

## 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 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590873

研究課題名（和文）

膵導管上皮のカルシウム吸収機構—新しい膵石予防法の研究—

研究課題名（英文）Mechanisms for  $\text{Ca}^{2+}$  absorption by pancreatic ductal epithelium: A study looking for a new strategy to prevent pancreatic stone formation.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：膵液は消化酵素を含むアルカリ性の消化液である。高濃度（～140 mM）の重炭酸イオン（ $\text{HCO}_3^-$ ）とともに、わずかに存在する炭酸イオン（ $\text{CO}_3^{2-}$ ）は、 $\text{Ca}^{2+}$ と結合して  $\text{CaCO}_3$  として析出する。膵石の形成を防ぐために、膵導管上皮は膵液中の  $\text{Ca}^{2+}$  を吸収するメカニズムを持っていると推定される。本研究では、ラット膵導管細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体の局在と生理活性を解析し、 $\text{Ca}^{2+}$  吸収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 digestive enzymes and high concentrations of  $\text{HCO}_3^-$ . A little amount of  $\text{CO}_3^{2-}$  in the juice binds to acinar cell-derived  $\text{Ca}^{2+}$ , which leads to the precipitation of  $\text{CaCO}_3$ . Pancreatic ductal epithelium is supposed to absorb luminal  $\text{Ca}^{2+}$  to prevent the formation of pancreatic stone. In the present study, we identified the membrane localization of  $\text{Ca}^{2+}$  transporters, measured the  $\text{Ca}^{2+}$ -transport activities, and demonstrated the mechanisms to absorb luminal  $\text{Ca}^{2+}$  by pancreatic ductal epithelium.

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
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：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：膵石症、膵導管上皮、カルシウム輸送体、単離小葉間膵管、microperfusion、多発性嚢胞腎症、PCK ラット、線毛

## 1. 研究開始当初の背景

膵液中の消化酵素は、腺房細胞で合成されて開口放出によって分泌され、高濃度の  $\text{HCO}_3^-$  を含む等張の液体成分は膵管の上皮細胞（導管細胞）から分泌される。腺房細胞から消化酵素が分泌される際には、同時に、チモゲン顆粒に含まれる高濃度（mM レベル）の  $\text{Ca}^{2+}$  が膵液中に分泌される。膵液は、高濃度（100～150 mM）の重炭酸イオン（ $\text{HCO}_3^-$ ）を含むため、炭酸イオン（ $\text{CO}_3^{2-}$ ）も 0.03～1 mM の濃度で存在すると推定される。 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{CO}_3^{2-}$

が共存すると不溶性の  $\text{CaCO}_3$  が析出し、タンパク栓に沈着すると膵石の形成が始まると推定されている。慢性膵炎の経過中に膵石が出現すると、膵液の流れが滞り、膵液中の  $\text{trypsin}$  が膵管内腔で活性化され、膵臓実質の炎症がさらに悪化する。慢性膵炎の進展を防ぐためには、膵石の形成を予防することが重要である。導管細胞からの水分分泌量が多ければ  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は薄まるが、導管上皮を介した  $\text{Ca}^{2+}$  の吸収が必要になる場合が想定される。現在までの生理学的検討により、導管細胞に、

Ca<sup>2+</sup>チャネル、Ca<sup>2+</sup>ポンプ、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換体の存在が推定されているが、その責任分子および局在は明らかにされていない。

生体のCa<sup>2+</sup>の恒常性は、腸管からの吸収、腎臓からの排泄、骨からの出入りによって厳密に保たれている。尿細管および小腸上皮では、TRP cation channel subfamily V のTRPV5とTRPV6、plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA1b)、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX) が、Ca<sup>2+</sup>輸送を担っていることがわかっている。

本研究は、膵導管上皮に発現するCa<sup>2+</sup>輸送体を同定し、その局在と生理学的特性を解析することを目的とした。現在まで、Ca<sup>2+</sup>輸送体の機能異常と膵石形成との関連に着目した研究は、行われていない。

## 2. 研究の目的

(1) 膵導管上皮による膵石形成の抑制メカニズムとして、管腔膜上のCa<sup>2+</sup>受容体および線毛(primary cilia)が膵液中のCa<sup>2+</sup>濃度を感知し、Ca<sup>2+</sup>濃度が高い場合は、管腔膜および基底側膜上のCa<sup>2+</sup>輸送体を介してCa<sup>2+</sup>を吸収するという仮説を立てた。

