

9538 塩素イオンチャネルと消化管の細胞防御

助成研究者：酒井 秀紀（富山医科薬科大学 薬学部）

共同研究者：五十里 彰（富山医科薬科大学）

竹口 紀晃（富山医科薬科大学）

胃酸分泌細胞は細胞防御機構のかなめの役割を果たしているものと考えられており、この機構にプロスタグランジンE₂ (PGE₂) が深く関与していることがこれまでにわかっているが、そのメカニズムは不明である。

これまでに我々は、ウサギ胃酸分泌細胞の基底側膜にPGE₂によって活性化される塩素イオンチャネル(Cl⁻チャネル)が存在することを発見している。このCl⁻チャネルは、膜電位形成に寄与することによりハウスキーピングの役割を担っており、Cl⁻チャネル阻害剤のNPPBに感受性である。PGE₂は、エタノールによる胃酸分泌細胞の形態変化と機能障害を *in vivo* および *in vitro* で保護することが報告されていることから、このCl⁻チャネルは細胞防御機構にも関与していることが考えられる。本研究では、パッチクランプ法、顕微蛍光Ca²⁺測定法、酵素免疫学的手法を用い、このCl⁻チャネルのPGE₂による活性化機構の全容を明らかにし、塩素イオンが関与する細胞防御機構の実体の解明に迫ることを目的とした。

本研究で、PGE₂によるCl⁻チャネルの活性化に関与するメッセンジャーは、Ca²⁺と一酸化窒素(NO)とサイクリックcGMP(cGMP)であることがわかった。この機構では、PGE₂による細胞内Ca²⁺濃度の上昇がNO産生を刺激し、それに続きグアニル酸シクラーゼが活性化されcGMPの産生が増大し、最終的にCl⁻チャネルが活性化されるものと考えられた。PGEリセプターのサブタイプに対してEP3アゴニスト/EP1アンタゴニストとして働くONO-NT-012は、細胞内Ca²⁺濃度を上昇させ、Cl⁻チャネルを活性化した。また、百日咳毒素(PTX)で細胞を前処理しておく、PGE₂の効果は完全に抑制された。したがってこの機構には、EP3リセプターが関与しており、PTX感受性のGTP結合蛋白質がEP3リセプターにカップルしているものと考えられた。

このCl⁻チャネルと細胞防御機構との機能的関連についても検討した。胃酸分泌細胞のエタノールによる障害の程度は、予め細胞内にロードした蛍光色素(BCECF)の漏れの量を測定することにより定量化した。胃酸分泌細胞をNO発生剤のニトロプルシドやcGMPアナログのジブチリルcGMPで前処理しておく、エタノールによる障害は有意に軽減された。cGMPによる細胞防御効果は、NPPBにより消失した。以上のことから、PGE₂による胃酸分泌細胞の細胞防御機構にはNO/cGMP経路が関与し、そのターゲットは基底側膜のCl⁻チャネルであることが考えられた。PGE₂の細胞防御機能の一部は、少なくともCl⁻チャネルによる膜電位の安定化を介しているものと思われる。

9538 塩素イオンチャンネルと消化管の細胞防御

助成研究者：酒井 秀紀 (富山医科薬科大学 薬学部)

共同研究者：五十里 彰 (富山医科薬科大学)

竹口 紀晃 (富山医科薬科大学)

1. 研究目的

胃は、食物を消化するために強酸 (塩酸) の分泌および大量の物質輸送をおこなっている。このため胃の各細胞は、絶えずpH変化やNaCl濃度変化などの過酷な条件にさらされているにもかかわらず、通常は死滅しない。これは、胃の細胞が巧妙なホメオスタシス (恒常性) 維持機構および細胞防御機構を兼ね備えているためである。

胃酸分泌細胞は細胞防御機構のなかめの役割を果たしているものと考えられており、この機構にプロスタグランジンE₂ (PGE₂) が深く関与していることがこれまでにわかっているが、そのメカニズムは不明である。

これまでに我々は、パッチクランプ法を用い、ウサギ胃酸分泌細胞の基底側膜にアラキドン酸およびPGE₂によって活性化される塩素イオンチャンネル (Cl⁻チャンネル) が存在することを発見している (1)。PGE₂は、エタノールによる胃酸分泌細胞の形態変化と機能障害を *in vivo* および *in vitro* で保護することが報告されていることから (2, 3)、このCl⁻チャンネルは細胞防御機構に関与していることが考えられる。

