

---

---

# 助成研究報告書

---

---

医学プロジェクト研究

(2000-2002年度)

クロール・イオンの生理的役割と調節機構

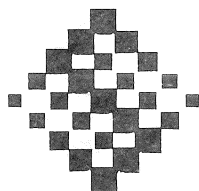
Physiological Roles of Chloride Ion and

Their Regulatory Systems

The Salt Science Research Foundation

Project Research Report

平成16年3月



財団法人ソルト・サイエンス研究財団

# クロール・イオンの生理的役割と調節機構

## プロジェクト・リーダー

自治医科大学

今井 正

## 研究チーム

関西医科大学

稲垣 千代子

東京医科歯科大学

内田 信一

佐賀医科大学

顛原 嗣尚

岡崎国立共同研究機構

岡田 泰伸

静岡県立大学

桑原 厚和

東北大学大学院

根東 義明

# クロール・イオンの生理的役割と調節機構

## 目 次

1	はじめに 今井 正 (自治医科大学) .....	1
2	神経系の興奮抑制制御におけるクロールの役割 稲垣 千代子 (関西医科大学) .....	5
3	腎におけるクロールの役割。CLCクロライドチャネルの生理的役割 とその制御 内田 信一 (東京医科歯科大学) .....	17
4	心・血管系におけるクロールの役割 顯原 嗣尚 (佐賀医科大学) .....	37
5	細胞容積調節におけるクロールの役割 岡田 泰伸 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所) .....	57
6	腸管・分泌細胞におけるクロールの役割 桑原 厚和 (静岡県立大学) .....	79
7	腎における役割。新生児早期の尿濃縮機構形質転換における 腎髄質部尿細管クロールイオン輸送機序の解析 根東 義明 (東北大学大学院) .....	99

## 1. はじめに

プロジェクト・リーダー  
今井 正 (自治医科大学名誉教授  
・国際医療福祉大学参与)

### ●研究プロジェクトの背景と構成

体液のナトリウムは細胞外液の主要なカチオンとして生理学的に重要な役割を果たしており、その調節機構も詳細な研究が行われている。これに対して、長い間クロールはナトリウムに随伴してイオンギャップを埋めるために存在するに過ぎないという認識があった。しかしながら、近年、クロールが神経系、循環系などにおける膜の興奮性の制御や、腎臓、腸管などにおける体液調節、さらにいろいろな細胞の容積調節など、さまざまな生理的機能の発現に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。クロールの細胞膜での輸送に関しても、能動輸送、共輸送、逆輸送、チャンネルなどの多彩な輸送機構も分子レベルで明らかにされつつある。

「クロール・イオンの生理的役割と調節機構」と題する医学プロジェクト研究は、このような多彩なクロールの働きとその調節機構を研究することによって、我々が無意識に摂取している食塩の中の、クロールの生理学および病態生理学的な役割を明らかにしようとしたもので、ソルト・サイエンス研究財団のプロジェクト研究として2000～2002年度の3年間にわたって実施された。

このプロジェクト研究は、(1) 神経系の興奮抑制制御におけるクロールの役割、(2) 心・血管系におけるクロールの役割、(3) 腎におけるクロール輸送の役割と制御機構、(4) 細胞容積調節におけるクロールの役割、(5) 腸管・分泌細胞のクロール輸送とその制御機構の5つのサブテーマの下に公募を行い、厳正な審査によって選ばれた6名の研究者によって遂行された。この報告書はその3年間の研究成果を取りまとめたものである。

### ●研究成果の概要

通常細胞膜電位はマイナス70～80mVであるが、この電位はナトリウム-カリウム・ポンプによって細胞内に汲み上げられたカリウムの平衡電位である。神経や筋肉などの興奮性の細胞は、この電位が脱分極することによって電気的興奮が伝えられる。ナトリウムが細胞内に流入すると、静止膜電位が浅くなるために、脱分極に対する閾値が下がり、興奮が促進される。これに対して、クロールが流入すると、静止膜電位は深くなり、興奮を抑制する。

神経系においては、その興奮抑制にGABA受容体やグリシン受容体を介するクロライド・チャンネルの重要性やその制御機構などがすでに解明されている。稲垣は、神経細胞のクロールの平衡電位から考えると、クロライドの能動輸送の

存在が必要であるという観点から、長年にわたってクロライド・ポンプの同定に精力的に取り組んできた。この研究プロジェクトによって、クロライド・ポンプが4つのサブユニットからなることが明らかにされ、そのサブユニットのひとつがクローニングされた。そして、アルツハイマー病の病態のカギを握るアミロイドβ蛋白によってクロライドポンプ活性が抑制され、細胞内クロール濃度が上昇することによって、興奮性アミノ酸の神経毒性が増強することが明らかになった。老人性痴呆の成因のひとつとして注目されているアルツハイマー病の病態に、クロライドポンプが関与することは、極めて興味深い知見である。さらに、アミロイドβ蛋白によるクロライドポンプの抑制がフォスファチジルイノシトール関連物質によって回復するという成績は、アルツハイマー病治療への応用の可能性を示す意味で、注目に値する。

顕原は、かねてより心筋のクロライドチャンネルの生理学に関する多くの研究成果を上げてきた。今回のプロジェクト研究では、クロライドチャンネルの細胞容積調節に果たす役割を中心に研究を行った。モルモットの単離心筋細胞を用いて、細胞容積の画像解析を行い、⑧アドレナリン受容体感受性で、cAMP依存性のクロライドチャンネル (CFTR-Cl channel) が、浸透圧負荷に対する細胞容積の調節に重要な役割を果たしていることを明らかにした。これに加えて、CFTR-Cl チャンネル非依存性の Cl チャンネルも、特定の条件下では細胞容積の調節に関与していることを明らかにした。さらに、CFTR-Cl チャンネル活性が細胞外液の ATP によって制御されていることを明らかにした。

上述のような興奮性の細胞において、クロライドイオンが生理的な機能を発揮するためには、細胞外液のクロール濃度が一定に保たれる必要がある。これに関与するのが腎臓からのクロールの排泄と、腸管からの吸収と排泄である。

腎臓におけるクロール輸送に関する研究は、内田と根東とによって行われた。内田は細いヘンレ上行脚のクロライドチャンネル (CLC-1) を世界に先駆けてクローニングして以来、腎臓その他のクロライドチャンネルの分子生物学的研究で高い評価を得ている。このプロジェクト研究では、CLC-3 チャンネルのノックアウトマウスの作成に成功し、その組織や細胞の解析から、このチャンネルがエンドソームの pH の制御に重要な働きをしていることを示唆した。また、腎臓に特異性がある CLC-K2 の発現の機構を培養細胞を用いて検討し、バーチンという特殊な蛋白の存在により膜内へのソーティングが起こることを証明した。この蛋白の欠損が一部の Bartter 症候群に見られることから、この型の Bartter 症候群では膜へのソーティング異常が、その病態の本態であることが明らかとなった。

根東は、細いヘンレ上行脚のクロライドチャンネルに関する生理学的な研究で、多くの成果を上げてきた。このプロジェクト研究においてあげた際だった業績は、尿の濃縮機構に関与するヘンレループのクロールチャンネルや、Na-K-2Cl 共輸送体、および集合管の尿素輸送体の発現が、胎生期から新生児期にかけて

急激に変化し、鳥型から哺乳類型の濃縮機構へと形質と機能の転換が起こることを示したことである。さらに、この形質転換の制御機構の解明に挑戦したが、単純に妊娠期間によって規定されるものではないことを明らかにした。一方、遺伝子ターゲティング法を用いて $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体遺伝子のホモとヘテロのマウスを作成し、太い上行脚の輸送機能を比較したが、mRNA量に差があるにもかかわらず、機能的には差が見られなかったことから、遺伝子転写以降のプロセスによっても、胎生期の機能と形質転換が制御されている可能性がある。

体液のクロライドバランスを規定するもうひとつの因子は、腸管におけるクロライドの輸送である。桑原は、腸管でのクロライド輸送を制御する因子としてのサブスタンスPとPGE2の相互作用を明らかにした。そして、両者の相乗作用のメカニズムに、細胞内カルシウムの増加、カルモデュリンの関与、ミオシン軽鎖キナーゼの活性化、F-アクチンの形成などの、一連のプロセスが関与することを明らかにした。

細胞が高浸透圧にさらされると細胞の容積は縮小するが、やがて正常に戻る(RVI)。また逆に、細胞が低張液にさらされると、いったん細胞は膨化するが、やがて正常化する(RVD)。このように細胞を一定容積に保つという現象は、細胞内のイオン環境を一定に保ち、細胞の機能を維持する上で基本的な働きである。このような細胞容積の制御にはカリウム輸送と並んでクロール輸送が重要である。これまで、細胞容積調節の細胞生理学に多くの業績を上げ貢献してきた岡田は、このプロジェクト研究において、アポトーシス性細胞容積減少(AVD)という新たな細胞生物学的な視点を切り開き、この現象にクロライドチャンネルが関与していることを明らかにした。また、乳酸アシドーシスによって、脳浮腫が起こるメカニズムとして、容積感受性のクロライドチャンネルの抑制が関与することを明らかにした。さらに、神経細胞がグルタミンによる過剰興奮時に、細胞が膨化して壊死に陥る現象を壊死性細胞容積増加(NVI)と呼び、この現象に容積感受性クロライドチャンネルの活性化が関与することを明らかにした。

#### ●プロジェクト研究の評価

以上のように、細胞生物学、神経系、循環系、腎臓、そして腸管といった広範囲な組織や細胞で、クロールの生理学的及び病態生理学的な役割に関する研究が展開された。各部門の研究の進展に関しては多少の長短はあるものの、国際的にも高く評価されるような多くの成果が得られた。プロジェクト研究は、総じて基礎的な研究が中心となっているが、アルツハイマーの治療や脳浮腫の治療への足がかりとなるような研究の進展も見られたことは、このプロジェクト研究の大きな成果であるといえる。各研究者の個別のプロジェクトが、これをきっかけにしてさらに発展し、医学の進歩に貢献することを期待して止まない。

## 2. 神経系の興奮抑制制御におけるクロールの役割

助成研究者 稲垣 千代子 (関西医科大学薬理学講座)  
共同研究者 服部 尚樹 ( 同 上 )  
北川 香織 ( 同 上 )

### 要約

研究目的 : 本研究は、脳神経細胞内の  $\text{Cl}^-$  濃度 ( $[\text{Cl}^-]_i$ ) を能動的に低く維持する機構の候補として我々が見出したホスファチジルイノシトールリン酸 (PIP) 要求性クロライドポンプについて、(1) サブユニットおよびその蛋白一次構造を明らかにし、(2) PI 関連中枢神経病態への関わりを明らかにすることを目的に実施された。

研究結果 : (1) クロライドポンプサブユニットの蛋白一次構造 — ラット脳の 520kDa クロライドポンプ蛋白から 51, 55, 60, 62 kDa サブユニット蛋白を単離し、cDNA クローニングにより新規 55kDa 蛋白がクロライドポンプ活性に必須のサブユニットであることを明らかにした。(2) PI 関連中枢神経病態への関与 — アルツハイマー病の病原性アミロイド  $\beta$  蛋白が細胞膜の PIP レベルの低下と共にクロライドポンプ活性を選択的に低下させ、 $[\text{Cl}^-]_i$  を上昇させて興奮性アミノ酸の神経毒性を増強することを明らかにした。

はじめに

脳の神経活動の抑制性制御には神経細胞内のクロライドイオン濃度 ( $[Cl^-]_i$ ) を能動的に低く維持するイオン輸送系が必須である。我々は、この輸送系の候補として、クロライドポンプ即ち ATP 依存性能動的外向きクロライド輸送活性をもち[1]、ホスファチジルイノシトールリン酸(PIP)により活性化される[2]、分子量 520 kDa の蛋白複合体を脳から単離した[3]。本研究では、クロライドポンプの(1)サブユニットおよびその蛋白一次構造を明らかにし、(2)ホスファチジルイノシトール(PI) 関連中枢神経病態への関わりを明らかにする。

## 研究方法

脳クロライドポンプサブユニットの蛋白一次構造：ラット脳の膜分画から MEGA-10 可溶化、イオン性カラムクロマトグラフィーに加え reactive red および二次元電気泳動によりクロライドポンプ 520kDa 蛋白複合体とそのサブユニット蛋白を単離した。固相法により解析した N 末アミノ酸部分配列から核酸プローブを作製し、ラット脳 cDNA ライブラリーおよび TA クローニングキットを用いた標準法によりサブユニット蛋白の cDNA クローニングを行った。

アミロイドβ蛋白のクロライドポンプ阻害機構解明とその回復因子の探索：アミロイドβ蛋白を培養ラット海馬神経細胞に 1-4 日間負荷し、クロライドポンプ/ATPase 活性、錐体細胞内  $Cl^-$ 濃度、細胞膜分画のイノシトールリン脂質、細胞生存率、DNA 断片化およびグルタミン酸神経毒性を測定した。また、これらの指標の変化に対するイノシトール、ホスファチジルイノシトール(PI)、PI4P、エストラジオールおよび cGMP の効果を測定して、そのアミロイドβ 毒性回復効果を解析した。

## 研究結果

### 1、クロライドポンプサブユニットの蛋白一次構造

ラット脳より可溶化・精製した 520kDa の ATP 依存性クロライド輸送活性をもつ蛋白複合体について、微量蛋白測定および微量無機リン定量による  $Cl^-$ -ATPase 活性確認の後、SDS-PAGE 法により 51, 55, 60, 62 kDa サブユニット蛋白を単離した。55kDa 蛋白の cDNA クローニングとその解析は、55kDa 蛋白がクロライドポンプサブユニットであることを示し、その結果は 2001 年に発表した[4]。55kDa 蛋白はそれまでにアミノ酸配列の報告されていない新規蛋白であり、cDNA の蛋白コード部 1512 塩基、28 アミノ酸シグナル配列をもつ糖蛋白で(図 1)、その mRNA および蛋白は共に脳に強く発現し、免疫組織化学上脳神経細胞の細胞膜に局在した(図 2)。

CGTTGCTGCAGTTTCAGCTGCGGAGGCCATGSGGCGCTTCGCCGCTACGCTGGTGGGCTCGCTGTTGCGGTCTGGGGCTGCTGCTGTGT 90

MetGlyArgPheAlaLeuAlaThrLeuValGlySerLeuPheGlyLeuGlyLeuLeuLeuCys 20



GGTCTAGCGAGGCTGGCGAGCGCCGAGCCCGGCCCTCCGGAAAGATCGCAATAGTTGGTCTGGAATCGGTGGTACTTCTCGGCC 180  
GlyLeuGlyArgLeuAlaSerAlaGluProArgAlaProProGluLysIleAlaIleValGlvAlaGlvIleGlvGlyThrSerSerAla 50

M M N M

TATTATCTTCGGAAGAAATTTGGGAAGGACGTGAAGATTGATGTTTGAAAGGAAAGAAATCGGGCCGCTTTGGCTACTTTGAAGGTG 270  
TyrTyrLeuArgLysLysPheGlyLysAspValLysIleAspValPheGluArgGluGluIleGlyGlyArgLeuAlaThrLeuLysVal 80

M

CAAGGTCACTGACTACGAAGCAGGGGTTCACTCATTACCCCTCTAAATTTGCACATGAAGCGATTTCGCAAGAGCTGGGTCTCCAGT 360  
GlnGlyHisAspTyrGluAlaGlyGlySerValIleHisProLeuAsnLeuHisMetLysArgPheValLysGluLeuGlyLeuSerSer 110

GTGCCCGCTTCAGGTGCCCTGGTGGGAGTCAATGGGAAGTCTCTGGTGTGGAGGAGCAGCTGGTTTATATCAACGTGATTAG 450  
ValProAlaSerGlyGlyLeuValGlyValTyrAsnGlyLysSerLeuValPheGluGluSerSerTrpPheIleIleAsnValIleLys 140

M M

CTGGTGTGGCGCTATGGATTTCACTCCCTGAGAAATGCACATGTGGTAGAAGACCTCTCGCAAGTTCATGAGGATCTATCGTTACCAG 540  
LeuValTrpArgTyrGlyPheGlnSerLeuArgMetHisMetTrpValGluAspLeuLeuAspLysPheMetArgIleTyrArgTyrGln 170

TCCCATGACTATGCTTCAGTAGCGTAGAAAAGTTGATGACGCCATTGGAGGGGATGACTATGTCAGACTGCTCAACCAACTCTCCGT 630  
SerHisAspTyrAlaPheSerSerValGluLysLeuMetTyrAlaIleGlyGlyAspAspTyrValArgLeuLeuAsnGlnThrLeuArg 200

GA AACCTG AAG AAG CAG GCTTCTCTGAGACGTTCCCTCAATGAGATGATCGCTCCCTCATGAAGTCAATTTGGCCAAAGCAGTAC 720  
GluAsnLeuLysLysAlaGlyPheSerGluThrPheLeuAsnGluMetIleAlaProValMetLysValAsnPheGlyGlnSerThrAsp 230

CTCAATGCTTTTGGTGGTGCATCATCAATGACTGCTGATTTCCAACCTTTGGGCACTGGAAGTGGTAAATAAAGTTGTTGCTCAGGG 810  
LeuAsnAlaPheValGlyAlaValSerMetThrAlaAlaAspSerAsnLeuTrpAlaValGluGlyGlyAsnLysValValCysSerGly 260

M

CTCCCTCAGCCCTCAACAGCAATCTATATCTGGCTCTGTAATGTCATAGAGAAGACCAAGCAGCAGGAAACCCCGGAAG 900  
LeuLeuGlnAlaSerAsnSerAsnLeuIleSerGlySerValMetSerIleGluLysThrArgThrLysGlnThrGlyThrProProLys 290

M

ATGTATGAAGTGGTTTATAAAACAGGATCTGAGATCCATTCTGACTTCTATGACATGTCTCTGTGGCTGCCCATTTGAATCGGAAGATG 990  
MetTyrGluValValTyrLysThrGlySerGluIleHisSerAspPheTyrAspIleValLeuValAlaAlaProLeuAsnArgLysMet 320

TCCAACATAACCTTCGAAATTTTGCATCCCCCATCGAGGAATCAATGACCCATATCAACACTCTGTGACAACTCTCATCAAAGGAGAG 1080  
SerAsnIleThrPheArgAsnPheAspProProIleGluGluPheAsnAspProTyrGlnGlnLeuValThrThrLeuIleLysGlyGlu 350

CTCAATCTACCTCTTCAGCTCCAGGCACAAGGATCAGTTCGGCCTGTCTGCGATCTTGTCACTGATGACTCAGATATGTTTATCAAC 1170  
LeuAsnSerThrLeuPheSerSerArgHisLysAspGlnPheGlyLeuSerAlaIleLeuValThrAspAspSerAspMetPheIleAsn 380

AGCCTGTCCATTGTGGCCTCTGTAAGTCATAAGAGGGTCCCCACCGGCTGGATGGCATGCATGTGTGGAAGACCTTCTCCAAAGGAC 1260  
SerLeuSerIleValAlaSerValSerHisLysGluGlyProProProAlaValAspGlyMetHisValTrpLysThrPheSerLysAsp 410

ATTCTCACAAAGAAAJAATCTCAAAGCTTCTCTGCTCAGATTATGCTGTGCGGAAGCCGTGGCTGCTACCTTACTACAATCT 1350  
IleLeuThrLysGluGlnIleSerLysLeuPheLeuSerTyrAspTyrAlaValArgLysProTrpLeuSerTyrProTyrTyrAsnPro 440

CCTCAGAAGTTCCTCCATATCTCCATGACCGGCTCTATTACCTCAATGGCATCGAGTTTGTGCCAGCTGCATGGAGATGAGTGCC 1440  
ProGlnLysCysProSerIleIleLeuHisAspArgLeuTyrTyrLeuAsnGlyIleGluPheAlaAlaSerCysMetGluMetSerAla 470

M

ATCGCTGGCTACACCGCGCTCCTTGCCTACCCAGTGGACGGCAATGAGGACATGATCGATCAGGACGACCTGTATGAAAAGCTT 1530  
IleAlaGlyTyrAsnAlaAlaLeuLeuAlaTyrArgTrpAsnGlyAsnGluAspMetIleAspGlnAspAspLeuTyrGluLysLeu 500

AAGCAGAACTGTAATTGAGCAGTCCCTCCCGAGCACCTGCTCTCAAGGATTGAGTCAACAAAGCTTCCCGACACCTCTCT 1620  
LysThrGluLeu

504

図1 クロライドポンプ 55kDa サブユニット cDNA の塩基およびアミノ酸配列

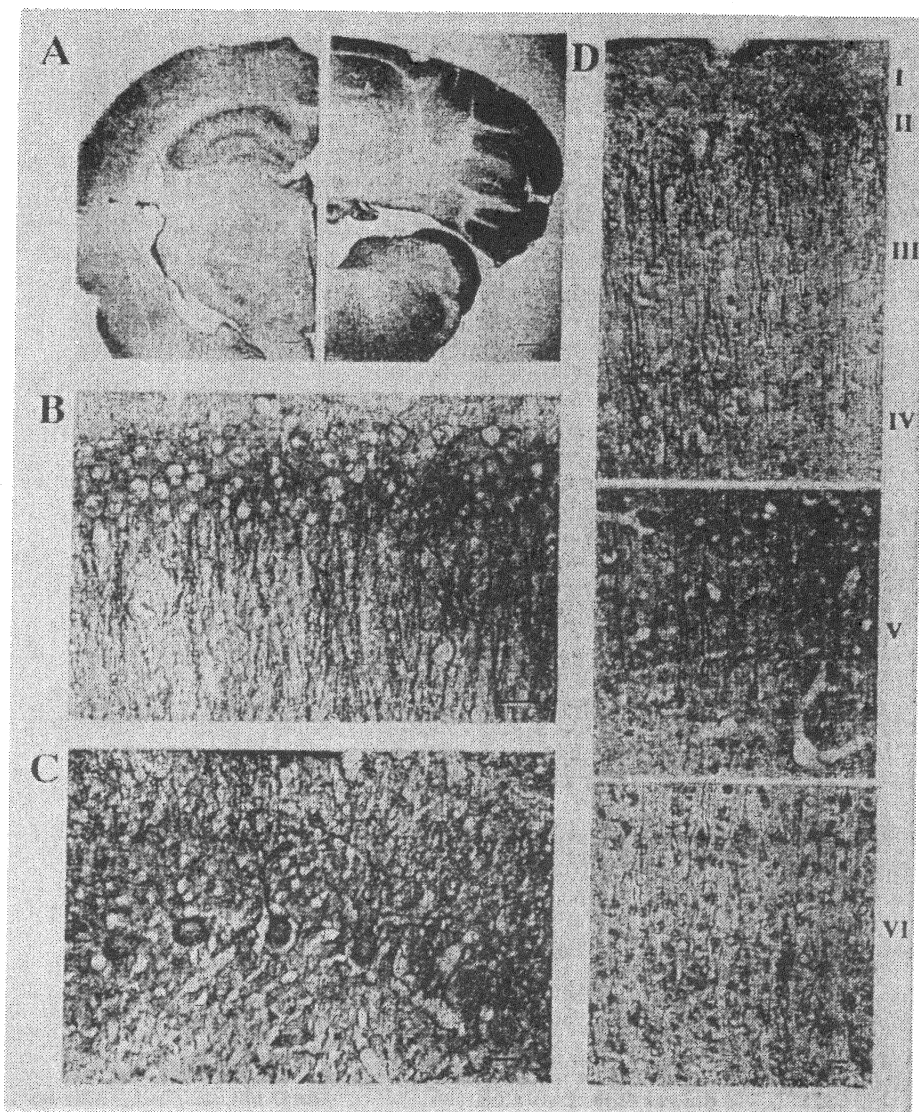


図2 クロライドポンプ 55kDa サブユニットの免疫組織染色

2、アミロイドβ蛋白によるクロライドポンプ阻害機構とその回復因子の探索：病態濃度のアミロイドβ蛋白(Aβ1-42、Aβ25-35)は培養ラット海馬神経細胞のクロライドポンプ(Cl<sup>-</sup>-ATPase)活性を選択的に低下させ(図3)、神経細胞の[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>を上昇させ(図4)、低濃度のグルタミン酸(10μM)の神経毒性を高めた(図5)[5]。これらの変化は、イノシトール、cGMP、および閉経後の女性に対してアルツハイマー病の予防・治療に用いられるエストラジオールにより回復した(図6-8)[6]。エストラジオールのこの効果は、核外エストロゲン受

容体刺激、CaMKII、PKG および PI 4-キナーゼ活性化を介するものであることが明らかになった。

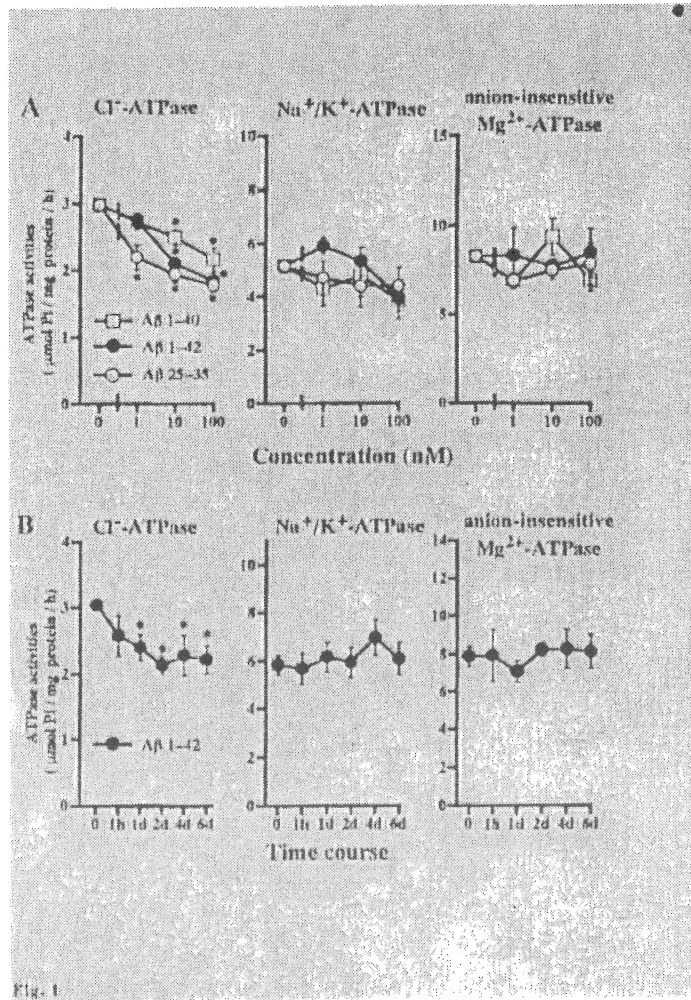


図 3 アミロイド β 蛋白による選択的 Cl<sup>-</sup>-ATPase 活性抑制

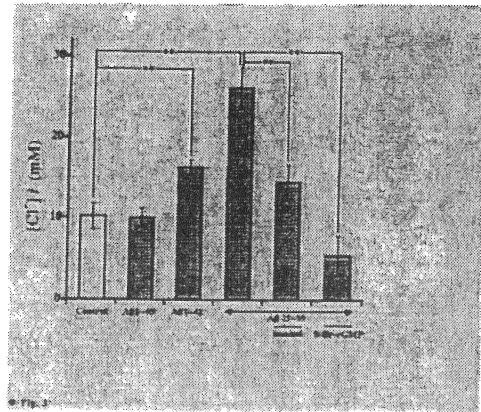


図4 アミロイドβ蛋白による神経細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度の上昇とイノシトールの cGMP による回復

