

## 9632 大腸粘膜上皮でのクロライド・イオン輸送に及ぼす カルシウム機能の解析

助成研究者：桑原 厚和(静岡県立大学 環境科学研究所)  
 共同研究者：塩川 健一(静岡県立大学 環境科学研究所)  
 鈴木 睦昭(静岡県立大学 環境科学研究所)  
 西田 雅大(静岡県立大学 環境科学研究所)  
 細田 豊(静岡県立大学 環境科学研究所)

我々は以前より、消化管粘膜上皮でのクロライドイオン分泌の神経性制御機構の研究を行っており、生体内での電解質輸送や水の分泌制御機構は、以前考えられていたよりもはるかに複雑であることを明らかにした。しかしながら、クロライドイオン分泌に対する細胞内情報伝達機構についてはあまり明らかにされていない。そこで、本研究では、リガンドとレセプターとの相互作用により駆動されると考えられるクロライドイオン分泌に関与する、細胞内カルシウム動態をsubstance Pをagonistとして使用し、共焦点レーザー顕微鏡により解析を行った。

実験には、体重350-600gのハートレー系雄モルモット下部大腸を使用し、タッピング法により大腸陰窩細胞(crypt cell)を得た。得られたCrypt CellsにIndo-1AMを導入後、共焦点レーザー顕微鏡(ACAS Ultima 575 UVC (Meridian Instruments Far East K. K., USA)にセットし、40倍の水浸レンズを用いてSubstance P刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変化の測定を行なった。

Substance Pは容量依存性に $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させた。また、この反応は、NK-1受容体拮抗薬であるFK888(1マイクロモル)の前処置により、殆ど抑制した。次に、Substance Pによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇について、細胞外 $Ca^{2+}$ の関与について検討を行った。その結果、 $Ca^{2+}$  free溶液の灌流により細胞外の $Ca^{2+}$ を除去したにもかかわらず、 $[Ca^{2+}]_i$ の最大値は、 $Ca^{2+}$ を除去しない場合と比較して、僅かに低下しただけであった。細胞外 $Ca^{2+}$ を除去してもSubstance P投与より $[Ca^{2+}]_i$ は上昇したことから、Substance PによるCrypt Cellsでの $[Ca^{2+}]_i$ の上昇には、細胞内 $Ca^{2+}$ 貯蔵部位もしくは $Ca^{2+}$ 結合タンパクの関与が示唆された。そこで、Substance P投与によるCrypt Cellsでの $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に対する小胞体内の $Ca^{2+}$ の関与について検討を加えた。Thapsigargin 10 $\cdot$ 6Mの単独適用によりCrypt Cells内の $[Ca^{2+}]_i$ はわずかな上昇を示した。Thapsigarginで前処置した標本にSubstance P 10 $\cdot$ 7Mを適用すると、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が観察されたが、その頂値は、対称群に比較して有意に減少していた。さらに、Thapsigargin処置と細胞外の $Ca^{2+}$ を取り除いた条件では、Substance PによるCrypt Cellsの $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、ほとんど観察されなかった。

以上の結果から、Substance PによるCrypt Cellsの $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、おそらく基底膜側に存在するNK-1受容体を介して行われており、その上昇には、細胞内外のカルシウムの関与が示唆された。



## 9632 大腸粘膜上皮でのクロライド・イオン輸送に及ぼす カルシウム機能の解析

助成研究者：桑原 厚和 (静岡県立大学 環境科学研究所)  
 共同研究者：塩川 健一 (静岡県立大学 環境科学研究所)  
 鈴木 陸昭 (静岡県立大学 環境科学研究所)  
 西田 雅大 (静岡県立大学 環境科学研究所)  
 細田 豊 (静岡県立大学 環境科学研究所)