その他にもこのチャンネルは以下のような数々の興味深い性質を有している。1) 単一チャンネルコンダクタンスは非常に小さいが (0.3 pS) が、1個の細胞当たり約3万個と非常に多数存在する (1, 4)、2) このCl⁻チャンネルは細胞内外の塩素イオン濃度差を利用し、膜電位を規定することによってハウスキーピング的役割 (生命維持機能) を担っている (5)、3) このチャンネルの活動はPTX非感受性GTP結合蛋白質を介した細胞内スーパーオキシドアニオン(O₂⁻)産生により抑制される (4, 6, 7)。

本研究では、この極めてユニークな細胞防御Cl⁻チャンネルのPGE₂による活性化機構の全容を明らかにし、塩素イオンが関与する細胞防御機構の実体の解明に迫ることを目的とした。

2. 研究方法

2.1 試薬

PGE₂ は東レ株式会社、ONO-NT-012 は小野薬品工業株式会社、KT-5823 は、協和メデックス株式会社のご好意によりいただいた。

2.2 ウサギ単離胃腺の調製

ウレタン麻酔したウサギ (日本白色種、オス、体重 1-3kg) より胃を摘出し、胃粘膜を

コラゲナーゼ処理することによって単離胃腺を得た。胃腺中から胃酸分泌細胞を突出させるために更にアクチナーゼE処理(500チロシン単位/ml, 室温で5分)を行った。

2.3 単離胃酸分泌細胞の調製

コラゲナーゼ処理で得た単離胃腺懸濁液を4,000チロシン単位/mlのアクチナーゼEを含む溶液中、35-37℃で50分間処理した。得られた単離細胞懸濁液をパーコール連続密度勾配遠心およびエルトリエーションにかけて精製した。これらの操作により、胃酸分泌細胞を80-90%含む細胞懸濁液が得られた。

2.4 ホールセルCl⁻電流の測定

ホールセル記録は、リスト社のEPC-7パッチクランプシステムを用いて行った(1, 4, 8)。パッチ電極は、胃腺中の胃酸分泌細胞の基底側膜に装着し、ホールセルCl⁻電流を記録した。以前の研究でホールセルCl⁻電流は、1種類のCl⁻チャネル(0.3 pS)より構成されていることがわかっている(1)。実験は35-37℃で行った。

2.5 単一胃酸分泌細胞の細胞内遊離Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i)の測定

Fura-2/AMをロードした胃腺中の、1個の胃酸分泌細胞の[Ca²⁺]_iを、SPEX顕微蛍光解析システムを用いて35-37℃で測定した。

2.6 胃酸分泌細胞の細胞内cGMP含量の測定

精製した胃酸分泌細胞懸濁液にトリクロロ酢酸を加え、遠心後に得られた上清を採取した。上清中のcGMP含量は、アマシャム社のcGMPエンザイムイムノアッセイキットを用いて定量した。

2.7 細胞毒性の評価

エタノール(10%)による胃酸分泌細胞の細胞毒性は、細胞からの蛍光色素(BCECF)の漏れを測定することにより定量化した(9)。細胞懸濁液には予め、BCECF/AMを負荷しておいた。

3. 研究結果 (10,11)

3.1 PGE₂によるCl⁻チャネルの活性化

Cl⁻チャネルの活性化の程度は、ホールセルCl⁻電流の増加量を測定することにより定量化した。細胞外にPGE₂(10 μM)を加えるとFig. 1aに示すようにホールセルCl⁻電流の増大が観察された。この効果は濃度依存的で、1nM, 0.1 μM, 10 μM PGE₂適用6分後で、Cl⁻電流はそれぞれコントロール(100%)の134±9%, 159±12%, 175±16% (n=5-6)まで増大した。PGE₂によって増大した電流はCl⁻チャネル阻害剤のNPPBによって完全に抑制された(Fig. 1a)。