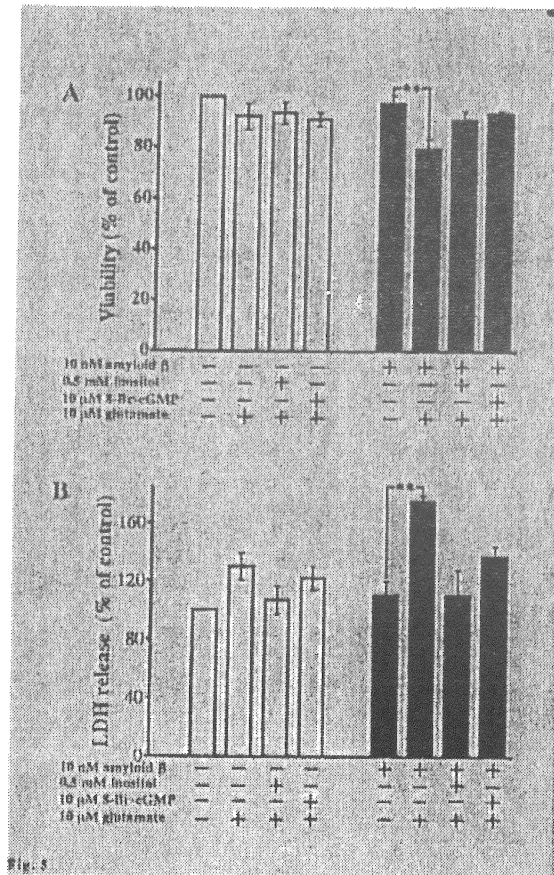


図5 アミロイドβ蛋白による神経興奮毒性亢進とイノシトールおよび cGMP による回復

さらに、PI 4-キナーゼの基質PI および生成物PI4P の抗アミロイドβ効果について検討した。動物（牛脳）性PI およびPI4P は50 nM以上の濃度でアミロイドβによるCl<sup>-</sup>-ATPase活性の阻害を回復させた。しかし高濃度のPI (>750 nM) またはPIP (>100 nM) はNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase活性を阻害した。この阻害はホスファチジルセリンの同時添加により消失したため、PI, PI4Pが細胞膜リン脂質の分布または合成に影響を与えたためと推測される。PI, PI4P (各75 nM) の添加はアミロイドβ蛋白による細胞内Cl<sup>-</sup>濃度の上昇を抑制し、Cl<sup>-</sup>-ATPase活性の回復が細胞内Cl<sup>-</sup>濃度を回復させたことが確認された[7]。また、牛脳由来PIに比べ、大豆PIはより低濃度からアミロイドβによるCl<sup>-</sup>-ATPase活性の阻害を回復させ、高濃度でもNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase活性を阻害せず(図6)、細胞内Cl<sup>-</sup>濃度を回復させ(図7)、グルタミン酸興奮毒性の亢進を防御することが明らかになった(図8) [8]。

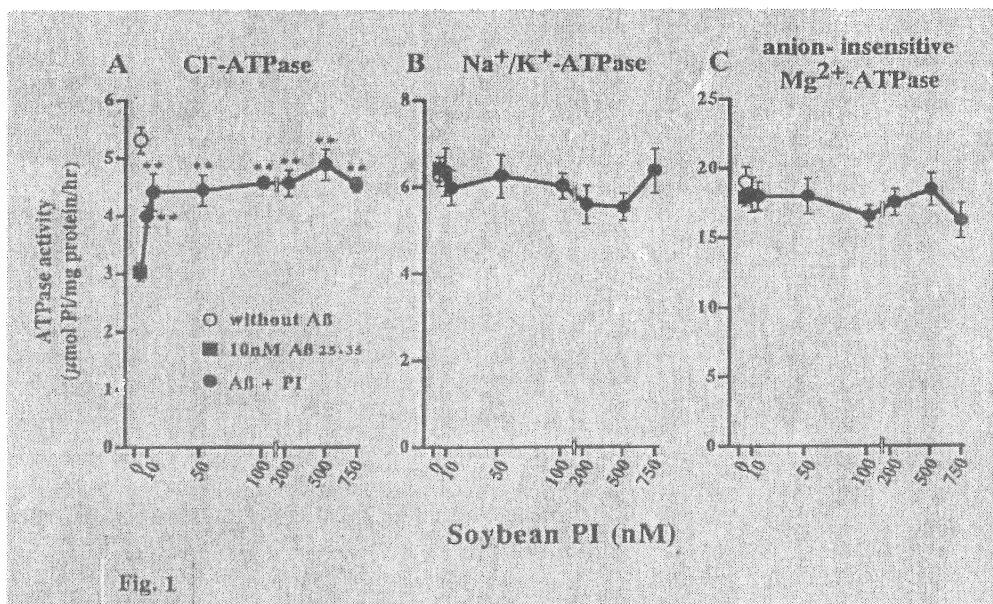


図6 大豆ホスファチジルイノシトール(PI)によるアミロイドβ蛋白誘発Cl<sup>-</sup>-ATPase活性阻害の回復

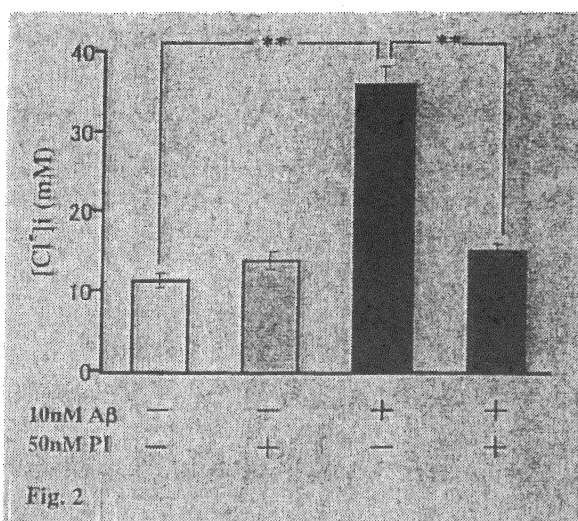


図7 大豆PIによるアミロイドβ蛋白誘発神経細胞内Cl<sup>-</sup>濃度上昇の回復

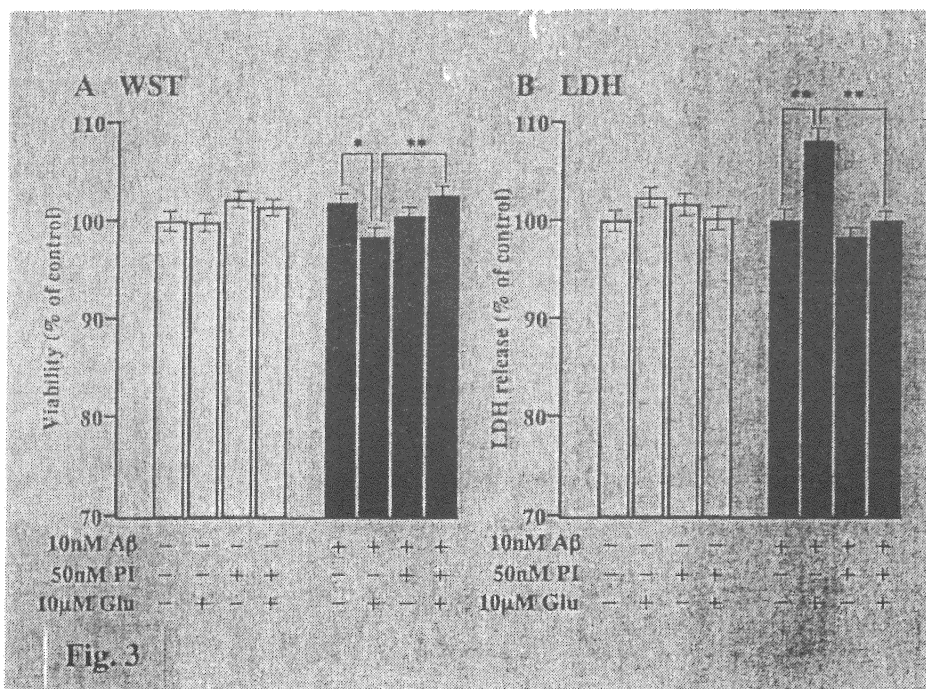


図8 大豆PIによるアミロイドβ蛋白誘発神経興奮毒性亢進の回復

## 考察

本実験の結果は、哺乳動物の脳に局在するクロライドポンプについて初めて新しい蛋白としての分子構造解明の端緒を開き、さらに社会的にも重要な問題となっているアルツハイマー病などのホスファジリノシトール関連病態に深く関わる可能性を初めて明らかにした点で、意義深いものと考えられる。今後さらにクロライドポンプの全構造解明を進め、また今回の研究で得られたクロライドポンプ機能回復手段が神経難病とされるアルツハイマー病の予防および治療に応用される可能性を期待して研究を進めたい。

## 謝辞

3年間にわたるプロジェクト研究に参加させて頂き、研究助成と共に有意義な討論の機会を与えて頂いたことに深く感謝致します。また、本報告本文に記載出来なかったクロライド関連の研究成果[9-18]をこのプロジェクト期間中に得ることが出来たことにも謝意を表します。

## 参考文献

1. Shiroya T, Fukunaga R, Akashi K, Shimada N, Takagi Y, Nishino T, et al. An ATP-driven  $\text{Cl}^-$  pump in the brain. *J Biol Chem* 1989;264: 17416-21.
2. Zeng XT, Hara M, Inagaki C. 1994. Electrogenic and phosphatidylinositol-4-monophosphate-stimulated  $\text{Cl}^-$  transport by  $\text{Cl}^-$  pump in the rat brain. *Brain Res* 1994; 641: 167-70.
3. Zeng XT, Higashida T, Hara M, Hattori N, Kitagawa K, Omori K, et al. Antiserum against  $\text{Cl}^-$  pump complex recognizes 51 kDa protein, a possible catalytic unit in the rat brain. *Neurosci Lett* 1998;258: 85-8.
4. Kitagawa K, Yagyu K, Yamamoto A, Hattori N, Omori K, Zeng XT, et al. Molecular cloning and characterization of  $\text{Cl}^-$  pump-associated 55 kDa protein in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289: 363-71.
5. Yagyu K, Kitagawa K, Irie T, Wu B, Zeng XT, Hattori N, et al. Amyloid  $\beta$  proteins inhibit  $\text{Cl}^-$ -ATPase activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 2001;78: 569-76.
6. Yagyu K, Kitagawa K, Wu B, Zhang NY, Irie T, Hattori N, et al. Protective effects of estradiol against amyloid  $\beta$  protein-induced inhibition of

- neuronal Cl<sup>-</sup>-ATPase activity. *Neuropharmacol* 2002;43: 1297-304.
7. Wu B, Kitagawa K, Yagyu K, Zhang NY, Hattori N, Inagaki C. Phosphatidylinositol and PI-4-monophosphate recover amyloid  $\beta$  protein-induced inhibition of Cl<sup>-</sup>-ATPase activity. *Life Sci* 2002;72: 455-63.
  8. Zhang NY, Kitagawa K, Wu B, Inagaki C. Soybean-derived phosphatidylinositol recovers amyloid  $\beta$  protein-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 2003;350: 105-8.
  9. Higashida T, Zeng XT, Hara M, Omori K, Sasaki S, Orikasa M, et al. Immunohistochemical demonstration of Cl<sup>-</sup> pump in type A intercalated cells of rat kidney. *Jpn J Pharmacol* 2000;83: 233-40.
  10. Kawasaki E, Hattori N, Miyamoto E, Yamashita T, Inagaki C. mRNA expression of kidney-specific ClC-K1 chloride channel in single-cell reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of outer hair cells of rat cochlea. *Neurosci Lett* 2000;200: 76-8.
  11. Zeng XT, Mikami-Uru T, Higashida T, Yagyu K, Kitagawa K, Hattori N, et al. Developmental changes in Cl<sup>-</sup>-ATPase activity in rat brains. *Neurosci Lett* 2001;302: 101-4.
  12. Irie T, Miyamoto E, Kitagawa K, Maruyama Y, Inoue K, Inagaki C. An anxiolytic agent, dihydrohonokiol-B, inhibits ammonia-induced increases in the intracellular Cl<sup>-</sup> of cultured rat hippocampal neurons via GABA<sub>A</sub> receptors. *Neurosci Lett* 2001;312: 121-3.
  13. Kawasaki H, Otani H, Mishima K, Imamura H, Inagaki C. Involvement of anion exchange in the hypoxia/reoxygenation-induced changes in pHi and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in cardiac myocyte. *Eur J Pharmacol* 2001;411: 38-43.
  14. Jiang B, Hattori N, Liu B, Kitagawa K, Inagaki C. Expression of swelling- and/or pH-regulated chloride channels (ClC-2, 3, 4 and 5) in human leukemic and normal immune cells. *Life Sci* 2002;70: 1383-94.
  15. Suzukawa J, Omori K, Yang L, Inagaki C. Continuous administration of antisense oligonucleotides to *c-fos* reduced the development of seizure susceptibility after ethacrynic acid-induced seizure in mice. *Neurosci Lett* 2003;349, 21-4.



16. Yang L, Omori K, Otani H, Suzukawa J, Inagaki C. GABA<sub>B</sub> receptor agonist suppressed ammonia-induced apoptosis in cultured rat hippocampal neurons by restoring phosphorylated BAD level. *J Neurochem* 2003;87: 791-800.
17. Yang L, Omori K, Suzukawa J, Inagaki C. Calcineurin-mediated BAD Ser155 dephosphorylation in ammonia-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 2004, in press.
18. Liu B, Hattori N, Jiang B, Zhang NY, Wu B, Kitagawa K, et al. Single cell RT-PCR demonstrates differential expression of GABA<sub>B</sub> receptor subunits in rat hippocampal pyramidal and granule cells. *Mol Brain Res* 2004; in press.

### 3. 腎におけるクロライドの役割：CLC クロライドチャネルの生理的役割とその制御

助成研究者 内田信一（東京医科歯科大学体内環境調節学）

#### 要約

腎臓に発現しているCLCクロライドチャネルのうち、CLC-3クロライドチャネルの生理的役割を明らかにするため、CLC-3クロライドチャネルノックアウトマウスを作成した。CLC-3ノックアウトマウスはライソゾーム病の一種であるneuronal ceroid lipofuscinosis様の症状を呈し、これによりCLC-3が細胞内膜系のクロライドチャネルであり、エンドソーム内のpH制御に関わりを持つことが示された。また、新たに発見されたCLC-Kチャネルのベータサブユニットであるバーチン蛋白は、CLC-Kチャネルと結合し、単独では細胞膜上に到達できないCLC-Kチャネルを細胞膜までリクルートする役目を果たしていること、またヒトにおいてバーター症候群を呈するバーチンの変異体は、それ自身が細胞膜上に到達できないことを示し、バーチン変異によるバーター症候群発症の分子メカニズムを明らかにした。最後に哺乳類以外の種で腎臓特異的なCLC-Kチャネルが進化的にどこまでさかのぼれるかを知るために、魚類にてCLC-Kチャネルのクローニングをこころみ単離に成功した。このチャネルは淡水状態のみ存在し、CLC-Kチャネルの本来の役割がNaCl再吸収と自由水産生であったことを明らかにした。

#### はじめに

腎臓は体液恒常性を維持する重要な臓器であり、盛んな水イオン輸送がおこなわれている。それは尿細管各部位における輸送体蛋白が種々の制御を受けることで成り立っているが、陽イオン、水輸送にかかわる輸送体遺伝子に比べ、陰イオンであるクロライドの輸送体は、生理的には種々のクロライドチャネルの存在が示唆されているものの、その腎臓における分子実体の解明、解析は遅れていた。我々は1992年より腎臓に存在するクロライドチャネルの単離を進め、種々のCLCクロライドチャネルのcDNAを腎臓より単離した(1-4)。これまでの研究では、単離した各々のチャネルの腎内での存在部位を確定し(5-7)、チャネルとしての機能からその生理的意義を推察してきたが、生体内、細胞内での役割の確定には各々のクロライドチャネルの欠損動物、欠損細胞が不可欠である。そこでCLC-K1クロライドチャネル欠損マウスを作成し、CLC-K1が尿濃縮機構に必須のクロライドチャネルであることを明らかにし(8)、その原因が髄質内層での溶質の蓄積障害であることを示した(9)。

このように発生工学的手法がクロライドチャネルの生体内での役割の確定にも有用であることが確認されたため、本研究の第一の目的として、生理的機能が未確定であり、容積感受性クロライドチャネルであるかという点も論争的(10)であった CLC-3 クロライドチャネルについて、その欠損動物の作成を試みた。CLC-3 はデント病の原因遺伝子であった CLC-5 と相同性の高い CLC クロライドチャネルであり、腎臓のみならず中枢神経系でその発現が多い。CLC-5 の異常が近位尿細管でのエンドサイトーシスの障害をもたらすことから、その神経版ともいえる CLC-3 のノックアウトでどのような形質が現れるか興味深かった。また、第2の研究対象として、腎臓特異的な CLC-K チャネルに関して、それらにバーチンというベータサブユニットが存在することが遺伝性バーター症候群の原因遺伝子探索から明らかとなったため(11, 12)、CLC-K チャネルとバーチン蛋白の相互作用とそれが CLC-K の細胞内局在にあたえる影響を検証した。最後に魚類ではじめて CLC-K チャネルを単離し、CLC-K の生まれた経緯について示唆を得ることができた。

## 方法

### CLC-3 クロライドチャネルノックアウトマウスの作成

通常の相同組み替え法により CLC-3 のエクソン5, 6 をネオマイシンジーンに組み替えた ES 細胞を得、blastocyst にインジェクションし、4 ラインの germ line transmission を得た。これらのマウスよりホモ欠損マウスを得た。

### 組織学的観察

HE 染色による光顕所見および電子顕微鏡所見により検討した。

### ライソゾーム内 F1FoATPase subunit C の蓄積の検討

F1FoATPase subunit C に対する特異抗体を用いて、免疫組織化学、percol gradient subfractionation により分画した蛋白によるウエスタンブロット法を行った。

### エンドソーム内 pH 測定

肝臓を使用し、in vivo で腹腔内に FITC-dextran を投与後、肝臓内エンドソーム分画を回収し、FITC 蛍光が、pH 依存性であることを利用し、単離したエンドソーム内の定常状態下の pH を測定した。

### バーチン安定発現細胞の樹立

MDCK 細胞にバーチン cDNA をクローニングした発現ベクターをトランスフェクションし、ネオマイシン存在下で、クローンを選択、バーチンにつけた myc タグによるウエスタンブロットで発現細胞を同定した。

### 免疫染色

細胞における発現蛋白の免疫染色は、タグ特異的な1次抗体(ラット抗 HA 抗体 3F10; ラビット抗 FLAG 抗体)と種特異的 Alexa-conjugated 2次抗体を用い

て行い、con-focal レーザー顕微鏡にて観察した。

#### 免疫沈降

COS7 細胞に一過性に HA タグを付けた CLC-K2 と myc タグをつけたバーチンを発現させ、HA 抗体で沈降させた沈殿物中にバーチンが存在するかをウエスタンブロットで検証した。

#### 蛋白安定性アッセイ

COS7 細胞に HA タグを付けた CLC-K2 をトランスフェクション後、細胞を 35S メチオニンでラベルし、経時的に細胞を回収後 HA 抗体で免疫沈降後 SDS-PAGE を行い、オートラジオグラフィにて検出した。

#### Tilapia からの CLC-K チャネルの単離

Tilapia 腎臓から cDNA ライブラリーを作成し、CLC チャネルで保存されている部分に degenerate PCR primer を作成し、RT-PCR によりクローンの部分シーケンスを得、それをプローブとしてフルクローンを得た。

### 成績

#### 1) CLC-3 ノックアウトマウスの解析

CLC-3 ノックアウトマウスはメンデルの法則に従い出生するものの、出産後は図 1 にみられるように成長障害がみられ、データは示していないが、死亡率も高かった。死亡したマウスの剖検所見にて肉眼的に明らかだったのは、小腸の出血性壊死であった (図 2)。この上皮の脱落は死亡したマウス全例にみられ、マウスの死因と考えられた。死亡していないマウスにおいても、focal な上皮脱落が検査したノックアウトマウスにはすべて確認された。

腸上皮以外に神経系において海馬の萎縮、網膜視細胞層の萎縮が著明であった。このような組織学的変化は、ライソゾーム酵素であるカテプシン D ノックアウトマウス (13) でみられる所見と類似していた。CLC-3 が細胞内膜系のクロライドチャネルであり、CLC-5 で想定されたように内膜内の H-ATPase による pH 酸性化に関与するクロライドチャネルであるとする、ライソゾーム内 pH 酸性化が障害されライソゾーム酵素活性が働かず、同じ形質を示す可能性が考えられた。一方、マウスのカテプシン D ノックアウトマウスは最近ヒト neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL) モデルであることが示された (13)。よって CLC-3 ノックアウトマウスも同じ範疇に入る病態であることを示すために、病理学的、生化

学的に NCL であるかのクライテリアを満たすかを検討した。図 3 に見られるように電子顕微鏡的に、細胞内に電子密度の高い物質の蓄積が見られた。この物質が、NCL の際に比較的特異的に蓄積し、マーカー蛋白として確立している F1FOATPase subunit C を含んでいるかどうかを検討するために免疫組織化学を施行した。海馬の F1FOATPase subunit C の免疫組織化学を施行したところ、細胞脱落が進んでいる CA 1 領域は染色性が少ないものの、その他の海馬の錐体細胞には著明な F1FOATPase subunit C の蓄積を証明した(14)。生化学的に F1FOATPase subunit C のライソゾームへの蓄積を証明するために、細胞内器官をパーコールにてミトコンドリアとライソゾームに分画し、ウエスタンブロットをおこなった。F1FOATPase subunit C は本来ミトコンドリア蛋白であるため、ノックアウトマウス、コントロールマウスともミトコンドリア分画にはその存在を確認できる。しかしながら、ノックアウトマウスではライソゾーム分画にもその存在を確認できた(図 4)。一方、カテプシン D 酵素自体は、その分子量などにもノックアウトマウスで変化が見られず酵素自体の変異はこの F1FOATPase subunit C の蓄積には関与していないと思われた。

最後に、この異常が CLC-3 の存在する細胞内膜系での pH ホメオスターシス異常によるものであるかを検討した。F1FOATPase subunit C は肝臓でも蓄積しており、CLC-3 ノックアウトマウスにおいて異常が起きている臓器であるという結果を得ているので、また、腹くう内 FITC-dextran 投与により in vivo で肝臓への投与が可能であることから、肝臓にて検討した。通常細胞内器官分画を行いウエスタンブロットにて CLC-3 の存在するフラクションを選択した。これは通常エンドソーム分画といわれる部分に相当し、ライソゾーム分画には CLC-3 は存在しなかった。この分画において、膜内 pH はノックアウトマウスにおいて優位に上昇しており(図 5)、CLC-3 はその存在する膜系において、その膜内 pH 制御に関与していることが示された。

## 2) CLC-K チャネルの細胞内局在制御機構

### a) バーチン蛋白の細胞内局在

野生型バーチン蛋白は細胞膜上に存在した。(図 6) 一方、バーター症候群を引き起こす R 8 L のミスセンス変異蛋白は細胞膜上に到達せず、細胞内機関にとどまった。この部位は ER marker である calnexin との 2 重染色により ER であることが判明した。

### b) CLC-K 2 クロライドチャネルの細胞内局在

以上で作成したバーチン蛋白安定発現細胞株に、CLC-K 2 クロライドチャネルを一過性発現させ、その細胞内局在を決定した。はじめに、バーチン蛋白が発現していない細胞では、CLC-K 2 クロライドチャネルは細胞内器官に発現し、マーカー蛋白との 2 重染色にて主としてゴルジ体に存在することが明らかとなった。

いっぽう、野生型バーチン蛋白発現細胞においては、CLC-K 2 は細胞膜上に到達していることが判明した。(図 7) さらに、R 8 L 発現細胞では、CLC-K 2 クロライドチャネルは R 8 L とほぼ局在が一致し、細胞内おそらくは ER にとどまっていると思われた。(図 7)

### c) バーチン蛋白と CLC-K 2 の分子的会合

つぎに、この両者の共存が、両者の物理的な結合によるものかどうかを検討した。図 8 に示すように、両者を一過性発現させた後、CLC-K 2 について HA タグで免疫沈降し、バーチンが共沈してくるかを検討した。その結果、野生型でも R 8 L でも CLC-K 2 には結合することがあきらかになった。

### d) バーチン結合による CLC-K2 蛋白の安定性の増加

バーチン発現下では、ウエスタンブロット上 CLC-K2 の発現がたえず増加していることから、バーチンによる CLC-K2 の蛋白安定性を検討した。

図 9 に示すごとく、バーチン非存在下では CLC-K2 の半減期は非常に早いのに対し、存在下ではその半減期は著明に延長していた。

以上より、

- 1) CLC-K 2 はバーチン無くしては細胞膜上に到達できない。
- 2) バーター症候群を引き起こすバーチン蛋白の変異はバーチン蛋白の細胞膜上への移行を阻害する。
- 3) 変異型バーチン蛋白も CLC-K 2 に結合できるため、バーチンの変異により CLC-K 2 の細胞膜へのソーティングが阻害される。
- 4) バーチンは CLC-K2 の細胞内局在を決定するのみならず CLC-K2 蛋白の安定性を増強する。

が、結論された(15)。

### 3) Tilapia CLC-K チャネルの単離。

単離された OmCLC-K は 684 個のアミノ酸からなり、ラットの CLC-K とおよそ 40% の相同性を持っていた。腎臓内分布は、哺乳類のヘンレの太い上行脚に相当する遠位部尿細管の basolateral 側で、その発現は淡水中に限られた (16)。

(図 10)