### 【研究目的】

申請者は以前より、消化管粘膜上皮でのクロライドイオン分泌の神経性制御機構の研究を行っており、生体内での電解質輸送や水の分泌制御機構は、以前考えられていたよりもはるかに複雑であることを明らかにした。昨年度は貴研究財団の援助により、各種神経伝達物質相互間の細胞内情報伝達機構のクロストークに関する研究を行い、カルシウム系とc-AMP系はc-AMP依存性PKA活性後の下流域にクロストーク機構が存在することを明らかにした。しかしながら、この研究過程で、リガンドとレセプターとの相互作用をバイパスさせたような単純な細胞内カルシウムイオン濃度、或いはc-AMP濃度の上昇だけではクロライドイオン分泌が殆どおこらないことが明らかとなった。この事実は、生体でのクロライドイオン分泌が単純に細胞内セカンドメッセンジャー濃度の上昇によるよりも、更に複雑な機構が関与していることを示唆している。そこで、本研究では、リガンドとレセプターとの相互作用により駆動されると考えられるクロライドイオン分泌に関与する、細胞内カルシウム動態をsubstance Pをagonistとして使用し、共焦点レーザー顕微鏡によりさらに詳細な解析を行った。

### 【研究方法】

実験には、体重350-600gのハートレー系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、肛門より約5cm離れた部位から約30cm下部大腸を摘出した。摘出した下部大腸はKrebs-Ringer液で洗浄後、約4cmに切断し、タッピング法により大腸陰窩細胞(crypt cell)を得た。得られたCrypt Cells懸濁液は1分間、1000rpmで遠心した後、上澄みを除き再度1mlの緩衝液に再懸濁後、1分間、1000rpmで遠心し、沈殿したCrypt Cellsを測定に使用した。単離したcrypt cellに細胞内カルシウム濃度測定用指示薬としてIndo-1AMを細胞内に導入した。測定前にcrypt cellを含むIndo-1-AM溶液を灌流用緩衝液で1回洗浄して細胞外のIndo-1-AM溶液を除去した。続いて、Indo-1-AM負荷Crypt cellsを付着させたガラスボトムカルチャーディッシュを共焦点レーザー顕微鏡(ACAS Ultima 575 UVC (Meridian Instruments Far East K. K., USA))にセットした。まず10倍のレンズで鏡検を行ない形態学的にCrypt Cellsの形を維持しているものを選び、40倍の水浸レンズを用いてSubstance P刺激による

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変化の測定を行なった。

### 【研究結果】

Substance Pは容量依存性に[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を上昇させた (Fig.1)。Substance P刺激による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇は、灌流開始約2分で急激に上昇し、約20秒後に頂値に達しその後、徐々に低下した。すなわち、Substance Pによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇は一過性であることが観察された。次にsubstance Pによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇が、どの受容体を介して行われているのかを検討するため、藤沢薬品工業株式会社より供与されたNK-1受容体拮抗薬であるFK888を使用した。FK888は用量依存性に、Crypt Cellsにおける[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇を抑制した。すなわち、10<sup>-8</sup>M以上の濃度のFK888前処置によりSubstance Pによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇は有意に抑制され、10<sup>-6</sup>Mでほぼ完全に抑制された (Fig. 2)。

ウサギ遠位結腸やマウス回腸などのCryptでは各種のアゴニスト刺激で[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が上昇し、その機構に細胞外Ca<sup>2+</sup>が関与している事が知られている。そこで、モルモット下部大腸Crypt cellでもSubstance Pによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇に細胞外Ca<sup>2+</sup>の関与が考えられたので、Substance Pによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇について細胞外Ca<sup>2+</sup>の関与について検討を行った。その結果、Ca<sup>2+</sup> free溶液の灌流により細胞外のCa<sup>2+</sup>を除去したにもかかわらず、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の最大値は、Ca<sup>2+</sup>を除去しない場合と比較して、僅かに低下しただけであった(Fig. 3)。