3.2 Cl⁻チャネルに対するNOおよびグアニル酸シクラーゼ関連化合物の効果

NPPB感受性Cl⁻電流の活性化機構にNO-グアニル酸シクラーゼ経路が介在しているの

かどうかについて検討した。PGE₂非存在下で、細胞内にNO発生剤(可溶性グアニル酸シクラーゼ活性化剤)のニトロプルシッド(30 μM)を加えると、PGE₂の場合(Fig. 1a)と同様のタイムコースでNPPB感受性Cl⁻電流が増大し、6分間でコントロール(100%)の154±13% (n=4)まで上昇した(Fig. 1b)。細胞をNO合成酵素の基質阻害剤であるN^ω-モノメチル-L-アルギニン(1mM)で前処理しておく(32°Cで70-110分)、PGE₂(10 μM)によるCl⁻電流増大効果は完全に抑制された(n=5)。これらの結果からPGE₂によるCl⁻チャンネルの活性化にはNO産生が必要であることが示された。

細胞内にcGMP(50 μM)を加えても、PGE₂(Fig. 1a)およびニトロプルシッド(Fig. 1b)の場合と同様のタイムコースでNPPB感受性Cl⁻電流が増大した(Fig. 1c; 154±9%, n=5)。一方、細胞内にグアニル酸シクラーゼ阻害剤のメチレンブルー(10 μM)を加えるとCl⁻電流増大効果はほぼ完全に抑制された(Fig. 1d; n=6)。したがってPGE₂によるCl⁻チャンネルの活性化には、NO産生とそれに続くグアニル酸シクラーゼの活性化(cGMP産生)が必要であることが示唆された。

3.3 胃酸分泌細胞のcGMP含量に対するPGE₂の効果

3.2でのホールセルCl⁻電流記録の結果に対応して、胃酸分泌細胞懸濁液にPGE₂(10 μM)を加えると細胞のcGMP含量は有意に上昇し、上昇のピークはPGE₂適用後、1-3分で観察された(Fig. 1e)。

3.4 PGE₂によるCl⁻チャンネルの活性化におけるCa²⁺の効果

これまでに多くのホルモンリセプターによるグアニル酸シクラーゼの活性化が、細胞内遊離Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)の上昇に続くCa²⁺依存性NO産生を介して起こることが報告されている(12-14)。そこでPGE₂によるCl⁻チャンネルの活性化機構にCa²⁺が関与しているのかどうかについて検討した。PGE₂(10 μM)のCl⁻電流増大効果は、細胞外液のCa²⁺を除いても影響を受けなかった(177±14%, n=3)、細胞内液のCa²⁺をBAPTA(5mM)で強くキレートすると著しく抑制された(105±6%, n=5)。これらの結果からPGE₂によるCl⁻チャンネルの活性化には、[Ca²⁺]_iの上昇が必要であり、Ca²⁺は細胞内ストアから遊離されることが示唆された。

3.5 胃酸分泌細胞の[Ca²⁺]_iに対するPGE₂の効果

3.4でのホールセルCl⁻電流記録の結果に対応して、細胞外にPGE₂(10 μM)を加えると単一胃酸分泌細胞の[Ca²⁺]_iは、Fig. 2に示すように上昇した。この効果は濃度依存的で、10nM, 0.1 μM, 10 μM PGE₂適用後30秒以内に一過性にそれぞれ17±6nM, 21±5nM, 47±12nM (n=4-7)上昇した。PGE₂(10 μM)の効果は細胞外Ca²⁺には依存せず、Ca²⁺-free溶液中でも44±8nM (n=9)の[Ca²⁺]_i上昇が観察された(Fig. 2a)。これまでに胃酸分

泌細胞においてPGE₂が[Ca²⁺]_iを上昇させるという報告はなく今回が初めてである。

3.6 A23187のCl⁻電流およびcGMP含量に対する効果

PGE₂非存在下でCa²⁺イオノフォアのA23187 (2 μM)を細胞外に加えると、Cl⁻電流はコントロール(100%)の177±16% (n=4)まで増大した。この効果は、細胞内にメチレンブルー (10 μM)を存在させることにより、完全に消失した (n=4)。

