

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293047

研究課題名(和文)胃酸分泌細胞の未知なる塩酸防御バリアの分子生理基盤解明

研究課題名(英文) Clarification of molecular and physiological properties of the acid-preventing barrier in gastric parietal cells

研究代表者

酒井 秀紀 (Sakai, Hideki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：60242509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,200,000円

研究成果の概要(和文)：胃酸分泌細胞の頂端膜は、過酷なpH条件下(pH 0.8)にさらされているにも関わらず、通常は傷害を受けないが、そのメカニズムについては不明である。これまでに我々は、胃酸分泌細胞基底側膜に存在する分子実体未知のCl⁻チャネルが細胞防御機構に関与することを見出している。本研究で、1)胃酸分泌細胞の細管小胞に多様性があり、発現するイオン輸送タンパク質のパターンが異なること、2)基底側膜に発現するSLC26A7のCl⁻チャネル機能が、細胞防御機構に必須であること、3)胃プロトンポンプ サブユニットの糖鎖末端のシアル酸がポンプの活性調節および細胞防御機構に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Though the apical membrane of the gastric parietal cell is exposed to the severe pH fluid (pH 0.8), the cell is not usually damaged by acid, but its mechanism has not been elucidated. We previously found that the unidentified Cl⁻ channel in the basolateral membrane of gastric parietal cells participates in the cytoprotective mechanism. In this study, we clarified the following points: 1) Gastric tubulovesicles have variety in their characteristics, and the expression pattern of ion transporting proteins is different among the vesicles. 2) A Cl⁻ channel function of SLC26A7 in the basolateral membrane is essential to the cytoprotective mechanism of gastric parietal cells. 3) The sialic acid at the end of the carbohydrate chain in gastric proton pump beta-subunit may be important for regulation of the pump activity and the cytoprotective mechanism.

研究分野：細胞生理学、分子生理学

キーワード：生理学 細胞・組織 胃酸分泌 細胞防御 イオン輸送 プロトンポンプ イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

胃は、強酸（塩酸：HCl）を分泌するが、通常は自己消化を引き起こさない。これは、胃粘膜表面に精巧な粘液バリアが構築されているためである。

一方、胃粘膜内の胃酸分泌細胞には、 H^+ 分泌の分子実体である胃プロトンポンプ（ H^+, K^+ -ATPase）が多量に発現しており、頂端膜（分泌側膜）から大量の胃酸を分泌している。しかし、胃酸分泌細胞は、健常時には、傷害を受けない。なぜ、頂端膜が、生体内で最も過酷な pH 条件下（pH 0.8）に暴露されているにもかかわらず、傷害を受けないのかについてのメカニズムは不明である。

これまでに我々は、胃酸分泌細胞の基底側膜（血流側膜）に「細胞防御 Cl^- チャンネル」が存在しており、このチャンネルがプロスタグランジン E_2 により活性化され、エタノール傷害に対する細胞保護機構に関与することを見出している。しかし現在まで、細胞防御 Cl^- チャンネルの分子実体は解明されていない。最近、我々は、胃酸分泌細胞の基底側膜に発現している「SLC26A7」についての研究を行い、SLC26A7 が、胃酸分泌細胞固有の細胞防御機構に関与している可能性を示唆する結果を得た。

他方、副細胞から分泌される糖鎖が、粘膜のピロリ菌の増殖および炎症を抑えることにより胃がんの発症を抑制するという興味深い知見が報告された（Karasawa ら；JCI, 2012 年）。糖タンパク質の糖鎖はこれまで、熱や酸に対する耐性を付与することが知られているが、胃酸分泌細胞に存在する糖鎖については殆ど研究されていない。

以上の諸観点から、胃酸分泌細胞の未知なる塩酸防御バリアの解明に挑むという着想に至った。

2. 研究の目的

胃粘膜表面には、重炭酸イオン（ HCO_3^- ）を含む粘液バリアが存在し、強酸（HCl）による攻撃を防御している。粘膜表面バリアの研究が進んでいる一方で、粘膜内に存在し強酸を分泌する胃酸分泌細胞の防御バリアについては不明である。