細胞外Ca<sup>2+</sup>を除去してもSubstance P投与より[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は上昇したことから、Substance PによるCrypt Cellsでの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇には、細胞内Ca<sup>2+</sup>貯蔵部位もしくはCa<sup>2+</sup>結合タンパクの関与が示唆された。そこで、Substance P投与によるCrypt Cellsでの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇に対する小胞体内のCa<sup>2+</sup>の関与について検討を加えた。細胞内Ca<sup>2+</sup>貯蔵部位 (主として小胞体) のCa<sup>2+</sup>を枯渇させるためにはCa<sup>2+</sup>-ATPase阻害薬であるThapsigarginを使用した。Thapsigarginの濃度は、Sato et al., (1995)のマウスCryptに用いた濃度と同じ10<sup>-6</sup>Mを使用した。Thapsigargin 10<sup>-6</sup>Mの単独適用によりCrypt Cells内の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>はわずかな上昇を示した。またこの上昇は一過性ではなく、持続的であった。このような標本にSubstance P 10<sup>-7</sup>Mを適用すると、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇が観察されたが、その頂値は、対称群と比較して有意に減少していた(Fig. 4)。これは、Thapsigarginにより小胞体のCa<sup>2+</sup>-ATPaseが阻害され、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>調節機構が一部働いていないためと考えられた。また、Thapsigargin処置と細胞外のCa<sup>2+</sup>を取り除いた条件では、Substance PによるCrypt Cellsの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇は、ほとんど観察されなかった。しかしながら、Thapsigargin処理と細胞外Ca<sup>2+</sup>の除去の同時処理を行った場合でもSubstance P刺激により、僅かながら[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇が観察された。この結果は、Thapsigargin非感受性のCa<sup>2+</sup>貯蔵部位からの遊離の存在を示唆している。

## 【考察】

本研究では Substance P の Crypt Cellsでの細胞内情報伝達機構を解明するためにモルモット下部大腸より単離したCrypt Cellの細胞内カルシウム濃度（ $[Ca^{2+}]_i$ ）変化を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

その結果、Substance P は Crypt Cellsで用量依存的に  $[Ca^{2+}]_i$  上昇させる事が観察された。このことから、Substance P が粘膜上皮に対し、直接作用を有していることが示唆された。また、Substance P の適用により  $[Ca^{2+}]_i$  は、急激に上昇して最大値を達し、その後減少した。この減少は、Substance P の灌流中に生じたことから、Substance P による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は一過性と考えられる。

Substance Pは生体内においてNK-1 受容体に結合してその作用を発現すると考えられている。本研究では、NK-1受容体特異的拮抗剤であるFK888の前処置により Substance PによるCrypt Cellsでの  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は有意に阻害された。この結果は、モルモット下部大腸のCrypt cellにNK-1受容体が存在することを示唆している。また、Ussing chamberを用いた実験では、Substance Pは漿膜側への適用に対してのみ、クロライドイオンを誘発させることができる。このことから考えて、Crypt cellでNK-1受容体は基底膜側に存在していることが、本研究の結果と合わせて示唆される。

