

9539 消化管粘膜上皮細胞でのイオン輸送における細胞内情報伝達機構のクロストークに関する研究

助成研究者：桑原 厚和（岡崎国立共同研究機構 生理学研究所）

消化管粘膜上皮ではクロライドイオンが分泌され、それに伴って水が分泌される。私たちは、二種類以上の神経伝達物質の放出によると考えられる粘膜上皮細胞でのクロライドイオン分泌の増大を観察報告している。また、このような現象は、それぞれの神経伝達物質の細胞内情報伝達系のクロストークにより誘発される可能性についても報告した。

本研究では、上述の実験結果を踏まえて、クロライドイオン分泌に及ぼす細胞内情報伝達系としての細胞内カルシウム系とc-AMP系とのクロストーク機構について、さらに検討を加えた。

【研究方法】粘膜上皮と粘膜下神経叢から成るモルモット下部大腸標本を作製し、Ussing chamberに装着して実験に供した。

【研究結果】

Substance Pを漿膜側に投与すると、短絡電流は容量依存性に増大した。このIscの増加は、漿膜側へのbumetanide或いはfurosemide(0.1 mM)投与により、大きく減弱するため、クロライドイオンの分泌によるものと考えられた。Iscの増大はatropine(1 μ M)及びTTX(0.2 μ M)の前処置により減少したが、消失することはなかった。VIPの漿膜側への投与によってもIscは容量依存性に増大した。このIscの増大はatropine及びTTXの前処置により減少したが、消失することはなかった。TTXの存在下でsubstance PによるIscの増大は、細胞外液中のカルシウムを除去すると、大きく減弱した。VIPによるIscの増大も、細胞外カルシウムの除去により著しく減弱した。protein kinase A阻害剤H-89（1 μ M）はsubstance Pにより誘発されるIscの増大に、何等影響を与えなかったが、VIPにより誘発されるIscの増大を有意に抑制した。組織をsubstance P或いはVIPで前処置しておき、その後、組織にそれぞれ、VIP或いはsubstance Pを適用した時のbasal-Iscに与える影響についても検討を加えた。Substance Pの前処置によりVIPによるIscは明らかに増大した。H-89の前処置により、この増大反応は著しく減弱した。また、細胞外カルシウムを除去した場合、同様にVIP或いはsubstance P前処置下でのVIP及びsubstance PによるIscの増大は著しく抑制した。

【結論】

本研究の結果は、substance PによるIscの増大には、細胞外カルシウムイオンの流入が重要な役割を有していることを示唆している。Protein kinase A阻害剤であるH-89は、VIPにより誘発されるIscの増大を有意に抑制した。従って、VIPにより誘発されるIscの増大には、cAMP依存性Protein kinase Aの関与が示唆された。substance PとVIPによるIscの増大反応は細胞外カルシウムの除去及びProtein kinase A阻害剤により著しく抑制されたことから、細胞内カルシウム系とc-AMP系とのクロストーク機構の存在部位はcAMP依存性Protein kinase A活性化の下流域に存在していることが考えられる。

9539 消化管粘膜上皮細胞でのイオン輸送における細胞内情報伝達機構のクロストークに関する研究

助成研究者：桑原 厚和 (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所)

【研究目的】

消化管粘膜上皮ではクロライドイオンが分泌され、それに伴って水が分泌される。このような生体内での電解質輸送や水の分泌制御機構は、神経性あるいは体液性に制御されているが、その制御機構は以前考えられていたよりもはるかに複雑であることが近年明らかにされつつある。神経伝達物質によるクロライドイオン分泌は、他の細胞と同様に伝達物質の細胞膜受容体への結合後に起こる一連の細胞内情報伝達系の活性化により発現する。私たちは、一種類の神経伝達物質が作用して発現するクロライドイオン分泌よりも、二種類以上の神経伝達物質の放出によると考えられる粘膜上皮細胞でのクロライドイオン分泌の増大を観察報告している。また、このような現象は、それぞれの神経伝達物質の細胞内情報伝達系のクロストークにより誘発される可能性についても報告した。

本研究では、上述の実験結果を踏まえて、クロライドイオン分泌に及ぼす細胞内情報伝達系としての細胞内カルシウム系とc-AMP系とのクロストーク機構について、さらに検討を加えた。

