

9631 塩素イオンチャンネルと消化管の細胞防御機構の分子レベルでの機能的連関

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 薬学部)

竹口 紀晃(富山医科薬科大学 薬学部)

ウサギ胃酸分泌細胞の基底側膜には、細胞の膜電位を規定する塩素イオン (Cl^-) チャンネルが存在している。これまでに我々は、プロスタグランジン E_2 (PGE_2) が Ca^{2+} /一酸化窒素/cGMP 経路を介して、このチャンネルを活性化することを報告している。 PGE_2 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保護することが報告されていることから、この Cl^- チャンネルは細胞防御機構に関与することが考えられる。

血管拡張剤の新規化合物 ecabapide は、胃血流量の増加、胃酸やペプシンの分泌の抑制、その他未知の細胞防御機構を介して、胃潰瘍の悪化を抑制すると考えられているが、これまでに胃酸分泌細胞に直接作用するという報告はない。そこで ecabapide のハウスキーピング Cl^- チャンネルに対する効果と、細胞防御機構との関連について検討した。

パッチクランプの実験から、ecabapide はこの Cl^- チャンネルを濃度依存的に活性化することがわかった。 Cl^- チャンネル阻害剤の NPPB はこの電流の増加を抑制した。可溶性グアニル酸シクラーゼの阻害剤である LY83583 で細胞を処理すると、ecabapide による電流の増加が起こらなくなった。またエンザイムイムノアッセイの実験から、ecabapide は濃度依存的に細胞内 cGMP 含量を増加させることがわかった。ecabapide は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こさないことから、グアニル酸シクラーゼに作用して cGMP 産生を増加させて Cl^- チャンネルを活性化することがわかった。

細胞保護効果を測定するためのモデル系として、エタノールによる細胞障害を調べた。障害の程度は、予め BCECF-AM を負荷した細胞からの蛍光色素の漏れを定量化して求めた。細胞懸濁液を cGMP アナログのジブチリル cGMP で処理すると、エタノールによる細胞障害が濃度依存的に軽減した。この効果は NPPB の処理により消失した。

以上のことから、胃酸分泌細胞基底側膜の Cl^- チャンネルが活性化されると細胞の膜電位が安定化し、細胞防御機能が強くなると示唆された。

9 6 3 1 塩素イオンチャネルと消化管の細胞防御機構の分子レベルでの機能的連関

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 薬学部)

竹口 紀晃(富山医科薬科大学 薬学部)

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行っている。このため胃の各細胞は、絶えず NaCl 濃度変化や pH 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。

これまでに我々は、ウサギ胃酸分泌細胞の基底側膜にアラキドン酸およびプロスタグランジン E₂ (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(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⁻チャネルは細胞防御機構に関与していることが考えられる。

血管拡張剤の新規化合物 ecabapide は、胃血流量の増加、胃酸やペプシンの分泌の抑制、その他未知の細胞防御機構を介して、胃潰瘍の悪化を抑制すると考えられている。これまでに ecabapide が胃酸分泌細胞に直接作用するという報告はない。本研究では PGE₂ によって活性化される Cl⁻チャネルに対する ecabapide の効果を調べ、Cl⁻チャネルと細胞防御機構との関連について検討した。

2. 研究方法

2.1 試薬

ecabapide は第一製薬株式会社、PGE₂ は東レ株式会社の御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1-3 kg)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 4000 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。得られた胃腺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)。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⁻ 電流を測定した。以前の研究でホールセル Cl⁻ 電流は、一種類の Cl⁻ チャネルより構成されていることがわかっている (1)。またランプ波は pCLAMP 6 プログラムを用いて測定した。実験は 35-37 °C で行った。

2.5 ノイズ解析

ホールセル Cl⁻ 電流のパワースペクトルをシグナルアナライザー (SM-2100A) を用いて、次式により計算した。

$$S_{(f)} = \frac{\gamma I (V_m - V_{eq})(1 - P_0) / \pi f_c}{1 + (f/f_c)^2} + \frac{A}{f}$$