次に、Crypt Cells でのsubstance Pによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇への細胞外 $Ca^{2+}$ の関与について検討を行った。、Substance P 投与により観察された  $[Ca^{2+}]_i$  変化は、その最大値を検討した場合、細胞外 $Ca^{2+}$ を除去しても、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化に有意な差は生じなかった。従って、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、細胞内 $Ca^{2+}$ 貯蔵部位から生じているものと考えられた。そこで細胞内 $Ca^{2+}$ 貯蔵部位の $Ca^{2+}$  ATPase阻害剤であるThapsigarginを適用した。Thapsigarginの単独投与により、Crypts Cellsの $[Ca^{2+}]_i$  は、緩やかな上昇を示した。Substance P による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、Thapsigargin  $10^{-6}M$  の前処置によって有意に抑制された。しかしながら、Thapsigarginは、Substance P 適用による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を完全には抑制しなかった。そこで Crypt Cells をThapsigargin で前処理しておき、さらに細胞外から  $Ca^{2+}$  を除去した場合のSubstance P による  $[Ca^{2+}]_i$  変化について検討を行った。その結果、Substance Pによる  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は Thapsigargin 及び細胞外  $Ca^{2+}$  の除去により、著しく抑制された。Bird G.S. ら(1992)は、ラット膵臓腫細胞系 AR4-2J を使い、Substance P により活性化される  $[Ca^{2+}]_i$  の変化は、初めに  $IP_3$  を介して細胞内 $Ca^{2+}$ 貯蔵部位から  $Ca^{2+}$  を遊離をする。そしてこの  $Ca^{2+}$  の遊離により  $Ca^{2+}$  流入が主として調節される事を示した。Seabrook G.R.と Fong T.M.(1993)は、ヒトNK-1受容体を発現させたチャイニーズハムスターの卵巣細胞を用いてSubstance P の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を検討した。その結果、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、細胞外 $Ca^{2+}$ の除去により減少し、またThapsigarginにより細胞内 $Ca^{2+}$ 貯蔵部位を枯渇する

ことにより Substance P による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を著しく抑制した。従って、NK-1 受容体の活性化による伝達メカニズムは、この細胞系においては細胞内外の  $Ca^{2+}$  の両方を利用していたと考えられた。Bordey A.ら(1994)は、ヒト星状腫細胞系 U 373MG を用いて Substance P による $[Ca^{2+}]_i$ 変動の研究を行った。その結果、細胞外  $Ca^{2+}$  の除去によっても Substance P による  $[Ca^{2+}]_i$  は変化しなかった。また、Thapsigargin 処理により Substance P の作用は減少した。従って、Substance P による $[Ca^{2+}]_i$  上昇は、これら細胞系でも細胞内外の  $Ca^{2+}$  により調節されていることを示唆していた。本研究の結果は、前述のSeabrook GRと Fong TMまたはBordey Aらの報告と類似していた。すなわち、Crypt Cells におけるSubstance P による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、他の細胞系と同様、細胞内外の $Ca^{2+}$ により  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させると考えられる。さらに細胞外の  $Ca^{2+}$  を除去した場合と $Ca^{2+}$  を除去しない場合とを比較した場合、Substance P による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の頂値には有意差を生じなかったことから考えて、Substance P による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は、最初に細胞内 $Ca^{2+}$  貯蔵部位からの  $Ca^{2+}$  の遊離により  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇がすることを示唆するものであった。また、細胞外  $Ca^{2+}$  除去により、コントロールと比較して、数十秒ほど基底濃度に戻るのが速かったことから、細胞外からの流入も  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に関与していることが、考えられた。

#### 【今後の課題】

本研究では、Substance P による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に細胞内及び細胞外のカルシウムイオンが重要な役割を演じていることを明らかにしたが、細胞外の  $Ca^{2+}$  を除去した場合と $Ca^{2+}$  を除去しない場合とを比較すると、Substance P による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の頂値には有意差を生じなかったことから考えて、Substance P による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は、初めに細胞内 $Ca^{2+}$  貯蔵部位からの  $Ca^{2+}$  の遊離により  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させていることが示唆された。従って、今後は、受容体にSubstance Pが結合した後、どのようなカスケードを駆動させて、細胞内貯蔵部位からカルシウムを放出させるのか、それによる $[Ca^{2+}]_i$  上昇がどのようなメカニズムでカルシウムチャンネルを開口させ、細胞外からのカルシウム流入を誘発しているのか等の検討を行う必要がある。

#### 【参考文献】

1. Bird GS; Takemura H; Thastrup O; Putney JW Jr and Menniti FS, Mechanisms of activated  $Ca^{2+}$  entry in the rat pancreatoma cell line, AR4-2J., Cell Calcium, 13 (1), 49-58, 1992

