

## 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 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22590757

研究課題名（和文）

抗エストロゲン剤によるプロトンポンプ輸送の制御—新しい嚢胞線維症の治療法の研究—

研究課題名（英文）Anti-estrogen regulates proton ion: A study looking for a new therapy of cystic fibrosis.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：膵液は高濃度の重炭酸を含むアルカリ性の消化液である。細胞外の  $\text{Na}^+$  と交換で細胞内の  $\text{H}^+$  を排出する  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  exchangers (NHE) はさまざまな上皮の基底側膜と管腔膜の両方に存在する。本研究では、マウス膵導管細胞における  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  交換輸送体の局在と生理活性を解析し、膵導管細胞の  $\text{HCO}_3^-$  分泌における管腔膜側の NHE の役割および調節機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic juice is an alkaline fluid that contains  $\text{HCO}_3^-$  rich fluid and digestive enzymes.  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  exchangers (NHE) are localized in both basolateral and apical membranes of various epithelia. In the present study, to investigate the role of apical NHE in  $\text{HCO}_3^-$  secretion from pancreatic duct cells, we identified the membrane localization of apical  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  exchangers, measured the activity of apical  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  exchange, and demonstrated the mechanisms to play a role of  $\text{HCO}_3^-$  secretion by pancreatic ductal epithelium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：胆道学、膵臓学

## 1. 研究開始当初の背景

細胞外の  $\text{Na}^+$  と交換で細胞内の  $\text{H}^+$  を排出するナトリウム-プロトン交換輸送体； $\text{Na}^+-\text{H}^+$  exchanger (NHE) は、SLC9 ファミリーに属し8つの isoform がある。NHE1 は多くの臓器に発現しており（管腔臓器の上皮膜細胞では基底側膜；血管側に局在）、細胞内 pH が酸性に傾いた時に活性化され細胞内 pH を中性に戻す“house keeping”的役割を担っている。一方、NHE3 は、上皮膜細胞の管腔膜に局在し、生理的条件下においても管腔膜を介して ( $\text{Na}^+$  の濃度勾配を利用して)  $\text{H}^+$  を分泌して

おり、重要な生体機能を担っている。近位尿細管では尿の酸性化 ( $\text{HCO}_3^-$  の再吸収) の、小腸では  $\text{H}^+$ -peptide 共輸送体 (PEPT1) に  $\text{H}^+$  を供給することによりタンパク質の消化吸収の key 分子として働く。

膵の導管系は、ヒトでは高濃度 (> 130mM) の  $\text{HCO}_3^-$  を含む等張液を約 2.5 L/日分泌し、膵導管細胞は高濃度の  $\text{HCO}_3^-$  を分泌する特殊な上皮膜細胞である。腺房に近い細い膵管が主な  $\text{HCO}_3^-$  と  $\text{H}_2\text{O}$  の分泌部位であろうと考えられている。膵導管細胞の基底側膜に  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  exchange (NHE) 活性があるのは知られてい

たが、 $\text{HCO}_3^-$ 分泌に特化している性質上、管腔膜に ( $\text{H}^+$ を分泌する) NHE は存在しないだろう (存在するはずがない) と考えられていた。ところが、最近、マウスの (十二指腸に近い) 太い膵管の管腔膜に NHE3 が発現していると報告された (Lee et al., *J Clin Invest* 105: 1651-8, 2000)。膵導管が、ある特殊な条件下では酸性の膵液を分泌していることを示唆している。膵液のアルカリ化が障害される代表的な疾病が、cystic fibrosis と慢性膵炎である。cystic fibrosis は、*CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) を原因遺伝子とし、白人に多い。慢性膵炎は、最近、*CFTR* 関連疾患の一つとして位置づけられるようになった。当研究室は、白人に限らず日本人においても、少なくとも一部の慢性膵炎患者では、*CFTR* 遺伝子変異/多型が発症に関与することを明らかにした (Fujiki, Ishiguro, Yamamoto, Kondo, Naruse, et al., *J Med Genet* 41: e55, 2004, Naruse, Ishiguro, Yamamoto, Kondo, et al., *Pancreas* 28: e80-e85, 2004)。*CFTR* は、上皮膜細胞 (膵臓では導管細胞) 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、 $\text{HCO}_3^-$ 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。ところが、cystic fibrosis 患者の膵液は、アルカリ性でないというだけでなく酸性に傾いていることがある。これは、*CFTR* に依存する  $\text{HCO}_3^-$ 分泌の低下だけでは説明できない。

