

発表番号 52

## 肺胞呼吸上皮ナトリウムイオン輸送の生理的意義と 制御機構の解明

助成研究者：丸中良典（京都府立医科大学 第一生理学教室）

共同研究者：新里直美（京都府立医科大学 第一生理学教室）

胎児の肺は、呼吸器上皮細胞においてクロライドイオン分泌を行なっている。このクロライドイオン分泌に伴い、ナトリウムイオンも移動し、結果として肺腔内浸透圧が高められ、水の肺腔内への分泌が行なわれている。肺腔内液分泌に伴い、肺腔内から外部に向かい陽圧が産み出され、胎児肺の分化・発生・成長にこの肺腔内液は大きく寄与している。一方で、胎児期におけるガス交換は母体を通じて行われ、新生児期以降は自らの肺を通じたガス交換の必要性が生じる。この肺腔内液は、分娩時に何らかのメカニズムを介して除去される必要がある。この肺腔内液除去過程に、分娩時ストレスにより惹起された血中カテコラミン濃度上昇が胎児肺胞上皮 II 型 (alveolar type II: ATII) 細胞に存在するアミロライド感受性ナトリウムイオン輸送 (再吸収) を促進させ、この結果、肺腔内液は血管側へと再吸収されることが明らかになってきた。アミロライド感受性上皮型ナトリウムイオンチャネル (epithelial  $\text{Na}^+$  channel: ENaC) がナトリウムイオン再吸収に寄与しているが、ENaCは  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  subunit から成り立っており、呼吸上皮においてはこの  $\alpha$  subunit のみで非選択性陽イオンチャネル (nonselective cation channel: NSC channel) を形成し、ナトリウムイオン再吸収に寄与している。この NSC channel は細胞内カルシウムイオンにより活性化され、一方で細胞内クロライドイオンにより不活性化されることも明らかとなってきた。本研究では、ラットの胎生20日目の ATII 細胞を用いて実験を行なった。その結果、terbutaline 刺激において、細胞内カルシウムイオン濃度を高く維持することは直接的にはナトリウムイオン吸収過程に重要な役割を果たしておらず、細胞内クロライドイオン濃度減少を介して細胞内カルシウムイオンはナトリウムイオン吸収促進に重要な役割を果たしていると結論付けられた。



10

助成番号 0241

## 肺胞呼吸上皮ナトリウムイオン輸送の生理的意義と制御機構の解明

助成研究者：丸中良典 (京都府立医科大学 第一生理学教室)

共同研究者：新里直美 (京都府立医科大学 第一生理学教室)

### 1. 研究目的

胎児の肺は、呼吸器上皮細胞においてクロライドイオン分泌を行なっている。このクロライドイオン分泌に伴い、ナトリウムイオンも移動し、結果として肺腔内浸透圧が高められ、水の肺腔内への分泌が行なわれている。肺腔内液分泌に伴い、肺腔内から外部に向かい陽圧が産み出され、胎児肺の分化・発生・成長にこの肺腔内液は大きく寄与している。一方で、胎児期におけるガス交換は母体を通じて行われ、新生児期以降は自らの肺を通じたガス交換の必要性が生じる。この肺腔内液は、分娩時に何らかのメカニズムを介して除去される必要がある。この肺腔内液除去過程に、分娩時ストレスにより惹起された血中カテコラミン濃度上昇が胎児肺胞上皮II型 (alveolar type II: ATII) 細胞に存在するアミロライド感受性ナトリウムイオン輸送 (再吸収) を促進させ、この結果、肺腔内液は血管側へと再吸収されることが明らかになってきた。このアミロライド感受性ナトリウムイオン再吸収は、新生児期、乳幼児から成人にいたる時期に発症した肺水腫からの回復過程にも寄与していることも明らかとなりつつあるが、そのメカニズムについての詳細は不明である。上皮型ナトリウムイオンチャネル (epithelial  $\text{Na}^+$  channel: ENaC) が、アミロライド感受性ナトリウムイオン再吸収に寄与していることが明らかとなっており、ENaCは $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  subunit から成り立っていることも既に報告されている。呼吸上皮においては、 $\alpha$  subunit のみで非選択性陽イオンチャネル (nonselective cation channel: NSC