(2) 膵導管細胞上皮を介する膵液中からのCa<sup>2+</sup>の吸収機構を明らかにするために、ラット膵から単離した小葉間膵管およびヒト膵導管細胞由来の培養細胞(Panc-1)を用いて、膵導管細胞におけるCa<sup>2+</sup>輸送体の発現、膜局在(基底膜側か管腔膜側か?)および生理学的特性を明らかにする。

(3) 線毛(管腔内Ca<sup>2+</sup>濃度のセンサー及びCa<sup>2+</sup>チャネル)機能が障害されている多発性嚢胞腎症ラット(PCKラット)の膵組織と膵外分泌機能を膵管系を中心に解析する。また、単離した小膵管の膵導管細胞機能(Ca<sup>2+</sup>輸送、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>輸送)を解析する。

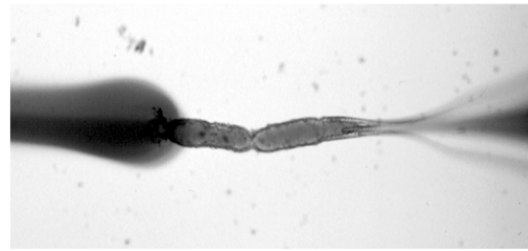
## 3. 研究の方法

(1) 正常ラット及びPCKラットの膵臓から直径~100 μmの小葉間膵管を単離した。



(2) ヒト膵cDNAおよびPanc-1細胞から抽出したmRNAを用いて、RT-PCRにより、Ca<sup>2+</sup>輸送体の発現を検討した

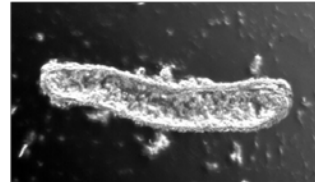
(3) 単離膵管の管腔をmicroperfusion(下図)して表層とは別個に灌流し、Fura-2を用いて細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)を測定した。



(4) 膵をコラゲナーゼで処理し、胆膵管を含む膵管樹を単離した。

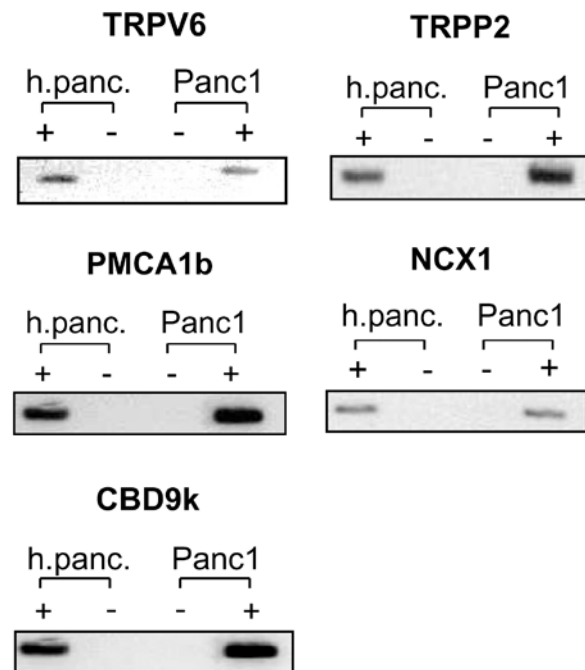
(5) 麻酔下で胆膵管にカニューレーションし、純粋膵液及び胆汁を採取した。

(6) 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(下図)。管腔容積の変化からfluid secretionを測定した。