## 考察

### 1) CLC-3 ノックアウトマウスに関して

CLC-3 はその生体内での機能が不明な CLC クロライドチャネルであったが、今回のノックアウトマウスの形質から、細胞膜状にあって経上皮クロライド輸送に関与しているというよりは、細胞内膜系特にエンドソームに存在するクロライドチャネルであり、しかもその場で内膜内の pH ホメオスターシスに関与していることが示された。CLC-3 ノックアウトマウスではライソゾームでなくエンドソーム内の pH 上昇がなぜライソゾーム酵素低下と同じ形質を示すのかという点は今後の検討が必要であるが、細胞内蛋白処理系はオートファゴソームに始まり、これが後期エンドソームに融合し、さらにライソゾームに成熟するという課程をとることから、その中間点に位置するエンドソームでの pH 上昇が何らかの影響を与える機会は十分考えられる。詳しい細胞内での CLC-3 の分布を決定することが今後の課題である。しかしながらこの研究により、CLC-3 がヒトでの NCL 責任遺伝子である可能性が示唆され、細胞形質膜上でのクロライド輸送以外にもクロライドチャネルの持つ生体内での多彩な機能を明らかにすることができた。容積感受性クロライドチャネルであるかどうかについては、共同研究により検討中である。

### 2) CLC-K2 の細胞内局在機構について

CLC-K2 の細胞膜への輸送のメカニズムをバーチンとの関連から明らかにした。

バーチンの変異がヒトでバーター症候群を引き起こすこと、バーチンとの共発現で CLC-K チャネルの発現が著明に増加することから、バーチンが CLC-K2 の細胞膜への移行を担っていることは示唆されていたが、今回培養細胞においてその現象の確認をおこなった。明らかに CLC-K チャネルは単独では CLC-3 同様細胞内膜系とくにゴルジ体にとどまり、バーチン存在下ではじめて細胞膜上に移行できた。このことは CLC クロライドチャネルはもともとは細胞内膜系のクロライドチャネルとして存在し（事実酵母の CLC クロライドチャネルはゴルジ体に存在している）、進化の過程で細胞膜上への移行をベータサブユニットの存在で獲得した可能性が示唆される。本研究ではバーチンのバーター症候群を引き起こす変異体は細胞膜移行に異常を生じ、しかしながら CLC-K2 との結合性が保持されていることから、CLC-K2 を細胞内でミスリードしてしまうことが、バーター症候群発症の分子機序であることを明らかにした。このように CLC-K チャネルの細胞内局在はバーチンが握っていることが明らかになったため、今後バーチン自身の細胞内局在の制御機構を明らかにすることで、CLC-K チャネルの生理的な機能制御機構が明らかになる可能性があると思われる。

### 3) 魚類 CLC-K チャネルに関して

CLC-K チャネルに関しては、今まで哺乳類以外では *Xenopus* までさかのぼることができていたが、さらに進化的に上流にある魚類に存在するかは明らかでなかった。海水中の魚類は過剰な塩分負荷にさらされており、また尿を濃縮する必要もない。よって腎臓内で CLC-K チャネルが活躍する必要はない。しかしながら淡水に進出した魚類は NaCl の喪失の危機に絶えずさらされており、腎臓においても NaCl を再吸収し自由水を排出する機構が求められるようになる。我々は、淡水と海水を行き来できる *t i l a p i a* という魚の腎臓を用いて、CLC-K チャネルが魚類の腎臓にも存在し、しかも上記の仮説どおり淡水中でのみ存在することを明らかにすることができた。魚類の遠位尿細管は水透過性が低く、哺乳類のヘンレの太い上行脚と性質が類似している。この部分に CLC-K が存在



し、NaCl を再吸収し、自由水を作り排出するという必要性が淡水に生きる魚には必要で、この我々が単離した OmCLC-K は哺乳類の CLC-K2 にその生理的意義が重なり、CLC-K 本来の使命は NaCl 保持という目的のために、魚が淡水に進出した時点で生まれてきたものと思われる。その後、根東らの研究にあるように(17)、哺乳類になり、更なる尿濃縮能が必要とされたときに、CLC-K1 が生まれ、対向流系を発達させたと思われた。

#### まとめ

CLC クロライドチャネルの生理的役割を検討した。CLC-K チャネルは上皮のクロライド輸送に関わり、その細胞膜発現にはバーチンというサブユニットが必要なことを明らかにした。バーチン非存在下では、CLC-K チャネルも細胞内とくにゴルジに存在し、このことは CLC-3 が細胞内膜系のクロライドチャネルであることが明らかになったことと考え合わせると、CLC クロライドチャネル自体は酵母の CLC の如く、もともとは内膜系のクロライドチャネルとして存在していたものが、他のサブユニットの助けを借りて他の細胞内部位に到達できるようになり、新たな生理的機能を獲得した可能性が示唆された。また、この CLC-K チャネルの魚類からの単離とその淡水中での発現は、CLC-K チャネルの起源を示唆していた。

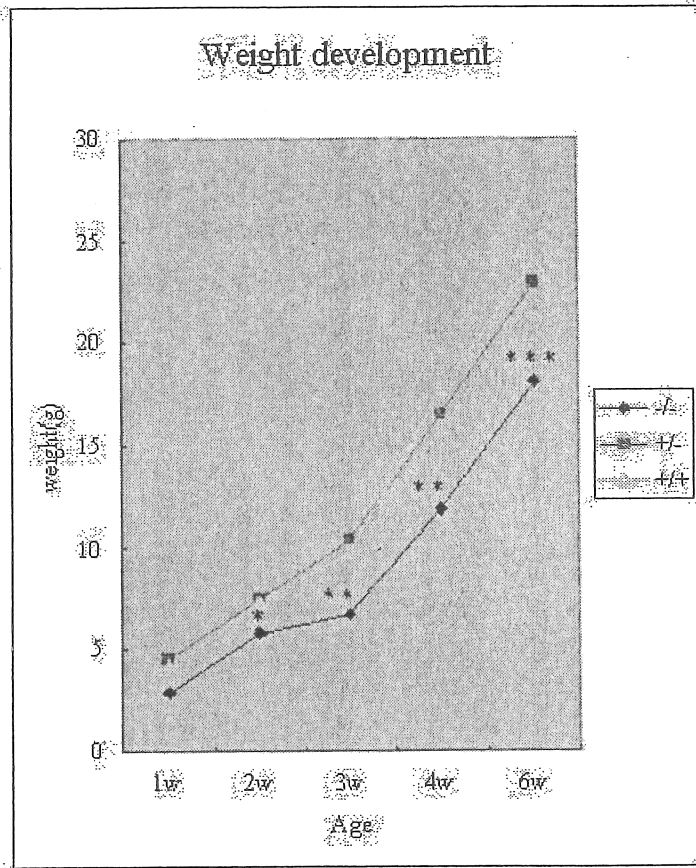
#### 謝辞

本研究は、ソルト・サイエンス研究財団のプロジェクト研究助成と、文部科学省科学研究費特定領域 B、 基盤 B により行われた。

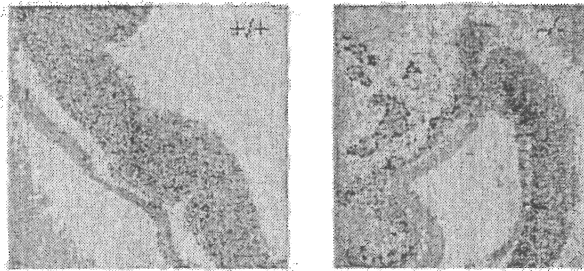
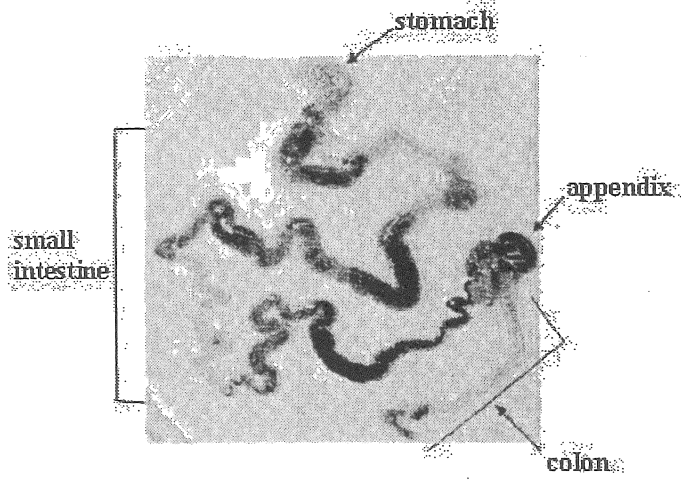
## 参考文献

1. Uchida S, Sasaki S, Furukawa T, Hiraok, M, Imai T, Hirata Y et al. Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *J Biol Chem* 1993;268: 3821-3824.
2. Adachi S, Uchida S, Ito H, Hata M, Hiroe M, Marumo F et al. Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney. *J Biol Chem* 1994;269: 17677-17683.
3. Kawasaki M, Uchida S, Monkawa T, Miyawaki A, Mikoshiba K, Marumo F et al. Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron* 1994;12: 597-604.
4. Sakamoto H, Kawasaki M, Uchida S, Sasaki S, Marumo F. Identification of a new outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channel that belongs to a subfamily of the ClC Cl<sup>-</sup> channels. *J Biol Chem* 1996;271: 10210-10216.
5. Kobayashi K, Uchida S, Mizutani S, Sasaki S, Marumo F. Intrarenal and cellular localization of CLC-K2 protein in the mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 2001;12: 1327-1334.
6. Yoshikawa M, Uchida S, Yamauchi A, Miyai A, Tanaka Y, Sasaki S, et al. Localization of rat CLC-K2 chloride channel mRNA in the kidney. *Am J Physiol* 1999;276: F552-558.
7. Takeuchi Y, Uchida S, Marumo F, Sasaki S. Cloning, tissue distribution, and intrarenal localization of ClC chloride channels in human kidney. *Kidney Int* 1995;48: 1497-1503.
8. Matsumura Y, Uchida S, Kondo Y, Miyazaki H, Ko SB, Hayama A, et al. Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nat Genet* 1999;21: 95-98.
9. Akizuki N, Uchida S, Sasaki S, Marumo F. Impaired solute accumulation in inner medulla of Clcnk1<sup>-/-</sup> mice kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280: F79-87.
10. Duan D, Winter C, Cowley S, Hume JR, Horowitz B. Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* 1997;390: 417-421.
11. Estevez R, Boettger T, Stein V, Birkenhager R, Otto E, Hildebrandt F

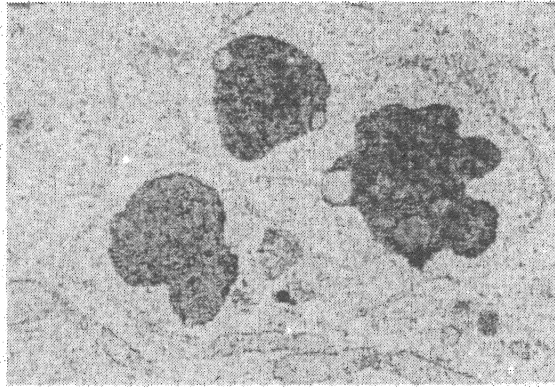
- et al. Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel beta-subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion. *Nature* 2001;414: 558-561.
12. Birkenhager R, Otto E, Schurmann MJ, Vollmer M, Ruf EM, Maier-Lutz I, et al. Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet* 2001;29: 310-314.
  13. Koike M, Nakanishi H, Saftig P, Ezaki J, Isahara K, Ohsawa Y, et al. Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons. *J Neurosci* 2000;20: 6898-6906.
  14. Yoshikawa M, Uchida S, Ezaki J, Rai T, Hayama A, Kobayashi K, et al. CLC-3 deficiency leads to phenotypes similar to human neuronal ceroid lipofuscinosis. *Genes Cells* 2002;7: 597-605.
  15. Hayama A, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Molecular mechanisms of Bartter syndrome caused by mutations in the BSND gene. *Histochem Cell Biol* 2003;119: 485-493.
  16. Miyazaki H, Kaneko T, Uchida S, Sasaki S, Takei Y. Kidney-specific chloride channel, OmClC-K, predominantly expressed in the diluting segment of freshwater-adapted tilapia kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99: 15782-15787.
  17. Liu W, Morimoto T, Kondo Y, Iinuma K, Uchida S, Imai M. "Avian-type" renal medullary tubule organization causes immaturity of urine-concentrating ability in neonates. *Kidney Int* 2001;60: 680-693.



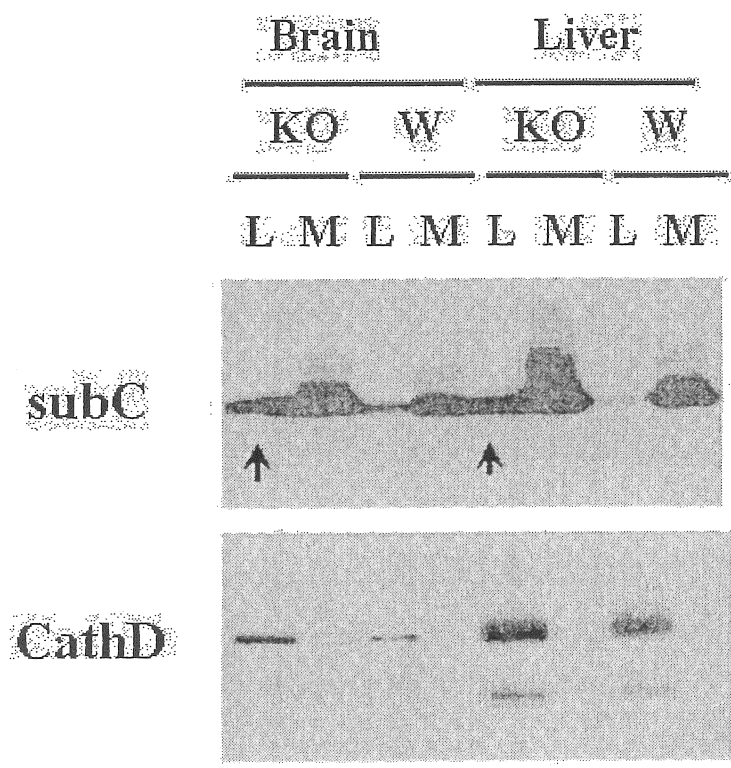
**图1**  
**Growth retardation observed in the**  
**CLC-3 KO mice**



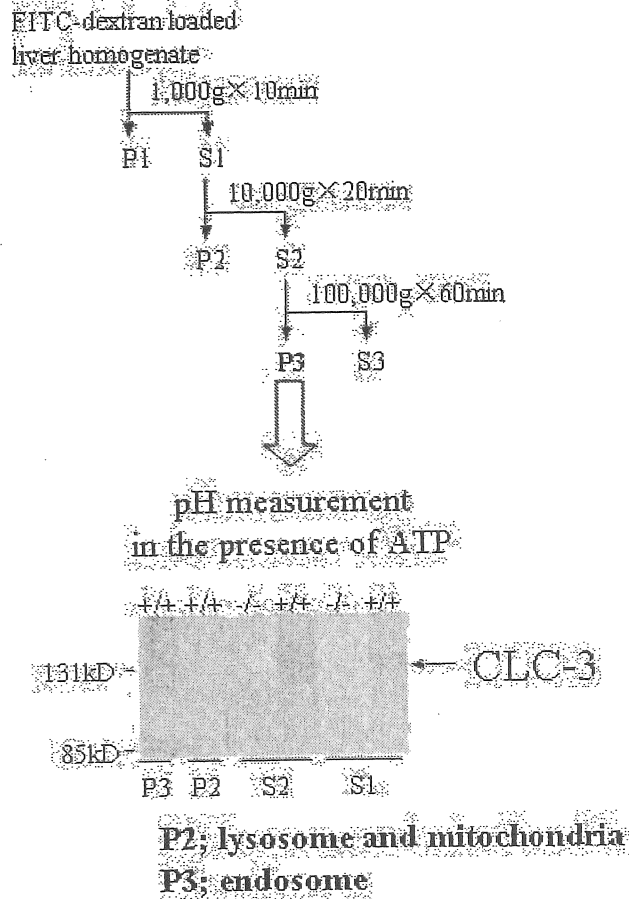
**图 2**  
**Intestinal necrosis observed in the**  
**CLC-3 KO mice**



**☒ 3 Electron dense deposit  
observed in the pyramidal cells in  
hippocampus of the CLC-3 KO  
mice**



**図 4**  
 Lysosomal accumulation of subunit c  
 of F1F0 ATP-ase in the CLC-3 KO  
 mice L:lysosome, M:mitochondria



### P3内pH

*Clcn3*<sup>+/+</sup>;  $6.37 \pm 0.04$

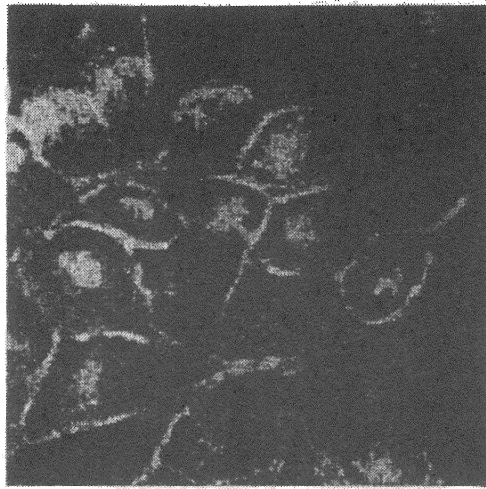
*Clcn3*<sup>-/-</sup>;  $6.76 \pm 0.09$

( $p < 0.01$ , unpaired t-test)

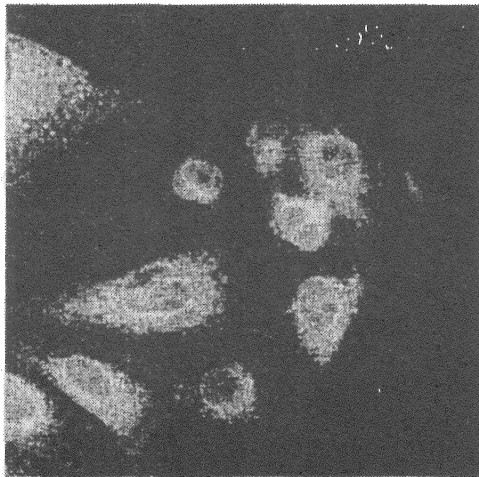
图 5 Intravesicular pH elevation in the CLC-3 KO mice



Wild-type



R8L



☒ 6 Intracellular localization of wild-type and R8L mutant barttin in MDCK cells.

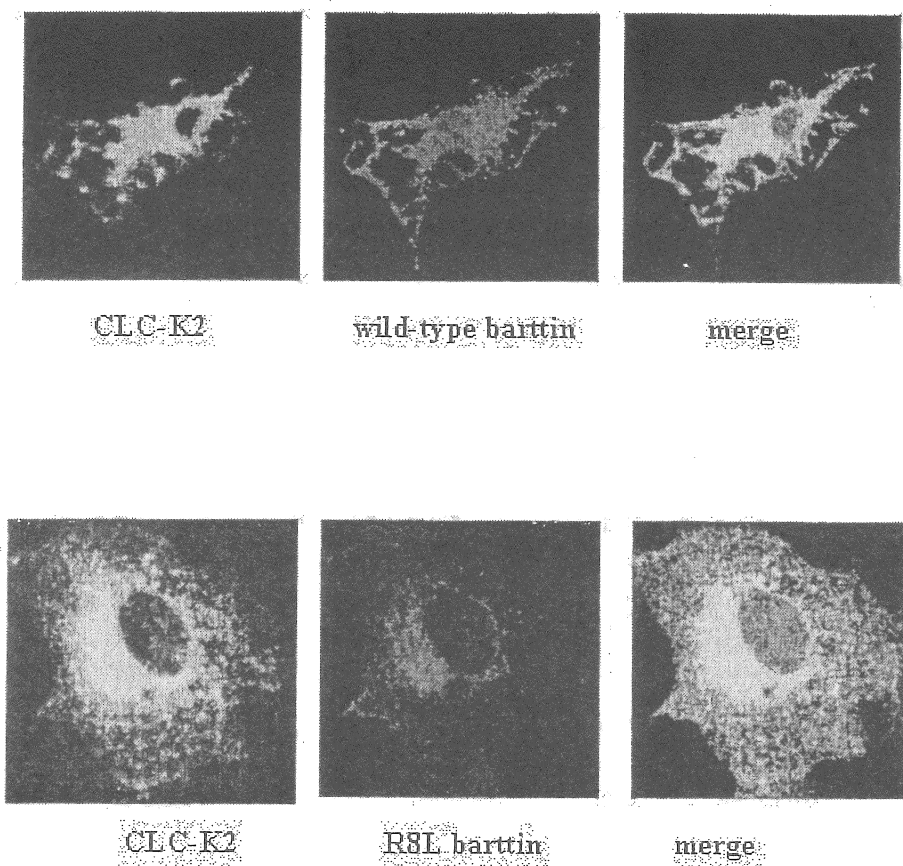
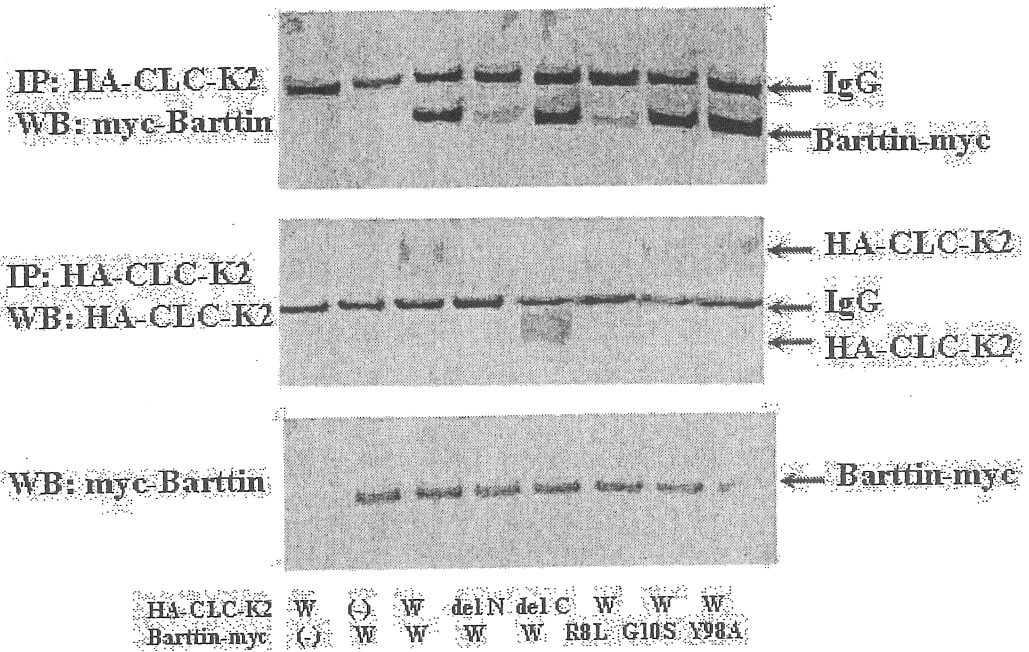
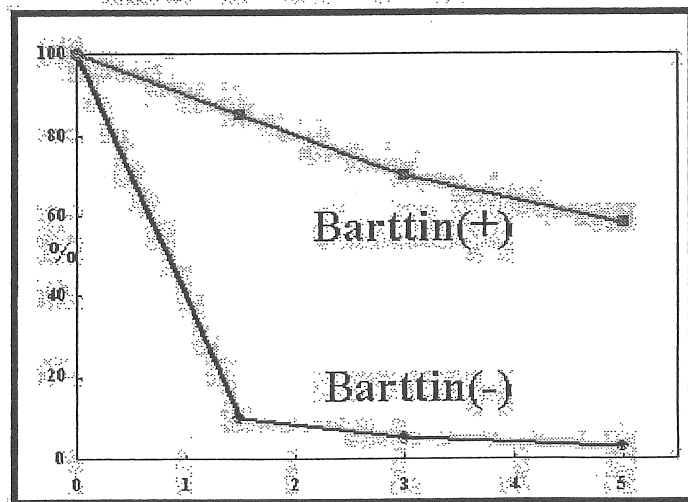
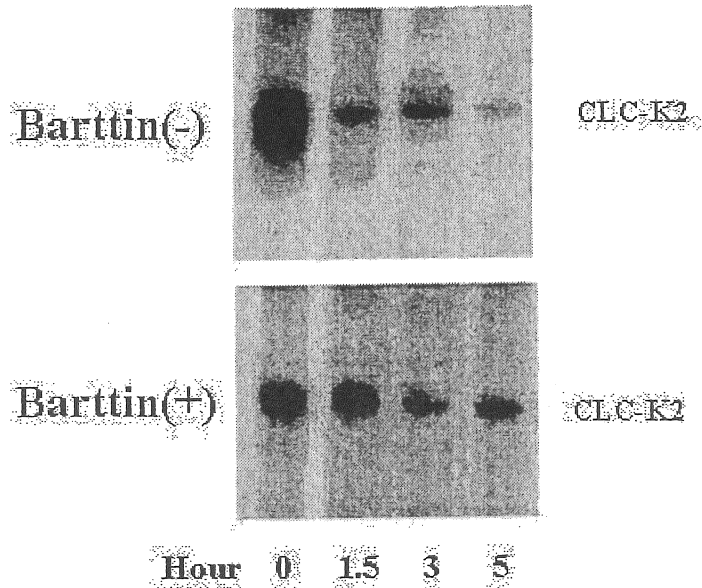


图 7 Intracellular localization of CLC-K2 co-expressed with wild-type or R8L mutant barttin in MDCK cells

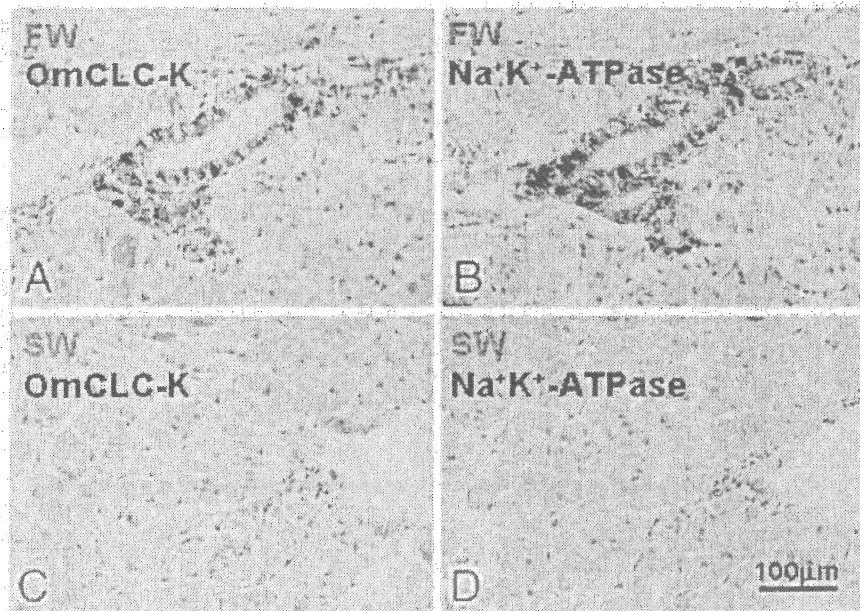


### Figure 8 Co-immunoprecipitation of CLC-K2 and Barttin

W: wild-type; delN: deletion of cytoplasmic amino terminus; delC: deletion of cytoplasmic carboxy terminus.



