

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790226

研究課題名(和文)膵臓外分泌細胞に存在する陰イオンチャンネル蛋白の構造機能協関

研究課題名(英文)Structure-function relationships of anion channels in exocrine pancreas

研究代表者

林 美樹夫(HAYASHI, Mikio)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：10368251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膵液分泌に重要な役割を果たす重炭酸イオン輸送を担うイオンチャンネルの生理機能と分子基盤を明らかにするため、膵臓導管細胞に存在するイオンチャンネルの電気生理学的同定を試みた。アデノシンは膵臓導管細胞の上皮膜イオン輸送およびClイオン電流を濃度依存性に増加させた。アデノシンA2B受容体は導管細胞の管腔側膜に局在していた。以上の結果は、アデノシンは管腔側膜に存在するアデノシンA2B受容体を介してcAMP活性化型Clチャンネルを活性化し、膵臓導管細胞の重炭酸イオン輸送を制御することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Adenosine modulates a wide variety of biological processes via adenosine receptors. In the exocrine pancreas, adenosine regulates transepithelial anion secretion in duct cells and is considered to play a role in acini-to-duct signaling. To identify the functional adenosine receptors and Cl channels important for anion secretion, we herein performed experiments on pancreatic duct cells using electrophysiological techniques. The addition of adenosine increased the transepithelial ion transport and whole-cell Cl currents in duct cells. Immunohistochemical analysis showed that the A2B receptors localized in the luminal membranes of the pancreatic ducts. These results indicate that luminal adenosine regulates anion secretion by activating cAMP-activated Cl channels via adenosine A2B receptors on the luminal membranes of the pancreatic duct cells.

研究分野：生理学

キーワード：イオンチャンネル 膵臓

1. 研究開始当初の背景

膵臓は、重炭酸イオンに富む膵液を分泌し、十二指腸に流入する胃酸を中和する。重炭酸イオン分泌に最も寄与している膵臓導管細胞には、セクレチンやVIPによるcAMP/cAMP依存性タンパクキナーゼ介在性、およびアセチルコリンや細胞外ATPによるCa²⁺/カルモジュリン介在性の刺激性分泌機構が備わっている。分泌上皮細胞では、イオン輸送蛋白が血管側膜と管腔側膜に極性をもって分布することで、一方向性のイオン輸送が可能となっている。管腔側膜の陰イオンチャンネルは陰イオン交換輸送体と共役し、膵液分泌の律速段階となっている。血管側膜のK⁺チャンネルは管腔側膜からの陰イオン輸送の駆動力維持に必須である。

膵臓や唾液腺などの分泌上皮細胞にはCa²⁺依存性K⁺チャンネルが機能発現し、刺激性分泌に役割を果たす[1]。申請者は、膵臓導管細胞および唾液腺細胞に機能発現するK⁺チャンネルの分子基盤を解明していた[2-4]。その一方で、重炭酸イオン輸送を担う膜蛋白として、cAMP活性型Cl⁻チャンネル[5]、Ca²⁺活性型Cl⁻チャンネル[6]、陰イオン交換輸送体[7]、bestrophin-2[8]などが提唱されているが、重炭酸イオン輸送体の分子機構は解明されていない。

膵液中の重炭酸イオン濃度は80-150 mMにまで達する[9]。細胞内液中の濃度は約20 mMであることから、重炭酸イオン選択性の高い輸送体の存在が予想されている。

膵液分泌は消化管ホルモン、神経伝達物質および腺房細胞から放出されるATPにより制御されている。膵管管腔に放出されたATPはエクトヌクレオチダーゼ(CD39およびCD73)によりアデノシンにまで加水分解される[10]。そして、アデノシン受容体介在性の細胞内情報伝達系が導管細胞における膵液分泌を制御している可能性が示唆されている[11]。

2. 研究の目的

膵液分泌に重要な役割を果たす重炭酸イオン輸送を担うイオンチャンネルの生理機能と分子基盤を明らかにするため、膵臓導管細胞に存在するイオンチャンネルの電気生理学的同定を試みた。さらに、イオンチャンネル活性を担うアデノシン受容体の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵臓導管細胞(Capan-1細胞)は20%ウシ胎仔血清およびグルタマックスを含むIscove改変Dulbecco培地中で培養した。Snapwell(Costar 3801, Corning)を用いて、Capan-1単層標本を作製した。Ussingチェンバー(P2300; Easymount Chamber System, Physiologic Instruments)を用いて、Capan-1単層標本の経上皮膜電位測定を行った。管腔側および基底外側には以下の組成(mM)からなる細胞外液を満たした。細胞