また、NHE3 は、cystic fibrosis および慢性膵炎の治療における有望な標的分子であると考えられ、輸精管や胎盤などの組織において、estrogen が NHE3 の発現を誘導するという報告がある (Zhou, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2001)。従来から、cystic fibrosis の女性患者は予後が不良であることが知られていた (生存期間の中間値: 女性 34.9 歳、男性 37.1 歳。Kulich, et al., *J Pediatr* 2003) が、その理由は不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) cystic fibrosis と慢性膵炎では、*CFTR* が太い膵導管の管腔膜に局在する NHE3 を抑制できないため、NHE3 が  $\text{H}^+$ を分泌し、膵液が酸性化するという仮説を立てた。

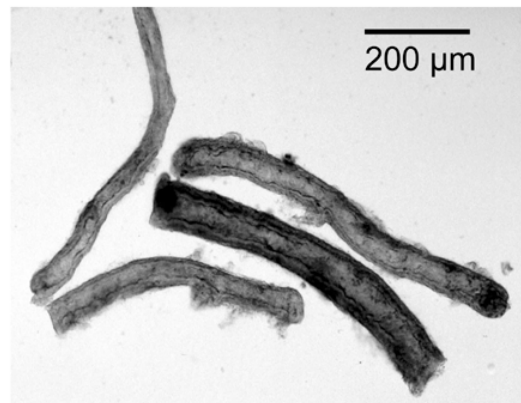
(2) cystic fibrosis のモデルマウスから小葉間膵管を単離し、管腔膜の  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange 活性を測定し、管腔内溶液 (膵液) の pH・水分量との関係を解析することにより、*CFTR* の障害が膵の  $\text{HCO}_3^-$ 分泌の低下にとどまらず膵液の酸性化を引き起こすメカニズムを明らかにする。上皮膜細胞の管腔膜に局在する NHE3 と *CFTR* は、NHERF という scaffolding タンパクを介して複合体 (トランスポートソーム) を形成し、互いに活性を調節している

ことが、いくつかの上皮細胞の培養系で報告されている。

(3) cystic fibrosis の女性患者は予後が不良であることが知られている。一方、輸精管や胎盤などの組織において、estrogen が NHE3 の発現を誘導するという報告がある。estrogen が膵管の管腔膜側の NHE3 の発現を調節しているという仮説を立て、NHE 活性に性差があるかどうかを検討する。また、正常マウス (ワイルドタイプ、WT/WT)、 $\Delta F$  ホモ接合体マウス ( $\Delta F/\Delta F$ ) の♀♂の累積生存率を検討し、antiestrogen が、NHE3 の発現を抑制することによって、CF や慢性膵炎における膵液の酸性化をおさえることができるかどうか、cystic fibrosis や慢性膵炎の治療になりうるかどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 正常マウス (ワイルドタイプ、WT/WT)、 $\Delta F$  ホモ接合体マウス ( $\Delta F/\Delta F$ ) から膵臓を摘出し、コラゲナーゼで処理した後、実体顕微鏡下で直径約 100  $\mu\text{m}$  の小葉間膵管を単離した。

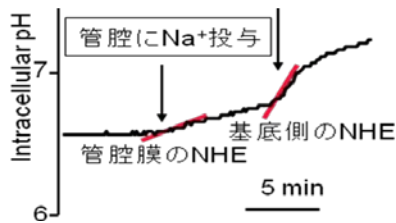
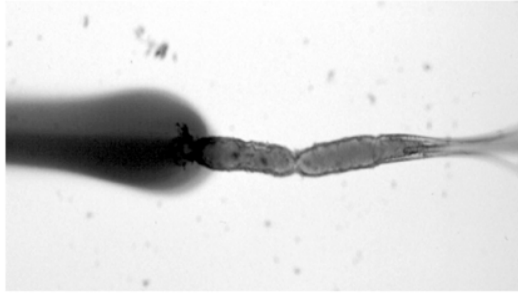