【研究方法】

実験には、体重340—550gの雄モルモット下部大腸を使用した。モルモットを放血屠殺後、肛門側より5—10cm口側の下部大腸を摘出し、内腔をクレブス液で洗浄した。その後、下部大腸を腸管膜附着部で長軸方向に沿って切開し、ピンでシャーレに固定した。さらに、実体顕微鏡を使用して、粘膜上皮と粘膜下神経叢から成る標本作製するために、下部大腸から筋

層とアウエルバッハ神経叢を切除した。このようにして作製した標本を Ussing chamber に装着して、実験に供した。用いた標本の面積は0.785cm² であり、両側をそれぞれ10 mlのクレブス液で還流した。短絡電流(Isc)は日本光電製voltage-clamp Amplifier (日本光電、SS-1335) により測定し、データはMac Lab system (MacLab/8 system, Analog Digital System, Australia) により解析した。また、コンダクタンスは、適宜10 mVの電圧パルスを組織に加えることにより測定した。すべての実験において、神経活動の影響を除くため0.2 μMのtetrodotoxin(TTX)を粘膜側及び漿膜側に添加した。

アゴニストとしては、細胞内情報伝達系としてカルシウムを利用する substance P及びc-AMPを利用すると考えられるモルモットVIPを使用した。

【研究結果】

1) Substance P及びVIPのIscへの効果

Substance Pを漿膜側に投与すると、Iscは容量依存性に増大した (図1)。このIscの増加は、漿膜側へのbumetanide或いは furosemide(0.1 mM)投与により、大きく減弱するため、クロライドイオンの分泌によるものと考えられた。Iscの増大はatropine(1μM)及びTTX(0.2μM)の前処置により減少したが、消失することはなかった(n=7-9)。この結果は、substance PによるIscの増大の一部は、粘膜上皮に直接作用して発現していることを示唆している。

VIPの漿膜側への投与は、Substance Pと同様Iscを容量依存性に増大させた (図2)。このIscの増大はatropine及びTTXの前処置により減少したが、消失することはなかった(n=6)。また、その減弱度はatropineピン及びTTX処置群において差がなかった。このことは、VIPが粘膜上皮に直接投射している非コリン作動性の神経伝達物質として機能していることを示唆している。

2) Substance P 及びVIPによるIscの増大に及ぼすカルシウムイオンの影響について

TTXの存在下においても、substance Pは1)に示したように、Iscを増大させたが、細胞外液中のカルシウムを除去すると、その反応は大きく減弱した。次に、単離したcrypt cellを用いて、細胞内にFura-2/AMをloadして、細胞内カルシウム濃度の測定を行った。図3 Aに示すように、substance Pは細胞内カルシウム濃度を上昇させた。substance Pの添加により、細胞内カルシウム濃度は急峻な立ち上がりを示し、その後、徐々に減衰していった。一方、この細胞内カルシウム濃度の上昇は、細胞外カルシウムを除去しても認められたが、その反応は一過性の上昇であった（図3 B）。この実験結果は、substance Pの刺激により誘発されるクロライドイオン分泌に、細胞内カルシウムストアー及び細胞外カルシウムの流に結うが重要な役割を果たしていることを示唆している。

VIPは、単離したcrypt cellによる実験でsubstance Pと異なり、細胞内カルシウムを殆ど上昇させなかった。ところが、VIPによるIscの増大は、細胞外カルシウムの除去により著しく減弱した。以上の結果は、VIPによるIscの増大においても、細胞外カルシウムが重要な役割を有している事を示唆している。

3) Substance P 及びVIPによるIscの増大に及ぼすprotein kinase A阻害剤の影響について

cAMPはcAMP依存性蛋白キナーゼ（Protein kinase A）の活性を調節することが知られているので、Substance P 及びVIPによるIscの増大に及ぼすprotein kinase A阻害剤の影響について検討を加えた。protein kinase A阻害剤であるH-8及びH-89（1 μ M）はsubstance Pにより誘発されるIscの増大に、何等影響を与えなかった。一方、H-8及びH-89（1 μ M）はVIPにより誘発されるIscの増大を有意に抑制した（図4 ;n=6）。従って、VIPによるIscの増大にはcAMP依存性Protein kinase Aの関与が示唆された。