channel) が形成され、呼吸器におけるアミロライド感受性ナトリウムイオン再吸収に寄与していることも明らかにされている。しかも、NSC channel は細胞内カルシウムイオンにより活性化され、一方で細胞内クロライドイオンにより不活性化されることも明らかとなってきた。本研究では、 $\beta$ アゴニスト刺激時に、これら細胞内イオン環境、特に細胞内カルシウムとクロライドイオンが、NSC channel に対し、相互に如何なる役割を担っているかについて検討した。

## 2. 研究方法

細胞培養：麻酔下で胎生20日目のラットより肺を摘出し、肺胞上皮II型(ATII)細胞を単離し、これを permeable support である NUNC filter 上に単層培養した。

パッチクランプ法：Leitz 社製倒立顕微鏡（モデル Labovert LS）を用い、マニピュレーターとしては、Newport 社の400シリーズを用いた。増幅器は、Axon Instruments 社の Axopatch 1D を用い、解析には、同社の P Clamp 8 を用いた。

細胞内カルシウムイオン濃度・クロライドイオン濃度測定：カルシウム感受性色素 (fura 2) およびクロライドイオン濃度感受性色素 (SPQ) を用い、細胞イメージング法により、細胞内カルシウムイオン濃度・クロライドイオン濃度を測定した。

## 3. 研究成果および考察

ラットの胎生20日目の肺II型呼吸上皮細胞肺腔内側膜には、2種類のアミロライド感受性のナトリウム透過性チャンネルが存在する（図1）。1.2 pS という単一イオンチャンネルコンダクタンスを持ちナトリウムイオンに対して特異的に透過性を持つチャンネル（ナトリウムチャンネル： $\text{Na}^+$  channel）および2.8～3.0 pS という単一イオンチャンネルコンダクタンスを持ちナトリウムイオンおよびカリウムイオンに対

してほぼ同程度の透過性を持つチャネル（非選択性陽イオンチャネル：nonselective cation channel (NSC channel)）の2種類のアミロライド感受性チャネルである。ベータアゴニストである terbutaline は、この NSC channel を活性化し、一方  $\text{Na}^+$  channel には何ら影響を及ぼさなかった（図1および2）。このことより、terbutaline に反応するのは、NSC channel であることが明らかとなり、NSC channel の活性化が $\beta$ アゴニストによるナトリウム輸送に寄与していることも示唆された。さて、NSC channel の活性化におけるカルシウムイオンの役割について検討した。まず、細胞外カルシウムイオンの存在の有無が cell-attached patch より記録した NSC channel 活性に如何なる影響を及ぼすかを terbutaline 刺激時と非刺激時において調べた。図3および図4に示すように、細胞外カルシウム除去の NSC channel 活性に及ぼす影響は、terbutaline 刺激時にのみ観察された。

細胞外カルシウム除去時に、細胞内カルシウムイオンがどの程度変化するかを調べた。図5に示すように、細胞外カルシウムイオン存在時には、terbutaline 投与により一過性の細胞内カルシウムイオン濃度上昇とそれに引き続く持続的上昇が観察された。一方、細胞外カルシウムイオン非存在時には、terbutaline 投与により一過性の細胞内カルシウムイオン濃度上昇のみが観察され、それに引き続く持続的上昇は観察されなかった（図5）。すなわち、terbutaline 刺激時に、細胞内カルシウムイオン濃度は、細胞外カルシウムイオンの存在（1 mM）の有無により、それぞれ 100 nM および 20 nM となった。次に、細胞内クロライドイオン濃度は、terbutaline により減少する（図6）が、細胞外カルシウムイオンを除去することにより、terbutaline による細胞内クロライドイオン濃度の減少の程度が押さえられた（図6）。すなわち、細胞外カルシウムイオン濃度が 1 mM の時には、terbutaline により細胞内クロライドイオン濃度は約 20 mM に減少する（図6）。一方、細胞外カルシウムイオンを除去した場合には、terbutaline 刺激時における細胞内クロライドイオン濃度は約 40 mM と、細胞外カルシウムイオン存在（1 mM）時より、約2倍になっている。