(2) 5%  $\text{CO}_2$  存在下で 37°C にて 18~24 時間培養すると、両端が自然に閉じて内腔に分泌液が貯留した状態となった。

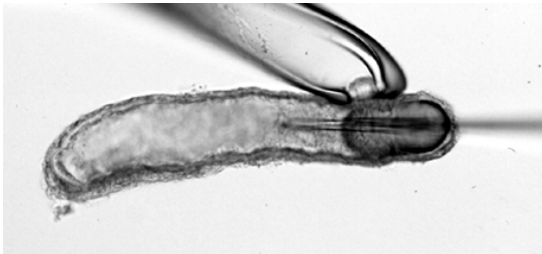


(3) 単離膵管を  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  を含まない HEPES 緩衝液で 37°C にて表層灌流し、管腔を別個に灌流 (microperfusion) した。pH 感受性蛍光色素である BCECF を負荷して、顕微鏡光測

光により細胞内 pH を測定した。NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (20 mM) パルスによる酸負荷後、管腔側に Na<sup>+</sup> を加えた時の細胞内 pH の回復速度を測定し、管腔膜の NHE 活性の指標とした。ワイルドタイプ (WT/WT) から単離した膵管と ΔF マウス (ΔF/ΔF) から単離した膵管の管腔膜の NHE 活性を比較検討した。また、ΔF マウスにおいての雌雄で差があるかどうかを検討した。



(4) 単離膵管を cAMP 刺激下に、24 時間培養した後に、micropuncture を行った。管腔内に pH 感受性蛍光色素の BCECF を注入し、膵管の管腔内 pH を測った。

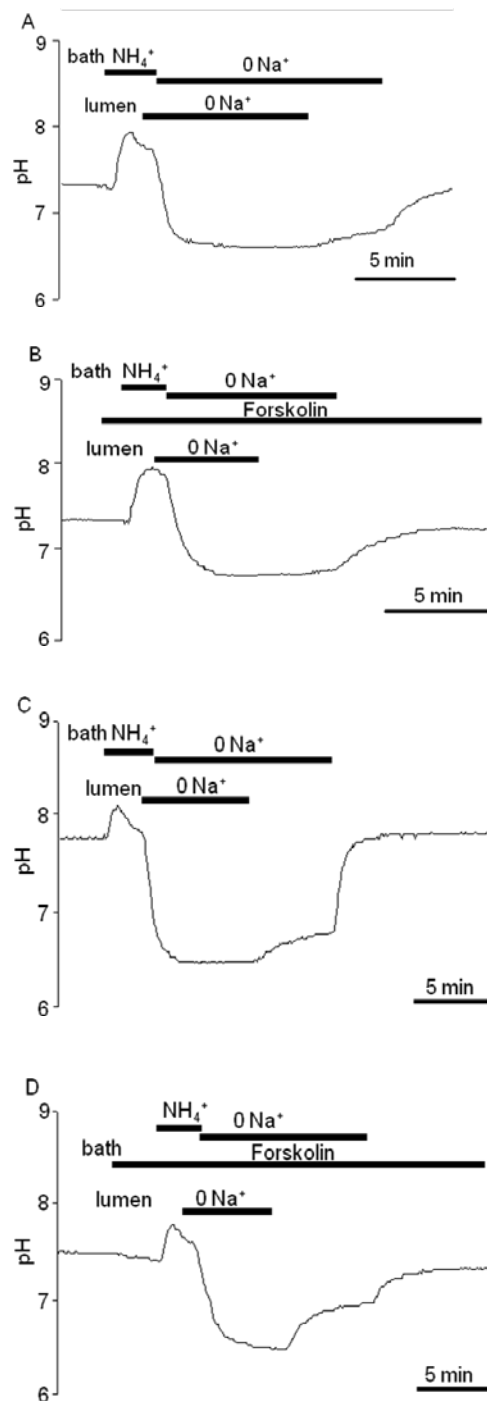


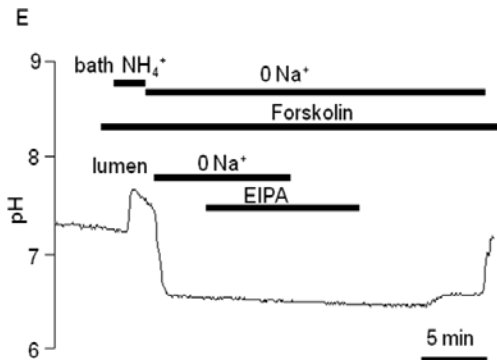
(5) ワイルドタイプマウス (WT/WT)、ΔF マウス (ΔF/ΔF) において、(観察期間 2010 年 3 月 10 日から 2012 年 2 月 27 日) 生存曲線を解析した。