2.6 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 を負荷した胃腺中の、一つの胃酸分泌細胞の [Ca²⁺]_i を、SPEX 顕微蛍光解析システムを用いて 35-37 °C で測定した。

2.7 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。

2.8 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 (4)。細胞懸濁液には予め、BCECF/AM を負荷しておいた。

3. 研究結果

3.1 ecabapide 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 ecabapide (0.1-10 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、0.1 μM から有意に上昇した。

3.2 ecabapide による電流の増大に対する Cl⁻ チャネル阻害剤の効果

ecabapide 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)。その IC₅₀ は 300 μM と以前報告した (1)。niflumic acid は 500 μM を適用しても、10 ± 3 % (n=4) の阻害効果しかみられなかった。ここで阻害効

果は、阻害剤を加えてから 30 秒後に評価した。

3.3 ecabapide と NPPB によって引き起こされる電流の逆転電位

ecabapide によって引き起こされた電流と、NPPB によって阻害された電流の逆転電位は、それぞれ -58 ± 4 と -58 ± 3 mV であった (Fig. 1b)。この値は Cl^- 平衡電位の理論値 (36 °C で -64 mV) と異なるが、有意差はなかった ($P > 0.05$)。そこで -64 mV に細胞の膜電位を固定して、ホールセル内向き電流に対する ecabapide と NPPB の効果を調べた。ecabapide は内向き電流を若干増加させ (-20 ± 7 pA, $n=4$)、NPPB は若干減少させた (12 ± 3 pA, $n=5$)。この電流の変化は、以前報告したように (5) アスパラギン酸イオンが Cl^- チャネルを透過するためと思われる。

3.4 ホールセル Cl^- 電流のノイズ解析

ecabapide によって活性化される Cl^- チャネルが、細胞の静止膜電位を形成しているチャネルと同一かどうかを調べるために、ホールセル Cl^- 電流のパワースペクトルを解析した。静止状態と ecabapide で活性化した後のパワースペクトルをそれぞれ解析するとローレンツ型のスペクトル形態を示し、コーナー周波数は 9 ± 1 と 3 ± 1 Hz ($n=3$) であった (Fig. 2)。これらの結果から、静止状態と ecabapide によって活性化された後に開いているチャネルは一種類であることがわかる。

3.5 ecabapide による Cl^- 電流の活性化に対する LY83583 の効果

可溶性グアニル酸シクラーゼの阻害剤である LY83583 (細胞内に $5 \mu\text{M}$) は静止状態の Cl^- 電流を 215 ± 19 pA から 164 ± 18 pA に抑制し (約 24% の抑制)、ecabapide ($10 \mu\text{M}$) による Cl^- 電流の増加量を 153 ± 33 pA ($n=4$) から 32 ± 13 pA ($n=5$) に抑制した (約 79% 抑制)。従って、ecabapide による Cl^- チャネルの活性化には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。

3.6 胃酸分泌細胞の細胞内 cGMP 含量の定量化

3.1 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 ecabapide ($10 \mu\text{M}$) を加えると、時間依存的に細胞内 cGMP 含量が増加した (Fig. 3a)。Fig. 3b は ecabapide を加えてから 5 分後の cGMP 含量の変化量を調べたもので、ecabapide の濃度に依存して cGMP 含量が増加した。その EC_{50} は $0.2 \mu\text{M}$ であった。次に、LY83583 の効果を調べた (Fig. 3c, d)。細胞を LY83583 ($10 \mu\text{M}$) で 30 分間インキュベーションすると cGMP 含量が約 22% 減少した。引き続き ecabapide を加えても、cGMP 含量の増加は起こらなかった。この結果は 3.5 のホールセル Cl^- 電流記録の結果と一致する。