胃酸分泌細胞懸濁液にA23187 (2 μM)を加えても、PGE₂の場合と同様なcGMP含量の有意な上昇が観察され、3分間で151±36から383±47 fmol/10⁶ cells (n=4)に増大した。これらの結果から、[Ca²⁺]_iの上昇が直接Cl⁻チャネルを活性化するのではなく、グアニル酸シクラーゼの活性化につながっていることが示された。

3.7 Cl⁻チャネルの活性化機構におけるEP3リセプターとPTX感受性GTP結合蛋白質の関与

10 μM ONO-NT-012 (EP1アンタゴニストおよびEP3アゴニスト) (15)を細胞外に適用すると、ホールセルCl⁻電流は、コントロール(100%)の183±14% (n=5)まで増大し、[Ca²⁺]_iは52±2nM (n=6)上昇した。このことからCl⁻チャネルの活性化機構には、EP3リセプターが関与していることが示唆された。

また、細胞を500ng/ml PTXで前処理すると(32℃で120-160分)、PGE₂ (10 μM)によるCl⁻電流増大効果および[Ca²⁺]_i上昇効果は完全に消失した(n=6-9)。したがって、PGEリセプターにはPTX感受性のGTP結合蛋白質がカップルしているものと考えられた。

3.8 cGMP依存性プロテインキナーゼ阻害剤の効果

cGMP産生からCl⁻チャネルの活性化に至る過程にプロテインキナーゼが関与しているのかを調べるためにcGMP依存性プロテインキナーゼ(タイプI)阻害剤のKT-5823 (16)を用いた。しかし、KT-5823 (細胞内に1 μM)はCl⁻電流増大効果に有意な影響を及ぼさなかった(n=6)。したがって少なくともタイプIのcGMP依存性プロテインキナーゼは関与していないものと考えられるが、別のタイプ(タイプII)が関与している可能性は十分に有り得る。現在までにタイプIIに特異的な阻害剤は見つかっていない。

3.9 Cl⁻チャネルの活性化と細胞防御機構との関連

ウサギ胃酸分泌細胞の膜電位はここで述べたCl⁻チャネルによって形成されている(5)。Fig. 3aに示したように、NPPB (500 μM)によりCl⁻チャネル電流が50%減少しても、膜電位はコントロールレベルに保たれていた(n=5)。しかし、開いているチャネル数があるレベル以下になると、急激に膜電位は消失した(Fig. 3a)。

本研究のこれまで結果から、PGE₂によるCl⁻チャネル活性化機構のメッセンジャーとし

てCa²⁺とNOとcGMPが考えられた。そこで、NO発生剤のニトロプルシッドとcGMPアナログのジブチリルcGMPが、胃酸分泌細胞のエタノール障害に対して、保護効果をもつかどうかを調べた（Fig. 3b）。コントロールとして10%エタノールで細胞を10分間処理した。エタノールを加える前に、ニトロプルシッド（200 μM）またはジブチリルcGMP（500 μM）で細胞を15分間前処理しておくこと、有意にエタノール障害が軽減された（Fig. 3b, open columns）。Cl⁻チャネル阻害剤のNPPB（500 μM）で細胞を1分間前処理しておくこと、ジブチリルcGMPによる保護効果が消失した（Fig. 3b, closed columns）。

4. 考察

本研究で、このCl⁻チャネルのPGE₂による活性化はCa²⁺/NO/cGMP経路を介して起こることがわかった（Fig. 4）。またこの機構に関与するPGE₂リセプターのサブタイプは、EP3リセプターで、PTX感受性GTP結合蛋白質とカップルしているものと考えられた（Fig. 4）。PGE₂によりCl⁻チャネルが活性化されるという知見は、これまでに大腸ガン培養細胞（17）や皮膚繊維芽細胞（18）などにおいて報告されているが、これらはアデニル酸シクラーゼ/cAMP系を介して活性化される。一方、我々が発見した胃酸分泌細胞のCl⁻チャネルはcAMP非感受性である（5）。

ウサギ胃にはEP3リセプターが豊富に存在することが報告されている（19）。PGE₂は、胃酸分泌細胞に作用してアデニル酸シクラーゼ/cAMP系を介した胃酸分泌を抑制することがよく知られているが、これもEP3リセプターを介しているものと考えられている。胃酸分泌細胞において、EP3リセプターが、基底側膜のCl⁻チャネルの活性化と管腔側膜のHCl分泌の抑制といった2つの重要な生理機能を、異なるメッセンジャー系を介して調節していることは非常に興味深い。