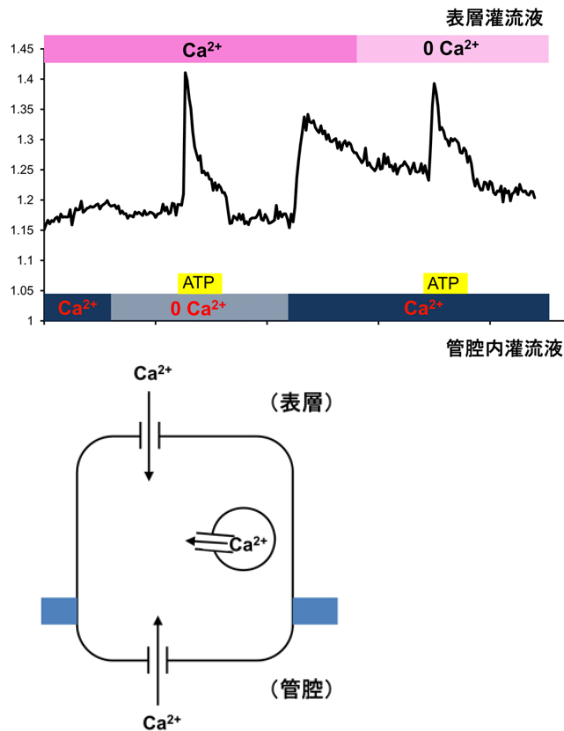


## 4. 研究成果

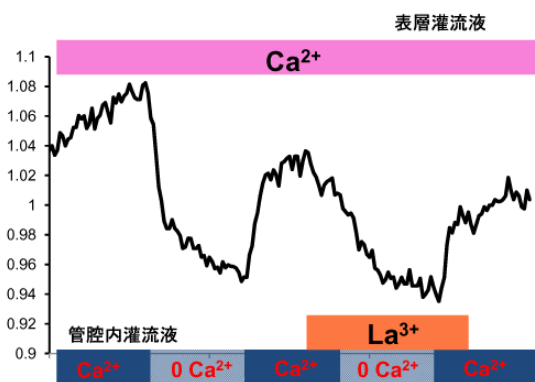
(1) ヒト膵cDNA(h.panc.)とPanc-1細胞(Panc1)には、Ca<sup>2+</sup>チャネルであるTRPV5、TRPV6、TRPP2、plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA1b)、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換体であるNCX1、Ca<sup>2+</sup>結合タンパクであるCBD9kのmRNA発現が認められた。



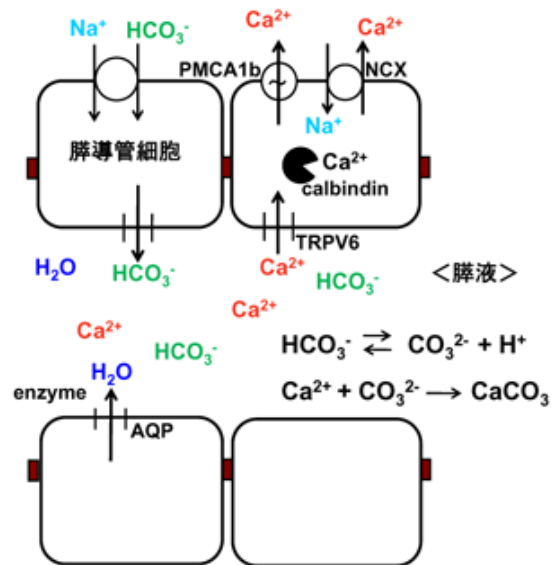
(2) 単離膵管の管腔灌流液から  $\text{Ca}^{2+}$  を除き再投与した時の膵導管細胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の変化は、表層灌流液の  $\text{Ca}^{2+}$  を除いた時の変化に比べて、大きかった。管腔内に ATP ( $10 \mu\text{M}$ ) を加えた時の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の増加は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの放出に加えて、管腔膜と基底側膜の両方を介する  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を伴っていた。(下図) 基底側膜の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送活性よりも管腔膜の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送活性の方が大きかった。



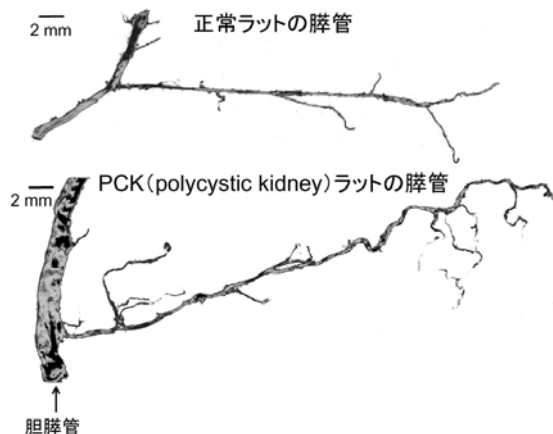
管腔膜を介する  $\text{Ca}^{2+}$  輸送に対する  $\text{La}^{3+}$  の効果を検討した (下図)。  $\text{La}^{3+}$  の投与により、  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の変化速度が有意に抑制されたため、  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを介する輸送と推定される。