**Figure 9** CLC-K2 protein stability in the presence or absence of barttin



**图10** Immunolocalization of OmCLC-K in tilapia kidney.

OmCLC-K is co-localized with Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase and only observed under freshwater (FW) condition.

#### 4. 心・血管系におけるクロールの役割

助成研究者 顕原 嗣尚 (佐賀医科大学医学部生理学講座)  
共同研究者 山本 信太郎 ( 同 上 )  
 松林 太朗 ( 同 上 )

##### [要約]

1. 心筋細胞の  $\beta$ -アドレナリン受容体-cyclic AMP 依存性クロライドチャネル (心筋 CFTR Cl チャネル) が細胞の容量調節に関与しているか否かについて検討した。単離したモルモット心室筋細胞を標本とし、顕微ビデオ画像解析によって得られた細胞像の面積を細胞容積の指標とした。低  $[Cl^-]_o$ 、5.4 mM  $[K^+]_o$  の外液中で (膜電位 ( $V_m$ ) は Cl の平衡電位 ( $E_{Cl}$ ) より negative)、adrenaline は細胞面積を減少させた。逆に正常  $[Cl^-]_o$ 、高  $[K^+]_o$  の外液中では ( $V_m$  は  $E_{Cl}$  より positive)、adrenaline は細胞面積を増加させた。これらの結果は、外向き、または内向きの CFTR Cl 電流の誘発はそれぞれ細胞の膨化、または縮小を惹き起こすことを示す。心筋細胞において、CFTR Cl 電流の活性化は等浸透圧液中でも  $V_m$  と  $E_{Cl}$  に依存して細胞を膨化もしくは縮小させることがわかった。
2. CFTR Cl チャネルに依存しない細胞容積調節機構について解析を行った。等張高 KCl 液中で adrenaline を作用させると細胞容積が増大するが、その後外液を高 KCl 液から正常タイロイド液変えると細胞が縮小した。この細胞縮小に  $I_{Cl, swell}$  チャネルが関与していることが示唆された。細胞を低張タイロイド液に浸すと細胞は膨化するが、その後細胞が有意に縮小する (RVD) した。いっぽう、低張の高 KCl 液中では RVD は発生せず、著しい細胞膨化が起こった。これら RVD および高 KCl 低張液中での細胞膨化増強に  $I_{Cl, swell}$  チャネルが関与していることが示唆された。
3. 心筋細胞の CFTR Cl 電流 ( $I_{Cl, PKA}$ ) に及ぼす細胞外 ATP の効果を検討した。ATP は単独では  $I_{Cl, PKA}$  を活性化しなかったが、isoprenaline (Iso) によって  $I_{Cl, PKA}$  を活性化した後 ATP (50  $\mu$ M) を作用させると、ほぼ全実験例で  $I_{Cl, PKA}$  が増加した。そのうちの約 2/3 の例では増加の前に一過性に  $I_{Cl, PKA}$  が減少した。薬理学的実験から、ATP による初期の  $I_{Cl, PKA}$  抑制は P1-purinoceptor 刺激により、増強効果は P2-purinoceptor 刺激によると考えられた。Iso を連続投与中に ATP の添加と除去を行うと、除去後も  $I_{Cl, PKA}$  の増強は数分持続することが観察された。モルモット心室筋細胞において、ATP による P2-purinoceptor 刺激は  $\beta$ -adrenergic receptor 刺激による  $I_{Cl, PKA}$  活性化を促進し、この促進作用は ATP 除去後も数分持続することが示された。

## 1. はじめに

心筋細胞に存在する  $\beta$ -アドレナリン受容体-cyclic AMP 依存性クロライドチャンネル (心筋 CFTR Cl チャンネル) (1-4) は、上皮細胞の持つ CFTR と遺伝子的に相同の Cl チャンネルである。心室筋細胞に広範に発現しているこのチャンネルの生理的役割については未解決のままであったが、数年前にこのチャンネルが低張環境下において心筋細胞の調節性容量減少 (RVD) に関与している可能性が指摘された (5)。元来多くの細胞種において、さまざまな Cl チャンネルが細胞の容量調節に寄与していることはよく知られており、上記の提唱は大変興味深い。しかしながら、心筋の CFTR Cl チャンネルが実際に細胞の容量または細胞内浸透圧の調節に関与していることを証明するためには、さらに実験的検討を加える必要があった。とくに膜電位との関係や、調節性容量増加 (RVI) をも起こしうるのか、浸透圧刺激との関係等々、明らかにされなければならない点は数多い。

異浸透圧環境に暴露されやすい上皮細胞系において調節性細胞容量減少 (RVD) や調節性細胞容量増加 (RVI) に関与する Cl チャンネルが発達していることはよく知られている (6-9)。心筋組織においても低浸透圧による細胞膨化ないし膜伸展に反応する Cl チャンネルが同定されてきたが、それとは別に CFTR Cl チャンネルが存在するのである。心筋組織では虚血により細胞内が高浸透圧になることが知られており (6, 10, 11)、これによる細胞障害を防ぐための機構として CFTR Cl チャンネルが働いている可能性がある。すなわち、CFTR Cl チャンネルは細胞膨化や膜伸展などが実際に起こらなくても、細胞質内溶質の排泄を行い細胞障害につながる細胞内高浸透圧を是正する働きを持っている可能性がある。本研究では以上のような背景のもとに、まず①心筋における CFTR Cl チャンネル電流活性化による細胞容積調節または細胞内浸透圧調節の機構を詳細に検討した。

以上の研究の結果、CFTR Cl チャンネルが細胞容積調節に関与していることについて若干の知見を得ることができたが、これらの研究の中でもう一つ明らかになったことは、CFTR Cl チャンネルに依存しない細胞容積の変化も存在するということであった。すなわち、高 K 液により脱分極させた細胞で CFTR Cl チャンネルを活性化すると細胞が膨化するが、この膨化した細胞は、CFTR Cl チャンネルを不活性化した状態でも、膜電位と Cl イオンの平衡電位 ( $E_{Cl}$ ) の関係を逆転させると縮小することが観察された。心筋組織においても低浸透圧による細胞膨化ないし膜伸展に反応する Cl チャンネル ( $I_{Cl,swell}$  チャンネル) が同定されているが (6, 12)、 $I_{Cl,swell}$  チャンネルが実際に心筋の細胞容積調節に関与していることを実証した研究はない。そこでわれわれは次の研究として、②上に述べた CFTR Cl チャンネル非依存性の細胞容積変化に  $I_{Cl,swell}$  チャンネルが寄与しているという仮説をたて、それを検証する実験を行った。さらに、心筋細胞の容積調節に  $I_{Cl,swell}$

チャンネルが関与しているならば、このチャンネルは心筋においても RVD を起こしうるかについても検討を行った。

いっぽう、心筋 CFTR Cl チャンネルの調節については、 $\beta$ アドレナリン機構によって活性化されたチャンネル活動をいくつかの生理的物質 ( $\alpha$ -agonist, adenosine, acetylcholine) が抑制することが明らかにされてきたが、 $\beta$ アドレナリン機構以外にこのチャンネルを活性化する機構があるか否かについては十分明らかになっていない。細胞外 ATP はラット、マウスの心室筋 (13-15) やモルモット心房筋 (16) でクロライド電流 ( $I_{Cl,ATP}$ ) を活性化する。また、マウス心室筋で $\beta$ アドレナリン受容体刺激はそれ自体でクロライド電流を活性化することはないが、ATP によって活性化された  $I_{Cl,ATP}$  を増強することが報告されている (13)。モルモット心室筋では、 $\beta$ アドレナリン受容体刺激によって CFTR Cl 電流 ( $I_{Cl,PKA}$ ) が活性化されるが、ATP 単独投与がクロライド電流を誘発するという報告はない。ところが、PKC (ATP によって活性化される可能性がある) の activator はモルモット心室筋の  $I_{Cl,PKA}$  を増強するという (17)。また、同じ細胞 (18-21) やネコの心室筋 (22) で PKC activator が単独でクロライド電流 ( $I_{Cl,PKC}$ ) を誘発するという報告もある。これらの複雑な所見は、 $I_{Cl,PKA}$  と  $I_{Cl,ATP}$  さらには  $I_{Cl,PKC}$  は果たして異なるチャンネル分子基盤を反映しているのかどうかという問題を提起している。このように ATP ないし PKC と心筋クロライド電流との関係は複雑であるが、 $I_{Cl,PKA}$  に及ぼす細胞外 ATP の効果は知られていない。そこで今回、③モルモット心室筋の  $I_{Cl,PKA}$  に対する細胞外 ATP の効果について検討した。

## 2. 研究方法

collagenase 処理により得られたモルモット単離心室筋細胞を標本とした。細胞容積変化の情報を得るため、倒立顕微鏡に高解像度 CCD カメラを取り付け細胞イメージのビデオ記録を行った。ビデオ記録をコンピュータに取り込み、新しい画像処理ソフトウェアによって細胞輪郭内面積を測定した。膜電流測定実験では whole-cell patch clamp を行った。保持電位を  $-40$  mV とし、 $\pm 80$  mV のランプ波 ( $dV/dt = \pm 1$  V/s) を 5 s 毎に印加して応答する膜電流を測定した。膜 conductance は  $I_{Cl,PKA}$  の逆転電位近傍で測定した。細胞外液、細胞内液 (ピペット内液) とともに、クロライド電流などの背景電流のみが記録できるものを用いた。すなわち、適当な inhibitor とイオン組成を用いて K 電流や Ca 電流は発生しないようにしたものである。実験温度、 $36.0 \pm 0.5$  °C。

## 3. 研究結果

### 3. 1. CFTR Cl チャンネルによる細胞容積調節

#### 3. 1. 1. さまざまな外液 K 濃度下における adrenaline の効果



今回のビデオ画像処理による細胞面積測定法は、異浸透圧刺激時の細胞容積変化の観測に有用であることを確かめた後、さまざまな K 濃度をもつ等張外液中における adrenaline の効果を調べた。Fig. 1 に等張高 K 液 (145.4 mM-K) 中での、adrenaline による細胞面積変化を示す。高 K 液自体は細胞面積に影響を与えなかったが、adrenaline は明らかな面積増加をもたらした。これは、次のような仮説で説明できる。高 K 液中では Cl<sup>-</sup> イオンの平衡電位 ( $E_{Cl}$ , おおよそ -40 mV) は膜電位より negative である。したがって、adrenaline によって活性化された CFTR Cl<sup>-</sup> 電流は外向きに流れる (Cl<sup>-</sup> イオンそのものは内向きに流れる)。外向きの Cl<sup>-</sup> 電流は膜をわずかでも過分極し、それにともない内向き整流 K チャネルを通る内向き K 電流が生じる。すなわち K と Cl<sup>-</sup> が同時に内向きに流れるので (KCl が細胞内に入るの) それとともに水も不可避的に細胞内に入り、細胞容積が増すことになる。なお、高 K 液中で adrenaline によって増大した細胞面積は、高 K 液を正常 K 液 (正常タイロイド液) にもどすもとのレベルにもどることが観察された (Fig. 1A)。この結果は予期しなかったもので、あとでさらに解析する。

上記の仮説をさらに検討するために、さまざまな K 濃度をもつ等張の外液中における adrenaline の効果を調べた。Fig. 2A に示すように、adrenaline は K 濃度が 25 mM 以上では細胞面積を増大し、25 mM 以下では逆にそれを減少する傾向がみられた。25 mM K での膜電位はおおよそ -45 mV であり (Fig. 2B)、この値は期待される Cl<sup>-</sup> イオンの平衡 (逆転) 電位に近い。すなわち、Cl<sup>-</sup> イオンが外向きに流れるときは細胞は縮小し、内向きに流れるときは細胞は膨張すると考えられる。Fig. 2C には、5.4 mM K 液中での adrenaline による膜電位変化を示す。5<sup>例</sup>平均で 1.0 mV の脱分極が観察されたが、これは内向き Cl<sup>-</sup> 電流によってもたらされたものであると考えられる。

高 K 液中でも Cl<sup>-</sup> イオンの平衡電位が膜電位より positive であれば、adrenaline は内向きの Cl<sup>-</sup> 電流を生じ (Cl<sup>-</sup> イオンそのものは外向きに流れる)、これは細胞を縮小させるであろう。実際、高 K 液中で adrenaline の作用により細胞が膨張している途中で外液 Cl<sup>-</sup> 濃度を 146.4 mM から 6.4 mM に減ざると、細胞膨張は縮小に転じた (データは示さず)。また、Cl<sup>-</sup> イオンの流れにとまなう K<sup>+</sup> イオンの流れも細胞容積変化の発生をもたらす重要な要素であると考えられるが、実際、高 K 液中で adrenaline の作用により細胞が膨張している途中で K<sup>+</sup> チャネルブロッカーである Ba (1 mM) を作用させると、明らかに細胞容積増加の速度が減少した (データは示さず)。

### 3. 1. 2. adrenaline 依存性細胞容積変化の薬理的性質

これまでみてきた adrenaline 依存性細胞容積変化は、β- アドレナリン受容体-cyclic AMP 系を抑制する acetylcholine、および CFTR Cl<sup>-</sup> チャネルの

非特異的ブロッカーである glibenclamide によって抑制された（データは示さず）。これらの結果は細胞容積変化に CFTR Cl チャネルが関わっていることを支持する。いっぽう、容積（膜伸展）感受性 Cl チャネルのブロッカーである DIDS は adrenaline による細胞容積変化に影響を与えなかった（データは示さず）。

### 3. 2. $I_{Cl,swell}$ チャネルによる細胞容積調節

#### 3. 2. 1. CFTR Cl チャネル非依存性の細胞容積変化

等張高 KCl 液 (145.4 mM-K) 中で adrenaline を作用させると細胞容積が増大し、その後 adrenaline を除去しても細胞面積は減少しないが、外液を高 KCl 液から正常タイロイド液に変えると細胞が縮小することはすでに示した (Fig. 1)。高 KCl 液を高 NMDG-Cl 液 (KCl を NMDG-Cl に置換したもの) や高 K-aspartate 液 (高 KCl 液中の KCl を K-aspartate に置換したもの) に変えても結果は同じであった (Fig. 3)。すなわち、この細胞縮小は Na 非依存性であり、 $E_{Cl}$  が膜電位より positive になったときに起こることがわかった。この結果は細胞縮小に CFTR Cl チャネルでない Cl チャネル、おそらく  $I_{Cl,swell}$  チャネルが関与していることを示唆する。そこでこの現象に対する  $I_{Cl,swell}$  チャネルのブロッカーの効果を検討した。Fig. 4 に示すように、 $I_{Cl,swell}$  チャネルのブロッカーである furosemide (2 mM) と glibenclamide (0.2 mM) は細胞縮小を有意に抑制した。DIDS (2 mM) も同様の効果を示した（データは示さず）。これらのことから、膨化した細胞に見られた CFTR Cl チャネル非依存性の細胞縮小に  $I_{Cl,swell}$  チャネルが関与していること強く示唆された。

#### 3. 2. 2. RVD の検討

心筋細胞容積調節に  $I_{Cl,swell}$  チャネルが関与していることが示されたので、はたして心筋細胞にも他の上皮細胞に見られるような RVD が発生するのかどうかを検討した。細胞を 70%低張液に浸すと細胞は膨化する。膨化した後の細胞面積の変化を精密に測ってみると、低張液中において細胞が有意に縮小することが観察された (Fig. 5)。この RVD に  $I_{Cl,swell}$  チャネルが関与しているならば、RVD の程度は膜電位や  $E_{Cl}$  に依存するはずである。そこで、RVD 発生中に外液の Cl 濃度を低下させてみると、RVD の増強が起こることが観察された (Fig. 6)。すなわち、低 Cl 液による Cl イオンの外向き駆動力の増強が  $I_{Cl,swell}$  チャネル電流を増加させ、その結果細胞縮小が強化されたと解釈される。

それでは膜電位と  $E_{Cl}$  の関係を逆転させたらどうなるかを検討したのが Fig. 7 に示す実験である。細胞を高 KCl 液に浸し、次に高 KCl 液を低張の高 KCl 液に変えると、著しい細胞の膨化が起こった。このとき RVD はけっしてみられず、むしろ細胞膨化の程度は正常 K 濃度の液中で記録されたもの (Fig. 5) よりは

るかに大きかった。すなわち、細胞膨化は  $I_{Cl,swell}$  チャネルを活性化するが、膜電位が  $E_{Cl}$  より positive である条件では  $I_{Cl,swell}$  チャネル電流は RVD とは逆の細胞膨化増強を引き起こしたと解釈される。

以上述べてきた RVD および高 KCl 低張液中での細胞膨化増強はともに  $I_{Cl,swell}$  チャネルのブロッカー (DIDS, furosemide, glibenclamide) によって有意に抑制された (データは示さず)。この結果は上記の現象に  $I_{Cl,swell}$  チャネルが関与していることを支持するものである。

### 3. 3. CFTR Cl 電流 ( $I_{Cl,PKA}$ ) に対する細胞外 ATP の効果

#### 3. 3. 1. $I_{Cl,PKA}$ に対する ATP の効果の特性と ATP 受容体について

細胞外 ATP は用いた多くの細胞で  $I_{Cl,PKA}$  に対して 2 相性の効果を及ぼすことが見出された。Fig. 8A に示すように、isoprenaline によって  $I_{Cl,PKA}$  を活性化した後 ATP を加えると、 $I_{Cl,PKA}$  ははじめ減少しつづいて増大した。Isoprenaline 0.01  $\mu$ M 以上、ATP 1  $\mu$ M 以上を使った実験で、約 2/3 の細胞でこのような 2 相性の効果が観察され、残りの細胞では初期の電流抑制は明らかでなかった (Fig. 8C)。電流増大はおおよそ 1 分でピークに達するものであった。ATP の効果のもう一つの特徴は、Fig. 8C に示すように isoprenaline 存在下に ATP を除くと、増大した電流の回復が遅いことである。このような aftereffect は少なくとも 3 分以上続くものであった。

ATP の関与しうる purinergic receptor には P1 type と P2 type があるが、どちらの type が上記の反応に関わっているかを検討するため、いくつかの adenosine 誘導体の効果を調べた。Fig. 9 に示すように、adenosine と AMP は  $I_{Cl,PKA}$  を抑制するのみであったが、ADP の効果は ATP の効果と同様であった。このことは、ATP を含めた adenosine 誘導体の  $I_{Cl,PKA}$  抑制効果には P1-purinoceptor が関与していることを示唆する。そこで、P1-purinoceptor の blocker (theophylline, DPCPX) を用いた実験を行った。0.2 mM theophylline 存在下では ATP による  $I_{Cl,PKA}$  の初期の抑制はけっして観察されず、また adenosine および AMP による電流抑制も消失した (データは示さず)。DPCPX (10  $\mu$ M) 存在下でも同様であった。このことは、電流抑制に P1-purinoceptor が関与しているという考えを支持する。ATP と ADP による電流増強には P2-purinoceptor の関与が考えられる。なお、非水解性 ATP analogue である ATP $\gamma$ S の  $I_{Cl,PKA}$  に対する効果は、ATP のそれと同様であった。

Forskolin は  $\beta$ -adrenoceptor を介さずに直接 adenylylase を活性化して  $\beta$ -agonist 様の作用を発揮する薬物である。ATP は forskolin によって誘発された  $I_{Cl,PKA}$  に対しても、isoprenaline 誘発  $I_{Cl,PKA}$  に対する効果と同様の効果を示した (データは示さず)。したがって、ATP の  $I_{Cl,PKA}$  に対する修飾作用は  $\beta$ -adrenoceptor レベルで起こっているのではない。

### 3. 3. 2. 用量作用曲線について

次に、ATP (50  $\mu\text{M}$ ) の  $I_{\text{Cl, PKA}}$  に対する増強効果をさまざまな isoprenaline 濃度のもとで調べた。多数例の結果をまとめたのが Fig. 10A である。ATP は  $I_{\text{Cl, PKA}}$  活性化における isoprenaline の  $\text{EC}_{50}$  を変えずに、isoprenaline 各濃度において  $I_{\text{Cl, PKA}}$  を約 1.3 倍にすることがわかった。ただしこの解析は ATP による初期の電流抑制を考慮せずに行ったので、真の増強効果は 1.3 倍より大きい可能性がある。さらに、 $I_{\text{Cl, PKA}}$  に対する増強効果における ATP の用量作用関係を一定 isoprenaline 濃度 (0.1  $\mu\text{M}$ ) のもとで調べた。Fig. 10B に示すグラフは多数例の結果をまとめたものである。データのばらつきが大きい、Hill の式にあてはめると  $I_{\text{Cl, PKA}}$  に対する増強効果における ATP の  $\text{EC}_{50}$  は約 1  $\mu\text{M}$  であった。

### 3. 3. 3. ATP 効果の遷延性

isoprenaline 存在下において、ATP によって増大した  $I_{\text{Cl, PKA}}$  の回復は ATP を除去しても遅いことはすでに示した (Fig. 8C)。この点について若干の検討を加えた。Fig. 11A に示す例では、isoprenaline によって活性化された  $I_{\text{Cl, PKA}}$  に対して最初の ATP 投与は抑制作用を示しており、続いて弱いながらも増強作用が現れている。さらに isoprenaline 存在下に ATP を除去すると  $I_{\text{Cl, PKA}}$  が増大しており、その増大した電流のレベルは最初の isoprenaline 単独作用時のものより大きい。さらに再度 ATP を作用させると今度は電流の抑制のみが生じている。このような  $I_{\text{Cl, PKA}}$  の変化が 3 回の同様な実験で観察された。この所見は、ATP の  $I_{\text{Cl, PKA}}$  に対する抑制効果は ATP 除去後速やかに消褪するが、増強効果は Fig. 8C で見たように ATP 除去後も遷延することを示唆している。ATP による電流抑制効果が比較的強く出現する細胞では、Fig. 11A に示すような現象が観察されると考えられる。

このような ATP の  $I_{\text{Cl, PKA}}$  に対する効果は  $\beta$  受容体刺激依存性のものであろうか、それとも独立して  $I_{\text{Cl, PKA}}/I_{\text{Cl, PKA}}$  調節系に何らかの作用をもたらしているのであろうか。そこで、ATP の  $I_{\text{Cl, PKA}}$  増強効果は ATP 除去後も遷延することと関連させて、ATP (単独) の前処置の効果について検討した。Fig. 11B に示す実験では、まず ATP のみを 1.5 分間作用させ、ATP を除去して 3 分後に isoprenaline を投与し、さらに ATP を作用させている。図に見られるように、2 番目の ATP 投与は  $I_{\text{Cl, PKA}}$  をほとんど増強しなかった。Fig. 11D は多数例の結果をまとめて、前処置なしの実験結果と比較したものである。ATP 前処置をするとその後 ATP の  $I_{\text{Cl, PKA}}$  増強効果が消失しているが、これは、次のような仮説で説明できる。①前処置により  $I_{\text{Cl, PKA}}/I_{\text{Cl, PKA}}$  調節系に何らかの変化が起こり、その変化は ATP 除去後も数分間は持続する。②その変化は  $\beta$  受容体刺激がない限り潜在性のものであるが、③  $\beta$  受容体刺激があると顕在化して  $I_{\text{Cl, PKA}}$  を増強するように働く。この仮説が正しければ、Fig. 11B の実験で isoprenaline 単独投与時に活性化された  $I_{\text{Cl, PKA}}$  はす

に ATP の増強作用を受けつつ発生したもので、したがって 2 番目の ATP 投与では電流増強が現れなかったと解釈される。

#### 4. 考察

##### 4. 1. CFTR Cl チャネルによる細胞容積調節

心筋細胞において、CFTR Cl 電流の活性化は等浸透圧液中でも膜電位と  $E_{Cl}$  に依存して細胞を膨化もしくは縮小させることがわかった。生理的条件下では  $E_{Cl}$  が膜電位もしくは K イオンの平衡電位 ( $E_K$ ) より negative になることはおそくないので、CFTR Cl 電流の活性化による細胞膨化の生理的意義をみつけることは難しい。他方、低 K 液中で発現する細胞縮小機構は病態生理学的に重要であろう。心筋虚血の際に心筋細胞の膨化が起こり (6, 10, 11)、この膨化がさらに冠循環を障害する (23) ことが知られているが、CFTR Cl 電流の活性化は細胞を縮小させることにより虚血心筋に保護的にはたらく可能性がある。

心筋 CFTR Cl チャネルが、Cl イオンを通すことにより細胞の容積調節に関与しうることが示されたが、もしこのチャネルが他の有機陰イオン (lactate その他) をも通すことができれば、さらに虚血心筋に対する保護効果が高まることになる。なぜなら、心筋虚血時にさまざまな有機陰イオンが細胞内に蓄積することが知られているからである (24)。このことをふまえながら CFTR Cl チャネルの有機イオン透過性について系統的に調べる必要がある。

##### 4. 2. $I_{Cl,swell}$ チャネルによる細胞容積調節

心筋細胞において、 $I_{Cl,swell}$  チャネルが細胞容積調節関連イオンチャネルとして作動しうること、心筋細胞にも RVD が起こること、条件によっては  $I_{Cl,swell}$  チャネルは細胞膨化の方向にも働きうることが示された。従来、膨化した心筋細胞で  $I_{Cl,swell}$  チャネル電流が発生することは多くの研究で証明されてきた。しかしながら、 $I_{Cl,swell}$  チャネル電流の活性化が実際に細胞の容積をどう変化させるかを研究した報告はない。われわれの研究結果は  $I_{Cl,swell}$  チャネルの作動により実際に細胞容積変化が起こることを実証したものであると考える。

心筋細胞も多くの上皮細胞と同じく RVD を起こしうことは病態生理学的に重要であろう。4. 1 でも述べたごとく、心筋虚血の際に心筋細胞の膨化が起こり、この膨化がさらに冠循環を障害するが、 $I_{Cl,swell}$  チャネルの活性化による細胞縮小 (RVD) は虚血心筋に保護的にはたらく可能性がある。CFTR Cl チャネル電流も細胞縮小を起こしうるが、この場合は  $\beta$ -adrenergic agonist の作動が必要である。実際の心筋では状況に応じて  $I_{Cl,swell}$  チャネルと CFTR Cl チャネルとが協調的に細胞容積調節に働いている可能性がある。心筋細胞ではこの他種々の transporter 分子も細胞容積調節に関与していると考えられており、今後 Cl チャネルも含めてこれら分子の役割とその作動条件を specify していくことが