これまでに、NOは胃粘膜において血流を増加させることにより、粘膜保護効果を有することが示されてきている（20-22）。本研究では新たに、NOのターゲットは胃酸分泌細胞であり、cGMPの上昇とそれに続くCl⁻チャネルの活性化により細胞防御機能が增强されることがわかった。これは、胃酸分泌細胞が細胞防御のかなめの役割を果たしていることを支持するものである。

胃酸分泌細胞基底側膜のCl⁻チャネルは、ハウスキーピング機能（Fig. 3a）と細胞防御機能（Fig. 3b）といった非常に重要な生理機能に関与している。本研究から胃酸分泌細胞のPGE₂による細胞防御機構においては、少なくともこのCl⁻チャネルが開き、膜電位を安定化（ハウスキーピング機能を增强）することが重要なステップであると考えられた。

5. 今後の課題

今後、この細胞防御Cl⁻チャネルを分子生物学的に研究し、一次構造の決定や細胞防御機構の発現に必要な部位を解明していきたいと考え、実験を始めたところである。また、

同様の機能を有するCl⁻チャンネルが、他の臓器にも存在するのかどうかについて調べ、胃での塩素イオンが関与する細胞防御機構の普遍性についても明らかにしたい。

6. 文献

- 1) Sakai, H., Okada, Y., Morii, M. and Takeguchi, N.: *J. Physiol.*, **448**: 293-306, 1992.
- 2) Robert, A., Leung, F.W. and Guth, P.H.: *Gut*, **33**: 444-451, 1992.
- 3) Barr, D.B., Duncan, J.A., Kiernan, J.A., et al.: *J. Physiol.*, **405**: 39-55, 1988.
- 4) Sakai, H. and Takeguchi, N.: *J. Physiol.*, **461**: 201-212, 1993.
- 5) Sakai, H., Okada, Y., Morii, M. and Takeguchi, N.: *Pflügers Arch.*, **414**: 185-192, 1989.
- 6) Sakai, H. and Takeguchi, N.: *J. Biol. Chem.*, **269**: 23426-23430, 1994.
- 7) Sakai, H. and Takeguchi, N.: *Jpn. J. Physiol.*, **45**: 673-679, 1995.
- 8) Sakai, H., Tabuchi, Y., Kakinoki, B., Seike, H., Kumagai, S., Matsumoto, C. and Takeguchi, N.: *Eur. J. Pharmacol.*, **291**: 153-158, 1995.
- 9) Kolber, M.A., Quinones, R.R., Gress, R.E., et al.: *J. Immunol. Methods*, **108**: 255-264, 1988.
- 10) Sakai, H., Kumano, E., Ikari, A. and Takeguchi, N.: *J. Biol. Chem.*, **270**: 18781-18785, 1995.
- 11) Sakai, H., Ikari, A., Kumano, E. and Takeguchi, N.: *Br. J. Pharmacol.* (改訂投稿中).
- 12) Reiser, G.: *Eur. J. Biochem.*, **189**: 547-552, 1990.
- 13) Ishii, K., Warner, T.D., et al.: *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **17 suppl. 7**: S426-S250, 1991.
- 14) Xu, X., Star, R.A., Tortorici, G. and Muallem, S.: *J. Biol. Chem.*, **269**: 12645-12653, 1994.
- 15) Maruyama, T., Kouketu, M., Tokumoto, H., Kondo, K. and Hamanaka, N.: *In 9th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds, Florence (Abstr.)* p.88, 1994.
- 16) Kase, H., Iwahashi, K., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**: 436-440, 1987.
- 17) Frizzell, R.A., Halm, D.R., Rechkemmer, G., et al.: *Federation Proc.*, **45**: 2727-2731, 1986.
- 18) Bear, C.E.: *FEBS Lett.*, **237**: 145-149, 1988.
- 19) Breyer, M.D., Jacobson, H.R., Davis, L.S. and Breyer, R.M.: *Kidney Int.*, **43**: 1372-1378, 1993.
- 20) Kitagawa, H., Takeda, F. and Kohei, H.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253**: 1133-1137, 1990.
- 21) Whittle, B.J.R., Lopez-Belmonte, J. and Moncada, S.: *Eur. J. Pharmacol.*, **218**: 339-341, 1992.
- 22) Brzozowski, T., Drozdowicz, D., Szlachcic, A., et al.: *Digestion*, **54**: 24-31, 1993.