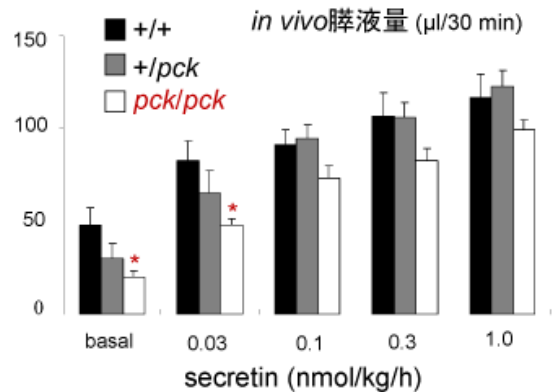
以上の結果は、膵導管細胞では、管腔膜上の  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが、膵液からの  $\text{Ca}^{2+}$  吸収を担っていることを示唆している。下図にモデル図を示す。基底側膜では、  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプが  $\text{Ca}^{2+}$  輸送を担っていると推定している。



(3) PCK ラットの膵では、膵管が拡張し、膵管周囲の線維化が見られたが、嚢胞は見られなかった。PCK ラットでは正常ラットに比べて、胆膵管、主膵管、一次分枝の内径が約 2.8、1.8、1.5 倍に拡張していた (下図)。PCK ラットの膵は、ヒト慢性膵炎の組織像と類似する点が多く認められた。

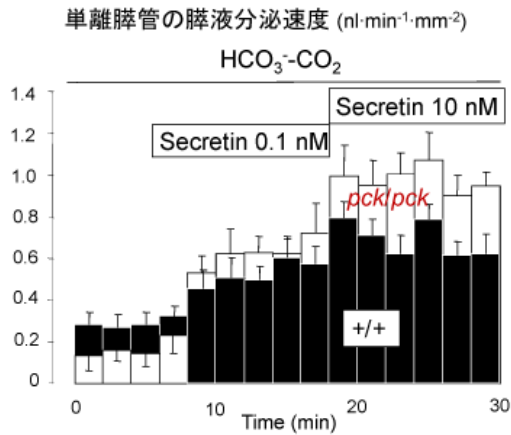


(4) 麻酔下の純粋膵液の採取では、PCK ラットでは、carbamylcholine 刺激によるアミラーゼ分泌は正常ラットと差は無かったが、生理的投与量 ( $0.03 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) の secretin 刺激下の膵液分泌量が約 40% 減っていた。

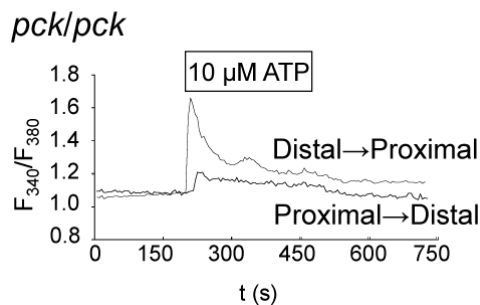
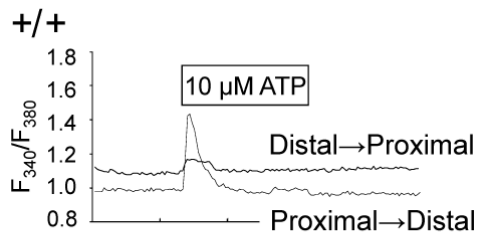
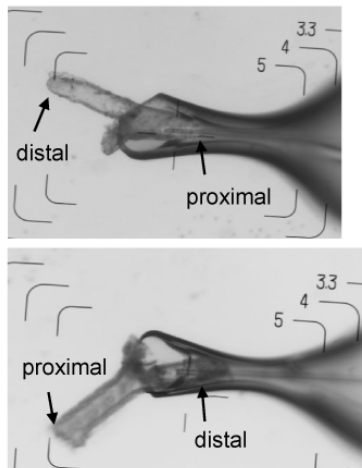