外液はNaCl (115), KCl (5), CaCl₂ (1), MgCl₂ (1), NaHCO₃ (25), HEPES (10), D-glucose (10)を含み、5% CO₂/95% O₂混合ガスを通気してpHを7.4に調整した。細胞外液は37°Cに保った。経上皮膜電位差(V_{te})は3 M KCl含有アガロースを接続したAg/AgCl電極と増幅器(CEZ-9100, 日本光電)を用いて測定した。電流パルス(18 μA/cm²)を5秒毎に与え、電位の変化分から経上皮膜抵抗(R_{te})および短絡電流(I_{sc})を算出した。

(2) グラミシジンパッチクランプ法を用いて、Capan-1細胞における全細胞電流を測定した。グラミシジンは0.1 mg/mlになるように電極内液に溶解した。電極内液はKCl (150)およびHEPES (10)を含み、pHを7.4に調整した。細胞外液はNaCl (150), CaCl₂ (1), HEPES (10)を含み、pHを7.4に調整した。全細胞電流は増幅器(EPC 800, HEKA)を用いて測定した。

(3) モルモットの膵臓から導管を単離した。動物実験は関西医科大学動物実験委員会の承認を得た方法で実施した。導管は外径30-60 μmの部位を使用した。顕微鏡下で導管を切り開き、管腔側膜を露出した。グラミシジンパッチクランプ法を用いて、導管細胞における全細胞電流を測定した。

(4) Maxwell 16 System (Promega)を用いてCapan-1細胞からRNAを抽出した。逆転写酵素(SuperScript III RT; Invitrogen)を用いてcDNAを合成した。A_{2B}受容体特異的オリゴヌクレオチドプライマー(5'-CTGCAGACGCCCACTACTAC-3', 5'-GAGCTGGCTGGAAAAGAGTGAC-3')とPhusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes)を用いてPCR反応をした。増幅されたPCRフラグメントはサブクローニングし、塩基配列を確認した(ABI 3100 Genetic Analyzer; Applied Biosystems)。

(5) 免疫組織化学法を用いて、Capan-1単層上皮およびラット膵臓導管細胞におけるイオンチャンネルおよび受容体の分布を観察した。標本は4%パラホルムアルデヒドを用いて固定し、0.2% Triton X-100を用いて膜の浸透性を高める処理をした。自家蛍光は0.1 M Tris-glycineを用いて減弱させた。パラフィン包埋切片の抗原はHistoVT-ONE(ナカライテスク)を用いて賦活化した。二次抗体を作製した動物種の血清(2%)を用いてブロッキング処理をした。一次抗体(100倍~800倍希釈)は4°Cで一晩反応させた。Alexa488およびAlexa568標識二次抗体(Molecular Probes)を用いて蛍光標識した。核は4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI, 同仁化学研究所)を用いて染色した。抗A_{2B}受容体抗体はAlomone社から抗ezrin抗体はLab Vision社から購入した。標本は共焦点顕微鏡(LSM510 META, Carl Zeiss)を用いて、観察した。

4. 研究成果

(1) アデノシン受容体が膵液分泌を制御する可能性を検証するために、Capan-1 単層標本の経上皮膜電位を測定した。静止状態における経上皮膜電位 (V_{te}) は -1.14 ± 0.05 mV (60 例) であった。これは陰イオンの分泌、あるいは陽イオンの吸収を意味する。経上皮膜抵抗は $400 \pm 14 \Omega \text{ cm}^2$ 、短絡電流 (I_{sc}) は $2.42 \pm 0.08 \mu\text{A/cm}^2$ であった。管腔側にアデノシンを投与すると、経上皮膜電位は濃度依存性に増加し、その EC_{50} 値は $11.6 \pm 6.5 \mu\text{M}$ であった (図 1; 4 例)。