3.7 ecabapide による Cl⁻ チャネル活性化における Ca²⁺ の効果

これまでに我々は、胃酸分泌細胞において PGE₂ が [Ca²⁺]_i の上昇を介して Cl⁻ チャネルを活性化することを示している (6)。しかし ecabapide は 100 μM という高濃度を用いても [Ca²⁺]_i を上昇させなかった (n=6)。また、細胞内液の Ca²⁺ を BAPTA (5 mM) で強くキレートしても ecabapide による Cl⁻ チャネルの活性化にはほとんど影響を及ぼさなかった (BAPTA 非存在下 174±23 pA (n=6)、存在下 167±25 pA (n=3))。このことから、ecabapide は [Ca²⁺]_i の上昇を介さずに Cl⁻ チャネルを活性化することが示唆された。

3.8 Cl⁻ チャネルの活性化と細胞防御機構との関連

細胞障害のモデル系として、エタノール障害に対する細胞保護効果について検討した。本研究のこれまでの結果から、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⁺ と一酸化窒素と cGMP が考えられている。そこで cGMP アナログのジブチリル cGMP がエタノール障害から細胞を保護できるかどうかを調べた (Fig. 4)。コントロールとして 10%エタノールで細胞を 10 分間前処理した (Fig. 4a)。エタノールを加える前に、ジブチリル cGMP (500 μM) で細胞を 15 分間前処理しておく、有意にエタノール障害が軽減された。この効果は濃度依存的で、EC₅₀ は 45 μM であった。Cl⁻ チャネル阻害剤の NPPB (500 μM) で細胞を 1 分間処理すると、ジブチリル cGMP による保護効果が消失した (Fig. 4b)。

4. 考察

本研究で血管拡張剤の ecabapide は、胃酸分泌細胞に直接作用し、ハウスキーピング Cl⁻ チャネルを活性化することがわかった。可溶性グアニル酸シクラーゼの阻害剤である LY83583 は ecabapide による Cl⁻ 電流と、細胞内 cGMP 含量の増加を阻害したことから、この活性化機構にはグアニル酸シクラーゼの活性化が関与していると考えられた。cGMP により Cl⁻ チャネルが活性化されるという知見は、これまでにヒト結腸ガン細胞の T84 (7) や HT29 (8) などにおいて報告されている。

LY83583 はスーパーオキシドアニオンの産生を介して、グアニル酸シクラーゼの活性化を阻害すると報告されている (9-11)。胃酸分泌細胞では、LY83583 は静止状態の cGMP 含量を減少させたが、その効果は完全ではなかった。一方、ecabapide による増加はほぼ完全に抑制した。この結果に対応して、LY83583 静止状態の Cl⁻ 電流を一部阻害し、ecabapide による増加をほぼ完全に抑制した。これまでに LY83583 の同様の効果が、マウス耳下腺細胞 (12) やラット膵島腫瘍細胞 (13) などにおいて報告されている。

ecabapide による Cl⁻ チャネル活性化機構の模式図を Fig. 5 に示す。ecabapide はグ

アニル酸シクラーゼに対する一酸化窒素の感受性または結合性を上昇させることにより、cGMP 産生を増加させると考えられる。しかし、ecabapide がグアニル酸シクラーゼを直接活性化するのかどうかは現在のところ不明である。また LY83583 は静止状態の細胞内 cGMP 含量を増加させなかったことから、一酸化窒素をクエンチングすることにより ecabapide の効果を抑制すると考えられる。

本研究では、cGMP が胃酸分泌細胞基底側膜の Cl⁻ チャネルを活性化し、エタノール障害に対する細胞保護効果を増強したことから、この Cl⁻ チャネルはハウスキーピング機能と細胞防御機能といった非常に重要な生理機能の調節に関与している。細胞防御機構においては、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増強) することが重要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、一次構造を決定し、細胞防御機能の発現に必要な部位などを解明していきたい。また、同様の機能を有する Cl⁻ チャネルが他の臓器にも存在するのかどうかを調べ、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検討していきたい。