胃酸分泌細胞の頂端膜は、絶えず強酸に曝露されているにもかかわらず、通常は傷害を受けない。胃酸分泌細胞が、粘膜表面のような粘液を分泌するという報告はない。したがって従来の概念とは異なる新規の防御バリアが装備されている可能性が高い。

本研究では、胃酸分泌細胞のイオン輸送タンパク質、糖タンパク質・糖鎖に着目し、新規塩酸防御バリアの分子生理機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

マウス、ラットを使用するすべての実験は、学長から承認を受けた実験計画書のもと、大学の動物実験指針と動物の愛護及び管理に

関する法律を遵守して行った。ブタ胃は富山食肉総合センターより入手した。免疫沈降実験は、Dynabeads M-280 に抗体を結合させたビーズを胃サンプルに反応させることにより行った。胃細管小胞の免疫染色では、ポリリジンコートしたカバーガラス上に小胞を固定し、TritonX-100 で膜透過性にした後、各種抗体を反応させた。電子顕微鏡観察用のサンプルは、胃粘膜組織を高圧凍結技法で処理することにより作製した。SLC26A7 由来のチャンネル電流は、AxoPatch 200B amplifier を用いたホールセルパッチクランプ法により電位固定することにより測定した。細胞内 pH は浜松ホトニクス Aquacosmos を用いて蛍光測定した。

4. 研究成果

(1) 胃細管小胞におけるイオン輸送タンパク質の発現パターン解析による小胞の多様性の解明

ブタ胃細管小胞（TV）の多様性とその機能について解析するため、まずカベオリン-1（23 kDa）とクラスリン（190 kDa）に着目した小胞の分別を行った。抗カベオリン-1 抗体とビーズを用いた胃細管小胞の沈降実験を行い、沈降（ビーズ結合）および上清（ビーズ非結合）サンプルの胃プロトンポンプ（ H^+, K^+ -ATPase; 95 kDa）量を比較した（図 1）。 H^+, K^+ -ATPase は、ビーズ非結合サンプルに主として検出されたことから、胃酸分泌に関わる小胞と塩酸防御に関わる小胞が独立して存在する可能性が示唆された。

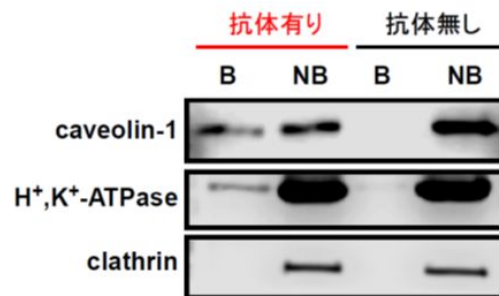


図 1. 抗カベオリン-1 抗体で免疫単離したビーズ結合サンプル(B)と非結合サンプル(NB)のウェスタンブロット

次に、カバーガラス上に TV を固定し、免疫染色を行った（図 2）。 H^+, K^+ -ATPase のシグナルは、ほぼ全ての TV で観察された。カベオリン-1 とクラスリンのシグナルの一致率は 3%と非常に低く、 H^+, K^+ -ATPase のシグナルとの一致率は、クラスリンで 50%、カベオリン-1 で 25%であった。 H^+, K^+ -ATPase と各種イオン輸送タンパク質とのシグナルの一致率は、 Cl^-/H^+ 交換輸送体の CIC-5 で 85%、 Cl^- チャンネルの CFTR で 50%と高い一方、 K^+ チャンネルの KCNQ1 では 25%と低かった。また、胃酸分泌細胞の電子顕微鏡解析において、カベオリン-1 で被覆されている小胞構造は少なかった。したがって、胃細管小胞には、クラスリ