2. Seabrook GR and Fong TM, Thapsigargin blocks the mobilisation of intracellular calcium caused by activation of human NK1 (long) receptors expressed in Chinese hamster ovary cells., *Neurosci Lett*, 152 (1-2), 9-12, 1993
3. Satoh Y, Habara Y, Ono K and Kanno T, Carbamylcholine- and catecholamine-induced intracellular calcium dynamics of epithelial cells in mouse ileum crypts., 108, 1345-1356, 1995

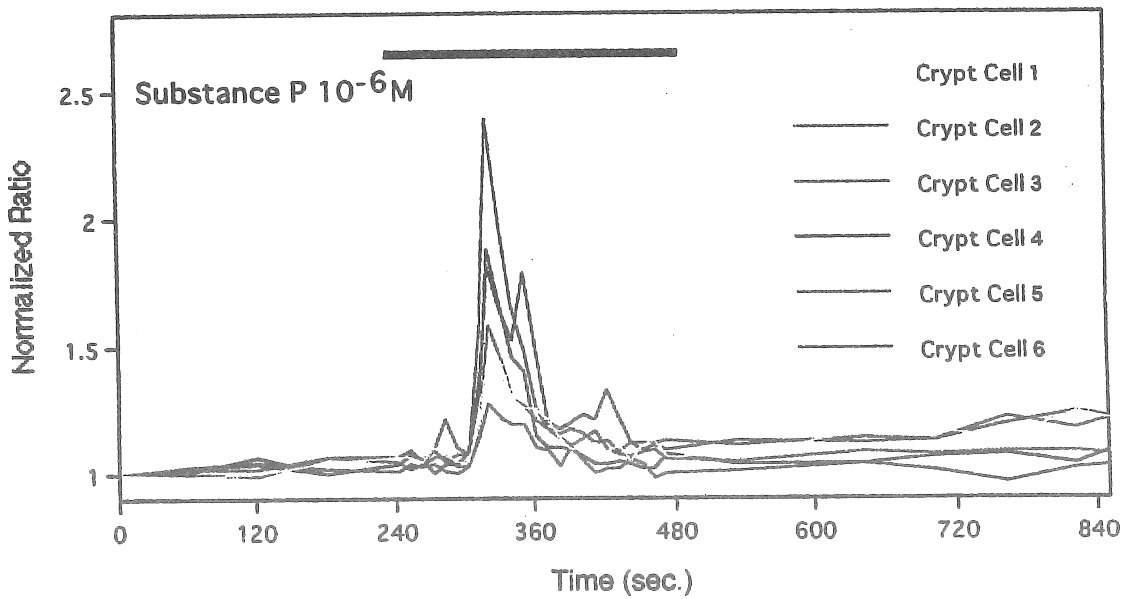


Fig. 1 Time courses of Substance P-induced changes of normalized ratio in isolated Crypt Cells.  
Solid line indicated presence of Substance P 10<sup>-7</sup>M in the chamber.