心筋細胞の容積調節の全体像を明らかにすることに繋がるであろう。

心筋  $I_{Cl,swell}$  チャネルと CFTR Cl チャネルの両者が、Cl イオンを通すことにより細胞の容積調節に関与しうることが示されてきたが、4. 1. でも述べたように、もしこれらのチャネルが他の有機陰イオンをも通すことができれば、さらに虚血心筋に対する保護効果が高まることになる。このことをふまえながら  $I_{Cl,swell}$  チャネルや CFTR Cl チャネルの有機イオン透過性について系統的に調べる必要がある。

心筋において whole cell レベルでの  $I_{Cl,swell}$  チャネル電流を記録した報告は多いが、その単一チャネル電流はまだ記録されていない。今後ぜひ単一チャネル記録を成功させるべきである。そして単一チャネルレベルでの  $I_{Cl,swell}$  の特性を明らかにし、他のクロライドチャネルと比較しつつその生理学的意義を論ずる必要がある。

#### 4. 3. CFTR Cl 電流 ( $I_{Cl,PKA}$ ) に対する細胞外 ATP の効果

モルモット心室筋細胞において、 $\mu\text{M}$  レベルの ATP はそれ自身  $I_{Cl,ATP}$  を誘発することはないが、 $I_{Cl,PKA}$  を増強することが明らかになった。ATP は交感神経終末から catecholamine とともに共放出される伝達物質であり、心筋において交感神経興奮時に catecholamine と ATP が協調して  $I_{Cl,PKA}$  を活性化している可能性がある。あるいは、autocrine 的に心筋組織から放出されたもしくは漏出した ATP が  $I_{Cl,PKA}$  の修飾に関与している可能性もある。

マウスやラットの心室筋細胞には  $I_{Cl,ATP}$  がある。この組織では  $\beta$ -agonist はそれ自身  $I_{Cl}$  を誘発することはないが、ATP によって活性化された  $I_{Cl,ATP}$  を増強するという (13)。 $\beta$ -adrenoceptor と P2-purinoceptor による  $I_{Cl}$  の調節の仕方がモルモットとネズミとでは逆ということになる。 $I_{Cl,PKA}$  と  $I_{Cl,ATP}$  とは同じ分子基盤を反映しており、動物種または組織種によってその制御機構が異なっているという可能性があるが、この点は今後の重要な検討課題である。

ATP がどのようなメカニズムで  $I_{Cl,PKA}$  を修飾するのか、抑制と増強の両面について明らかにされねばならない。モルモット心室筋細胞で PKC の activator である PDBu などが  $I_{Cl,PKA}$  を増強するという報告がある (17)。今回の ATP 作用が PKC 活性化と関連しているか否かについてはぜひとも検討したいところである。実際、P2-purinoceptor 刺激が PKC を活性化するという事は、心筋以外のいくつかの組織標本で報告されている。今後、ATP と PDBu など、あるいは PKC の inhibitor を併用した実験が有力な手段となろう。

ATP の効果の特徴は、ATP の  $I_{Cl,PKA}$  増強効果は ATP 除去後も遷延する、そして ATP 前処置によっても  $I_{Cl,PKA}$  増強効果が潜在的に発生する、ことなどであった。これは何を意味するのであろうか。P2-purinoceptor 刺激によって活性化された細胞内 second messenger が長く残存するせいであらうか。あるいはチャネルも

もしくはその関連要素に構造的変化 ( $\beta$ 受容体刺激による  $I_{Cl, PKA}$  活性化がなければその働きが顕在化しない) が起こるせいであろうか。今後これらの点についてぜひ検討していきたいと考えている。

## 5. 謝辞

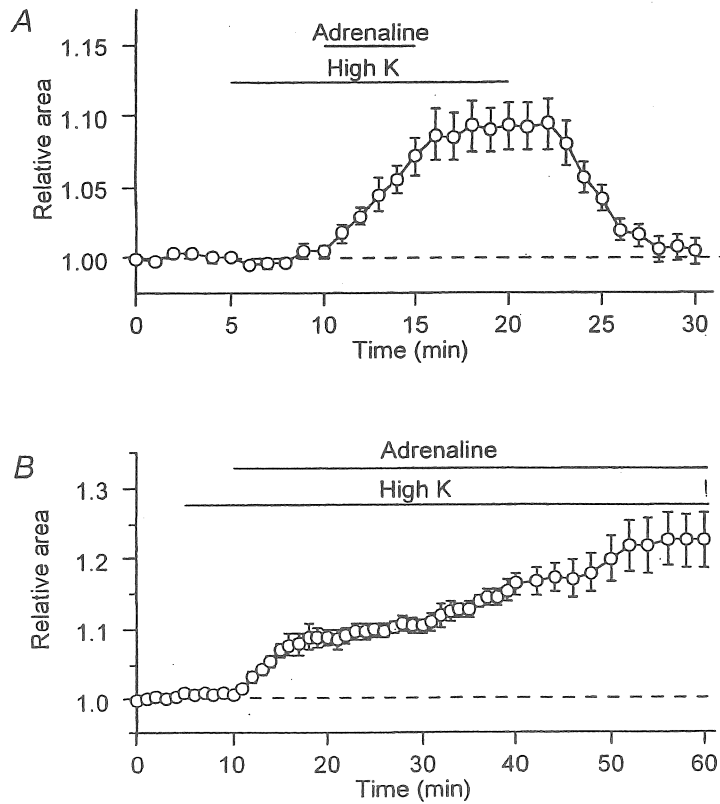
このプロジェクト研究遂行に多大の支援をいただいたソルト・サイエンス研究財団に深甚の謝意を表します。研究の一部は文部科学省科学研究費補助金の助成を受けた。

## 参考文献

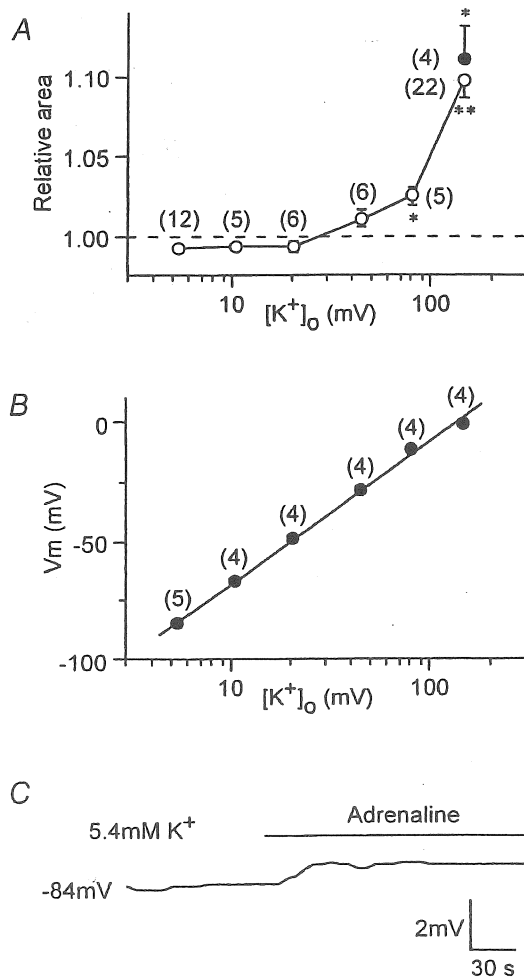
1. Egan TM, Noble D, Noble SJ, Powell T, Twist VW, Yamaoka K. On the mechanism of isoprenaline- and forskolin-induced depolarization of single guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 1988;400: 299-320.
2. Bahinski A, Nairn AC, Greengard P, Gadsby DC. Chloride conductance regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase in cardiac myocytes. *Nature* 1989;340: 718-721.
3. Harvey RD, Hume JR. Autonomic regulation of a chloride current in heart. *Science* 1989;244: 983-985.
4. Matsuoka S, Ehara T, Noma A. Chloride-sensitive nature of the adrenaline-induced current in guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol* 1990;425: 579-598.
5. Wang Z, Mitsuiye T, Rees SA, Noma A. Regulatory volume decrease of cardiac myocytes induced by  $\beta$ -adrenergic activation of the  $Cl^-$  channel in guinea pig. *J Gen Physiol* 1997;110: 73-82.
6. Vandenberg JJ, Rees SA, Wright AR, Powell T. Cell swelling and ion transport pathways in cardiac myocytes. *Cardiovas Res* 1996;32: 85-97.
7. Strange K, Emma F, Jackson PS. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am J Physiol* 1996;270: C711-730.
8. Wright AR, Rees SA. Cardiac cell volume: crystal clear or murky waters? A comparison with other cell types. *Pharmacol Therap* 1998;80: 89-121.
9. Okada Y. Volume expansion sensing outward-rectifier  $Cl^-$  channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol* 1997; 273: C755-789.
10. Macknight AD, Leaf A. Regulation of cellular volume. *Physiol Rev* 1977; 57: 510-573.
11. Trantum-Jensen J, Janse MJ, Fiolet WT, Krieger WJ, D'Alnoncourt CN,

- Durrer D. Tissue osmolality, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart. *Circ Res* 1981;49: 364-381.
12. Sorota S. Insights into the structure, distribution and function of the cardiac chloride channels. *Cardiovas Res* 1999;42: 361-376.
  13. Duan D, Ye L, Britton F, Miller LJ, Yamazaki J, Horowitz B, Hume JR. Purinoceptor-coupled  $\text{Cl}^-$  channels in mouse heart: a novel, alternative pathway for CFTR regulation. *J Physiol* 1999;521: 43-56.
  14. Kaneda M, Fukui K, and Doi K. Chloride conductance regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase in cardiac myocytes. *Brit J Pharmacol* 1994;111: 1355-1360.
  15. Levesque PC, Hume JR. ATP, but not  $\text{cAMP}_i$ , activates a chloride conductance in mouse ventricular myocytes. *Cardiovas Res* 1995;29: 336-343.
  16. Matsuura H, Ehara T. Activation of chloride current by purinergic stimulation in guinea-pig heart cells. *Circ Res* 1992;70: 851-855.
  17. Middleton LM, Harvey RD. PKC regulation of cardiac CFTR  $\text{Cl}^-$  channel function in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1998;275: C293-302.
  18. Collier ML, Hume JR. Unitary chloride channels activated by protein kinase C in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 1995;76: 317-324.
  19. Shuba LM, Asai T, McDonald TF. Phorbol ester activation of chloride current in guinea-pig ventricular myocytes. *Brit J Pharmacol* 1996;117: 1395-1404.
  20. Walsh KB. Activation of a heart chloride current during stimulation of protein kinase C. *Mol Pharmacol* 1991;40: 342-346.
  21. Walsh KB, Long KJ. Properties of a protein kinase C-activated chloride current in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 1994; 74: 121-129.
  22. Zhang K, Barrington PL, Martin RL, Ten Eick RE. Protein kinase-dependent  $\text{Cl}^-$  currents in feline ventricular myocytes. *Circ Res* 1994;75: 133-143.
  23. Vogel WM, Cerel AW, Apstein CS. Post-ischemic cardiac chamber stiffness and coronary vasomotion: the role of edema and effects of dextran. *J Mol Cell Cardiol* 1986;18: 1207-1218.
  24. Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen CJr, Reimer KA. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circ Res* 1985;56: 262-278.



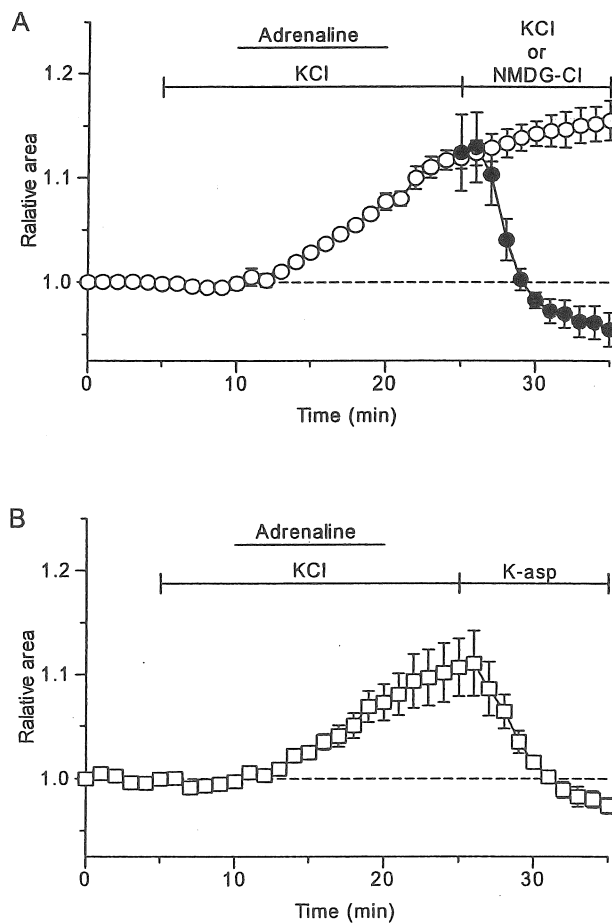


**Figure 1. Cell swelling induced by adrenaline in isosmotic high-K solution.** The bathing solution was initially normal Tyrode solution and switched to the solution with 145.4 mM K (lower bar), and adrenaline (5.5  $\mu$ M) was applied for the period indicated by upper bar. Each point represents mean  $\pm$  S.E.M. (n=9 in A; n=6 in B). In A, adrenaline was applied for a brief period. The cell area obtained 5 min after application of adrenaline was significantly ( $p < 0.05$ ) greater than that obtained before adrenaline. In B, application of high-K solution and adrenaline was prolonged.

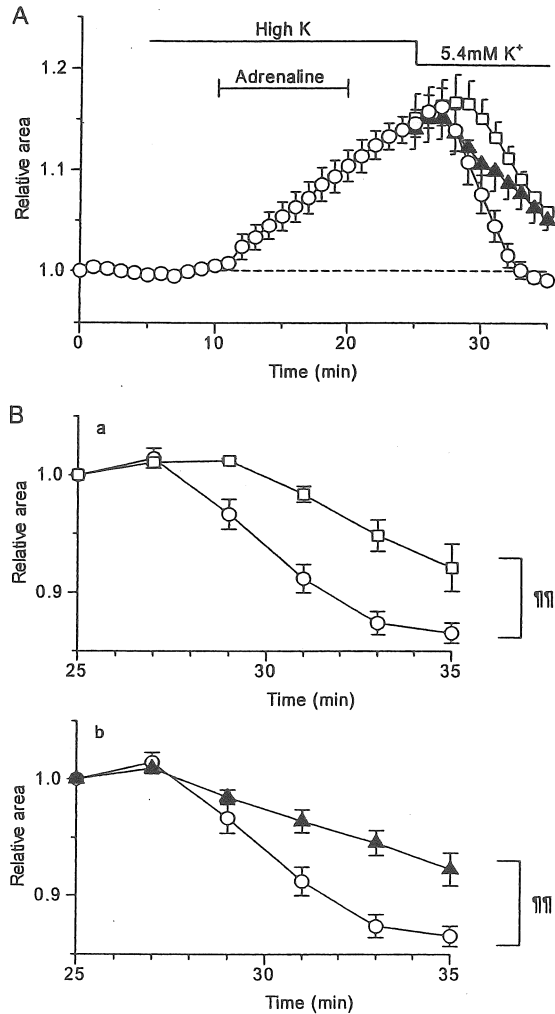


**Figure 2.** Effects of adrenaline on area of cell image and membrane potential at various K concentrations.

A, area of cell image as a function of  $[K^+]_o$  in a logarithmic scale. The cell area obtained in the presence of 5.5  $\mu$ M adrenaline is expressed as relative to that obtained before adrenaline at each  $[K^+]_o$  (open circles). Each point represents mean  $\pm$  S.E.M. Number in parenthesis is the number of the experiments. The data obtained with forskolin cocktail (5  $\mu$ M forskolin + 2 mM IBMX) is also shown (closed circle). \* and \*\*, significantly greater than control with  $p < 0.02$  and  $p < 0.001$ , respectively. B, membrane potential ( $V_m$ ) as a function of  $[K^+]_o$  in a logarithmic scale. Each point represents mean of 4-5 measurements made in the absence of adrenaline. S.E.M. values are within the symbols for all points. The linear line was fitted to the data according to regression analysis with least-squares method, and was described as  $V_m = 60.5 \cdot \log([K^+]_o/[K^+]_i)$  mV with a theoretical  $[K^+]_i$  of 149 mM. C, effect of adrenaline on the membrane potential of ventricular cell in isosmotic solution containing 145.4 mM  $K^+$ . Membrane potential was measured with gramicidin-perforated patch-clamp method. Adrenaline (5.5  $\mu$ M) was applied for the period indicated by bar.



**Fig. 3.** Time course of the cell shrinkage observed when the cells inflated by adrenaline in high-KCl solution were bathed in NMDG-Cl (A) or K-aspartate solution (B). The cells were initially bathed in high-KCl solution, and adrenaline ( $5.5 \mu\text{M}$ ) was applied to them for 5 min, which resulted in swelling of the cells, and adrenaline was washed for 5 min thereafter. Then the perfusion with high-KCl solution was continued (open circles in A;  $n=5$ ) or the cells were exposed to NMDG-Cl (closed circles in A;  $n=5$ ) or K-aspartate solution (K-asp; squares in B;  $n=4$ ). Each point represents mean  $\pm$  SEM. The data of the NMDG-Cl group obtained before NMDG exposure are not shown for clarity.



**Fig. 4.** Effects of furosemide or glibenclamide on the time course of the cell shrinkage observed when the cells inflated by adrenaline in high-K solution were bathed in Tyrode solution (5.4 mM K).

As shown in A, the cells were initially bathed in high-KCl solution, and adrenaline (5.5  $\mu$ M) was applied to them for 5 min, which resulted in swelling of the cells, and adrenaline was washed for 5 min thereafter. Then three types of experiments were made. One group of the cells (open circles,  $n=4$ ) was exposed to normal Tyrode solution for control. The second group (triangles,  $n=5$ ) and the third one (squares,  $n=5$ ) were exposed to normal Tyrode solution containing furosemide (2 mM) or glibenclamide (0.2 mM), respectively. Each point represents mean  $\pm$  SEM. In A, the data for the furosemide and glibenclamide groups obtained during exposure to high-K solution are not shown for clarity. B-a and B-b, respectively, show an expanded illustration of the time course of cell shrinkage with furosemide or glibenclamide, supplemented with a control curve (open circles). The values are expressed as relative to those at 25 min in A, at which the bathing solution was changed. A comparison of curves with repeated measures ANOVA yielded  $p < 0.01$  (¶¶).

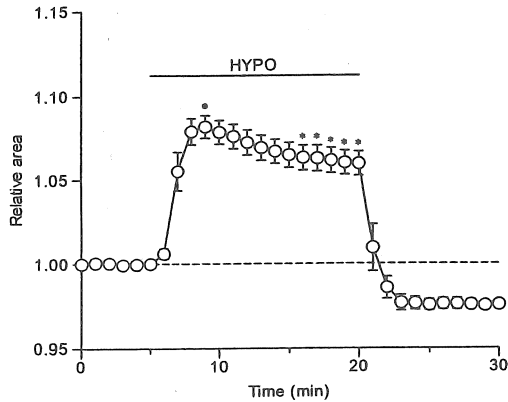


Figure 5. Cell swelling followed by a spontaneous cell shrinkage (regulatory volume decrease, RVD) observed during application of hyposmotic solution. Hyposmotic solution (70% of control) was applied during the period indicated by bar. Each point represents mean  $\pm$  SEM (n=7). \*: significantly smaller than the cell area at the maximum cell swelling (denoted by dot) with  $p < 0.01$ .

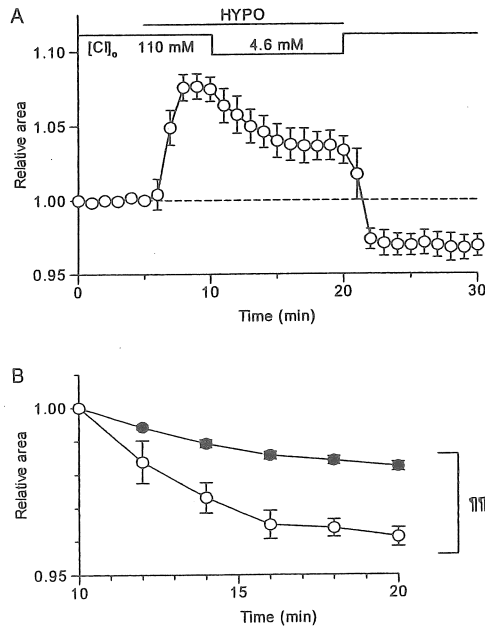
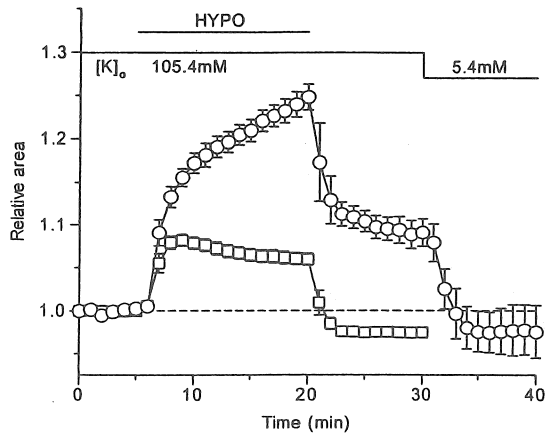
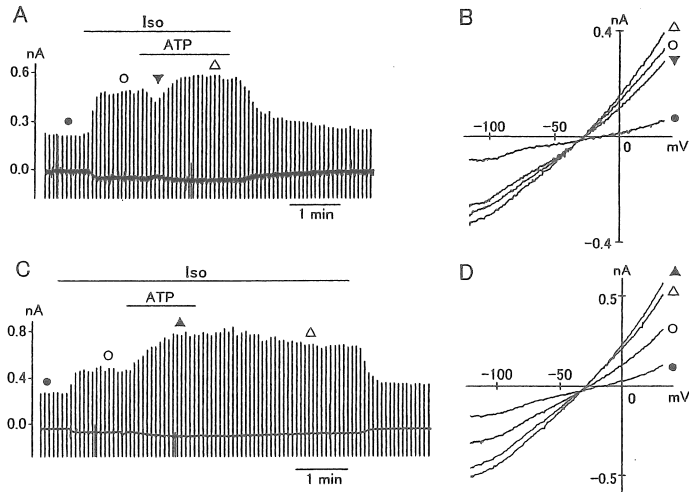


Figure 6. Enhancement of RVD in low-Cl solution.

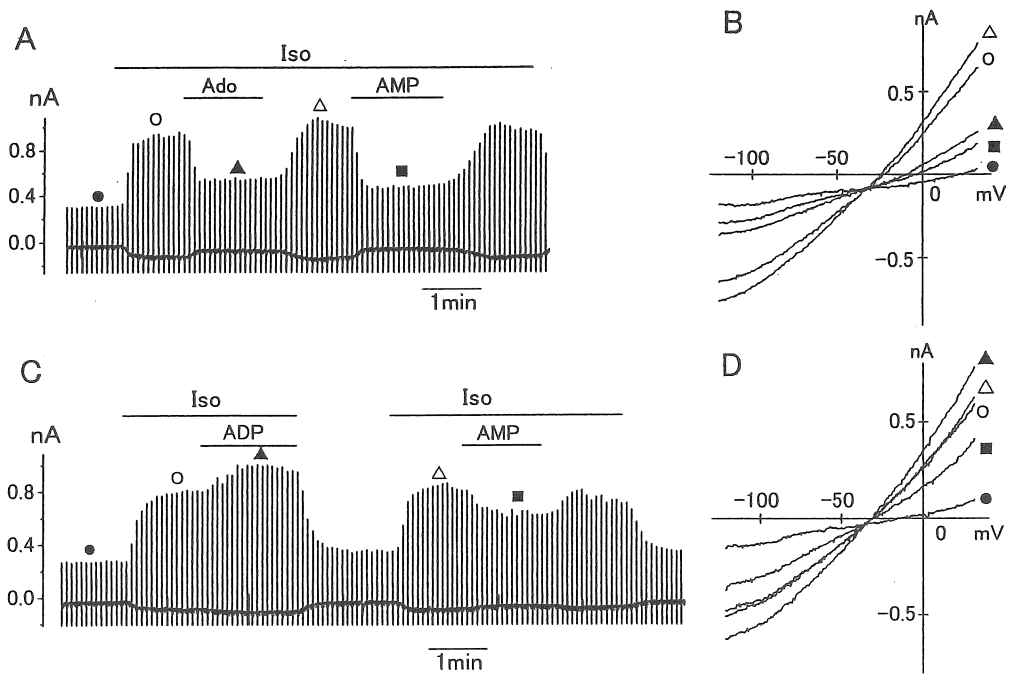
The cells were treated as in the experiments shown in Fig. 3, but the Cl concentration ( $[Cl]_0$ ) was lowered from 110.0 to 4.6 mM during application of hyposmotic solution, as indicated by bars in A. Each point represents mean  $\pm$  SEM (n=4). B shows an expanded illustration of a part of A (open circles; test curve), supplemented with a control curve (closed circles) which was derived from the experiments shown in Fig. 3. The values are expressed as relative to those obtained at 10 min (5 min after application of hyposmotic solution), at which  $[Cl]_0$  was lowered in the experiments shown here. A comparison of curves with repeated measures ANOVA yielded  $p < 0.01$  ( $\pi$ ).