ンもしくはカベオリン-1 でコートされた小胞およびどちらにもコートされていない小胞が存在し、Cl⁻輸送とK⁺輸送を担う小胞が異なっていることが示唆された。

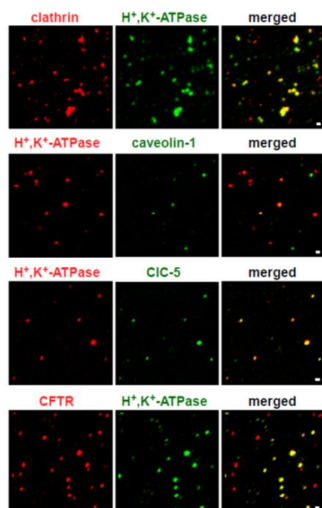


図2 . 胃細管小胞の免疫染色
バー長 : 500 nm

(2) 胃酸分泌細胞における SLC26A7 の機能解析

SLC26A7 発現細胞における機能解析

ヒト SLC26A7 をサブクローニングし、HEK293T 細胞に発現させたところ、免疫細胞染色により、原形質膜における発現が確認された。これらの細胞にホールセルパッチクランプ法を適用すると、SLC26A7 の発現に起因する NPPB (500 μM) 感受性および diphenylamine-2-carboxylate (DPC; 500 μM) 感受性の Cl⁻電流が観察された。Mock 細胞の電流は DPC により影響を受けなかった。また、SLC26A7 チャネル発現細胞において、胃酸分泌細胞防御機構のメッセンジャーである cGMP (30 μM) が、SLC26A7 電流を増大させることを見出した。

SLC26A7 発現細胞と mock 細胞にそれぞれ pH 感受性色素の BCECF をロードし、細胞外 Cl⁻濃度変化 (0~115 mM) による細胞内 pH 変化を、重炭酸バッファ中で測定したところ、両者の pH 変化に有意な差は観察されなかった。pH 変化は DIDS (500 μM) に感受性であり、内因的な Cl⁻/HCO₃⁻交換輸送体が関与していることが示唆された。これらの結果から SLC26A7 は Cl⁻チャネルとして機能し、Cl⁻/HCO₃⁻交換輸送体としての機能は有していないものと考えられた。

マウス胃および胃酸分泌細胞における機能解析

SLC26A7 ノックアウトマウス (SLC26A7- KO) とワイルドタイプマウス (WT) の胃にジブチリル cGMP (1 mM 溶液; 5 ml/kg) を前投与した後、エタノールを経口投与し、胃粘膜を摘出し組織標本作製した。ジブチリル cGMP は、WT のエタノール傷害を有意に軽減したが、SLC26A7- KO のエタノール傷害を回復しなかった。他方、生理食塩水投与による粘膜傷害は観察されなかった。

また、SLC26A7- KO と WT の胃に、発現系において SLC26A7 由来の Cl⁻チャネル電流を阻害した DPC (1 mM 溶液; 5 ml/kg) を前投与した後、エタノールを経口投与した。WT のエタノールによる胃粘膜傷害の程度は、DPC 前投与により有意に増悪した。免疫染色した組織標本の顕微鏡観察により、DPC 前投与で傷害を受ける胃酸分泌細胞数が有意に増大していることがわかった。一方、SLC26A7- KO のエタノールによる胃粘膜傷害および傷害を受ける胃酸分泌細胞数は、DPC 前投与によって変化がなかった。したがって胃酸分泌細胞の SLC26A7 チャネルの機能が DPC により抑制されると、エタノールによる傷害が増大することが示唆された (図3)。

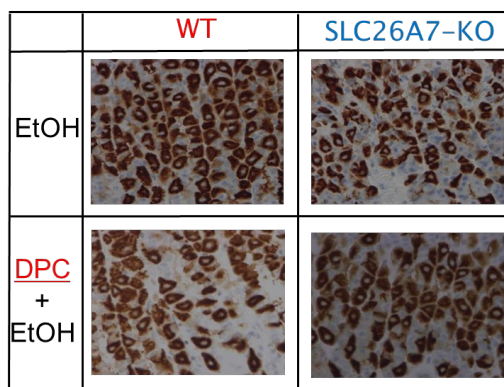


図3 . エタノール (EtOH) および DPC 処理後のマウス胃粘膜における抗胃プロトンポンプ抗体による免疫組織染色

SLC26A7- KO と WT の胃より単離した胃腺中の胃酸分泌細胞に BCECF をロードし、細胞外 Cl⁻濃度変化による細胞内 pH 変化を測定したところ、両者の pH 変化に有意な差は観察されなかった。この結果は、発現細胞で得られた前述の結果と一致しており、胃酸分泌細胞では、SLC26A7 のチャネル機能が、細胞防御機構に重要であることがわかった。