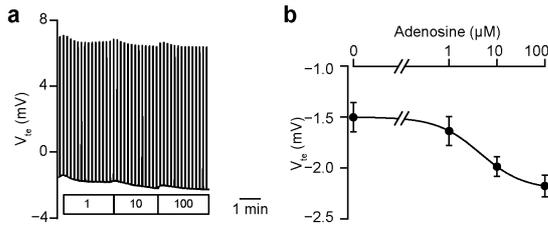


図 1 Capan-1 単層標本の経上皮膜電位におけるアデノシンの影響

アデノシンによる経上皮膜電位および短絡電流の増加は、管腔側に cAMP 活性化型 Cl⁻ チャンネルの遮断薬 (20 μM CFTRinh-172) を投与すると抑制された。(図 2; 5 例)。

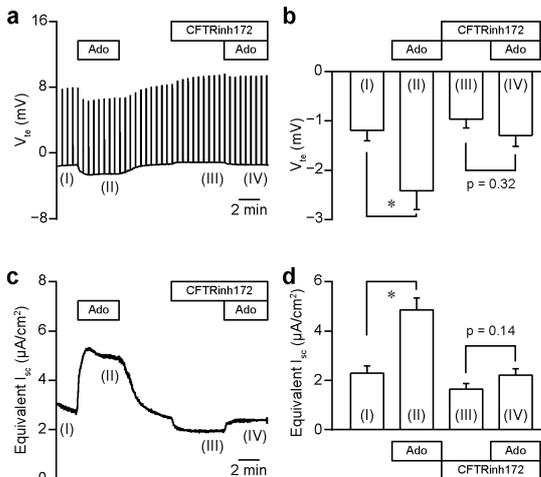


図 2 アデノシンによる短絡電流における CFTRinh-172 の抑制効果

管腔側の選択的アデノシン A_{2B} 受容体作動薬の BAY60-6583 (10 μM) は経上皮膜電流を増加させた (6 例)。またアデノシン作動性電流は、選択的アデノシン A_{2B} 受容体拮抗薬の PSB603 (1 μM) により抑制された (9 例)。

(2) グラミシジン パッチクランプ法を用いて、Capan-1 細胞におけるアデノシンの影響を検討した。細胞外のアデノシンは Capan-1 細胞の陰イオン電流を濃度依存性に増加させ、その EC_{50} 値は $9.2 \pm 5.3 \mu\text{M}$ だった (図 3a,b; 5 例)。また、アデノシン A_{2B} 受容体作動薬の BAY60-6583 (10 μM) は陰イオン電流を増加させた。その電流は cAMP

活性化型 Cl⁻ チャンネル抑制薬 (CFTRinh-172) により抑制された (図 3c,d; 13 例)。BAY 60-6583 による活性化は 68% の細胞で観察された。電流の逆転電位から細胞内の Cl⁻ イオン濃度を算出すると、51 mM だった (9 例)。

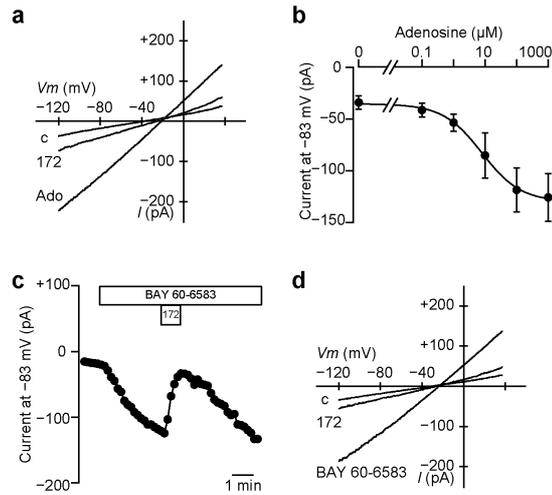


図 3 Capan-1 全細胞電流におけるアデノシンの影響

(3) モルモットの新鮮分離膵臓導管細胞におけるアデノシンの影響を検討した。細胞外のアデノシンは陰イオン電流を濃度依存性に増加させ、その EC_{50} 値は $21.2 \pm 11.7 \mu\text{M}$ だった (図 4; 5 例)。