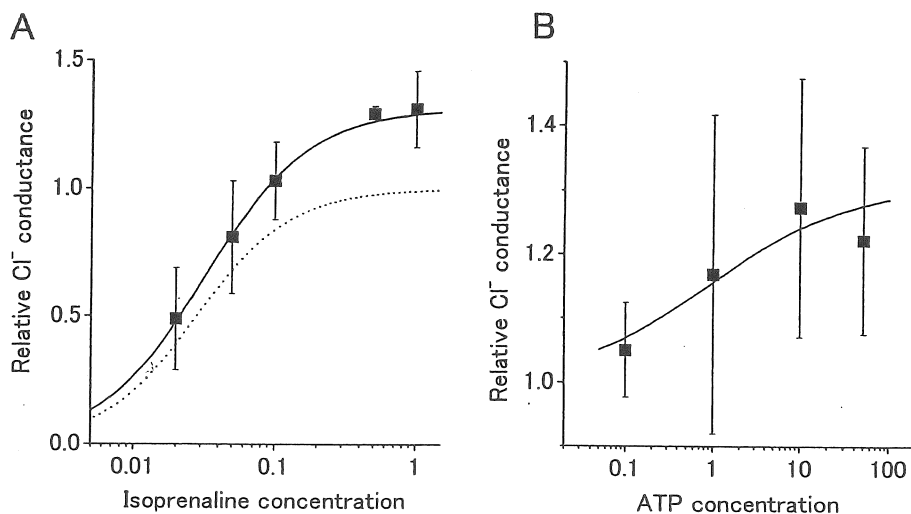
**Figure 7.** Enhancement of hyposmotic cell swelling in high-K solution (open circles). The cells were initially bathed in isosmotic high-K solution (105.4 mM  $[K]_o$ ), and were exposed to hyposmotic (70% of control) high-K solution for the period indicated by bar. The bathing solution was finally switched to normal Tyrode solution with 5.4 mM  $[K]_o$ . Each point represents mean  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). For comparison, the data obtained at normal  $[K]_o$ , which are shown in Fig. 3, are reproduced in this figure (squares).



**Figure 8.** Inhibition and potentiation of CFTR Cl current by external ATP. Two examples are shown (upper and lower panels). A and C, chart record of membrane current in response to ramp pulses. Isoprenaline (Iso, 0.1  $\mu$ M) and ATP (50  $\mu$ M) were applied for the period indicated by bars. Current traces indicated by the symbols are the sources for I-V relations shown in B and D. In A, ATP exerted a biphasic effect on the Cl current, initially suppressing and subsequently potentiating it. The initial suppression was virtually absent in C.



**Figure 9. Effects of adenosine and various adenine nucleotides on CFTR Cl current.** Two examples are shown (upper and lower panels). A and C, chart record of membrane currents in response to ramp pulses. Isoprenaline (Iso, 0.1 μM), adenosine (Ado, 50 μM), AMP (50 μM) and ADP (50 μM) were applied for the period indicated by bars. B and D show I-V relations obtained at the times indicated by the corresponding symbols in A and C, respectively.



**Figure 10. A. Dose-response relations for the Cl<sup>-</sup> conductance and isoprenaline as influenced by ATP.**

Cl<sup>-</sup> conductance was measured about 1 min after application of 50 μM ATP at different isoprenaline concentrations and was normalized to conductance magnitude activated by isoprenaline alone at each isoprenaline concentration. In each experiment, effect of ATP was determined at one or two isoprenaline concentrations. To show the effect of ATP on the dose-response relation, data are plotted as relative to the "normal" dose-response relation for Cl<sup>-</sup> conductance and isoprenaline alone (dotted line), which was determined in a previous study (11). Each data point represents mean ± S.D. of 4-8 experiments. The solid line was drawn by the least-squares fit of the Hill equation:

$$\text{normalized conductance} = G_{\max} / (1 + (K_{1/2}[\text{drug}]^{-1})^n),$$

where  $G_{\max}$  is the normalized maximum conductance,  $K_{1/2}$  is the half-maximally activating drug concentration, and  $n$  is the Hill coefficient. Without ATP:  $G_{\max} = 1$ ,  $K_{1/2} = 28$  nM,  $n = 1.3$ . With ATP:  $G_{\max} = 1.3$ ,  $K_{1/2} = 32$  nM,  $n = 1.2$ .

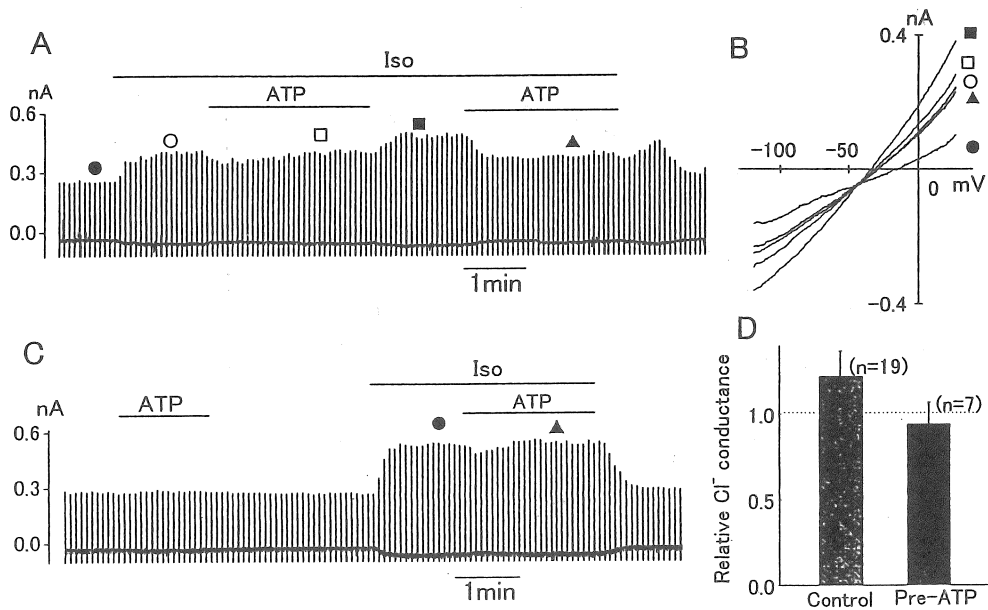
**B. Dose-response relation for the isoprenaline-activated Cl<sup>-</sup> conductance and ATP.**

Cl<sup>-</sup> conductance was measured about 1 min after application of different concentrations of ATP at a constant isoprenaline concentration (0.1 μM) and was normalized to conductance magnitude activated by isoprenaline alone. Each data point represents mean ± S.D. of 4-8 experiments. The solid line was drawn by the least-squares fit of the modified Hill equation:

$$\text{normalized conductance} = 1 + (G_{\max} - 1) / (1 + (K_{1/2}[\text{drug}]^{-1})^n),$$

where  $G_{\max}$ ,  $K_{1/2}$  and  $n$  are the same as those described above.  $G_{\max}$  was assumed to be 1.3 according to the data shown in A. In this fitting,  $K_{1/2} = 0.97$  μM and  $n = 0.57$ .





**Figure 11. Sustained effect of ATP on  $I_{Cl,PKA}$**

A and C, chart record of membrane current in response to ramp pulses. Isoprenaline (Iso,  $0.1 \mu M$ ) and ATP ( $50 \mu M$ ) were applied for the period indicated by bars. Current traces indicated by the symbols in A are the sources for I-V relations shown in B. In A, the first exposure to ATP induced an inhibition of  $I_{Cl,PKA}$  as usual, but its subsequent increase was unusually slight in this particular case (cf. Fig. 8A). The removal of ATP in the presence of isoprenaline resulted in a prominent increase in  $I_{Cl,PKA}$ , and the reapplication of ATP induced only an inhibition of  $I_{Cl,PKA}$ . In C, the cell was briefly pretreated with ATP alone. After a drug-free interval of 3 min, isoprenaline and ATP were applied as indicated. Note that the potentiation of  $I_{Cl,PKA}$  by ATP in the presence of isoprenaline was virtually absent in this experiment. D. Effect of ATP on  $I_{Cl,PKA}$  in ATP-pretreated (Pre-ATP) and non-treated cells (Control).  $Cl^-$  conductance was measured about 1 min after application of  $50 \mu M$  ATP in the presence of  $0.1 \mu M$  isoprenaline, and is expressed as relative to conductance magnitude activated by isoprenaline alone. In Pre-ATP group, cells were pretreated by ATP alone for 1.5 min, and were left in drug free solution for 3 min before application of isoprenaline, as shown in C. In Control group, isoprenaline was applied to the cells without ATP-pretreatment.

## 5. 細胞容積調節におけるクロールの役割

助成研究者	岡田 泰伸	(岡崎国立共同研究機構・生理学研究所 ・細胞器官研究系・機能協関研究部門)
共同研究者	前野 恵美	( 同 上 )
	森島 繁	( 同 上 )
	森 信一郎	( 同 上 )
	井上 華	( 同 上 )

### 要約

細胞容積調節におけるクロライドイオンの役割について、1) 多種の細胞におけるアポトーシス細胞死への役割、2) グリア細胞及び神経系細胞における乳酸アシドーシス性ネクローシス細胞死への役割、及び3) 脳ニューロンのグルタミン酸過興奮性細胞傷害への役割の3点につき検討した。その結果、1) アポトーシス死の初期にみられる細胞縮小化にクロライドチャンネル活性化による  $\text{Cl}^-$  流出が本質的役割を果していること、2) 乳酸アシドーシス時の脳浮腫の原因となるグリア細胞とニューロンの細胞膨張の持続は、容積調節に関与する容積感受性クロライドチャンネルの抑制によること、3) グルタミン酸過興奮毒性時にはグルタミン酸レセプター/カチオンチャンネルを介しての  $\text{Na}^+$  と  $\text{Ca}^{2+}$  の流入にトリIGGERされてニューロンの細胞体の膨張がもたらされるばかりではなく、樹状突起に多数の varicosity が形成されるが、これに伴って容積感受性クロライドチャンネルの活性化がもたらされ、このチャンネルを介するクロライド流出が防御的に働くものと思われること、などを明らかにした。このようにクロライドチャンネルはアポトーシス死の誘導やネクローシス死の防御に関与するものと考えられた。

### はじめに

細胞はたとえ異常浸透圧環境下において膨張や収縮を強いられたとしても、短時間のうちに元の正常容積にもどることができる。このような容積調節に  $\text{Cl}^-$  イオンの流出入が重要な役割を果していることが知られている (1, 2)。膨張後の容積調節は RVD (regulatory volume decrease) と呼ばれ、細胞外への  $\text{KCl}$  流出に駆動された水流出によって達成されるが、この  $\text{KCl}$  流出は多くの細胞で  $\text{K}^+$  チャンネルと  $\text{Cl}^-$  チャンネルの並列的活性化によって達成されることが知られている。その中で特に、容積感受性外向整流性 (VSOR)  $\text{Cl}^-$  チャンネルが殆んど細胞で中心的な役割を担っている (3)。一方、細胞死の過程では容積調節異常が見

られ、アポトーシス初期には AVD (apoptotic volume decrease) と呼ばれる持続性の細胞縮小化が、ネクローシス初期には NVI (necrotic volume increase) と呼ばれる持続性の細胞膨張化が伴われる (4)。本研究では、この AVD におけるクロライドチャネルの役割と、乳酸アシドーシスやグルタミン酸過興奮毒性時の NVI におけるクロライドチャネルの役割について三年間にわたって研究した。

## 第 1 部 アポトーシス性細胞容積減少 (AVD) におけるクロライドの役割

アポトーシスは、エネルギー要求性の細胞死であり、細胞にプログラムされた秩序立った反応の連鎖によってもたらされる。その過程の詳細は生化学的・分子生物学的に明らかにされてきた。生理的条件下において役割を終えた細胞を、そして病理的条件下においては傷害された細胞を、細胞融解・破裂による有害物質放出を伴うことなく静かに取り除くという意味で、これは「生理学的」細胞死である。この過程には、進行性の細胞収縮と、これに続く細胞断片化 (アポトーシス小体形成) が伴われることがよく知られている (5)。アポトーシス小体の形成以前のごく早期に見られる細胞縮小化を、アポトーシス性細胞容積減少 Apoptotic Volume Decrease (AVD) と私たちは名付けた (6)。本研究では、まず第 1 にこの AVD のイオンメカニズム、とくにクロライドイオンやクロライドチャネルの役割を検討した (6、7)。

### [方法]

細胞としては HeLa, U937, PC12, NG108-15 の 4 種の培養株を用いた。ミトコンドリア仲介性アポトーシス誘導剤としてはスタウロスポリン staurosporine (STS: 1~8  $\mu\text{M}$ )、レセプター仲介性のものとしては  $\text{TNF}\alpha$  (2~10 ng/ml) に cycloheximide (CHX: 0.1~1  $\mu\text{g/ml}$ ) を併用したものをを用いた。細胞容積の測定はコールターカウンター法を、カスパーゼ 3 の測定は通常キットによる蛍光測定法を、DNA ラダーの検出には電気泳動法を、細胞生存率の測定は MTT 法を用いた。

### [結果]

上皮系 (HeLa)、リンパ系 (U937)、神経系 (PC12, NG108-15) のいずれの細胞においても、アポトーシス誘導剤としてミトコンドリア刺激を介する STS を用いようが、細胞死レセプター刺激を介する  $\text{TNF}\alpha$  (シクロヘキシミド CHX 併用) を用いようが、図 1 に示すように、刺激後 1~2 時間以内に AVD が発生した。

AVD は、VSOR  $\text{Cl}^-$  チャネル (3) を含む多くのクロライドチャネルをブロック

する NPPB や DIDS や、低濃度では他のクロライドチャンネルには影響を与えずに VSOR  $\text{Cl}^-$ チャンネルのみを選択的にブロックする phloretin (8) の同時投与によって、STS や  $\text{TNF}\alpha$  による AVD の誘導は完全に阻止された (図 1)。Fas リガンドによる U937 細胞のアポトーシス誘導によっても、2 時間以内に AVD の発生が見られ、これもクロライドチャンネルブロッカー-DIDS によって完全に阻止された。

AVD 進行中の細胞において、RVD 能をもつ細胞種においてはその RVD スピードがより速くなっており、RVD を殆んど示さない PC12 細胞においても RVD を顕著に示すようになった (図 2)。RVD は (一部の赤血球などの例外を除く) 多くの細胞において主として  $\text{K}^+$ チャンネルと  $\text{Cl}^-$ チャンネルの並列的活性化による  $\text{KCl}$  流出によって実現されるが、AVD 時の促進性 RVD もまたこれら容積調節性チャンネルのブロッカーによって阻止された (図 2)。

カスパーゼ 3 の活性化 (図 3) も、DNA ラダー化 (図 4) も、これらの細胞のアポトーシス刺激後 4~8 時間以内に観察された。これらのアポトーシス性生化学的反応もまた、クロライドチャンネルブロッカーである DIDS や NPPB によって、そして VSOR  $\text{Cl}^-$ チャンネルブロッカーである phloretin によっても完全に阻止された (図 3、図 4)。

細胞生存率を MTT アッセイ法によってモニターしたところ、これらの細胞のすべてにおいて、STS や  $\text{TNF}\alpha$  刺激後 8 時間以内に細胞死誘導を受けた (図 5)。しかも、このような細胞死はすべて  $\text{Cl}^-$ チャンネルブロッカーによって完全に救済されることが判明した (図 5)。

AVD の発生はカスパーゼ活性化に先行し、更にはカスパーゼ阻害剤である zVAD-fmk や zD-dcb を投与しておくともカスパーゼ活性化は抑制されるが AVD の発生は抑制されないことが明らかになった (図 6)。

#### [考察]

以上の結果から、AVD はアポトーシス過程の最も初期に見られる不可欠の現象であり、これにはおそらく容積調節に関与するクロライドチャンネルの (浸透圧性膨張なしにもたらされる異常な) 活性化が伴われているものと結論される。クロライドチャンネル活性化によるクロライドイオン流出による細胞収縮そのものか、あるいはこのときの細胞内  $\text{Cl}^-$ 濃度減少かが、その後のアポトーシス性生化学反応の発生の不可欠の条件を与えているものと考えられる。

## 第 2 部 乳酸アシドーシス条件下におけるネクローシス性細胞容積増加 (NVI) におけるクロールの役割

脳虚血条件下においては乳酸の蓄積とプロトン産成亢進による乳酸アシドー

シスが伴われ、これによって脳浮腫が引起される結果、重篤な障害をもたらされることが知られている (9、10)。乳酸アシドーシスは、神経やグリア細胞に持続性膨張をもたらしてネクローシス死に到ることが *in vitro* 実験系においても観察されている (11-13)。そこで本研究では、次にこの乳酸アシドーシス性 NVI におけるクロライドチャネルの役割を神経系細胞 (14) とグリア系細胞 (15) で検討した。

#### [方法]

用いた細胞は cAMP によって神経分化させた NG108-15 株とアストロサイトーマ由来のグリア C6 株である。細胞容積の測定はコールターカウンター法、電気生理実験はパッチクランプ全細胞記録法を用いて行った。

#### [結果]

神経に分化させた NG108-15 細胞において、乳酸アシドーシス (7.5 mM 乳酸を含む pH 6.2 の等張リングル液) による細胞膨張をコールターカウンターによって観察した (図7: 黒丸)。これに対して、正常 pH(7.4)条件下で乳酸を投与しても容積は大きく変化しなかった (図7: 白丸)。この乳酸アシドーシスによる細胞膨張の誘導には、 $H^+$ -モノカルボン酸シンポータ (MCT) によるプロトンと乳酸の細胞内流入が関与することがアストロサイトにおいて示唆されている (16) ので、神経分化 NG108-15 細胞でも同様かどうかを、MCT の阻害剤 CHC (1 mM) を用いてテストした。その結果、CHC は乳酸アシドーシスによる細胞膨張を事実、部分的ではあるが抑制することが明らかとなった (図7: 黒四角)。

しかし、殆どの細胞は浸透圧性細胞膨張の後に、通常は RVD と呼ばれる容積調節で応ずることが知られており、この神経分化 NG108-15 細胞においても RVD 能の存在を確認している (データ提示省略)。しかし、乳酸アシドーシスによる浸透圧性膨張時には RVD が見られないのは何故であろうか。RVD は多くの細胞で、 $K^+$ チャネルと  $Cl^-$ チャネルの並列的開口による KCl 流出と、それに駆動された水流出によってもたらされることが知られているので、神経分化 NG108-15 細胞を低張液で膨張させたときに活性化される VSOR  $Cl^-$ チャネルへの乳酸アシドーシスの影響をパッチクランプ全細胞記録法を用いて調べた。その結果、浸透圧性膨張時には  $Cl^-$ チャネル電流が図8に示すように活性化され、その性質は他の多くの細胞で活性化される VSOR と呼ばれる容積感受性外向整流性 (VSOR)  $Cl^-$ チャネル (3) と同じ性質を示すことが判明した。そしてこの電流は、pH 6.4 の乳酸アシドーシス条件下 (図8) でも、pH 6.2 の乳酸アシドーシス条件下 (データ提示省略) でも著しく抑制されることが明らかになった。これに対し、同じ濃度の乳酸の存在下でも pH が正常 (7.4) であれば VSOR 電流の抑制は見られない (データ提示省略)。全く同様の観察は、C6 グリア細胞でも得られた (データ提

示省略)。

乳酸アシドーシス条件下における RVD の欠除の原因の 1 つに、VSOR  $\text{Cl}^-$  チャンネル活性の抑制が関与していることがこれによって明白となったが、これが唯一の原因かどうかは不明である。この点は、人工的にアニオンチャンネルを導入して、乳酸アシドーシス性細胞膨張後に RVD を実現させることができるかどうかを調べれば明らかになるものと考え、VacA ペプチドを用いてテストした。VacA はヘリコバクタ・ピロリ菌の毒素であり、動物神経膜上でもアニオンチャンネルイオノフォアとして働くことが HeLa 細胞を用いて証明されているからである (17, 18)。実際に、本ペプチドの投与によってアニオン電流の活性化が C6 細胞で認められた (データ提示省略)。そして、C6 細胞は乳酸アシドーシス条件下において細胞膨張を示してこれが持続するが (図 9: 黒四角)、VacA 存在下では、その後直ちに RVD を示すことが観察された (図 9: 黒逆三角)。したがって、乳酸アシドーシス下での VSOR  $\text{Cl}^-$  チャンネルの抑制が、RVD 欠除の唯一の原因であることが明らかとなった。

#### [考察]

以上の結果から、脳虚血において伴われる乳酸アシドーシスによる脳浮腫に、ニューロンやグリア細胞の容積増加が関与し、この容積増の持続 (RVD の欠除) には容積感受性クロライドチャンネルの抑制が原因していることが結論された。このクロライドチャンネルを乳酸アシドーシス性脳浮腫の治療の対象とすることが可能となる日が来るかもしれない。

### 第 3 部 グルタミン酸過興奮毒性条件下におけるニューロンの NVI におけるクロライドの役割

細胞容積調節はすべての動物細胞にとって本質的に重要な機能である。細胞の膨張や縮小が異常に長く続くと細胞死に到るからである (5)。脳細胞では、脳虚血やテンカン発作やグルタミン酸性過興奮 excitotoxicity などの病理的条件下においてばかりでなく、生理的な神経・シナプス活動時においても膨張が伴われることが知られているので、容積調節能は重要である。しかしながら、脳ニューロンにおいても RVD 能が見られるのか？ 見られるとすれば VSOR  $\text{Cl}^-$  チャンネルの発現がやはり重要な働きをしているのか？ excitotoxicity 時のニューロン膨張時にも VSOR  $\text{Cl}^-$  チャンネルは活性化されているのか？ などの点は未だ明らかではない。次に本研究は、これらの設問に答えるために行われた (19、

20)。

#### [方法]

用いた細胞はマウス胎仔の脳皮質の初代培養 5-7 日目のニューロンである。細胞形態の観察及びサイズの測定はカルセイン calcein をロードした細胞を用いて行った。細胞容積の指標として二光子レーザー顕微鏡下での細胞の cross-section area (CSA) を用いた。Cl<sup>-</sup>電流はパッチクランプ全細胞記録法を用いて記録した。

#### [結果]

初代培養ニューロンに calcein をロードして、二光子レーザー顕微鏡下で細胞のサイズの指標として cross-sectional area (CSA) を観察したところ、低浸透圧 (65% 浸透圧) 刺激によって急速に膨張を示した後に、ゆっくりと容積が回復していく、いわゆる RVD 現象が確認された (図 10 : Control)。VSOR Cl<sup>-</sup>チャンネルの阻害薬である NPPB の存在下ではこの RVD は完全に阻止された (図 10 : NPPB)。従って、皮質ニューロンにも RVD 能が存在していることが明らかとなり、これには VSOR Cl<sup>-</sup>チャンネルが関与していることが示唆された。

次にパッチクランプ全細胞記録法によって Cl<sup>-</sup>電流を測定したところ、外液を低浸透圧 (90% 浸透圧) 液に置換すると、細胞膨張が観察されるのに伴って、大きな Cl<sup>-</sup>電流の活性化が確認された (図 11A)。その電圧依存性をパルス印加によって観察したところ、外向整流性が見られた (図 11B, C)。そのアニオン選択性は、I<sup>-</sup>>Br<sup>-</sup>>Cl<sup>-</sup> というアイゼンマン I 型の低フィールド選択性を示し、他の VSOR Cl<sup>-</sup>チャンネルの性質と一致した。この電流は、VSOR Cl<sup>-</sup>チャンネルの阻害薬として知られる NPPB、DIDS、phloretin に対して感受性を示すが、一部の細胞で VSOR Cl<sup>-</sup>チャンネルを抑制することの報告されている抗エストロゲンレセプター薬 tamoxifen や、PKC 阻害薬 PMA によっては影響されないことが明らかとなった (データ提示省略)。

グルタミン酸を介する脳傷害、即ち excitotoxicity、にはニューロンの膨張が伴われることはよく知られている (21)。培養皮質ニューロンにおいては、図 12 に示すようにグルタミン酸レセプター/チャンネルのリガンドである NMDA (30 μM) を外液に加えると細胞体の膨張も見られるが、それより顕著に dendritic varicosity の形成が見られるようになった。即ち、樹状突起の軸上の所々にお

いて局所的な膨張が見られた。この時に  $\text{Na}^+$  存在下で全細胞電流を記録するとグルタミン酸レセプター／チャンネルを介する内向き  $\text{Na}^+$  電流が見られる (図 13Ba)。しかし、 $\text{Na}^+$  を大型カチオン  $\text{NMDG}^+$  に置換して NMDA を含まない液で洗うと、このカチオン電流は消失するが、細胞膨張や varicosity 形成はまだ持続してベースの電流が NMDA 投与前に比べて増大していることが判明した (図 13Ba)。この電流は外向整流性を示し (図 13Bb)、NPPB に対する感受性を示すなど VSOR  $\text{Cl}^-$  チャンネル電流と同一の性質を示した。なお、グルタミン酸レセプター／チャンネルの Mg ブロックを防ぐためにこれらの電流記録は低  $\text{Mg}^{2+}$  条件で行われたが、NMDA を加えずに低  $\text{Mg}^{2+}$  液のみの投与では  $\text{Na}^+$  電流も見られず、その後の細胞体の膨張も varicosity の形成も VSOR  $\text{Cl}^-$  電流の活性化も見られなかった (図 13A)。更には、高濃度  $\text{Mg}^{2+}$  存在下、あるいは  $\text{Na}^+$  除去下ではニューロン膨張も varicosity 形成も VSOR  $\text{Cl}^-$  電流活性化も見られなかった。

#### [考察]

以上の結果から、NMDA によるグルタミン酸レセプター／チャンネルを介する  $\text{Na}^+$  流入によってニューロン細胞の膨張や varicosity 形成が引き起こされ、VSOR  $\text{Cl}^-$  チャンネルの活性化がもたらされることが明らかになった。グルタミン酸過興奮毒性の際の NVI に対抗して VSOR  $\text{Cl}^-$  チャンネルが容積調節作用をしている可能性が示唆された。

#### 謝辞

VacA を用いた実験は、Vanderbilt 大の T. L. Cover 博士との共同研究において得られたものである。本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただいたゾルト・サイエンス研究財団に深く感謝いたします。

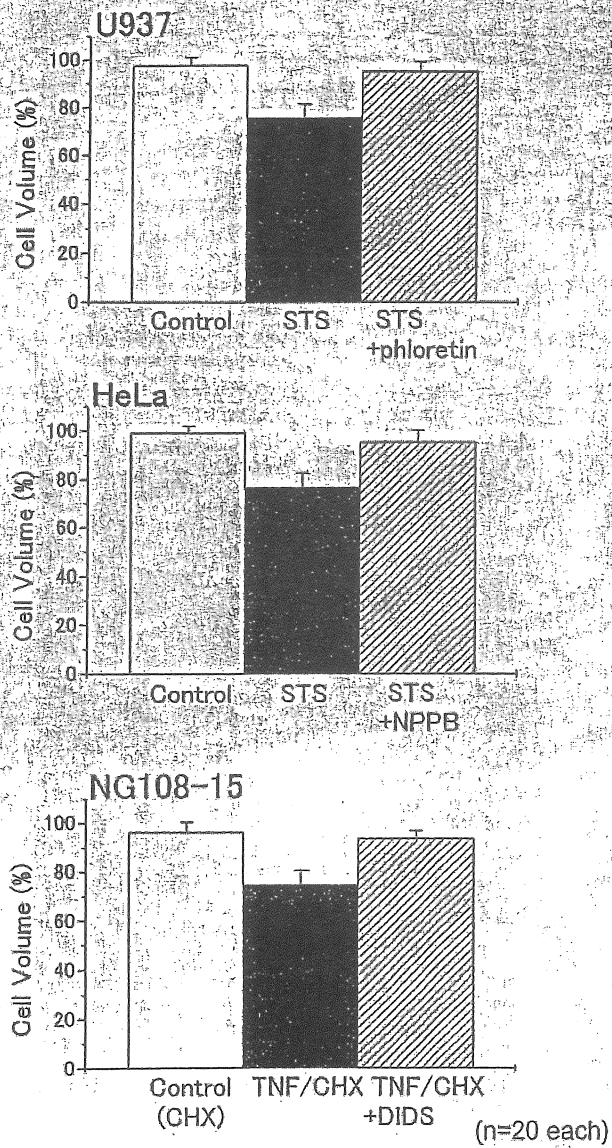
#### 参考文献

1. Hoffmann EK, Simonsen LO. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol Rev* 1989;69: 315-82.
2. Okada Y, Hazama A. Volume-regulatory ion channels in epithelial cells. *News Physiol Sci* 1989;4: 238-42.