PCK ラットの膵外分泌腺では、腺房細胞機能（消化酵素分泌）は保たれていたが、導管細胞機能（溶液分泌）が障害されていた。

(5) PCK ラットの単離膵管では secretin (10 nM) 刺激下の溶液分泌が約 40% 増えていた。



(6) 管腔内 ATP による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 反応は、管腔の灌流方向（十二指腸側/腺房側から）に依存していた。正常ラットの膵管では、腺房側から灌流した場合の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 反応が大きかったが、PCK ラットでは逆であった。



## 国内外における位置づけとインパクト

膵管内の膵石の形成機序に関しては、従来から多くの研究が行われてきたが、そのほとんどはタンパクの不溶化=タンパク栓の形成に着目したものであった。以前からヒト膵液の Ca<sup>2+</sup>濃度は血清中よりもかなり低いことが知られていたが、その意義については研究対象にされてこなかった。HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (および CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) 濃度が高い膵液中では、Ca<sup>2+</sup>濃度を低く保つことが CaCO<sub>3</sub> の析出を防ぐのに重要であると想定される。本研究は、膵管上皮が膵石の形成を防いでいる生理的機構を初めて明らかにした。我々の研究は、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 Ca<sup>2+</sup>輸送を解析しており、国内外から高い評価を得ている。従来の膵導管細胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の測定は、もっぱら細胞内情報伝達としての解析であった。本研究は、Ca<sup>2+</sup>の経上皮膜輸送を解析している。

## 今後の展望

膵導管細胞に存在する Ca<sup>2+</sup>輸送体の発現と輸送活性は、小腸上皮や腎尿細管と同様に副甲状腺ホルモン (PTH)、ビタミン D3、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> による調節を受けている可能性がある。ビタミン D3 の投与などにより、膵導管における Ca<sup>2+</sup>吸収が促進されれば膵石の形成を予防できる可能性がある。また、慢性膵炎の食事療法についても、従来の高糖質・低脂肪食だけでなく、Ca<sup>2+</sup>出納を考慮した新たな食事療法が慢性膵炎の症状悪化を防ぐ可能性がある。

## 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 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). 査読有り
- 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))
- ③ 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)
- ④ 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)
- ⑤ 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)
- ⑥ 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)
- ⑦ 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)
- ⑧ High glucose inhibits  $\text{HCO}_3^-$  and fluid secretion in rat pancreatic ducts. Futakuchi S, Ishiguro H, Naruse S, Ko SB, Fujiki K, Yamamoto A, Nakakuki M, Song Y, Steward MC, Kondo T, Goto H. *Pflügers Arch* 459:215-26, 2009. 査読有り (DOI:10.1007/s00424-009-0731-6)
- ⑨ 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. 査読有り (DOI:10.1085/jgp.200810122)
- ⑩ Functional coupling of apical  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange with CFTR in stimulated  $\text{HCO}_3^-$  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. 査読有り (DOI:10.1152/ajpgi.90697.2008)
- ⑪ Molecular and cellular regulation of pancreatic duct cell function. Steward MC, Ishiguro H. *Curr Opin Gastroenterol* 25:447-53, 2009. 査読有り (DOI:10.1097/MOG.0b013e32832e06ce)
- [学会発表] 計 7 件)
- ① Pancreatic duct dysfunction and pancreatitis. Ishiguro H. *Gordon Research Conferences; Salivary Glands & Exocrine Biology* (Galveston), 2011.
- ② 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.
- ③ 膵導管細胞において膵石形成に関わるカルシウム輸送体の検討 石黒真理子、石黒 洋、山本明子、藤木理代、北川元二、近藤孝晴 第 64 回日本栄養・食糧学会大会 (徳島) 2010.
- ④ Fluid secretion from the pancreatic duct in PCK rats. Yi L, Ishiguro H, Yamamoto A, Nakakuki 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), 2010.
- ⑤ 膵導管細胞におけるカルシウム輸送体の発現と局在の検討 石黒真理子、石黒 洋、山本明子、藤木理代、北川元二、近藤孝晴 第 40 回日本膵臓学会大会 (東京) 2009
- [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  
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
- (2) 研究分担者  
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  
洪 繁 (KO SHIGERU)  
国立長寿医療研究センター病院・内科総合診療部  
研究者番号: 90402578  
長尾 静子 (NAGAO SHIZUKO)  
藤田保健衛生大学・疾患モデル教育研究センター・准教授  
研究者番号: 20183527
- (3) 連携研究者 なし