4) VIP或いはsubstance P前処置下におけるVIP及びsubstance Pの

basal-Iscに対する効果

上述の実験結果から、substance Pは細胞内のカルシウムイオンを上昇させ、また、VIPはcAMP依存性Protein kinase Aの活性化によりIscを上昇させることを明らかにした。次に、この細胞内情報伝達系のクロストークの機構を検討するために、組織をsubstance P或いはVIPで前処置しておき、その後、組織にそれぞれ、VIP或いはsubstance Pを適用した時のbasal-Iscに与える影響について検討した。図5に示すようにsubstance Pの前処置によりVIPによるIscは明らかに対照群に比べ上昇した。H-89 (1 μ M) の前処置により、この増大反応は著しく減弱した。また、細胞外カルシウムを除去した場合、同様にVIP或いはsubstance P前処置下でのVIP及びsubstance PによるIscの増大は著しく抑制した。

【考察】

本実験結果は、substance PによるIscの増大には、細胞外カルシウムイオンの流入が重要な役割を有していることを示している。また、この過程には、細胞内からのカルシウムイオンの上昇も必要であることが考えられる。一方、VIPによるIscの増大は、細胞外カルシウムイオンの除去により著しく減弱したがcrypt cellを用いた実験では、VIPは細胞内カルシウムイオン濃度に何等影響を与えなかった。このことは、VIPによるIscの増大は、単に細胞内cAMPの上昇だけで発生するのではなく、その機構に何らかの形で細胞外カルシウムイオンが関与していることを示唆している。Protein kinase A阻害剤であるH-8及びH-89 (1 μ M) はsubstance Pにより誘発されるIscの増大に、何等影響を与えなかったが、VIPにより誘発されるIscの増大を有意に抑制した。従って、VIPにより誘発されるIscの増大には、cAMP依存性Protein kinase Aの関与が示唆された。substance PとVIPによるIscの増大反応は細胞外カルシウムの除去及びProtein kinase A阻害剤により著しく抑制されたことから、細胞内カルシウム系とc-AMP系とのクロストーク機構の存在部位はcAMP依存性Protein kinase A活性化の下流域に存在して

いることが考えられる。

【今後の課題】

Substance Pによるクロライドイオン分泌には細胞外からのカルシウムイオンの流入及び細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出が重要な役割を果たしていることが考えられたが、細胞外カルシウムの流入がどのような機序で細胞内カルシウムストアからカルシウムを放出させるか、今後詳細に検討する必要がある。また、VIPにより誘発されるIscの増大にはcAMP依存性Protein kinase Aの関与が示唆されたが、本実験の結果は、細胞外カルシウムの存在が、substance Pと同様、VIPにおいても重要であることを示唆している。従って、細胞外カルシウムの存在がどのようなメカニズムでVIPによる分泌機構に関与しているか、今後検討する必要がある。

【参考文献】

1. Kuwahara, A. and Radowitz-Cooke, H.J. J. Physiol. (Lond.), 395:271-284, 1988.
2. Kuwahara, A. and Cooke, H.J. J. Pharmacol. & Exptl. Ther., 252(1):1-7, 1990.
3. Kuwahara, A., Sugiya, H. and Yanaihara, N. Regulatory Peptides, (Suppl. 1):S95, 1992.
4. Kuwahara, A., Kuwahara, Y., Mochizuki, T. and Yanaihara, N. Am. J. Physiol., 264G433-G441, 1993.
5. Reddix, R., Kuwahara, A., Wallace, L. and Cooke, H.J. J. Pharmacol. & Exptl. Ther., 269(2):1124-1129, 1994.
6. Kadowaki, M., Gershon, M. D. and Kuwahara, A. Behavioural Brain Research 73(1/2):293-296, 1996.