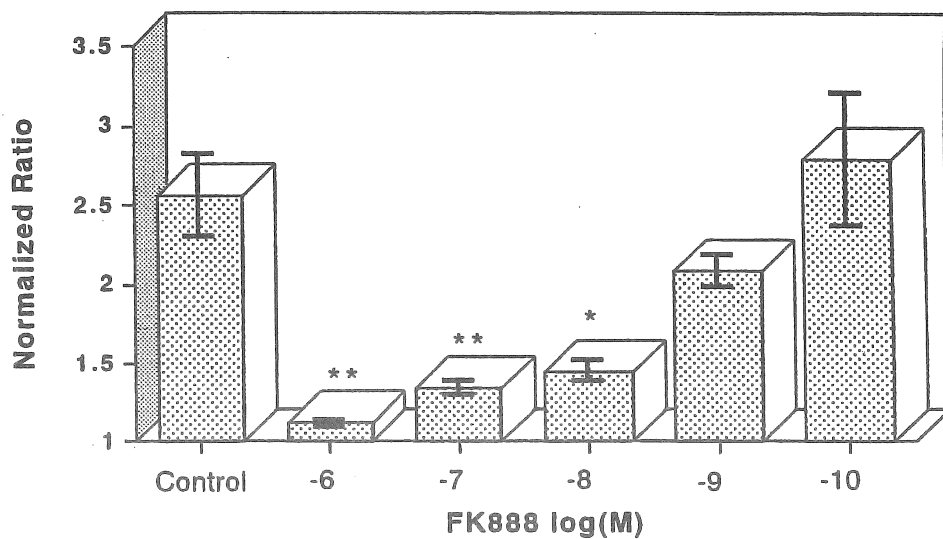


Fig. 2 Effects of NK-1 specific receptor antagonist, FK888 on Substance P  $10^{-7}M$ -induced normalized ratio changes in Crypt Cells. Each column and vertical bar indicate mean  $\pm$  S.E. (n=4). Significantly different from control (Substance P  $10^{-7}M$ ), \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ .

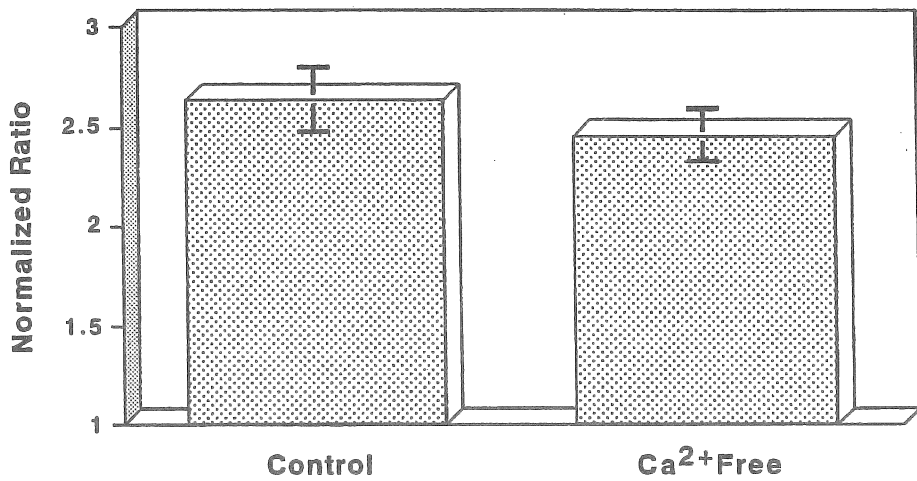


Fig. 3 Substance P-induced changes of normalized ratio in the presence or absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> (Ca<sup>2+</sup> free) in isolated Crypt Cells. Data showed  $\Delta$  peak values of normalized ratio stimulated by Substance P 10<sup>-7</sup>M. Each column and vertical bar indicate mean  $\pm$  S.E. (n=6-9).