上記の結果を踏まえ、inside-out patch の条件下において、細胞内クロライドイオン濃度が 20 mM および 40 mM の時に、NSC channel 活性化の細胞内カルシウムイオン濃度依存性を調べた。細胞内クロライドイオン濃度が 40 mM の NSC channel 活性化は、細胞内クロライドイオン濃度が 20 mM の時に比べ、高濃度の細胞内カルシウムイオンを必要とすることが判明した (図7)。

これらの結果から、細胞外にカルシウムイオンが存在しない時においても (すなわち細胞内カルシウムイオン濃度として 20 nM となったとしても)、細胞内クロライドイオン濃度が 20 mM (すなわち細胞外カルシウムイオン濃度が 1 mM 存在する時の細胞内クロライドイオン濃度) となれば、NSC channel の活性は terbutaline 刺激で全く細胞内カルシウムイオン濃度の低下の影響を受けないこと (図7) が明らかとなった。

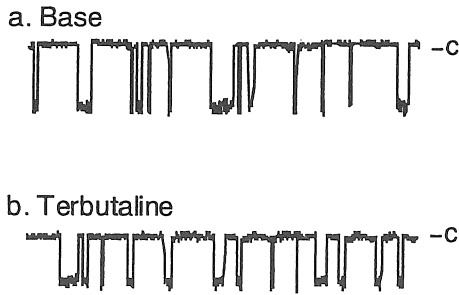
以上のことより、カルシウムイオンは、terbutaline 刺激において、細胞内カルシウムイオン濃度を維持することは直接的にはナトリウムイオン吸収過程に重要な役割を果たしておらず、細胞内クロライドイオン濃度減少を介するナトリウムイオン吸収促進に重要な働きを有していると結論付けられた。

#### 4. 今後の課題

細胞内カルシウムイオンおよびクロライドイオンが、NSC channel の活性に重要な働きを有していることは明らかとなり、その相互間の役割も明確になった。

しかしながら、その分子メカニズムに関しては、未だ不明な点があり、今後分子メカニズムに関して明らかにする必要性はある。

**A. Na<sup>+</sup> channel**



**B. NSC channel**

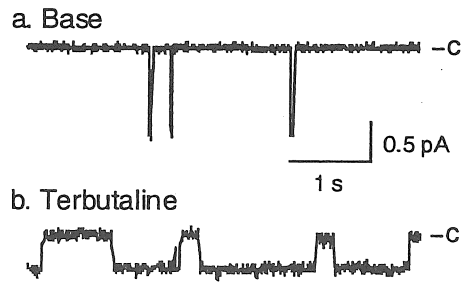


図1 ラットの胎生20日目の肺 II 型呼吸上皮細胞肺腔内側膜に存在する2種類のアミロライド感受性のナトリウム透過性チャネルの cell-attached patch より記録した単一イオンチャネル電流