(3) 胃プロトンポンプ サブユニット (HK) の糖鎖末端の機能解析

胃プロトンポンプ (H⁺, K⁺-ATPase) サブユニット (HK) の糖鎖末端のシアル酸をノイラミニダーゼ (シアリダーゼ) または pH 5 溶液により切断すると、胃酸分泌機能が有意に低下することを発現細胞系において見出した。

またラット胃において、酸分泌休止時 (ファモチジン処理; 5 mg/kg 腹腔内投与) には、HK にシアル酸が付加しているが、酸分泌刺激時 (ヒスタミン処理; 2 mg/kg 腹腔内投与) には HK のシアル酸が切断されることを見出した (図4)。同様な結果はブタ胃粘膜においても観察できた。

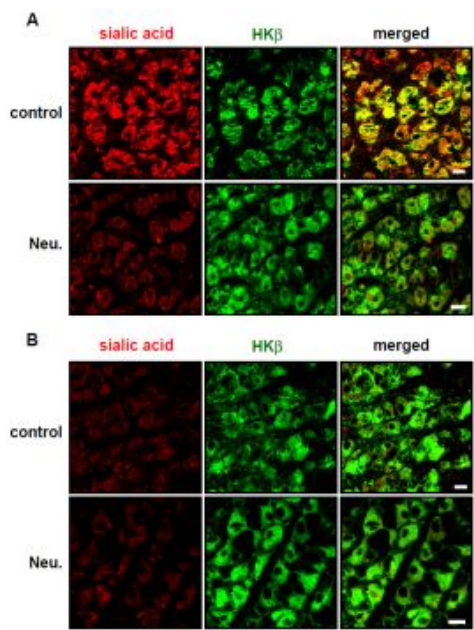


図4 . ラット胃粘膜の免疫組織染色
 (A) ファモチジン処理、(B) ヒスタミン処理、
 Neu.: ノイラミニダーゼ、バー長: 10 μm

ファモチジン処理したラット胃から調製したサンプルにおける H^+, K^+ -ATPase 活性は、ヒスタミン処理ラット由来の胃サンプルの活性よりも有意に高かった。ファモチジン投与サンプルにおける H^+, K^+ -ATPase 活性の上昇は、ノイラミニダーゼ処理により減弱した。

以上の結果から、 H^+, K^+ -ATPase サブユニットの糖鎖には、酸分泌休止状態では末端にシアル酸が付加されている一方、酸分泌刺激状態では切断されていることがわかった。シアル酸付加が、胃酸分泌機構および細胞防御機構と関連している可能性が考えられた。(図5)

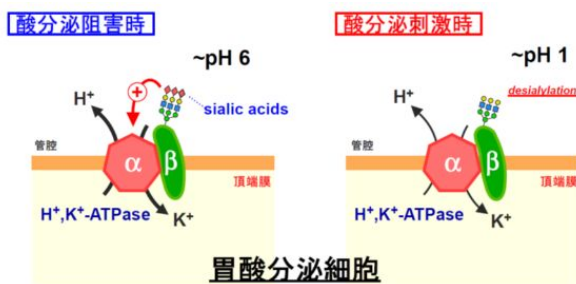


図5 . 胃プロトンポンプにおけるシアル酸の機能

(4) 初代胃酸分泌細胞の作製法の構築

ラット胃より効率的に高純度で初代培養胃酸分泌細胞を作製する方法を構築した。細胞は1週間以上培養可能であり、 H^+, K^+ -ATPase と機能共役する Cl^-/H^+ 交換輸送体の CIC-5 を強制発現させることができた。

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)

Fujii T, Watanabe M, Shimizu T, Takeshima H, Kushiro K, Takai M, Sakai H. (2016) Positive regulation of the enzymatic activity of gastric H^+, K^+ -ATPase by sialylation of its α -subunit. *Biochim. Biophys. Acta* 1858: 1228-1235. 査読有 doi: 10.1016/j.bbamem.2016.02.029.

Fujii T, Takahashi Y, Takeshima H, Saitoh, C, Shimizu T, Takeguchi N, Sakai H. (2015) Inhibition of gastric H^+, K^+ -ATPase by 4-(2-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentylindan-1-on-5-yloxy)butyric acid (DCPIB), an inhibitor of volume-regulated anion channel. *Eur. J. Pharmacol.* 765: 34-41. 査読有 doi: 10.1016/j.ejphar.2015.08.011.