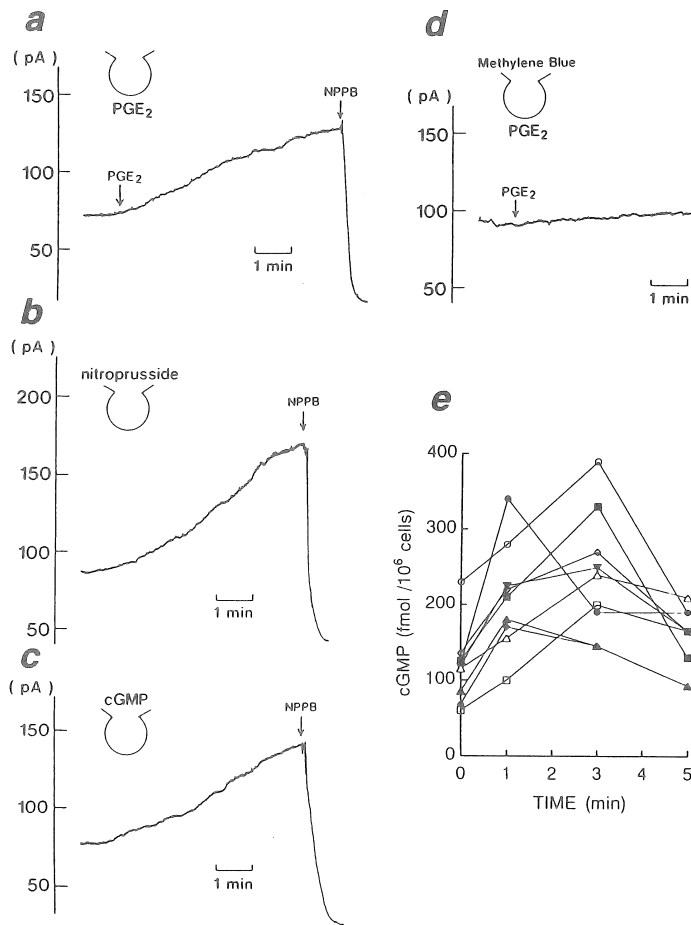


FIG. 1. Involvement of the NO-guanylate cyclase pathway in the PGE₂-induced activation of cytoprotective Cl⁻ channels. *a-d*, Typical traces of the whole-cell Cl⁻ current. 30 μM nitroprusside (*b*), 50 μM cGMP (*c*) or 10 μM Methylene Blue (*d*) was supplemented to the pipette solution. 10 μM PGE₂ and 500 μM NPPB were used. *e*, Effect of PGE₂ on the intracellular cGMP content in the parietal cell-rich suspension. The content was measured before (0 min) and after (1, 3 and 5 min) the application of 10 μM PGE₂.