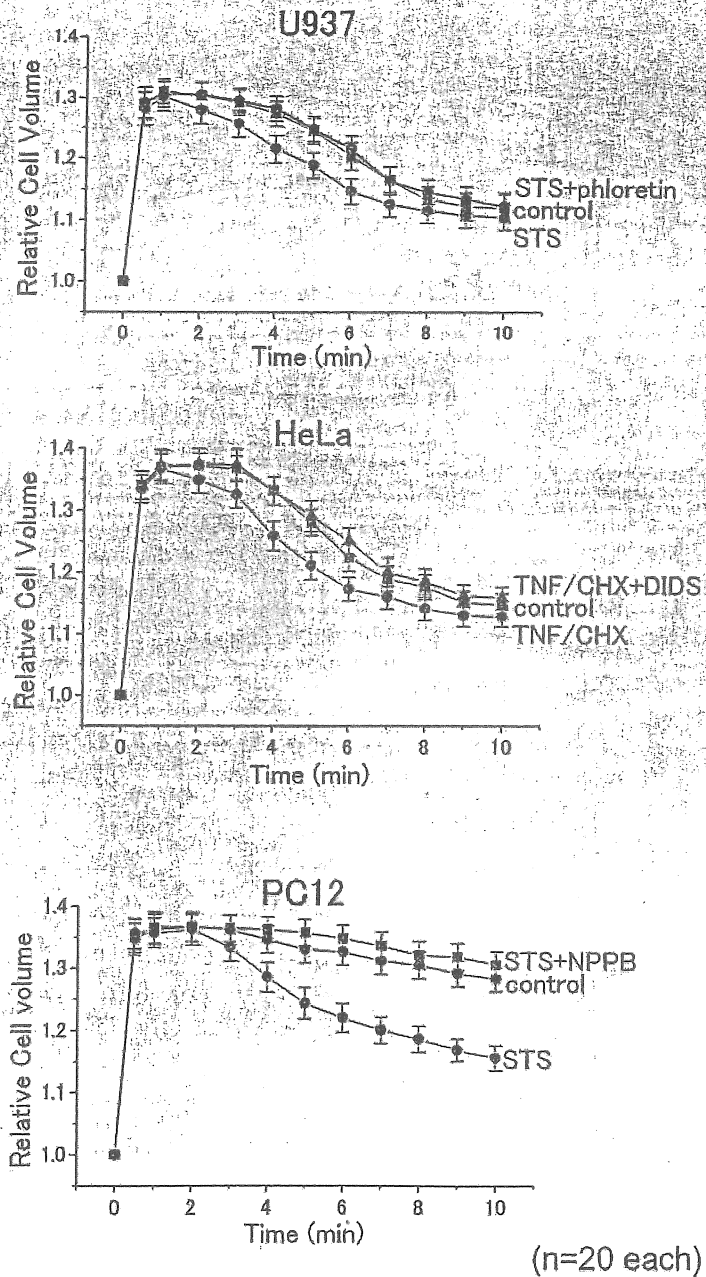


3. Okada Y. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl<sup>-</sup> channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol* 1997;273: C755-89.
4. Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J, Morishima S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol (London)* 2001;532: 3-16.
5. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68: 251-307.
6. Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97: 9487-92.
7. Okada Y, Maeno E. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem Physiol Part A* 2001;130: 377-83.
8. Fan H-T, Morishima S, Kida H, Okada Y. Phloretin differentially inhibits volume-sensitive and cAMP-activated, but not Ca-activated, Cl channels. *Br J Pharmacol* 2001;133: 1096-106.
9. Kraig RP, Petito CK, Plum F, Pulsinelli WA. Hydrogen ions kill brain at concentrations reached in ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987;7: 379-86.
10. Siesjö BK. Acidosis and ischemic brain damage. *Neurochem Pathol* 1988;9: 31-88.
11. Staub F, Mackert B, Kempfski O, Peters J, Baethmann A. Swelling and death of neuronal cells by lactic acid. *J Neurol Sci* 1993;119: 79-84.
12. Alojado MES, Morimoto Y, Morimoto Y, Kemmotsu O. Mechanism of cellular swelling induced by extracellular lactic acidosis in neuroblastoma-glioma hybrid (NG108-15) cells. *Anesth Analg* 1996;83: 1002-8.
13. Jakubovicz DE, Klip A. Lactic acid-induced swelling in C6 glial cells via Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Brain Res* 1989;485: 215-24.
14. Mori S, Morishima S, Takasaki M, Okada Y. Impaired activity of volume-sensitive anion channel during lactacidosis-induced swelling in neuronally differentiated NG108-15 cells. *Brain Res* 2002;957: 1-11.
15. Nabekura T, Morishima S, Cover TL, Mori S, Kannan H, Komune S, et al. Recovery from lactacidosis-induced glial cell swelling with the aid of exogenous anion channels. *Glia* 2003;41: 247-59.

16. Lomneth R, Medrano S, Gruenstein EI. The role of transmembrane pH gradients in the lactic acid induced swelling of astrocytes. *Brain Res* 1990;523: 69-77.
17. Szabo I, Brutsche S, Tombola F, Moschioni M, Satin B, Telford JL, et al. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J* 1999;18: 5517-27.
18. Tombola F, Oregna F, Brutsche S, I Szabo, Del Giudice G, Rappuoli R, et al. Inhibition of the vacuolating and anion channel activities of the VacA toxin of *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett* 1999;460: 221-5.
19. Inoue H, Okada Y. Swelling-activated Cl<sup>-</sup> currents in cortical neurons. *Jpn J Physiol* 2002;52(Suppl): S59.
20. Inoue H, Okada Y. (in preparation)
21. Coi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurophysiol* 1992;23: 1261-76.



**Figure 1.** Induction of AVD by the 2-h treatment with STS (1~4  $\mu$ M) or TNF  $\alpha$  (2~10 ng/ml) (plus CHX), and its prevention by simultaneous treatment with a Cl<sup>-</sup> channel blocker, phloretin (30  $\mu$ M), NPPB (0.5 mM) or DIDS (0.5 mM).



**Figure 2.** Facilitation of RVD by the 2-h treatment with STS or TNF  $\alpha$  (plus CHX), and its prevention by a Cl<sup>-</sup> channel blocker, phloretin (30  $\mu$ M), NPPB (0.5 mM) or DIDS (0.5 mM).

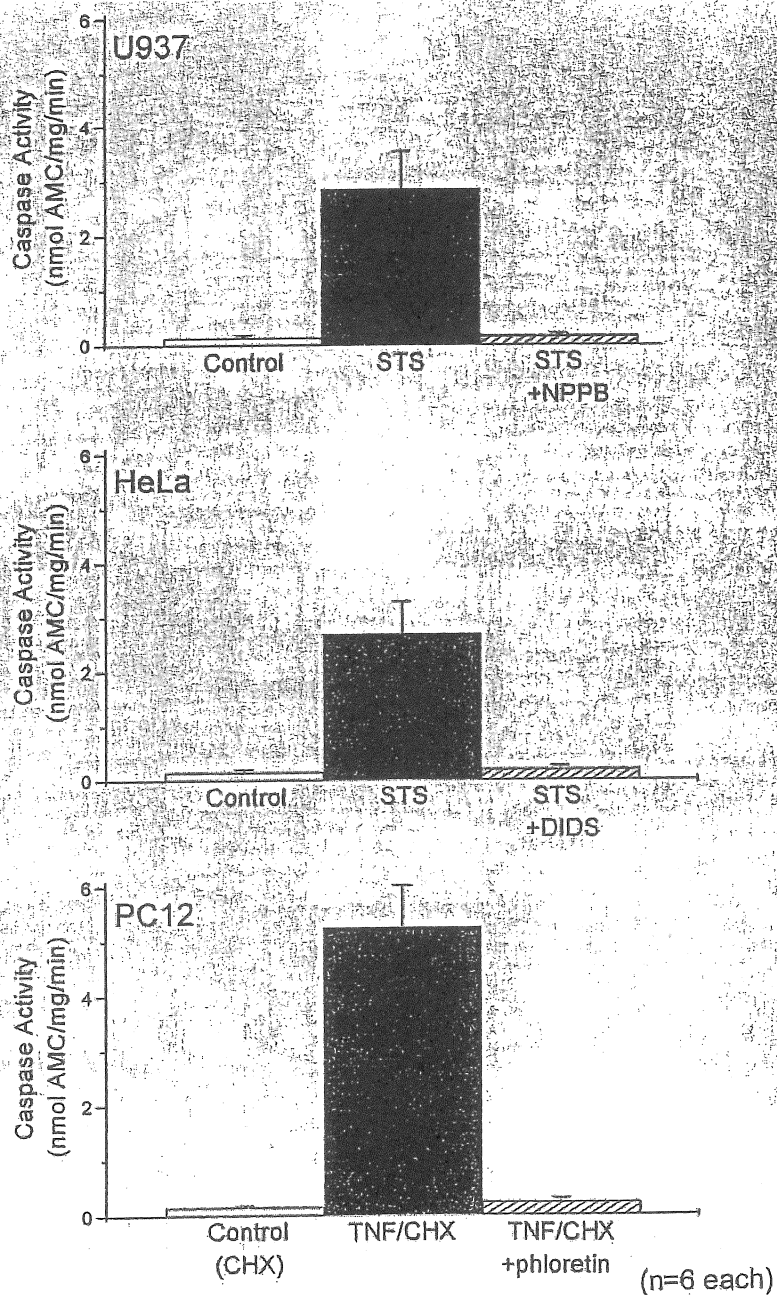


Figure 3. Caspase-3 activation induced by the 4-h or 8-h treatment with STS or TNF $\alpha$  (plus CHX), and its prevention by simultaneous treatment with a Cl<sup>-</sup> channel blocker, phloretin (30  $\mu$ M), NPPB (0.5 mM) or DIDS (0.5 mM).

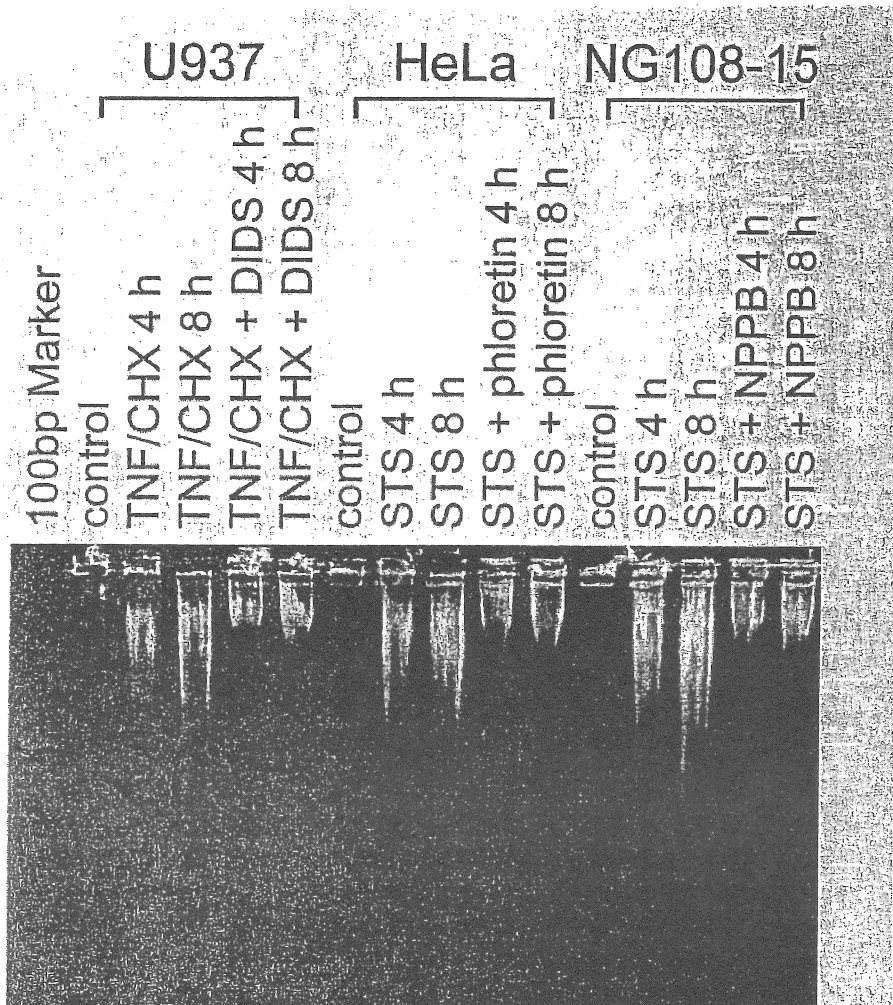


Figure 4. DNA laddering induced by the 4-h or 8-h treatment with STS or TNF $\alpha$  (plus CHX), and its prevention by simultaneous treatment with a Cl<sup>-</sup> channel blocker, phloretin (30  $\mu$ M), NPPB (0.5 mM) or DIDS (0.5 mM).

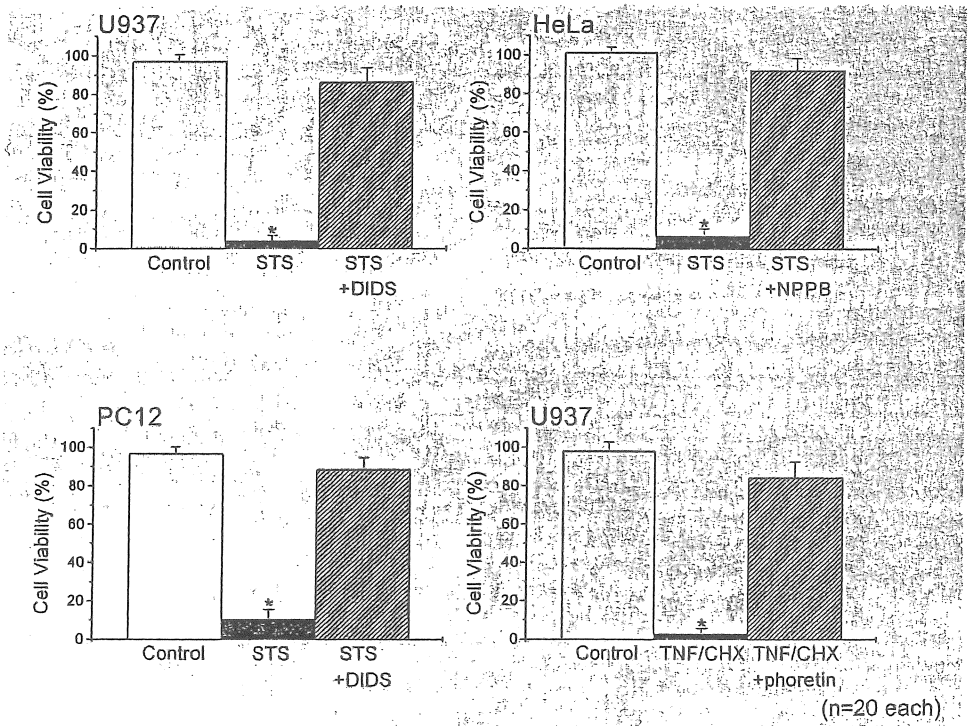
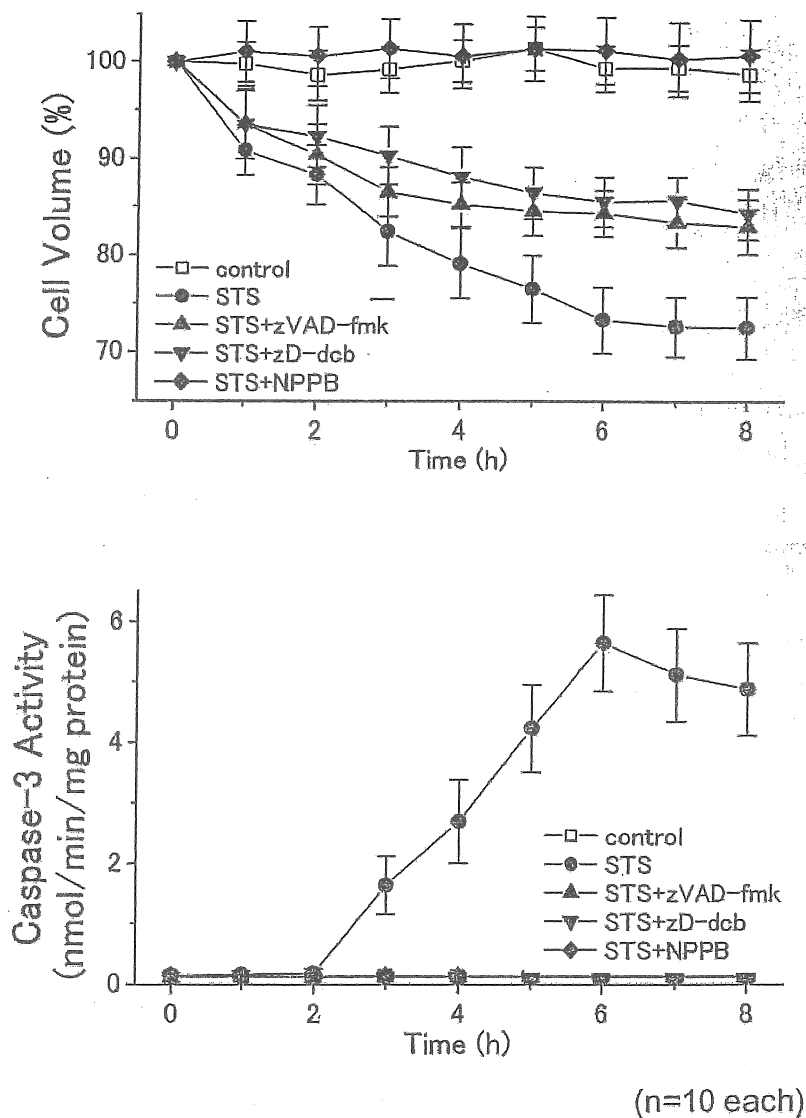
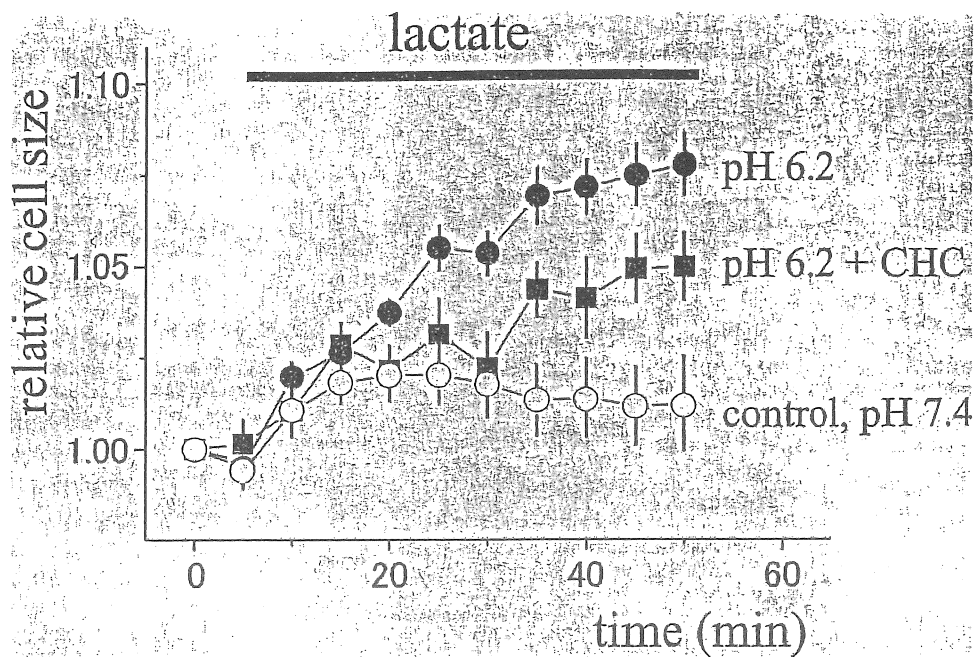


Figure 5. Cell death induction by the 8-h treatment with STS or TNF $\alpha$  (plus CHX), and its rescue by simultaneous treatment with a Cl<sup>-</sup> channel blocker, phloretin (30  $\mu$ M), NPPB (0.5 mM) or DIDS (0.5 mM).

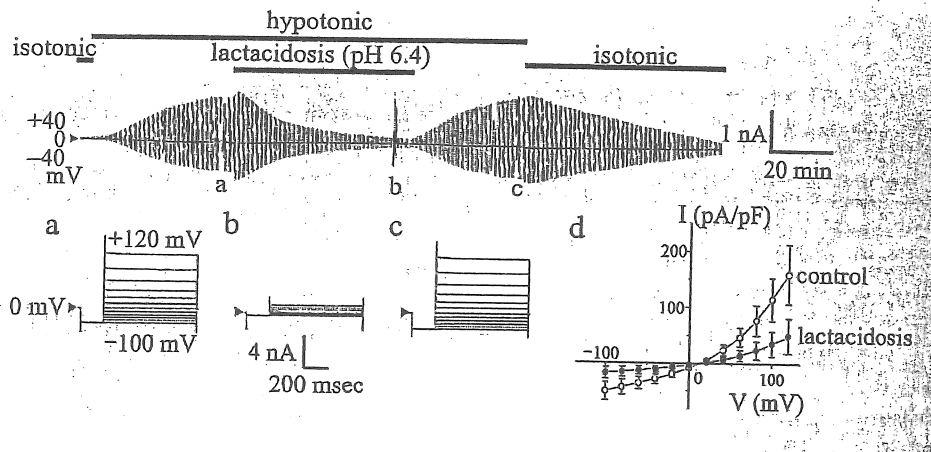


**Figure 6.** Time courses of the AVD induction and caspase-3 activation in U937 cells by STS (1  $\mu$ M), and the effect of a  $\text{Cl}^-$  channel blocker (phloretin 30  $\mu$ M, NPPB 0.5 mM or DIDS 0.5 mM) or a caspase blocker (zVAD-fmk 50  $\mu$ M or zD-dcb 100  $\mu$ M) thereon.

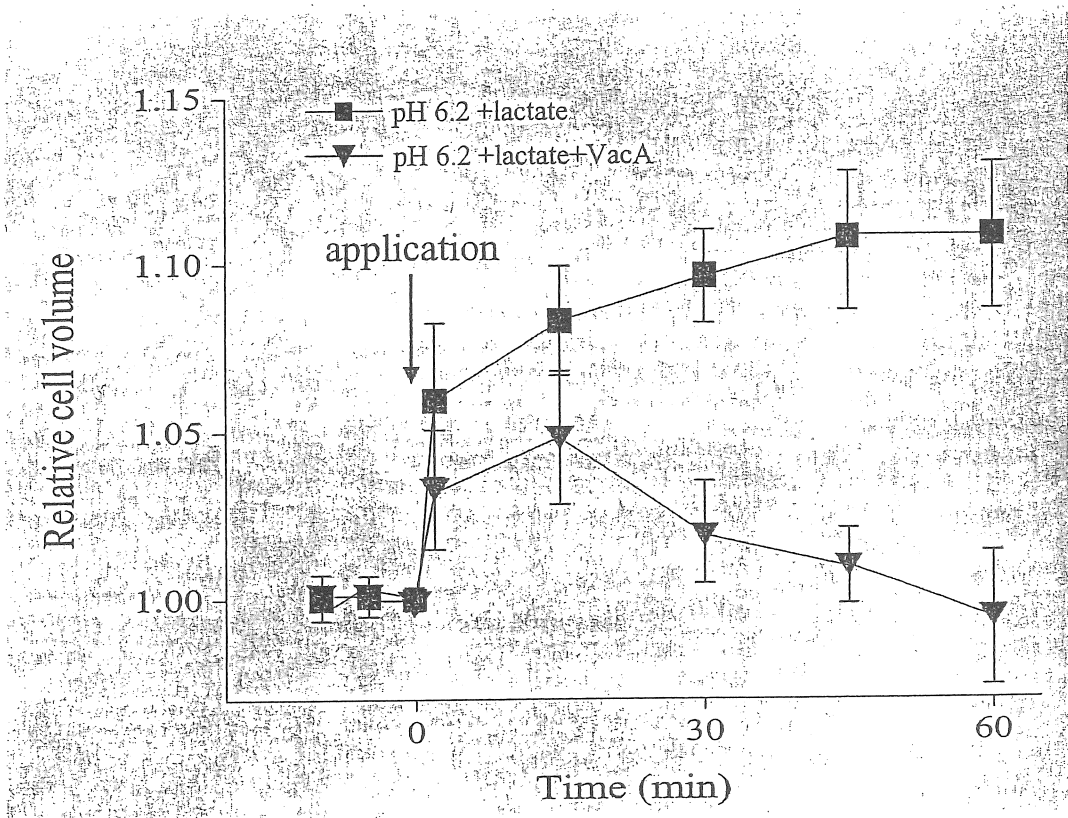




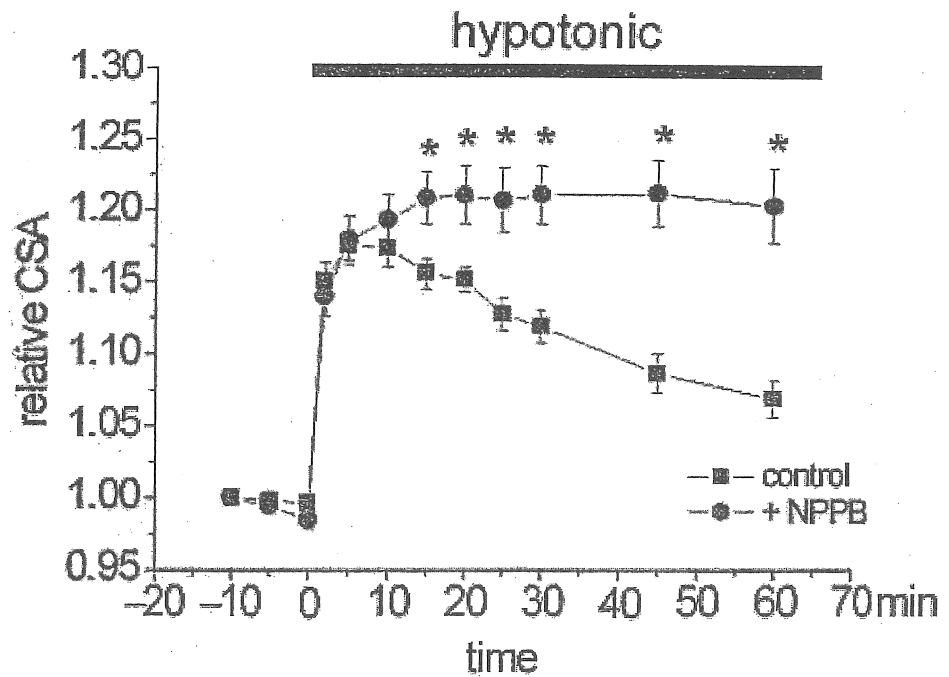
**Figure 7.** Effects of lactacidosis on cell size in neuronally differentiated NG108-15 cells. Relative cell size is the ratio of planar area of a single cell at a given time to that at time zero. Each symbol represents the mean value for 10 to 19 cells (vertical bars: SEM). Lactate-containing isotonic acidic solution at pH 6.2 was applied during the time period indicated by the horizontal bar, in the absence (filled circles) or presence of 1 mM CHC (filled squares). For control experiments (open circles), lactate-containing isotonic solution of pH 7.4 was applied.