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) Kolber, M. A., Quinones, R. R., Gress, R. E., *et al.* : *J. Immunol. Methods*, **108** : 255-264, 1988
- 5) Sakai, H., Okada, Y., Morii, M., Takeguchi, N. : *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **414** : 185-192, 1989
- 6) Sakai, H., Kumano, E., Ikari, A., Takeguchi, N. : *J. Biol. Chem.*, **270** : 18781-18785, 1995
- 7) Lin, M., Nairn, A. C., Guggino, S.E. : *Am. J. Physiol.*, **262** : C1304-C1312, 1992
- 8) Kunzelmann, K., Kubitz, R., Grolik, M. Warth, R., Greger, R. : *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **421** : 238-246, 1992
- 9) Mülsch, A., Lückhoff, A., Pohl, U., Busse, R., Bassenge, E. : *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **340** : 119-125, 1989
- 10) Cherry, P. D., Omar, H. A., Farrell, K. A., Stuart, J. S., Wolin, M. S. : *Am. J. Physiol.*, **259** : H1056-H1062, 1990
- 11) Kontos, H. A., Wei, E. P. : *stroke*, **24** : 427-434, 1993
- 12) Watson, E. L., Singh, J. C., Mcphee, C., Beavo, J. Jacobson, K. L. : *Mol. Pharmacol.*, **38** : 547-553, 1990
- 13) Laychock, S. G., Modica, M. E., Cavanaugh, C. T. : *Endocrinology*, **129** : 3043-3052, 1991

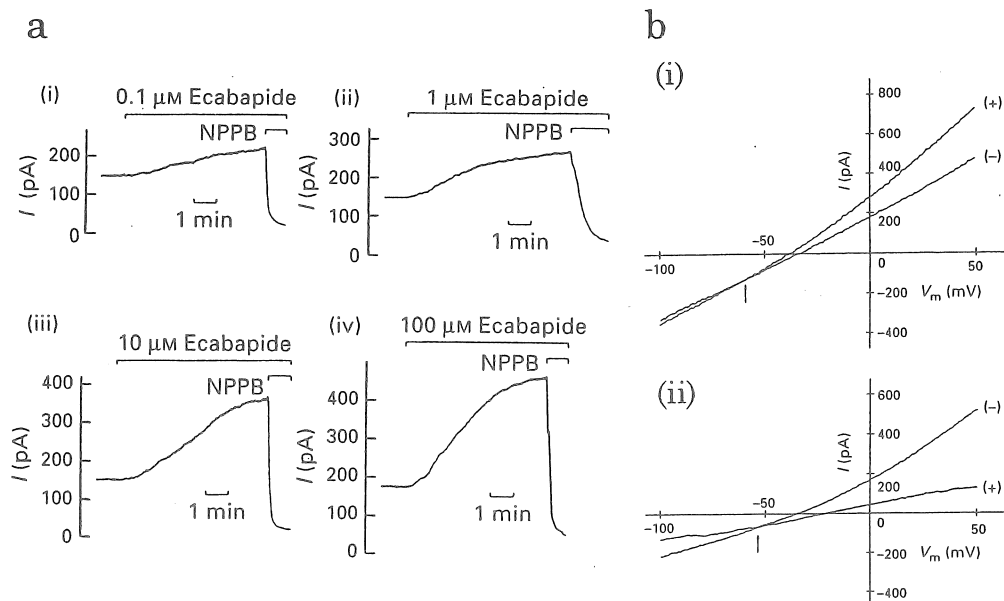


Fig. 1 (a) Ecabapide-induced increase in whole-cell outward Cl^- currents recorded from single parietal cells. The bathing solutions containing 0.1 μM (i), 1 μM (ii), 10 μM (iii) or 100 μM (iv) were perfused as indicated; 500 μM NPPB was used. (b) Reversal potentials of the ecabapide-elicited and NPPB-sensitive currents. (i, ii) Typical relations between whole-cell currents (I) and membrane potential (V_m). The currents in response to voltage ramps from -100 to $+50$ mV for 1 s were recorded before (-) and 6 min (i,+) or 30 s (ii,+) after the addition of 10 μM ecabapide (i) or 500 μM NPPB (ii). The reversal potential at which two ramps cross is indicated by the arrow.

