明

ビサコジルの瀉下作用における大腸 AQP3 の役割を検討した。ラットにビサコジルを経口投与したところ、大腸の AQP3 のタンパク質発現量が投与 2 時間後から著明に低下した。また、AQP3 の発現低下と下痢発生の経時変化が相関していた (図 2)。以上の結果から、ビサコジルは大腸の AQP3 の発現量を低下させることにより、腸管側から血管側への水の移動を抑制し、瀉下作用を示している可能性が示唆された。

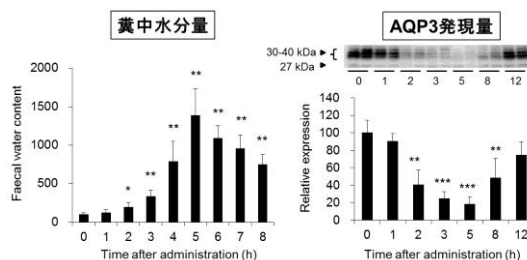


図 2. ビサコジル投与による糞中水分量および大腸 AQP3 の発現変化

次に、ビサコジルがどのようなメカニズム

で AQP3 の発現量を低下させるかについて検討した。

まず、ビサコジルが直接、大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現量を低下させた可能性について HT-29 細胞を用いて調べた。その結果、ビサコジルが直接 AQP3 の発現量を低下させている可能性は低いことが明らかとなった。

続いて、ビサコジルが間接的に大腸の AQP3 の発現量を低下させた可能性について検討した。ビサコジルは大腸マクロファージを活性化すること、マクロファージが活性化すると炎症性サイトカインの分泌が亢進し、シクロオキシゲナーゼ 2 (COX2) の発現増加を介して PGE₂ が分泌されること、および TNF-α や PGE₂ は AQPs の発現量を低下させることが知られている。そこで、ビサコジルが直接マクロファージを活性化し、TNF-α や PGE₂ を分泌させるか否かをマクロファージ Raw264.7 細胞を用いて検討した。その結果、ビサコジルはマクロファージを直接活性化し、TNF-α および PGE₂ の産生および分泌を亢進することがわかった。さらに、PGE₂ が HT-29 細胞の AQP3 の発現を著明かつ速やかに低下させることが明らかとなった。

最後に、COXs 阻害剤インドメタシンをラットに前処置することにより、ビサコジルの瀉下作用が減弱するかどうかについて調べた。その結果、インドメタシンを前投与することにより、ビサコジルの瀉下作用が抑制されるとともに、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 タンパク質発現量の低下および PGE₂ 濃度の上昇がいずれも抑制されることがわかった (図 3)。このことより、ビサコジル投与による大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の急速かつ著明な発現低下には、PGE₂ が関与している可能性が確認できた。

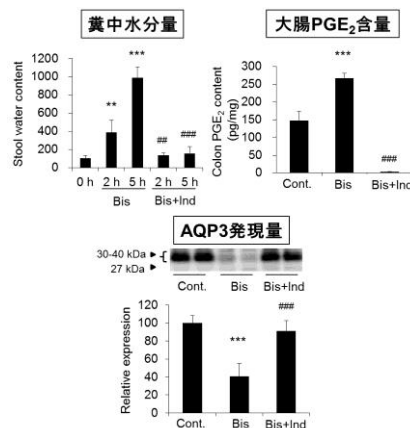


図 3. インドメタシンを前処置し、ビサコジルを投与した際の糞中水分量、大腸 PGE₂ 含量および AQP3 のタンパク質発現量

以上の結果から、ビスコジルは直接、大腸のマクロファージを活性化させることにより PGE₂ の産生および分泌を亢進すること、およびこのマクロファージの産生する PGE₂ がパラクライン因子として大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現を低下させていることが明らかとなった。

(3) AQP3 活性化阻害剤の大腸での水の輸送に及ぼす影響

上述したように、大腸の AQP3 の発現量の変動により水の輸送能が変動することが明らかとなったものの、AQP3 の発現量ではなく、AQP3 の機能を変化させた場合、大腸の水の輸送能にどのような影響を及ぼすかについては全く不明であった。そこで、AQP3 の機能を阻害した際に大腸における水の輸送能がどのように変化するかについて AQP3 活性化阻害剤である HgCl₂ および CuSO₄ を用いて検討した。HgCl₂ および CuSO₄ をラットに直腸内投与した結果、投与 1 時間以内に下痢が発生することがわかった。一方、これらは大腸内浸透圧および AQP3 の発現量に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

以上の結果から、大腸粘膜上皮細胞に局在する AQP3 の機能を阻害すると下痢が発生することが明らかとなった。また、生理的条件下では AQP3 を介して水は管腔側から血管側に輸送され、糞中水分量が調節されていることも確認できた。

(4) MgSO₄ とビスコジルとの併用効果およびそのメカニズムの解明

これまで、複数の瀉下剤を併用した場合、瀉下作用が増強するか否かについての明確なエビデンスはなかった。そこで、MgSO₄ およびビスコジルを併用した場合、瀉下作用が増強するか否かを検討した。その結果、MgSO₄ とビスコジルを併用しても糞中水分量の変動パターンおよび変化率には両薬剤の相加効果あるいは相乗効果は見られず、ビスコジル単独投与時のそれらとほぼ同様であることが明らかとなった。一方、併用投与した際の大腸内浸透圧は Control 群に比べて高く、MgSO₄ 単独投与時とほぼ同程度であることがわかった。また、併用投与時の大腸の AQP3 のタンパク質発現量は Control 群に比べて有意に低く、この低下率はビスコジル単独投与時とほぼ同程度であることが明らかとなった (図 4)。