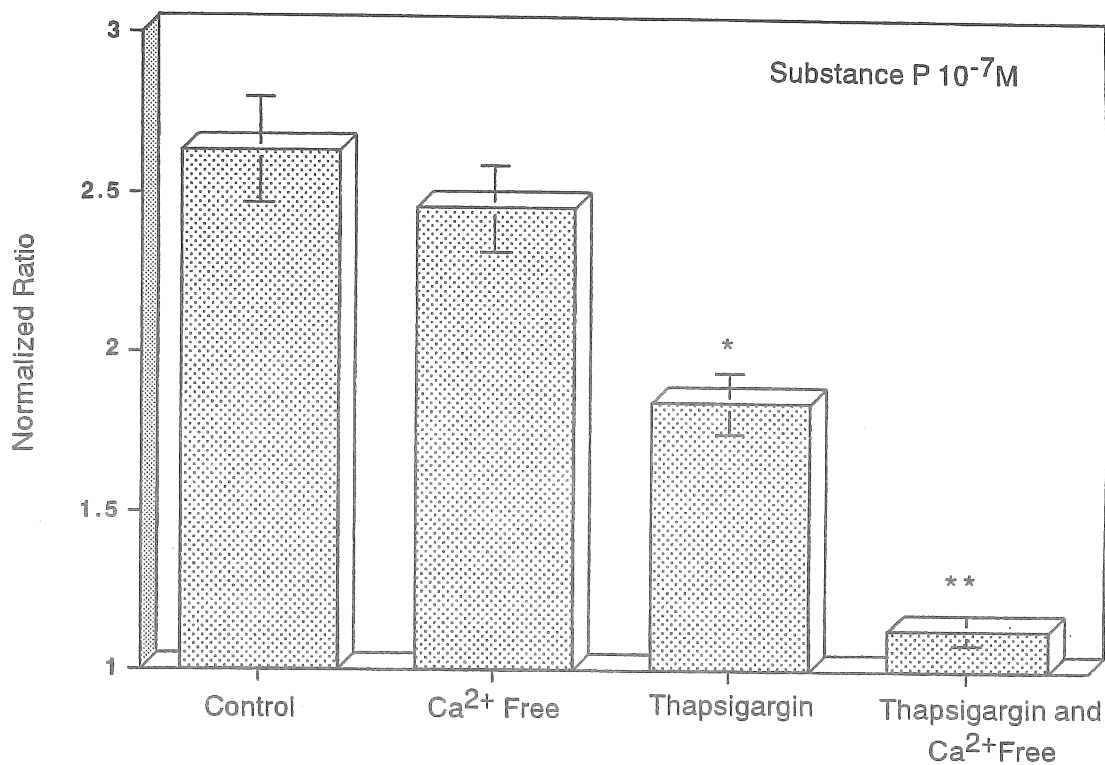


Fig. 4 Substance P-induced changes of normalized ratio (peak values). Crypts were pretreated with Thapsigargin  $10^{-6}M$  and/or removed extracellular  $Ca^{2+}$ . Each column and vertical bar indicate mean  $\pm$  S.E. (n=4-6). Significantly different from control (Substance P  $10^{-7}M$ ), \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.005$ .

## Analysis of intracellular calcium signaling pathway by substance P in isolated crypt cells from guinea pig distal colon.

Atsukazu Kuwahara, Ken-ichi Shiokawa, Mutsuaki Suzuki, Masahiro Nishida, Yutaka Hosoda

Laboratory of environmental physiology, Institute for Environmental sciences, University of Shizuoka, 422 JAPAN

### Summary

Crypt cells play an important role in the chloride secretion. Many neuropeptides including substance P can evoke chloride secretion in epithelial cells. However, mechanism of intracellular signaling pathway of chloride secretion is incompletely understood.

Thus, we have examined intracellular  $Ca^{2+}$  signaling pathway in isolated crypt cells from guinea-pig distal colon using confocal laser scanning microscope. In the present studies, tachykinins were used as secretagogues. Substance P increased in  $[Ca^{2+}]_i$  in isolated crypt cells in a concentration-dependent manner. Specific NK-1 receptor antagonist, FK888 was antagonized substance P-induced increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . The finding suggests that crypt cells possess NK-1 receptors. In extracellular  $Ca^{2+}$  free condition, substance P still evoked increase in  $[Ca^{2+}]_i$  similar to that of control. On the other hand, substance P-evoked increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was significantly decreased by the pretreatment with thapsigargin

From the present results, it is reasonable to speculate that the substance P-induced increases in  $[Ca^{2+}]_i$  occurs following steps; 1) substance P binds to NK-1 receptors at basolateral membrane 2) activated-substance P receptors probably activate PLC, and then, 3)  $Ca^{2+}$  release occurs from thapsigargin-sensitive  $Ca^{2+}$  stores and  $Ca^{2+}$  influx from serosal side.