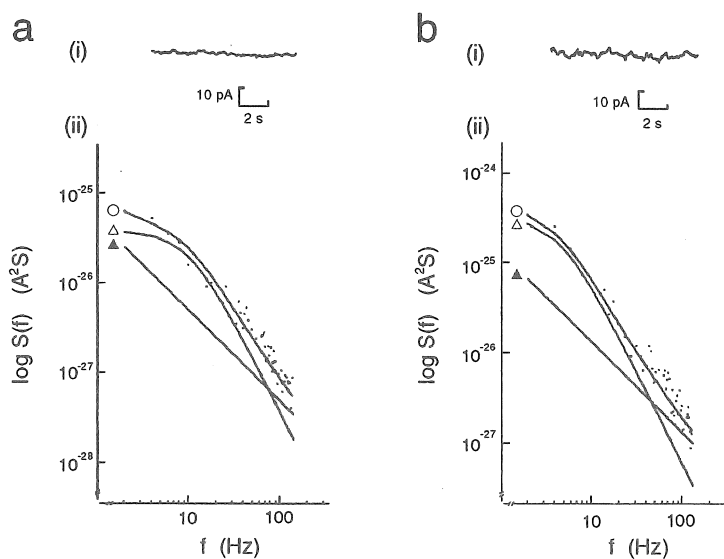


Fig. 2 Whole-cell Cl⁻ current noises and the power spectra. (a, b) Representative traces of whole-cell Cl⁻ currents recorded at 0 mV (i) and the corresponding power spectra of the Cl⁻ currents (ii). The data were obtained before (a) and 6 min after (b) the addition of 10 μM ecabapide. In (ii), the fitted lines (O) were drawn as described in Methods. Line (Δ) and (▲) represent 1/f² (Lorentzian) and 1/f components, respectively.

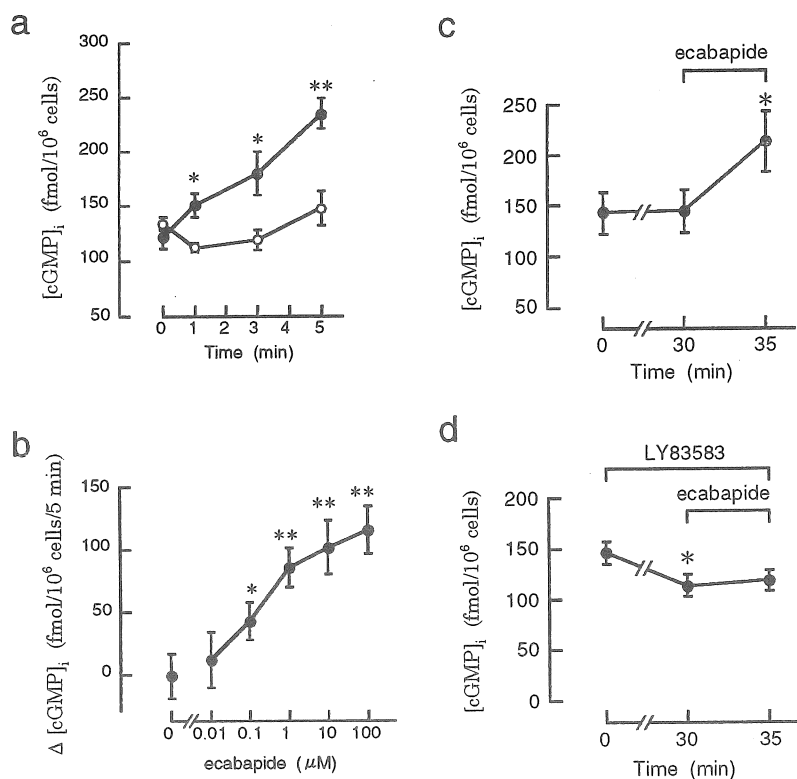


Fig.3 Ecabapide-induced increase in [cGMP]_i in parietal cell-rich suspension.