以上のことから、MgSO₄ とビスコジルを併用した際の瀉下作用は MgSO₄ 単独時よりも減弱し、ビスコジル単独時の場合とほぼ同程度であることが明らかとなった。さらに、MgSO₄ とビスコジルを併用した場合の大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現パターンが、

ビスコジル単独投与時とほぼ同様になることがその理由として考えられた。

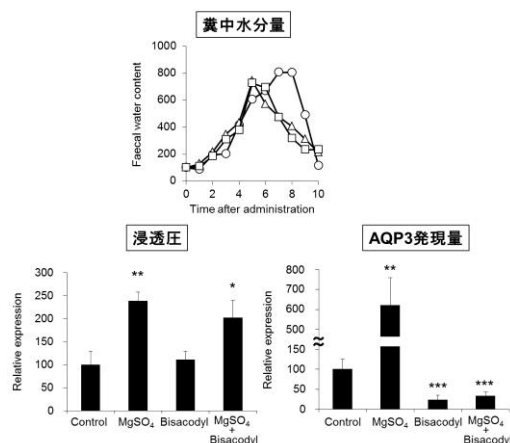


図 4. MgSO₄ (○)、ビスコジル (□) あるいは MgSO₄ およびビスコジル併用時 (△) における糞中水分量、浸透圧および大腸 AQP3 の発現変化

本研究の結果から、浸透圧性下剤および大腸刺激性下剤の瀉下作用において、大腸の AQP3 の発現量が重要な役割を担っていることが明らかとなった。加えて、大腸 AQP3 の機能を阻害すると、下痢が発生することも明らかとなった。AQP3 はヒトの腸管において最も多く発現している AQP である。今後、腸管 AQP3 の発現および機能と水の移動についてさらなる研究を展開することにより、AQP をターゲットとした新たな瀉下剤や止瀉剤の開発が可能になるものと考えられる。

さらに本研究により、瀉下剤の併用が必ずしも瀉下作用を増強しないことが初めて明らかとなった。薬物の服用数の増加は薬物間相互作用の増加につながるため、安易な併用は避けるべきである。今後、瀉下剤に対してもその治療効果に対するエビデンスを明確にし、適正使用を図ることが必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

N. Ikarashi, T. Mochiduki, A. Takasaki, T. Ushiki, K. Baba, M. Ishii, T. Kudo, K. Ito, T. Toda, W. Ochiai, and K. Sugiyama. A mechanism by which the osmotic laxative magnesium sulphate increases the intestinal aquaporin 3 expression in HT-29 cells, *Life Sci.*, 88, 194-200 (2010).

N. Ikarashi, K. Baba, T. Ushiki, R. Kon, A. Mimura, T. Toda, M. Ishii, W. Ochiai, and K. Sugiyama. The laxative effect of bisacodyl

is attributable to decreased aquaporin-3 expression in the colon induced by increased PGE₂ secretion from macrophages, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver*, 301, G887-G895 (2011).

N. Ikarashi, T. Ushiki, T. Mochiduki, T. Toda, T. Kudo, K. Baba, M. Ishii, K. Ito, W. Ochiai, and K. Sugiyama. Effects of magnesium sulphate administration on aquaporin 3 in rat gastrointestinal tract, *Biol. Pharm. Bull.*, 34, 238-242 (2011).

N. Ikarashi, A. Mimura, R. Kon, T. Iizasa, M. Omodaka, C. Nagoya, M. Ishii, T. Toda, W. Ochiai, and K. Sugiyama. The concomitant use of an osmotic laxative, magnesium sulphate, and a stimulant laxative, bisacodyl, does not enhance the laxative effect, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 45, 73-78 (2012).

N. Ikarashi, R. Kon, T. Iizasa, N. Suzuki, R. Hiruma, K. Suenaga, T. Toda, M. Ishii, M. Hoshino, W. Ochiai, and K. Sugiyama. Inhibition of aquaporin-3 water channel in the colon induces diarrhea, *Biol. Pharm. Bull.*, 35, 957-962 (2012).

〔学会発表〕（計4件）

五十嵐信智, 今理紗子, 三村綾子, 飯笹朋彦, 面高みどり, 名古屋智香, 石井 敬, 戸田雄大, 落合 和, 杉山 清, 浸透圧性下剤硫酸マグネシウムと大腸刺激性下剤ピサコジルを併用しても、瀉下作用は増強しない, 医療薬学フォーラム 2012, 2012年7月14-15日, 福岡

五十嵐信智, 大腸におけるアクアポリン3の機能解析とその発現制御機構の解明, 第56回日本薬学会関東支部大会, 2012年10月13日, 東京

今理紗子, 五十嵐信智, 楠 欣己, 石井 敬, 落合 和, 杉山 清, 大腸のアクアポリン3の活性が低下すると下痢が発症する, 第85回日本生化学大会, 2012年12月14-16日, 福岡

五十嵐信智, 今理紗子, 楠 欣己, 石井 敬, 落合 和, 杉山 清, ビサコジルは大腸マクロファージからのPGE₂の分泌亢進を介して、大腸粘膜上皮細胞のアクアポリン3の発現を低下させることにより下痢を引き起こす, 第85回日本生化学大会, 2012年12月14-16日, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐信智 (IKARASHI NOBUTOMO)

星薬科大学・助教

研究者番号：40409363