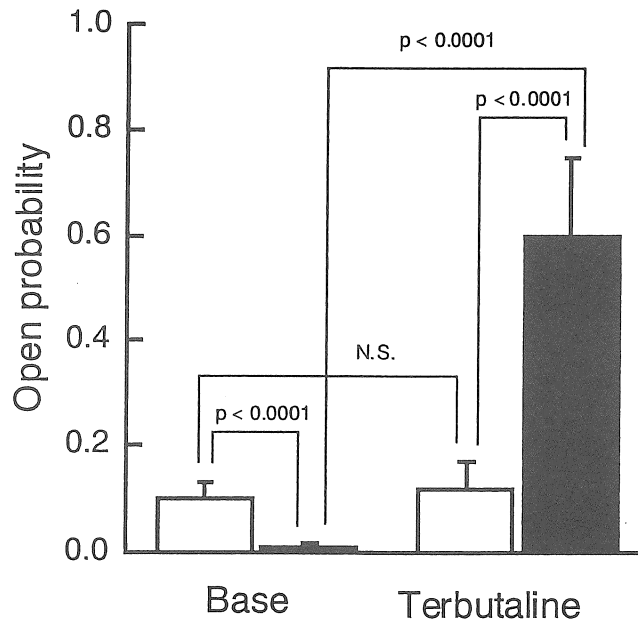
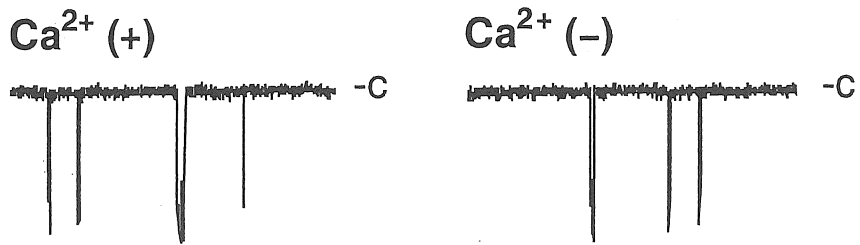


図2 Terbutaline の2種類のアミロライド感受性ナトリウム透過性チャネルに対する影響. Open column, Na<sup>+</sup> channel : Closed column, NSC channel

## A. Base



## B. Terbutaline

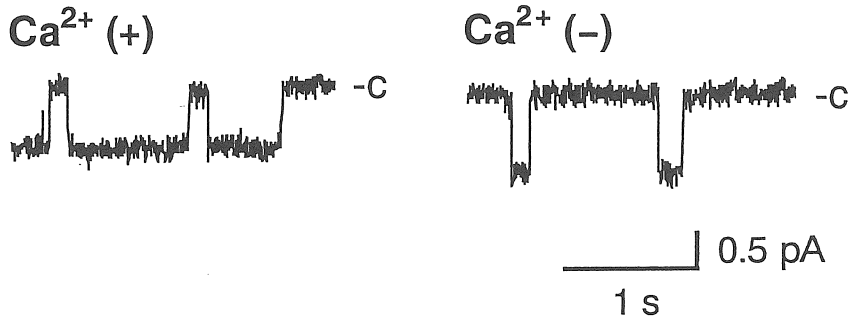


図3 Cell-attached patch より記録した NSC channel の単一イオンチャネル電流。 Base, terbutaline 非投与時 : Terbutaline, terbutaline (10  $\mu$ M) 投与時。 Ca (+), 細胞外カルシウムの存在時 (1 mM) : Ca (-), 細胞外カルシウムの非存在時