(a) [cGMP]_i was measured 1, 3 and 5 min after the addition of 10 μM ecabapide (●) or vehicle (O). (b) The concentration-response curve for increase in [cGMP]_i by ecabapide. The ecabapide-induced net increase of cGMP (Δ [cGMP]_i) was assessed 5 min after the addition of ecabapide or vehicle. (c, d) Inhibition of the basal and ecabapide-increased cGMP by LY83583. [cGMP]_i in parietal cell-rich suspensions was measured before (0 min) and 30 min after the addition of 10 μM LY83583 (d) or vehicle (c). At 30 min, 10 μM ecabapide was subsequently added and then [cGMP]_i was measured at 35 min (5 min after the addition of ecabapide).

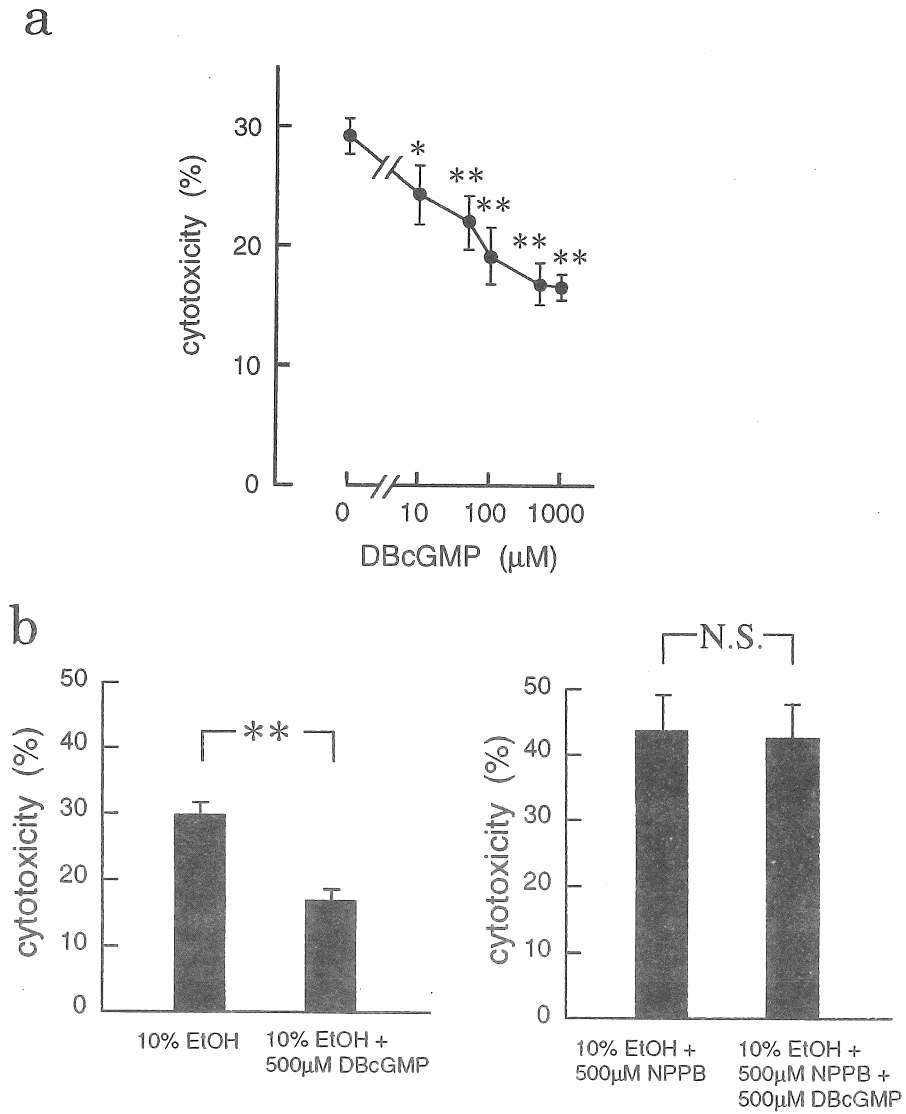


Fig. 4 EtOH-induced cytotoxicity in the parietal cell-rich suspension.

(a) The concentration-response curve for cytoprotective effects by DBcGMP.

(b) The cells were incubated with or without 500 μM DBcGMP for 15 min, and then incubated with 10% EtOH for 10 min. When NPPB was used, they were incubated with 500 μM NPPB for 1 min at the end of reaction.

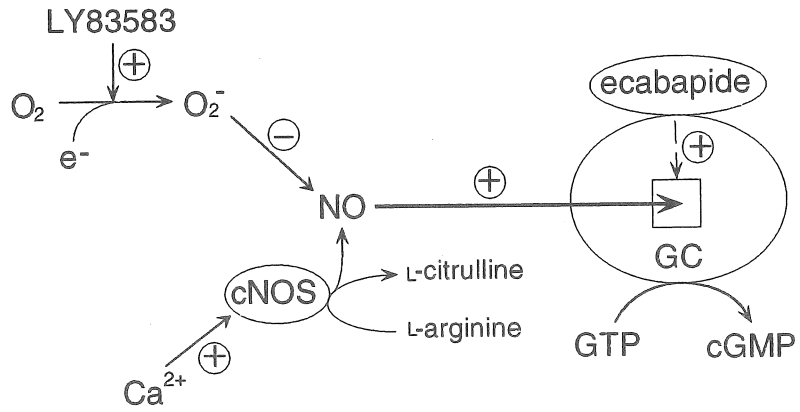


Fig. 5 A tentative scheme of action of ecabapide in rabbit parietal cells. cNOS, constitutive NO; GC, guanylate cyclase; + and -, activation and inhibition, respectively.

No. 9631

The Relation of Chloride Channels and Cytoprotective Mechanism
in Gastrointestinal Cells.

Hideki Sakai, Akira Ikari, Noriaki Takeguchi

Faculty of Pharmaceutical Science, Toyama Medical and Pharmaceutical University

Summary