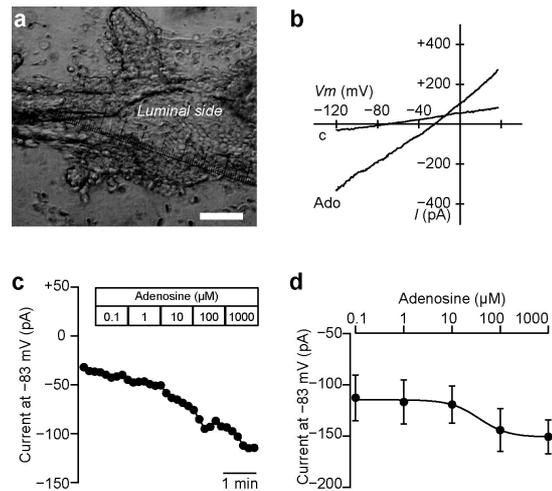


図 4 モルモット膵臓導管全細胞電流におけるアデノシンの影響

(4) Capan-1 から抽出した mRNA に A_{2B} 受容体の発現を認めた (図 5)。増幅された 676 bp の PCR フラグメントはヒト A_{2B} 受容体の塩基配列 (NM_000676) と完全に一致した。

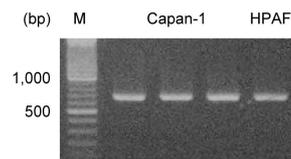


図 5 Capan-1 における A_{2B} 受容体の発現

(5) アデノシン A_{2B} 受容体は細胞膜裏打ちタンパク質の ezrin とラット膵臓導管細胞および Capan-1 細胞の管腔側膜において共局在することを免疫組織学的に認めた (図 6)

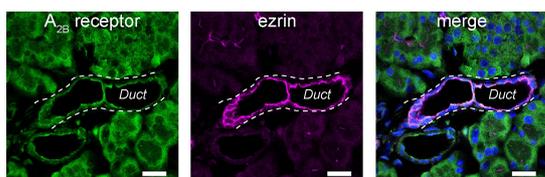


図 6 ラット膵臓導管における A_{2B} 受容体の分布

以上の結果は、アデノシンは管腔側膜に存在するアデノシン A_{2B} 受容体を介して cAMP 活性化型 Cl⁻ チャンネルを活性化し、膵臓導管細胞の重炭酸イオン輸送を制御することを示唆する [12]。また、アデノシンは炎症性疾患、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、神経変性疾患などに広く関与することから、アデノシンが膵炎や膵癌などの膵臓病の進行に中心的な役割を果たす可能性がある。

今後は、新鮮分離膵臓導管細胞の管腔側膜に機能発現する陰イオンチャンネルおよび K⁺ イオンチャンネルの電気生理学的同定および分子基盤が解明され、膵液分泌機構の理解が深まることが期待される [13, 14]。

< 引用文献 >

- Maruyama, Y., Gallacher, D. V. & Petersen, O. H. Voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channel in baso-lateral acinar cell membranes of mammalian salivary glands. *Nature* 302, 827–829 (1983).
- Takahata, T., Hayashi, M. & Ishikawa, T. SK4/IK1-like channels mediate TEA-insensitive, Ca²⁺-activated K⁺ currents in bovine parotid acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C127–144 (2003).
- Hayashi, M., Komazaki, S. & Ishikawa, T. An inwardly rectifying K⁺ channel in bovine parotid acinar cells: possible involvement of Kir2.1. *J Physiol* 547, 255–269 (2003).
- Hayashi, M., Kunii, C., Takahata, T. & Ishikawa, T. ATP-dependent regulation of SK4/IK1-like currents in rat submandibular acinar cells: possible role of cAMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C635–646 (2004).
- Park, H. W. *et al.* Dynamic regulation of CFTR bicarbonate permeability by [Cl⁻]_i and its role in pancreatic bicarbonate secretion. *Gastroenterology* 139, 620–631 (2010).
- Zsembery, A., Strazzabosco, M. & Graf, J. Ca²⁺-activated Cl⁻ channels can substitute for CFTR in stimulation of pancreatic duct

bicarbonate secretion. *FASEB J* 14, 2345–2356 (2000).

Ko, S. B. *et al.* Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nat Cell Biol* 6, 343–350 (2004).