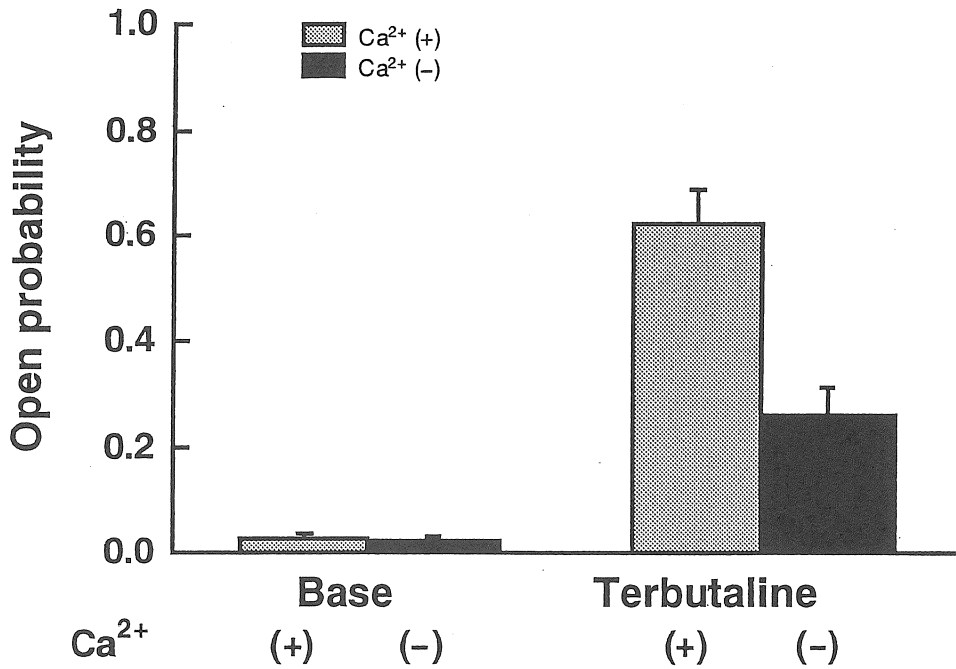


図4 NSC channel の開口確率 (open probability)