#### 4. 研究成果

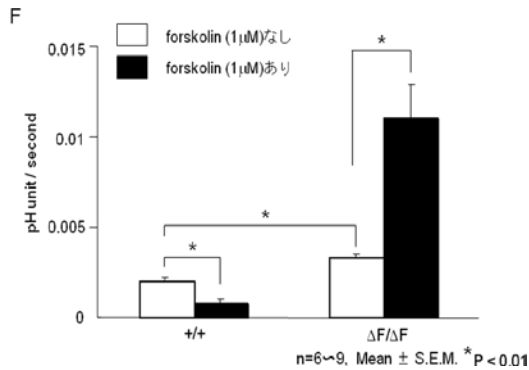
(1) ワイルドタイプ (WT/WT) から単離した膵管では、管腔側 Na<sup>+</sup> に依存する細胞内 pH の上昇速度 (dpH/dt) は  $0.12 \pm 0.01$  pH units/min (mean  $\pm$  SE, n=8) であり、細胞内 cAMP を増加させる forskolin (1M) により有意 ( $p < 0.01$ ) に抑制された ( $0.05 \pm 0.01$ , n=9) (図 A, B)。ΔF マウス (ΔF/ΔF) から単離した膵管における管腔膜の NHE 活性は  $0.20 \pm 0.01$  pH units/min (mean  $\pm$  SE, n=6) であり、WT/WT に比べて有意に ( $p < 0.01$ ) 高かった (図 C)。forskolin を加えるとさらに ( $p < 0.01$ ) 増加した ( $0.66 \pm 0.11$ , n=6) (図 D)。この NHE 活

性は、NHE の阻害剤である EIPA (20 μM) によりほぼ完全に抑制された (図 E)。図 F に NHE 活性の比較のまとめを示した。

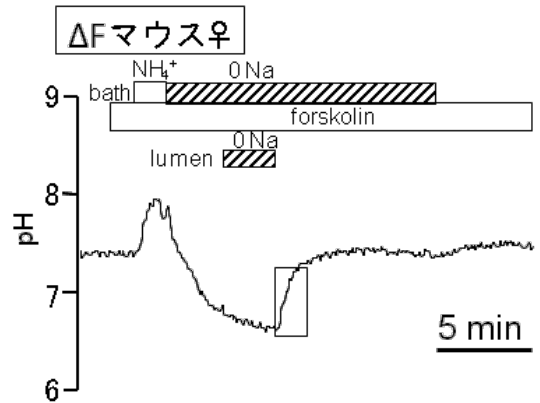
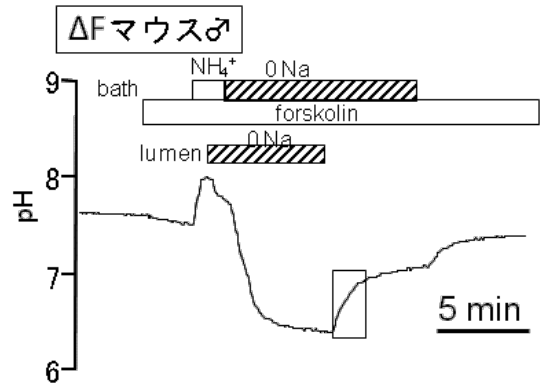




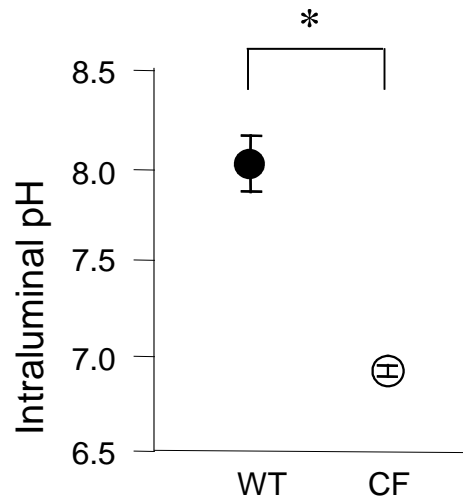
マウス膵導管細胞の管腔膜に存在する NHE は、それ自体 cAMP によって活性化されるが、一方で CFTR により抑制されている。嚢胞線維症では NHE 活性が抑制されないために、 $\text{HCO}_3^-$  輸送および膵液の pH 調節が障害されている可能性がある と推定される。