Yu, K., Lujan, R., Marmorstein, A., Gabriel, S. & Hartzell, H. C. Bestrophin-2 mediates bicarbonate transport by goblet cells in mouse colon. *J Clin Invest* 120, 1722–1735 (2010).

Novak, I. *et al.* Pancreatic bicarbonate secretion involves two proton pumps. *J Biol Chem* 286, 280–289 (2011).

Yegutkin, G. G., Samburski, S. S., Jalkanen, S. & Novak, I. ATP-consuming and ATP-generating enzymes secreted by pancreas. *J Biol Chem* 281, 29441–29447 (2006).

Novak, I., Hede, S. E. & Hansen, M. R. Adenosine receptors in rat and human pancreatic ducts stimulate chloride transport. *Pflügers Arch* 456, 437–447 (2008).

Hayashi, M., Inagaki, A., Novak, I. & Matsuda, H. The adenosine A_{2B} receptor is involved in anion secretion in human pancreatic duct Capan-1 epithelial cells. *Pflügers Arch* (2016) in press.

Hayashi, M., Wang, J., Hede, S. E. & Novak, I. An intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel is important for secretion in pancreatic duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 303, C151–159 (2012).

Hayashi, M. & Novak, I. Molecular basis of potassium channels in pancreatic duct epithelial cells. *Channels (Austin)* 7, 432–441 (2013).

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 3件)

Hayashi, M., Inagaki, A., Novak, I. & Matsuda, H. The adenosine A_{2B} receptor is involved in anion secretion in human pancreatic duct Capan-1 epithelial cells. *Pflügers Arch* (2016). 査読有、印刷中
DOI: 10.1007/s00424-016-1806-9

Hayashi, M. & Novak, I. Molecular basis of potassium channels in pancreatic duct epithelial cells. *Channels (Austin)* 7, 432–441 (2013). 査読有
DOI: 10.4161/chan.26100.

Hayashi, M., Wang, J., Hede, S. E. & Novak, I. An intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel is important for secretion in pancreatic duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 303, C151–159 (2012). 査読有、DOI: 10.1152/ajpcell.00089.2012.

〔学会発表〕(計 15 件)

Hayashi, M., Hoque K. M. & Matsuda, H. Accessory cholera enterotoxin activates anoctamin 6 (TMEM16F) Cl⁻ channels.

第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 24 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

Hayashi, M. & Matsuda, H. Regulation of CFTR Cl⁻ channels by adenosine in pancreatic duct cells.

第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 21 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

林 美樹夫、稲垣 明浩、松田 博子 アデノシンによる膵液分泌調節

第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 10 日、北海道大学高等教育推進機構(北海道・札幌市)

Hayashi, M., Inagaki, A. & Matsuda, H. Adenosine A_{2B} receptor regulates CFTR in pancreatic duct cells.

第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 17 日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市)

Hayashi, M., Inagaki, A. & Matsuda, H. Adenosine regulates Cl⁻ channels in human adenocarcinoma cell monolayer.

The 37th Congress of the International Union of Physiological Sciences、2013 年 7 月 23 日、Birmingham(英国)

Hayashi, M., Wang, J., Hede, S. E. & Novak, I. Kca3.1 channel is important for secretion in pancreatic duct cells.

第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 28 日、タワーホール船堀(東京都)

Inagaki, A., Hayashi, M. & Matsuda, H. Adenosine receptors regulate Cl⁻ channels in pancreatic duct cells.

第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 28 日、タワーホール船堀(東京都)

林 美樹夫、Jing Wang、Ivana Novak、松田 博子 膵液分泌に寄与するカリウムイオンチャネルの同定

2012 年度生理学研究所研究会、2012 年 11 月 30 日、自然科学研究機構(愛知県・岡崎市)

林 美樹夫、Jing Wang、Ivana Novak、松田 博子 膵臓導管細胞に機能発現するカリウムイオンチャネル

第 105 回近畿生理学談話会、2012 年 9 月 29 日、関西医科大学(大阪府・守口市)

〔その他〕

ホームページ情報

https://www.researchgate.net/profile/Mikio_Hayashi?ev=hdr_xprf&_sg=a_OQTDIW3WFF4fkgAwgsLqgbC5buVMZSYEkjBJtXnHpTeZ5JveFENfEA7G3oGtdI

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 美樹夫 (HAYASHI, Mikio)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：10368251