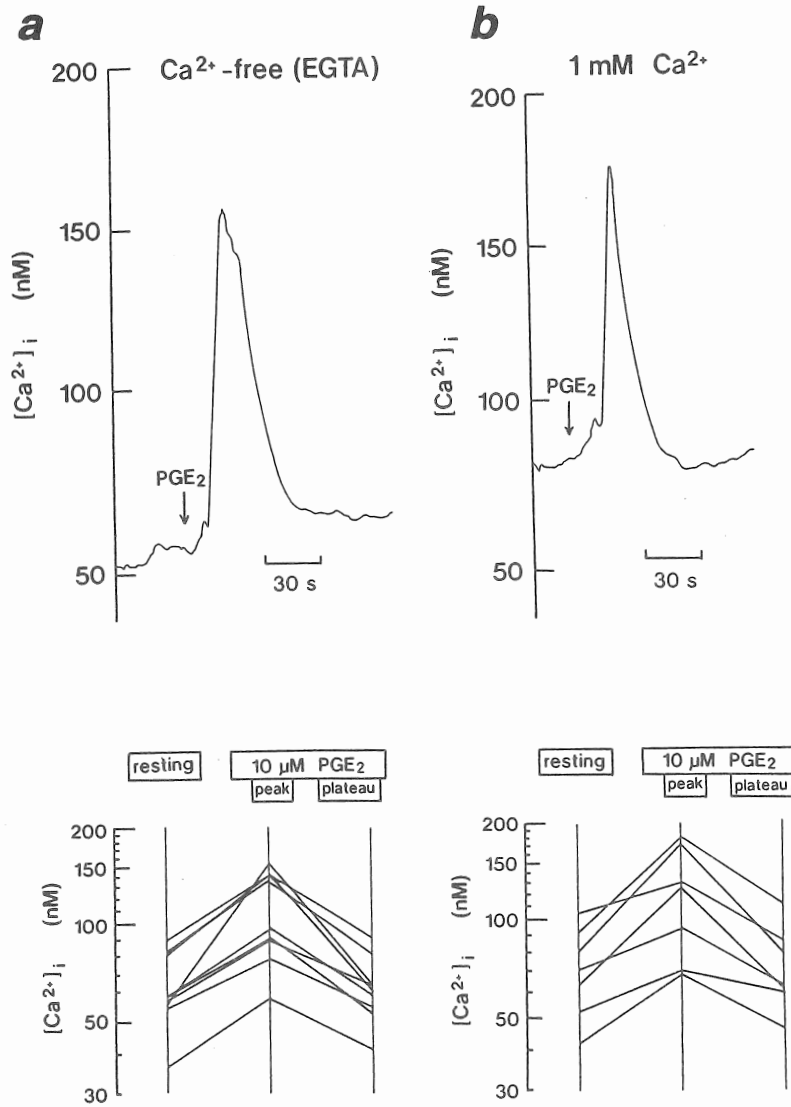


FIG. 2. Effect of PGE₂ on $[Ca^{2+}]_i$ of single parietal cells in gastric glands. Representative traces are shown. Cells were bathed in the solutions contained 0.1 mM EGTA (Ca²⁺-free, a) or 1 mM Ca²⁺ (b). 10 μM PGE₂ was perfused as indicated.

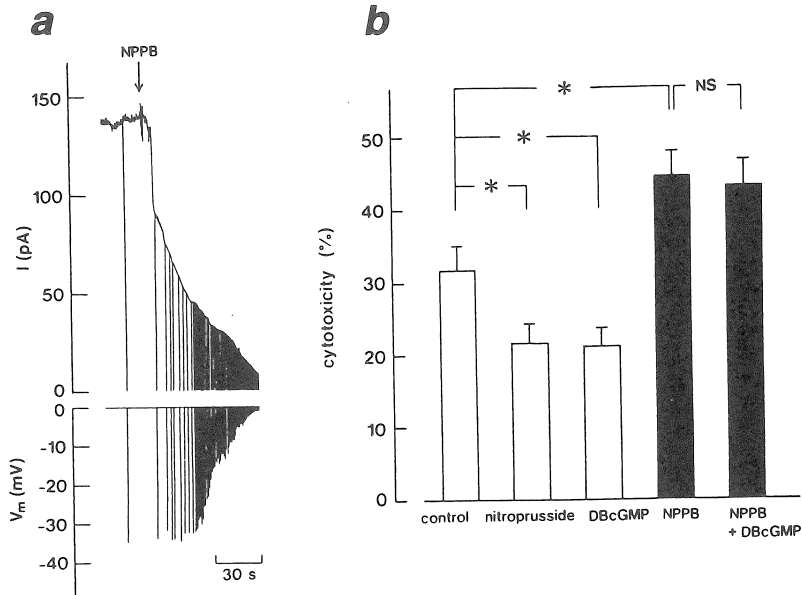


FIG. 3. Housekeeping Cl^- channel as a key target in the cytoprotective mechanism. *a*, Simultaneous recording of the whole-cell Cl^- current and membrane potential (V_m) of a parietal cell. $500 \mu\text{M}$ NPPB was added as indicated. *b*, Ethanol-induced cytotoxicity in the parietal cell-rich suspension. When indicated (*closed columns*), the cells were incubated with $500 \mu\text{M}$ NPPB for 1 min and then washed. They were incubated with or without $200 \mu\text{M}$ nitroprusside or $500 \mu\text{M}$ DBcGMP for 15 min, and then incubated with 10% ethanol for 10 min.