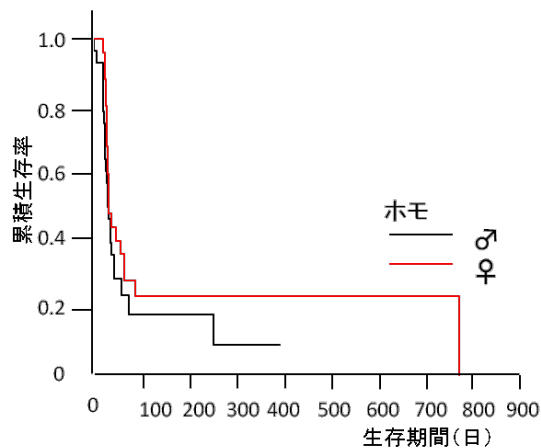
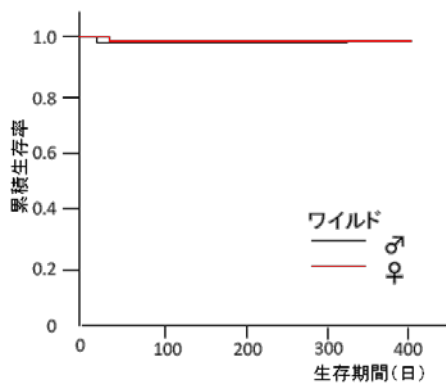
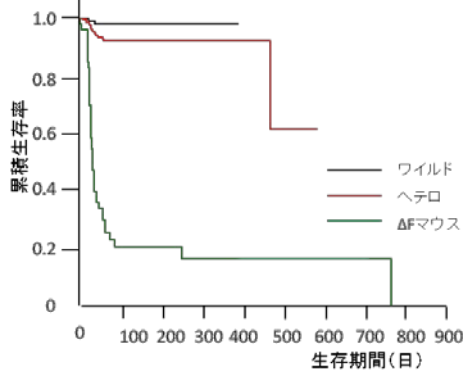
(2) 前述したように、CFTR 機能が障害されている  $\Delta F$  マウス ( $\Delta F/\Delta F$ ) の膵管の管腔膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE) 活性は、ワイルドタイプよりも高く、ワイルドタイプとは逆に cAMP 刺激により増加した。この活性化されている膵導管細胞の管腔膜の NHE 活性が、♂ と ♀ とで活性に違いがあるかどうかを検討した。下図に示すように、 $\Delta F$  マウスの ♀ の管腔膜の NHE 活性は、♂ の NHE 活性に比し、有意に高かった。輸精管や胎盤などの組織において、estrogen が NHE3 の発現を誘導するという報告がある (Zhou, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2001)。この研究においても、estrogen が膵管の管腔膜側の NHE3 の発現を調節している可能性が示唆された。



(3)  $\Delta F$  マウス ( $\Delta F/\Delta F$ ) およびワイルドタイプ (WT/WT) マウスから小膵管を単離して、cAMP 刺激 24 時間後の管腔内 pH を測定した。単離膵管を pH7.4 の重炭酸緩衝液で表層灌流している時、ワイルドタイプ (WT/WT) の膵管腔内 pH は約 8.0 であったのに対し、 $\Delta F$  マウス ( $\Delta F/\Delta F$ ) の膵管腔内 pH は約 6.9 と酸性に傾いていた。この膵液酸性化は NHE3 の阻害剤によって抑制された。cystic fibrosis では、CFTR による NHE3 の制御機構が破綻し、NHE3 を介する病的な  $\text{H}^+$  分泌が起こると考えられる。