Shimizu T, Ohtake H, Fujii T, Tabuchi Y, Sakai H. (2015) Volume-sensitive outwardly rectifying Cl^- channels contribute to butyrate-triggered apoptosis of murine colonic epithelial MCE301 cells. *J. Physiol. Sci.* 65: 151-157. 査読有 doi: 10.1007/s12576-014-0352-5.

Ikari A, Taga S, Watanabe R, Sato T, Shimobaba S, Sonoki H, Endo S, Matsunaga T, Sakai H, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Sugatani J. (2015) Clathrin-dependent endocytosis of claudin-2 by DFYSP peptide causes lysosomal damage in lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1848: 2326-2336. 査読有 doi: 10.1016/j.bbamem.2015.07.003.

Takahashi Y, Fujii T, Fujita K, Shimizu T, Higuchi T, Tabuchi Y, Sakamoto H, Naito I, Manabe K, Uchida S, Sasaki S, Ikari A, Tsukada K, Sakai H. (2014) Functional coupling of chloride-proton exchanger CIC-5 to gastric H^+, K^+ -ATPase. *Biol. Open* 3: 12-21. 査読有 doi: 10.1242/bio.20136205.

Shimizu T, Fujii T, Takahashi Y, Takahashi Y, Suzuki T, Ukai M, Tauchi K, Horikawa N, Tsukada K, Sakai H. (2014) Up-regulation of Kv7.1 channels in thromboxane A_2 -induced colonic cancer cell proliferation. *Pflügers Arch.* 466: 541-548. 査読有 doi: 10.1007/s00424-013-1341-x.

Ikari A, Tonegawa C, Sanada A, Kimura T, Sakai H, Hayashi H, Hasegawa H, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Endo S,

Matsunaga T, Sugatani J. (2014) Tight junctional localization of claudin-16 is regulated by syntaxin 8 in renal tubular epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 289:13112-13123. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M113.541193.

Higuchi T, Shimizu T, Fujii T, Nilius B, Sakai H. (2014) Gating modulation by heat of the polycystin transient receptor potential channel PKD2L1 (TRPP3). *Pflügers Arch.* 466: 1933-1940. 査読有 doi: 10.1007/s00424-013-1439-1.

Ikari A, Atomi K, Yamazaki Y, Sakai H, Hayashi H, Yamaguchi M, Sugatani J. (2013) Hyperosmolarity-induced up-regulation of claudin-4 mediated by NADPH oxidase-dependent H₂O₂ production and Sp1/c-Jun cooperation. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 2617-2627. 査読有 doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.016.

Fujii T, Awaka S-Y, Takahashi Y, Fujita K, Tsuji H, Shimizu T, Gomi T, Tsukada K, Sakai H. (2013) Modulation of H⁺,K⁺-ATPase activity by the molecular chaperone Erp57 highly expressed in gastric parietal cells. *FEBS Lett.* 587: 3898-3905. 査読有 doi: 10.1016/j.febslet.2013.

Shimizu T, Iehara T, Sato K, Fujii T, Sakai H, Okada Y. (2013) TMEM16F is a component of a Ca²⁺-activated Cl⁻ channel but not a volume-sensitive outwardly rectifying Cl⁻ channel. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 304: C748-C759. 査読有 doi: 10.1152/ajpcell.00228.2012.

〔学会発表〕(計47件)

酒井秀紀, 藤井拓人, 久代京一郎, 高井まどか. 胃酸分泌細胞の生体界面において H,K-ATPase 鎖のシアル化はプロトンポンプ活性を正に制御する. 第93回日本生理学会大会; 2016年3月22-24日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

藤井拓人, 酒井秀紀. 胃壁細胞分泌膜界面において糖鎖末端シアル酸はプロトンポンプ活性を正に制御する. 第4回生体界面研究会; 2016年2月1-2日, 新潟大学(新潟県新潟市)

Sakai H, Fujii T, Shimizu T. Properties of chloride-transporting proteins in gastric parietal cells. The 21st Kyung Hee Ease-West Pharmaceutical Research Institute Symposium; 2015年11月20日, キョンヒ大学(韓国ソウル市)