The membrane potential of rabbit gastric parietal cells is dominated by a chloride (Cl^-) channel with a subpicoSiemens single channel conductance in the basolateral membrane. The effect of ecabapide, a vasodilator, on the opening of this Cl^- channel, the cGMP content and the intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) of parietal cells were investigated by patch-clamp technique, enzyme immunoassay and Fura 2-fluorescence measurement. Furthermore, we investigated cytoprotective function of this channel. Ecabapide stimulated the opening of the Cl^- channel as determined by the reversal potential. Both the basal and ecabapide-induced openings of the channel were inhibited by NPPB, a Cl^- channel blocker. The power spectra of the currents before and after the addition of ecabapide were analyzed. Both spectra contained only one Lorentzian ($1/f^2$) component. LY83583, which prevents activation of soluble guanylate cyclase, significantly inhibited both the basal and ecabapide-induced openings of the Cl^- channel. Ecabapide concentration-dependently elevated the cGMP content in the parietal cell-rich suspension. In single Fura 2-loaded parietal cells, ecabapide did not increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Our results indicate that ecabapide stimulates an intracellular production of cGMP in the parietal cell without increasing $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and leads to an activation of the housekeeping Cl^- channel. On the other hand, 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 ecabapide elevates the cGMP contents, resulting in the opening of the Cl^- channel in the basolateral membrane. Therefore, the Cl^- channel is the target of the cytoprotective mechanism in the parietal cell.