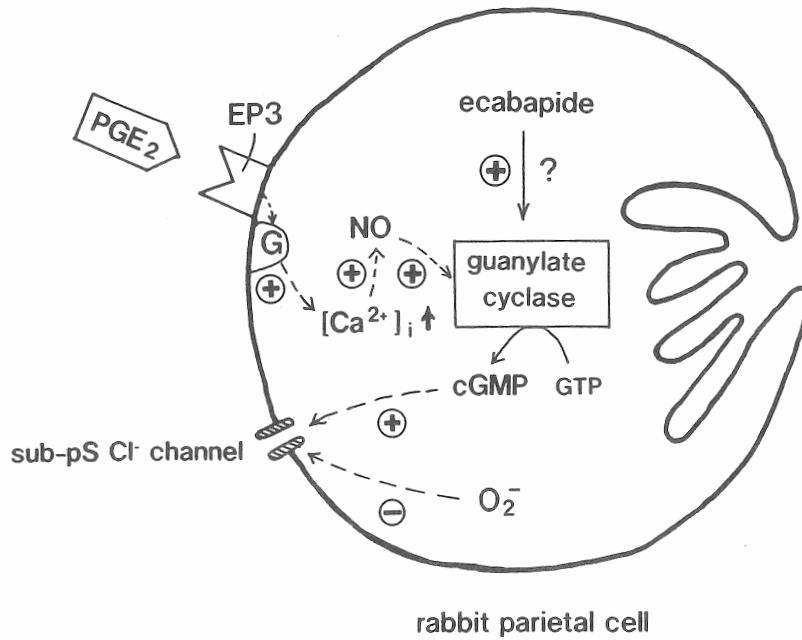


FIG. 4. Conceptual model for PGE₂-induced activation of the cytoprotective Cl⁻ channel in a rabbit parietal cell. EP3, a putative prostaglandin EP3 receptor; G, a PTX-sensitive G protein; + and -, activation and inhibition, respectively.

Chloride Channels and Cytoprotection in Gastrointestinal Cells

Hideki Sakai, Akira Ikari and Noriaki Takeguchi

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University

Summary

Prostaglandin E₂ (PGE₂) is known to have cytoprotective role on the gastric parietal cells against ethanol, but its mechanism is unknown. We recently found that PGE₂ opened a housekeeping chloride (Cl⁻) channel in the basolateral membrane of rabbit gastric parietal cells. This channel is sensitive to NPPB, a Cl⁻ channel blocker. In the present study, we investigated the cellular signaling mechanism of PGE₂-induced activation of the NPPB-sensitive Cl⁻ channel and cytoprotective function of the channel by patch-clamp technique, Fura 2-fluorescence measurement and enzyme immunoassay. Ca²⁺, nitric oxide (NO) and cGMP were involved as intracellular messengers in the PGE₂-induced activation of the channel. A novel bi-functional prostaglandin EP3 agonist/EP1 antagonist, ONO-NT-012, also increased both the [Ca²⁺]_i and the channel opening. The PGE₂-induced effects were blocked when parietal cells were pre-treated with pertussis toxin (PTX). Our results indicate that PGE₂ elicits the EP3 receptor-mediated increase in the [Ca²⁺]_i via a PTX-sensitive GTP-binding protein, resulting in successive production of NO and cGMP, and the opening of the housekeeping Cl⁻ channel. On the other hand, nitroprusside, a NO donor, and dibutyryl cGMP showed cytoprotective effect on the BCECF-loaded isolated parietal cell against ethanol. The cytoprotective effect of dibutyryl cGMP was abolished when the Cl⁻ channel was inhibited by NPPB. We suggest that the PGE₂-elicited cytoprotection was mediated via mobilization of the NO/cGMP pathway and that the target was a housekeeping Cl⁻ channel in the basolateral membrane of the parietal cell. The cytoprotective action of PGE₂ is mediated, at least, in part via stabilization of the membrane potential