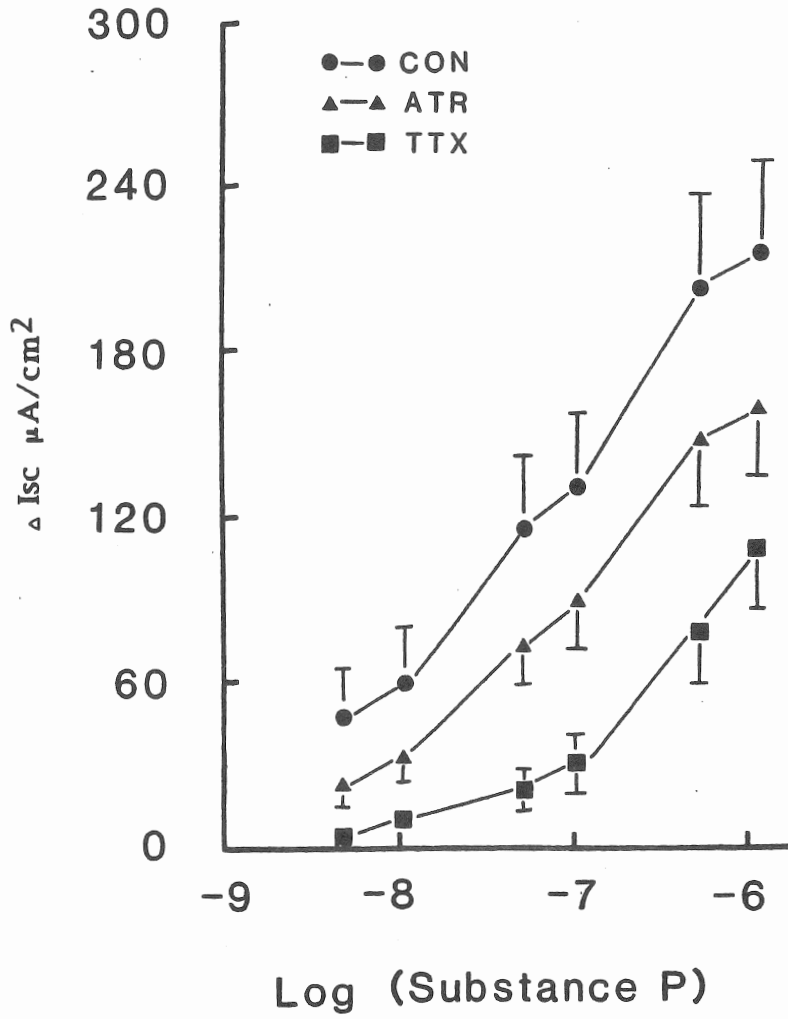


図1 Substance Pのイオン輸送に及ぼす影響

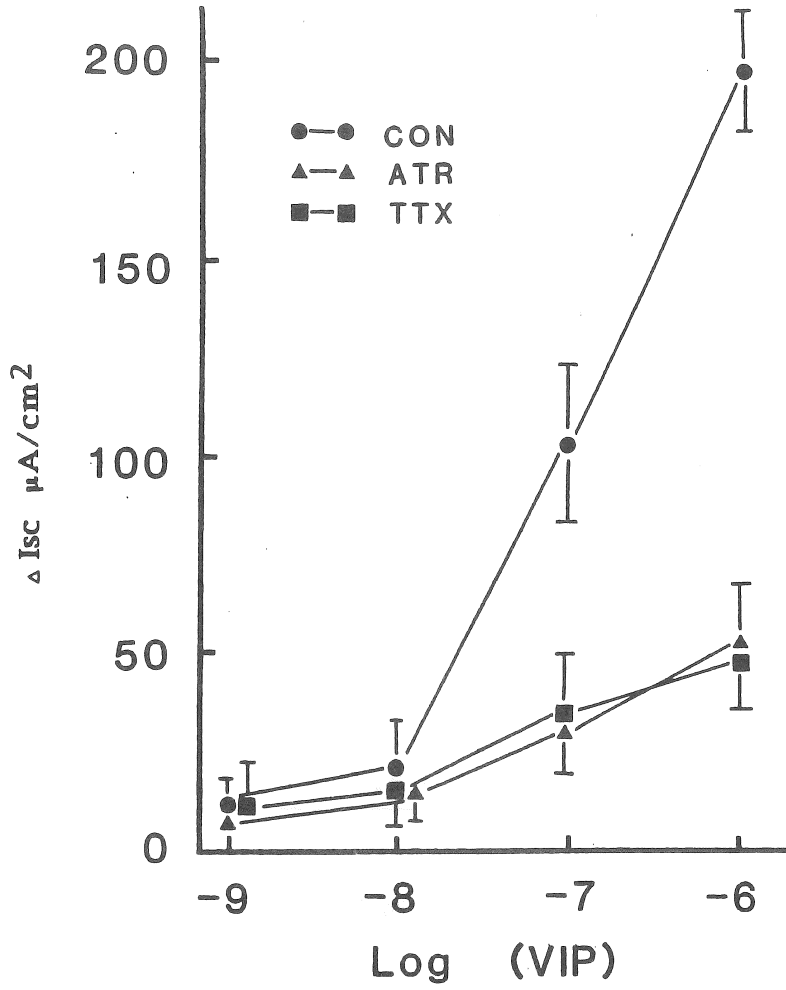
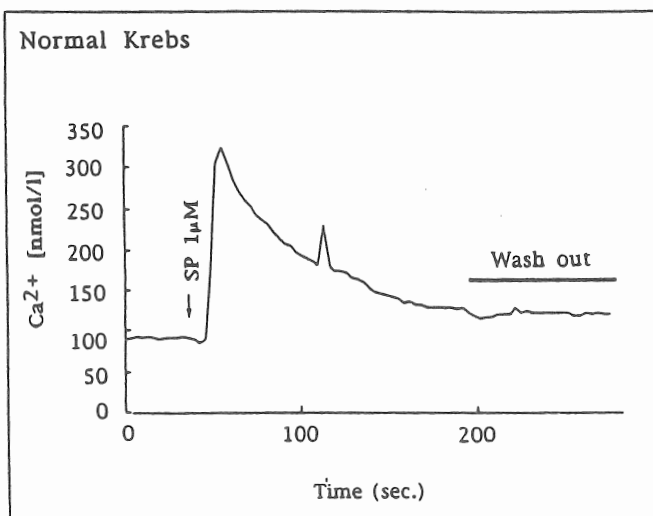