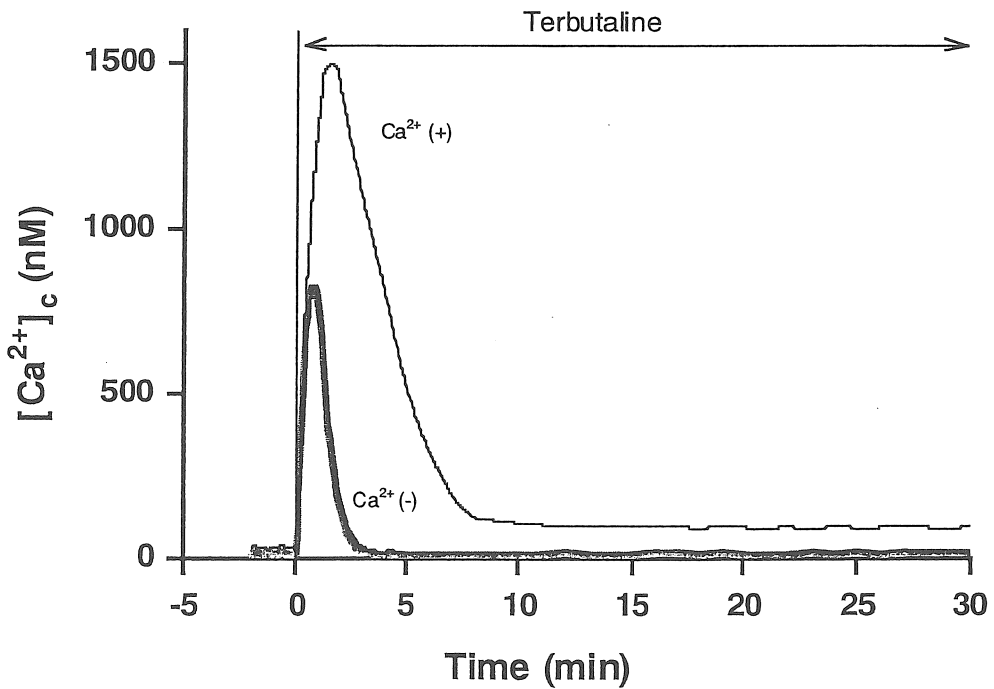


図5 細胞外カルシウム存在の有無による terbutaline 投与時の細胞内カルシウムイオン濃度の変化

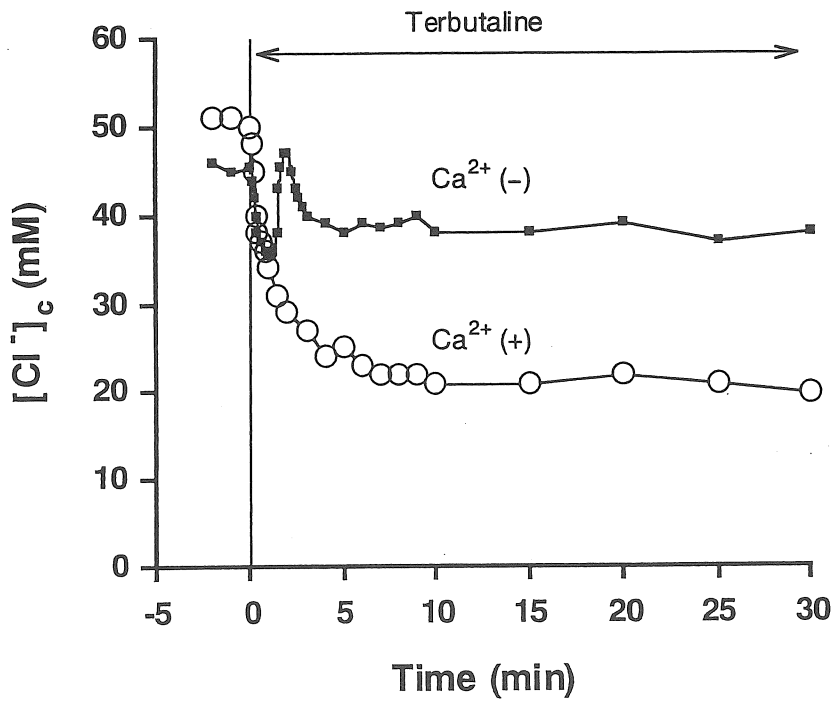


図6 細胞外カルシウム存在の有無による terbutaline 投与時の細胞内クロライドイオン濃度の変化

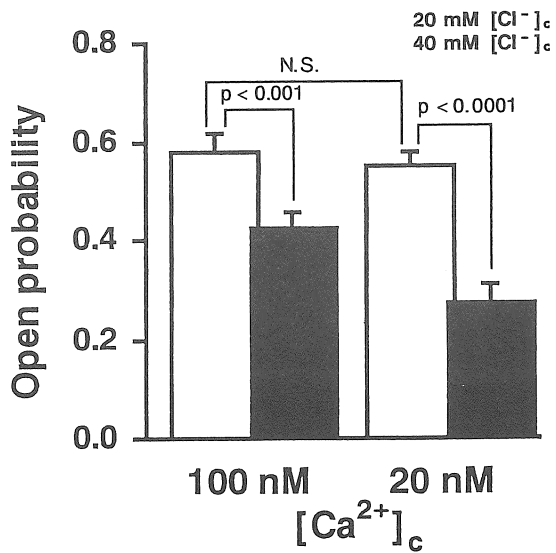


図7 細胞内カルシウムイオンとクロライドイオンの NSC channel 開口確率に及ぼす影響

## **Roles of $\text{Ca}^{2+}$ and $\text{Cl}^-$ in $\text{Na}^+$ transport and clearance of lung fluid in fetal lung**

Yoshinori Marunaka, Naomi Niisato  
Department of Cellular and Molecular Physiology  
Kyoto Prefectural University of Medicine

### Summary

To clarify roles of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cl}^-$  in regulation of amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  transport in rat fetal distal lung epithelial (FDLE) cells, we measured single channel currents from cell-attached and inside-out patches formed on the apical membrane of FDLE. FDLE had two types of amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$ -permeable cation channels: nonselective cation (NSC) and  $\text{Na}^+$  channels. Only the NSC channel responded to a beta adrenoceptor agonist (beta agonist), but the  $\text{Na}^+$  channel did not. Therefore, we focused our study on the NSC channel. A beta agonist increased the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) and decreased cytosolic  $\text{Cl}^-$  concentration ( $[\text{Cl}^-]_c$ ). The NSC channel was activated by cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ , while the channel was inhibited by cytosolic  $\text{Cl}^-$ . Therefore, we studied which factor, an increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  or a decrease in  $[\text{Cl}^-]_c$  caused by a beta agonist, played an essential role in stimulation of the channel leading to an increase in the  $\text{Na}^+$  transport and clearance of lung fluid. Our study indicates that the increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  plays an important role in decreasing the  $[\text{Cl}^-]_c$ , however the beta-agonist-caused decrease in  $[\text{Cl}^-]_c$  essentially activates the NSC channel. Based on these results, we conclude that the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  plays an important role in the stimulatory action of beta agonist on the NSC channel and  $\text{Na}^+$  reabsorption leading to fetal lung fluid clearance via reduction of  $[\text{Cl}^-]_c$ .