桧物拓也, 藤井拓人, 清水貴浩, 酒井秀紀. 小胞コート蛋白質に着目した胃細管

小胞の多様性解析. 日本薬学会北陸支部第127回例会; 2015年11月15日, 富山大学杉谷キャンパス(富山県富山市)

井上貴斗, 阿波加隼也, 藤田恭輔, 藤井拓人, 清水貴浩, Ursula Seidler, 酒井秀紀. 胃酸分泌細胞の細胞防御機構における SLC26A7 の役割. 第62回中部日本生理学会大会; 2015年11月13-14日, 富山大学五福キャンパス(富山県富山市)

酒井秀紀, 藤井拓人, 清水貴浩. 胃細胞の分泌膜界面の構成と機能. 平成27年度生理研研究会「第3回生体界面研究会」; 2015年7月16-17日, 自然科学研究機構生理学研究所(愛知県岡崎市)

酒井秀紀, 藤井拓人, 清水貴浩. 胃酸分泌に関わるイオン輸送タンパク質の機能動態. 第92回日本生理学会大会; 2015年3月21-23日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

阿波加隼也, 藤田恭輔, 清水貴浩, 藤井拓人, 酒井秀紀. 胃酸分泌細胞における SLC26A7 が関与する新規細胞防御機能. 日本薬学会北陸支部第126回例会; 2014年11月16日, 金沢大学(石川県金沢市)

Fujita K, Awaka S, Shimizu T, Fujii T, Seidler U, Sakai H. SLC26A7 as a candidate of cytoprotective molecule in gastric parietal cells. International Symposium on Epithelial Barrier and Transport; 2014年11月1-2日, 立命館大学(滋賀県草津市)

酒井秀紀, 藤井拓人, 清水貴浩, 塚田一博. 消化器がん細胞におけるポンプとチャネル機能の異常. 日本薬学会第134年会 一般シンポジウム「生体膜のフロントライン: 上皮膜バリアの病態生理機能研究の新展開」; 2014年3月27-30日, 鶴屋百貨店東館(熊本県熊本市)

藤井拓人, 阿波加隼也, 清水貴浩, 塚田一博, 酒井秀紀. 胃壁細胞頂端膜における Erp57 の機能. 日本薬学会第134年会; 2014年3月27-30日, 熊本市総合体育館(熊本県熊本市)

酒井秀紀, 藤井拓人, 清水貴浩. 細胞膜マイクロドメインにおける Na,K-ATPase の機能調節機構. 第91回日本生理学会大会 シンポジウム「上皮膜の階層的機能形態研究の新展開」; 2014年3月16-18日, 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

藤井拓人, 阿波加隼也, 清水貴浩, 塚田一博, 酒井秀紀. Erp57 によるシャペロン機能非依存的な胃 H⁺,K⁺-ATPase の活性化. 第91回日本生理学会大会; 2014年3月16-18日, 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

齋藤知里, 藤井拓人, 清水貴浩, 酒井秀紀. 胃プロトンポンプ活性に対する Cl⁻ チャネル阻害剤の効果. 日本薬学会北陸支部第125回例会; 2013年11月17日,

北陸大学 (石川県金沢市)

〔図書〕(計2件)

Sakai H, Fujii T, Takeguchi N. *Met. Ions Life Sci.* Springer ; 2016 .
Poton-Potassium (H⁺/K⁺) ATPases:
Properties and Roles in Health and
Diseases. 16: 459-483. doi: 10.1007/
978-3-319-21756-7_13.

酒井秀紀. 標準生理学 第8版. 小澤瀨
司, 福田康一郎監修. 東京: 医学書院;
2014. 第56章 食物の摂取と輸送, 第
57章 胃; p816-828.

〔その他〕

ホームページ等

研究代表者の所属研究室 Web ページ

[http://www.pha.u-tooyama.ac.jp/phaphy1/
index-j.html](http://www.pha.u-tooyama.ac.jp/phaphy1/index-j.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 秀紀 (SAKAI, Hideki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・
教授

研究者番号: 60242509

(2) 研究分担者

澤口 朗 (SAWAGUCHI, Akira)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号: 30336292

五十里 彰 (IKARI, Akira)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 50315850