(4) ワイルドタイプマウス (WT/WT ♂:n=48, ♀:61)、ヘテロマウス (ΔF/WT ♂:n=107, ♀:119)、ΔFマウス (ΔF/ΔF ♂:n=28, ♀:27) において、(観察期間 2010 年から 2012 年 2 月 27 日) 生存曲線を解析した。ホモマウスは、ワイルドマウス、ヘテロマウスに比し、有意に生存期間が短かった。従来から、cystic fibrosis の女性患者は予後が不良であることが知られていた(の生存期間の中間値 34.9 歳であり、男性の 37.1 歳に比し、有意に生存率が悪いと報告されていた(生存期間の中間値: 女性 34.9 歳、男性 37.1 歳。Kulich, *et al.*, *J Pediatr* 2003)。しかし、マウスにおける今回の検討では、WT/WT マウス、ΔF/ΔF マウスにおいて♀♂において累積生存率の差はなかった。



結論および今後の展望

嚢胞性線維症 (cystic fibrosis) と一部の慢性膵炎では、CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) の機能障害によって膵液のアルカリ化が障害される。我々は、小動物の膵臓から単離した小膵管を用いた研究により、CFTR に依存する  $\text{HCO}_3^-$  分泌の低下に加えて、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger 3 (NHE3) を介する  $\text{H}^+$  分泌の増加が、膵液アルカリ化障害の原因であることを明らかにした。cystic fibrosis や慢性膵炎において、この NHE3 の活性を抑え、膵液の酸性化を抑えることが重要である。ΔF マウスの♀の管腔膜の NHE 活性は、♂の NHE 活性に比し、有意に高かった。しかし、マウスにおける今回の検討では、WT/WT マウス、ΔF/ΔF マウスにおいて♀♂において累積生存率の差はなかった。現在、ヘテロについて検討中である。

### 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 8 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* 41: 1292-1298, 2012. 査読有り
- ② Deletion of Slc26a6 alters the stoichiometry of apical  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange in mouse pancreatic duct. Song Y, Yamamoto A, Stewart MC, Ko SB, Stewart AK, Soleimani M, Liu BC, Kondo T, Jin CX, Ishiguro H. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C815-824, 2012. 査読有り
- ③ 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. 査読有り ([http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya\\_j\\_med\\_sci/7412/01\\_Ishiguro.pdf](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya_j_med_sci/7412/01_Ishiguro.pdf))
- ④ Pancreatic stone protein/regenerating protein family in pancreatic and gastrointestinal diseases. Jin CX, Hayakawa T, Ko SB, Ishiguro H, Kitagawa M. *Intern Med* 50:1507-16, 2011. 査読有り (DOI:10.2169/internalmedicine.50.5362)
- ⑤ 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. 査読有り

- (DOI: 10.1152/ajpcell.00089.2011)
- ⑥ 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. 査読有り  
(<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.093>)
- ⑦ 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*. 査読有り (DOI: 10.3998/panc.2011.16)
- ⑧ 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. 査読有り  
(DOI:10.1053/j.gastro.2010.01.001)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Pancreatic duct dysfunction and pancreatitis. Ishiguro H. *Gordon Research Conferences; Salivary Glands & Exocrine Biology* (Galveston), Feb. 9. 2011.
- ② 膵疾患の遺伝的背景を探る パネルディスカッション1 「性膵炎におけるCFTR遺伝子の関与」藤木理代、石黒洋、中莖みゆき、近藤志保、山本明子、洪繁、北川元二、成瀬達 第42回日本膵臓学会大会 (青森) 2011. 7. 30
- ③ 膵疾患の遺伝的背景を探る パネルディスカッション1 「わが国の嚢胞性線維症におけるCFTR遺伝子変異」中莖みゆき、山本明子、藤木理代、石黒洋、成瀬達 第42回日本膵臓学会大会 (青森) 2011. 7. 30
- ④ Symposium“Chronic Pancreatitis: Pathogenesis to Treatment”Molecular and cellular regulation of pancreatic duct function. Ishiguro H, Ko SBH, Yamamoto A. *Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society* (Fukuoka), July.13. 2010.
- ⑤ Fluid secretion from the pancreatic duct in PCK rats. Yi L, Ishiguro H, Yamamoto A, Nakauki M, Furuya S, Nagao S, Wei M, Kondo T, Naruse S. *Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society* (Fukuoka),

July.13.2010

- ⑥ 膵疾患の遺伝的背景を探る パネルディスカッション1 膵液のアルカリ化障害におけるNa<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>交換輸送体の役割 パネルディスカッション「膵炎の基礎と臨床」山本明子、石黒洋 第52回日本消化器病学会大会 DDW-Japan 2010.10.15 (横浜)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (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

### (3) 連携研究者 なし