図2 VIPのイオン輸送に及ぼす影響

A



B

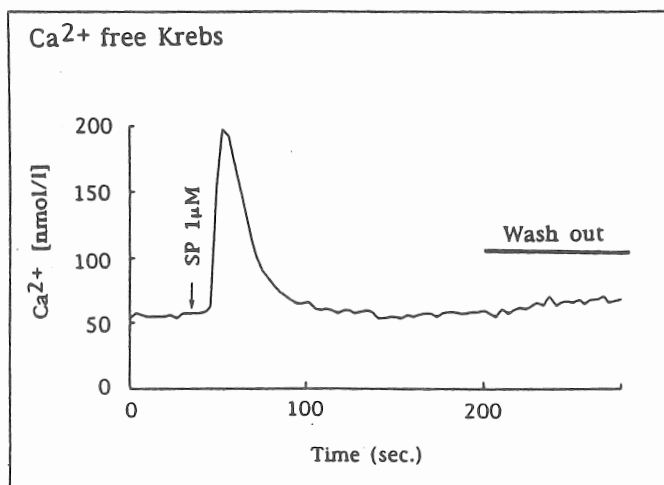


図3 Substance Pの細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響

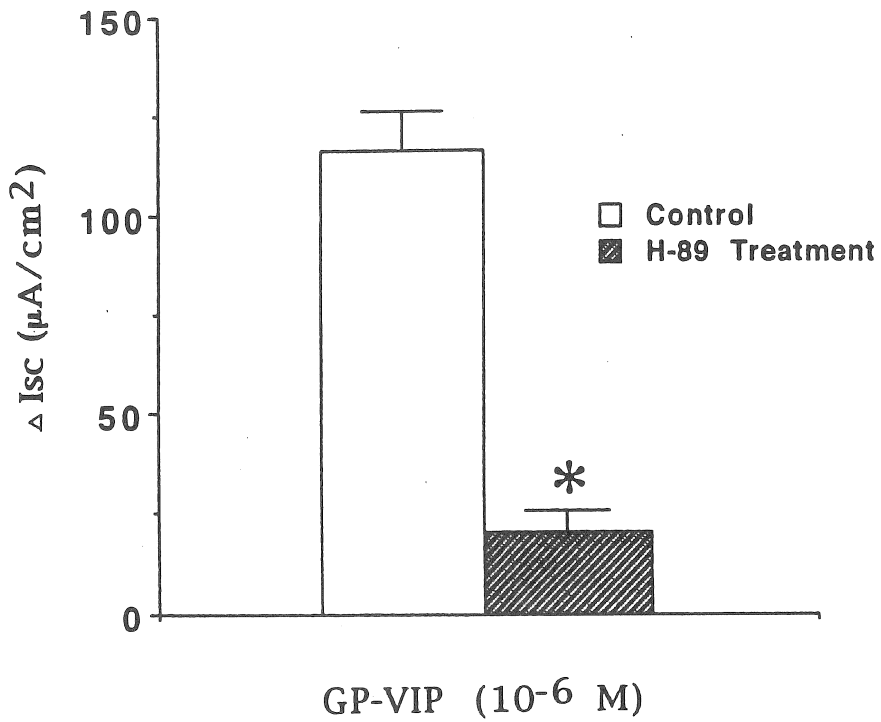


図4 Protein Kinase A阻害剤H-89のVIPによる短絡電流増大に対する影響

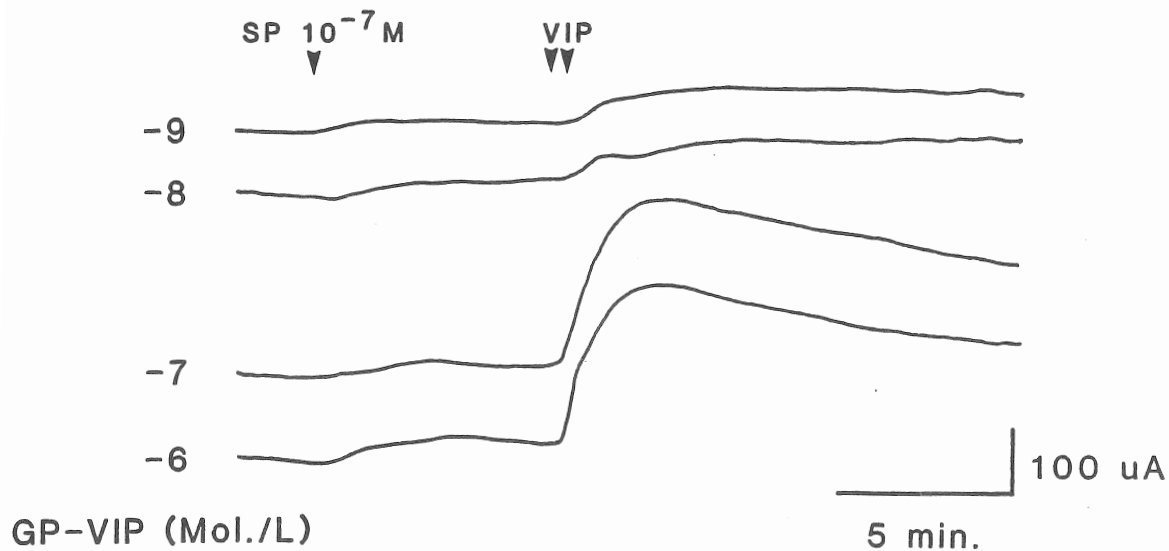


図5 Substance P前処置下におけるVIPのイオン輸送に与える影響.

Cross-talk mechanisms of substance P and VIP-evoked chloride secretion in guinea-pig distal colon

Atsukazu Kuwahara

Laboratory of Environmental Physiology, Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka, yada 52-1 Shizuoka 422 JAPAN

Summary

Enteric nervous system contains various neuropeptides such as substance P (SP) and VIP, which coexist with other classical transmitters or neuropeptides. The morphological evidence raises the possibility that enteric neurons may simultaneously release these neuropeptides and neuropeptides may cooperate with each other to modify the effector cell functions. We have examined this possibility using the isolated guinea-pig distal colon and dissociated crypt cells. Muscle-stripped preparations consisting of submucosal ganglia and mucosa were set up in Ussing flux chambers to measure the short-circuit current (Isc). All tissues were treated with tetrodotoxin (TTX)(2×10^{-7} M) to prevent neural activity. VIP or SP alone increased Isc, primarily due to chloride secretion in the presence of TTX. These responses were greatly reduced by the depletion of extracellular calcium. The SP-evoked increase in Isc was significantly enhanced by pretreatment with GP-VIP (10^{-6} M) and *vice versa*. The protein kinase A inhibitors, H-8 and H-89 significantly decreased the VIP-evoked response. H-8 and H-89 also decreased GP-VIP enhanced SP-evoked response. The augmentation of chloride secretion from epithelial cells by SP and VIP suggests a existence of cross-talk mechanism in the epithelial cells and the augmentation on chloride secretion by SP and VIP may occur in the process after protein kinase A activation.