**Figure 8.** Effects of lactacidosis on volume-sensitive  $\text{Cl}^-$  currents in neuronally differentiated NG108-15 cells. The current traces represent 4 similar observations. Upper panel: a representative record before, during and after exposure to hypotonic solution, with exposure to acidic lactate-containing solution (pH 6.4) for a period of time during the hypotonic exposure. The current was monitored by applying alternating step pulses to  $\pm 40$  mV every 15 s from a holding potential of 0 mV. Step pulses from  $-100$  to  $+120$  mV in 20-mV increments were applied at a, b and c. Gain of chart recorder was changed to one-fifth at a. Lower panel: current responses to step pulses recorded at a, b and c in the upper panel, and I-V relationships (d) recorded at a and b. Open and filled circles represent the mean  $\pm$  SEM (vertical bars) of 4 observations under control and lactacidosis conditions, respectively.

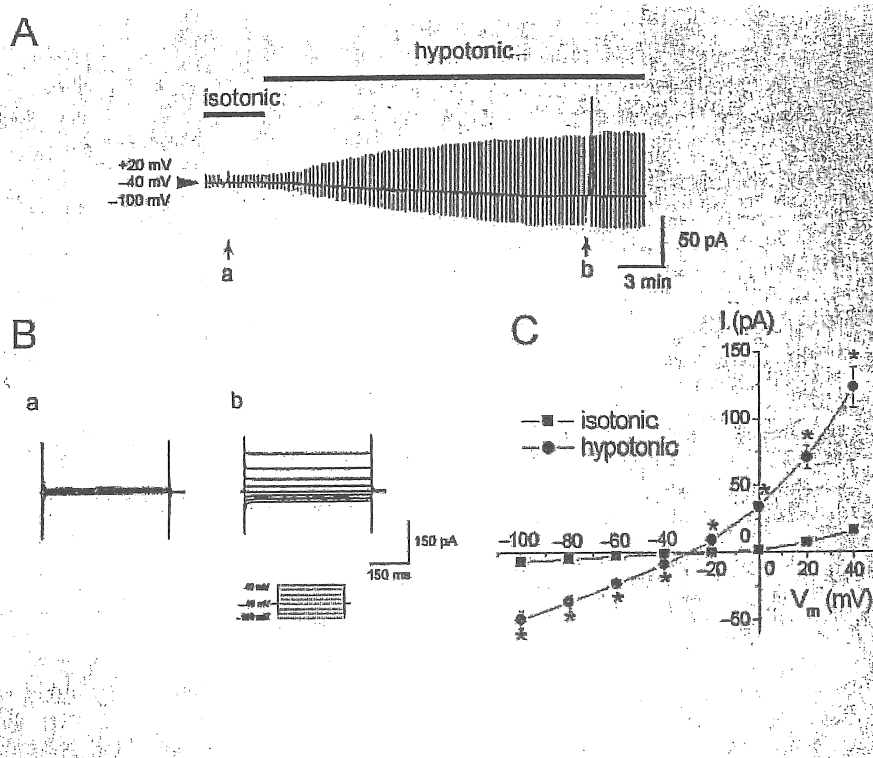


**Figure 9.** Effects of pretreatment with VacA (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) on lactacidosis-induced cell swelling in C6 glioma cells. Cell volume was measured using a Coulter counter during application of lactate-containing acidic solution for positive control (pH 6.2 + lactate: filled squares) and VacA-pretreated (pH 6.2 + lactate + VacA: filled triangles). Each symbol represents the mean  $\pm$  SEM (vertical bar) of 5 experiments



**Figure 10.** RVD after hypotonic swelling in cortical neurons. Effects of a Cl<sup>-</sup> channel blocker, NPPB (100 μM), on RVD in cortical neurons. Each point represents the mean value of 15-18 observations with S.E.M.

\* P<0.05 vs control.



**Figure 11.** Volume-sensitive currents in cortical neurons. A) Representative current activation upon osmotic cell swelling under whole-cell recordings during application of alternating pulses (2-s duration, every 15 s) or of step pulses from -100 mV to +40 mV in 20 mV increments (at arrows) in a single cortical neuron. B) Expanded traces of current responses (a and b in A) to step pulses (protocol shown in Inset) under isotonic (310 mOsm) conditions (a) and hypotonic (270 mOsm) conditions (b). C) Current-voltage relationships of currents before (squares) and after (circles) application of hypotonic stress. Each point represents the mean current of 19 observations with S.E.M. \*  $P < 0.05$  vs isotonic. NMDG-rich solutions were employed for both bath and pipette solutions.

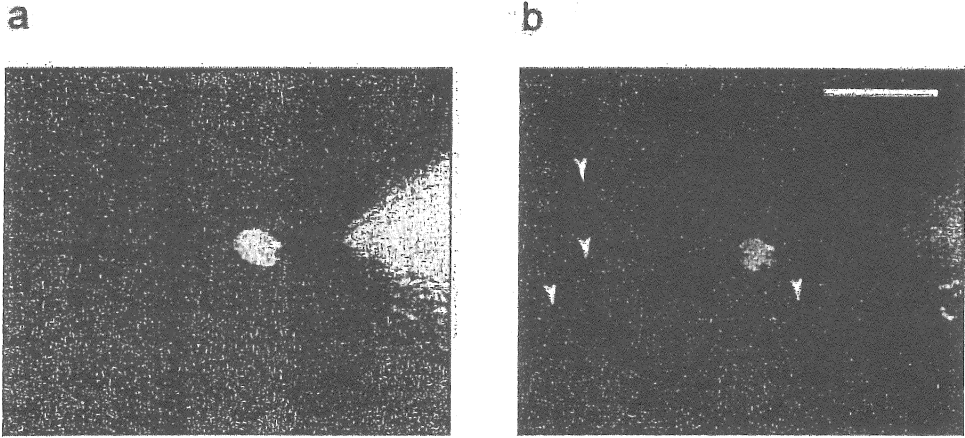
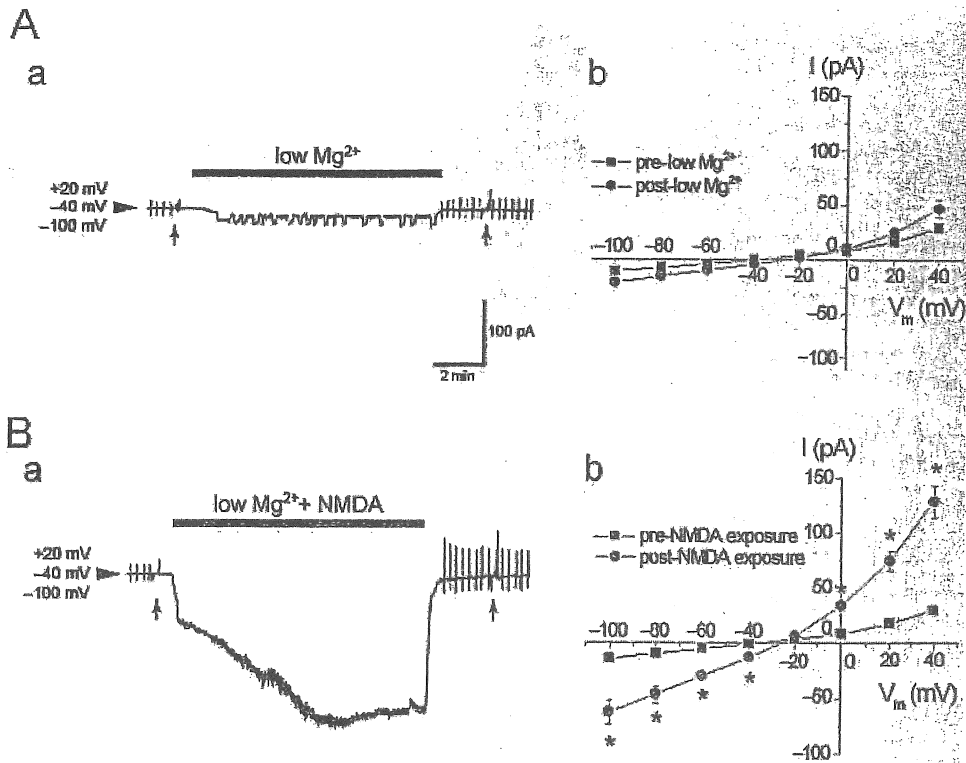


Figure 12. Varicosity formation induced by NMDA exposure. Morphological changes induced by 30  $\mu\text{M}$  NMDA exposure. Fluorescent images were captured before (a) and after (b) NMDA exposure. Bar, 30  $\mu\text{m}$ . Calcein was introduced into the cells via addition to the pipette solution.

Figure 13. Cl<sup>-</sup> currents activated by NMDA exposure



A) Effect of application of low Mg<sup>2+</sup> solution on Cl<sup>-</sup> currents. a) Representative record of whole-cell currents in the absence of NMDA. Alternating pulses (2-s duration, every 15 s) or of step pulses from -100 mV to +40 mV in 20 mV increments (at arrows) were applied before and after exposure to low Mg<sup>2+</sup> (0.5 mM) solution for 10 min. During exposure to low Mg<sup>2+</sup> solution, cells were voltage-clamped at -40 mV. b) Current-voltage relationships of Cl<sup>-</sup> currents recorded before (squares) and after (circles) exposure to low Mg<sup>2+</sup> solution. Each point represents the mean current of 11 observations with S.E.M.

B) Effect of exposure to NMDA on Cl<sup>-</sup> currents. Representative record in the presence of NMDA. Alternating pulses (2-s duration, every 15 s) or of step pulses from -100 mV to +40 mV in 20 mV increments (at arrows) were applied before and after exposure to low Mg<sup>2+</sup> solution containing 30 μM NMDA for 10 min. During exposure to low Mg<sup>2+</sup> containing 30 μM NMDA, cells were voltage-clamped at -40 mV. b) Current-voltage relationships before (squares) and after (circles) exposure to low Mg<sup>2+</sup> solution containing 30 μM NMDA. Each point represents the mean current of 15 observations with S.E.M. \* P < 0.05 vs pre-exposure.

## 6. 腸管・分泌細胞におけるクロールの役割

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 唐木 晋一郎 ( 同 上 )

### 【要約】

本研究では、消化管下部大腸において、クロライドイオン分泌を誘発する神経伝達物質として知られている SP と、免疫応答細胞から分泌される  $\text{PGE}_2$  の粘膜上皮細胞での相互作用によるイオン輸送を、組織及び細胞レベルで検討した。

モルモット下部大腸を用いた組織レベルでの研究から SP は大腸粘膜上皮においてクロライドイオン分泌とそれに伴う水分分泌の誘発物質として機能し、その作用は prostanoid の存在下で発現されることが示唆された。また、モルモット下部大腸より単離した crypt 底部に位置する単一の粘膜上皮細胞を用いて、SP 刺激による細胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  動態を、共焦点レーザー顕微鏡により検討した。最後に、T84 細胞を用いて、SP と  $\text{PGE}_2$  により起こる相乗的なクロライドイオン分泌に対する細胞内情報伝達系の関与を検討した。その結果、この相乗的な分泌機構には、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  の産生、MLCK の活性化、F-actin の形成、による NKCC1 活性化などが関与していることを明らかにした。

### 【はじめに】

我々は生体維持のためのエネルギー源を外部環境に依存しているが、その必然として消化管は常に外界からの異物の侵入にさらされるという宿命を負っている。そのため、消化管には生体にとって有害なものを排除する機構が備わっており、管腔内の有害物質を排除するためにクロライドイオン分泌に伴った水分分泌が発生する。この生体内での電解質の輸送に伴った水の分泌機構には、消化管壁内に存在する壁内神経叢が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。さらに、最近の研究から壁内神経系によるイオン輸送の制御系には免疫系が関与する経路が存在することが示唆されている。

免疫担当細胞から分泌される局所ホルモンの一種である prostaglandin は、放出された部位のごく近くで作用を現し、通常は循環系に入る前に分解される。粘膜下には各種の免疫担当細胞が多数存在するが、なかでも mast cell は、粘膜上皮でのイオン輸送に影響する各種のメディエーターを遊離することが知られている。壁内神経叢で神経伝達物質として機能している Substance P (SP) によるクロライドイオン分泌機構にも mast cell から遊離される histamine や



prostaglandinE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)が関与していることが明らかになっている[1, 2]。しかし、SP のクロライドイオン分泌機構において、粘膜上皮細胞で SP と PGE<sub>2</sub>がどのように相互作用しているのかは明らかではない。

本研究では、消化管下部大腸において、クロライドイオン分泌を誘発する神経伝達物質として知られている SP と、免疫応答細胞から分泌される PGE<sub>2</sub>の粘膜上皮細胞での相互作用によるイオン輸送を、組織及び細胞レベルで検討した。

## 【方 法】

### (1) モルモット下部大腸を用いた Ussing chamber 法による検討

実験には雄性ハートレー系モルモット (体重: 400 g-750 g ; 日本 SLC 浜松) を使用し、実験開始まで給餌および給水を自由な状態で飼育した。

モルモット下部大腸の粘膜上皮のみから成る組織標本を作成するためにモルモットを撲殺後、頸動脈から放血し、正中線に沿って腹腔を切開した。その後、肛門側より 5-10cm 口腔側の下部大腸を 20-30cm 程摘出した。摘出した下部大腸を腸間膜付着部で長軸方向に切開し、粘膜側を上にしてプラスチック板の上に置き、スライドガラスを用いて粘膜を剥離し、粘膜のみからなる組織標本を作成した。この様にして作成した組織標本をナイロンメッシュ (200 メッシュ、74 ミクロン) ではさみ、Ussing chamber (0.64cm<sup>2</sup>) に装着して実験を行なった。

短絡電流 (I<sub>sc</sub>) は Voltage-Clamp Amplifier (SS-1335, 日本光電, 東京) により測定した。データは Mac Lab system (MacLab/8 system, Analog Digital System, Castle Hill, Australia) により実験開始から連続的に記録を行い、実験終了後、同 system を利用してデータ解析を行なった。組織標本のコンダクタンスは、10mV の電圧パルスを組織に加え、膜間を流れる電流を計測することによりオームの法則から算出した。なお実験中は、漿膜、粘膜側に 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> の混合ガスを通気させた Krebs-Ringer 液をそれぞれ 10ml 加え灌流した。

SP 及び PGE<sub>2</sub> の投与は漿膜側のみに行なった。各種阻害剤は SP および PGE<sub>2</sub> 投与の 10 分前に組織標本に適用した。データ解析にあたっては、SP 及び PGE<sub>2</sub> 投与により増大した短絡電流を計測し、値は平均値±標準誤差として示した。各データの統計処理は Student's t-test を用い、5%未満の危険率をもって有意とした。

## (2) 単離 crypt を用いた SP 刺激による細胞内カルシウム動態の検討

実験には雄性ハートレー系モルモット（体重：400-750g 日本 SLC 浜松）を使用し、実験開始まで給餌および給水を自由な状態で飼育した。

モルモットを撲殺後、頸動脈から放血し、正中線に沿って腹腔を切開し、その後、肛門側より 5-10cm 口腔側の下部大腸を 20-30cm 程摘出した。摘出した結腸は Krebs-Ringer 液で肛門側から洗浄後、約 4 cm に切断し氷冷下の緩衝液中に浸した。さらに、結腸内腔を緩衝液で満たし、鉗子で両端を挟み 37°C の緩衝液内に 3 分間浸漬した。その後、片方の鉗子を外し内腔の緩衝液を除去した後、緩衝液で洗浄し、再び緩衝液を満たして、結腸の両端を鉗子で結紮した。緩衝液を満たした結腸を 3 分間タッピングし、その後片方の鉗子を外して 1.5 ml の遠心管 (BioMedical Equipment Co. LTD. 東京) に遊離した Crypt を採取した。同様の操作を 2 回繰り返した後、得られた Crypt は 4°C で保存した。採取した Crypt 懸濁液を 1 分間、1000rpm (RL-101, TOMY 精工, 東京) で遠心したのち上澄みを除去し、再度 1 ml の緩衝液に懸濁後 1 分間、1000rpm で遠心し、沈殿した Crypt を測定に使用した。

本研究では、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 測定用試薬として Indo1-AM を使用した。まず、得られた Crypt を含む懸濁液に 5  $\mu$ M の Indo1-AM を負荷し、その懸濁液を 220  $\mu$ l づつ Cell-Tak を塗布した Glass bottom culture dish 上に流し、遮光下 4°C で約 4-5 分間静置することにより Crypt を dish のガラス面に固定した。Crypt 固定後、さらに適量の 5  $\mu$ M Indo1-AM 溶液を dish に添加し 4°C で保存し Indo1-AM を細胞内に導入した。測定前に Indo1-AM 溶液を灌流用緩衝液（緩衝液 1 に 0.1% の BSA を加えたもの）で置換して、細胞外の Indo1-AM 溶液を除去した。その後、Glass bottom culture dish を顕微鏡にセットし、灌流用緩衝液を流速 2.0 ml/min で表面灌流し、dish 内の水温及び水量を安定させた後、SP 溶液を表面灌流しながら  $[Ca^{2+}]_i$  の測定を共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

## (3) T84 細胞を用いた Ussing chamber 法による検討

本研究には、ヒト結腸上皮由来の培養細胞株である T84 を用いた。T84 を継代培養し、経上皮抵抗 (Transepithelial Resistance, TER) が、ヒト結腸やモルモット等の結腸の経上皮抵抗 (50~3000) に準じた標本を実験に供した。このようにして作成した単層培養標本を Ussing chamber (0.64 cm<sup>2</sup>) に装着して実験を行った。

短絡電流 (I<sub>sc</sub>) は Voltage-Clamp Amplifier (SS-1335, 日本光電, 東京) により測定した。データは Mac Lab system (MacLab/8 system, Analog Digital System, Castle Hill, Australia) により実験開始から連続的に記録を行い、実験終了後、

同 system を利用してデータ解析を行なった。組織標本のコンダクタンスは、10mV の電圧パルスを組織に加え、膜間を流れる電流を計測することによりオームの法則から算出した。なお実験中は、基底膜、粘膜側に 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> の混合ガスを通気させた Krebs-Ringer 液をそれぞれ 10ml 加え灌流した。本実験では、agonists として、細胞内カルシウム濃度を上昇させるために Acetylcholine (ACh) を、細胞内 c-AMP 濃度を上昇させるために PGE<sub>2</sub> を使用した。ACh 及び PGE<sub>2</sub> の投与は基底膜側から行なった。各種阻害剤は PGE<sub>2</sub> 及び ACh 投与の 10 分前に組織標本に適用した。データ解析にあたっては、PGE<sub>2</sub> 及び ACh 投与により増大した短絡電流を計測し、値は平均値±標準誤差として示した。各データの統計処理は、Wilcoxon Rank Sum Test (Mann-Whitney U Test) 及び分散分析法 (ANOVA: Dunnett Test) を用い、5%未満の危険率をもって有意とした。

実験は、標本を chambers に装着後、経皮膜電位 (potential difference, PD) を安定させるため 1 時間静置した後で開始した。試薬は、piroxicam, 実験目的に応じた試薬、PGE<sub>2</sub>, ACh の順に 10 分おきに加え、投与による短絡電流の増減 ( $\Delta I_{sc}$ ) を評価した。Piroxicam は T84 細胞が Prostaglandin 類を産生する酵素、cyclooxygenase (COX) を有するため、その阻害を目的として添加した。なお用いた試薬は以下の通りである。

NPPB (5-Nitro-2-(3-phenylpropyl-amino)benzoic acid), DMSO, Acetylcholine Chloride, phalloidin (actin stabilizer), Bumetanide (NKCC inhibitor), piroxicam (COX inhibitor), L-NAME, Genistein (TK inhibitor), ML-7 (MLCK inhibitor), PKG inhibitor, Cytochalasin D (actin unstabilizer), H-89 (PKA inhibitor), KN-93 (CaMK $\alpha$  inhibitor), W-7 (Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin inhibitor), DIDS (4, 4'-Diisothiocyanato-stilbene-2, 2'-disulfonic acid disodium, CaCC inhibitor), Chelerythrine Chloride (PKC inhibitor), PGE<sub>2</sub>。試薬の溶解には、phalloidin では ethanol (HPLC grade) を用い、KN-93 及び W-7 では蒸留水を用いた。その他の試薬は全て dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。

## 【成績】

### (1) モルモット下部大腸を用いた Ussing chamber 法による検討

モルモット下部大腸粘膜上皮において、漿膜側に SP 10<sup>-7</sup>M を投与すると短絡電流は増大し、その値は 15.3±4.9  $\mu$ A/cm<sup>2</sup> を示した (n=3)。しかしこのような粘膜のみからなる標本においても、神経線維や mast cell が残存しており短絡電流を増大させている可能性が考えられた。従って、神経や mast cell の影響を除去するため、神経を遮断する tetrodotoxin (TTX) と prostaglandin 合成阻害剤である piroxicam を前投与した。TTX 10<sup>-7</sup>M の単独前投与により、SP 10<sup>-7</sup>M による

短絡電流の増大は  $16.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  を示し、対照群と比較して差はなかった ( $n=2$ )。一方、piroxicam  $10^{-6}\text{M}$  の単独前投与では、SP  $10^{-7}\text{M}$  による短絡電流の増大は  $4.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  の値しか示さなかった。TTX と piroxicam 両者の前投与により、SP による短絡電流の増大は  $5.2 \pm 0.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  まで減少した ( $n=10$   $P < 0.005$ )。また TTX, piroxicam 投与後、 $\text{PGE}_2$   $10^{-5}\text{M}$  を投与すると短絡電流は  $135.4 \pm 11.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  まで増大した ( $n=6$ )。このような標本にさらに SP  $10^{-7}\text{M}$  を投与すると短絡電流は 2 相性を示した。最初のピークを P-1、2 番目のピークを P-2 とし、その短絡電流の増大値は P-1 では  $240.3 \pm 17.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 、P-2 では  $387.8 \pm 33.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  となり、対照群及び  $\text{PGE}_2$  単独投与よりも有意に増大した ( $n=10$ )。このことより粘膜上皮において SP と  $\text{PGE}_2$  は相乗的に作用して短絡電流を増大させることが示唆された。以後の実験には  $\text{PGE}_2$  投与 10 分前に TTX  $10^{-7}\text{M}$ 、piroxicam  $10^{-6}\text{M}$  を前投与した。SP と  $\text{PGE}_2$  は、モルモット下部大腸粘膜上皮で相乗的に作用して短絡電流を増大させることが本実験で明らかになった。次にその相乗作用による短絡電流の増大に対する  $\text{PGE}_2$  の用量依存性について検討を行なった。すなわち  $\text{PGE}_2$  を  $10^{-4}$ – $10^{-7}\text{M}$  までの範囲で漿膜側に前投与し、10 分後に SP  $10^{-7}\text{M}$  を漿膜側に投与した場合の短絡電流の変化を観察した (Fig. 1)。Fig. 1 に示したように SP による短絡電流の増大は、前投与する  $\text{PGE}_2$  の用量に依存し、 $\text{PGE}_2$   $10^{-5}\text{M}$  前投与時の SP  $10^{-7}\text{M}$  投与による短絡電流の増大は P-1 で  $284.5 \pm 40.8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 、P-2 で  $413 \pm 54.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  を示した (Fig. 1  $n=4-15$ )。すべての  $\text{PGE}_2$  の濃度において、短絡電流の増大は常に P-2 が高い値を示した。また SP  $10^{-7}\text{M}$  を前投与し、 $\text{PGE}_2$   $10^{-5}\text{M}$  を投与した場合、 $\text{PGE}_2$   $10^{-5}\text{M}$  単独投与よりも有意に短絡電流は増大した。

SP と  $\text{PGE}_2$  による短絡電流の増大に伴い分泌されるイオン種を決定するために、漿膜側及び基底膜側、粘膜側両側のクロライドイオンを除去して実験を行なった。その結果、SP と  $\text{PGE}_2$  による短絡電流の増大の大部分はクロライドイオン分泌によるものであると推測された。

$\text{PGE}_2$  を前投与した後、SP を投与することにより短絡電流は相乗的に増大したが、この反応には細胞内 cAMP 濃度の上昇が関与していることが考えられた。そこで cAMP のアナログである 8-bromo-cAMP と forskolin を使用し、この相乗作用に対する cAMP の関与について検討を行なった。8-bromo-cAMP  $10^{-4}\text{M}$  の単独投与では短絡電流は増大しなかった ( $n=4$ )。一方、forskolin  $10^{-3}\text{M}$  を投与すると短絡電流は  $64.6 \pm 16.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  まで増大した ( $n=3$ )。しかしながら、このような標本にそれぞれ SP  $10^{-7}\text{M}$  を投与すると、短絡電流は P-1 で  $194.9 \pm 42.8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  及び  $326.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 、P-2 で  $317.0 \pm 74.5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  及び  $465.6 \pm 56.8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  まで増大し、 $\text{PGE}_2$   $10^{-5}\text{M}$  を前投与した時と同様の 2 相性の反応を示した (Fig. 2;  $n=3-4$ )。このことより SP と  $\text{PGE}_2$  による短絡電流の相乗的作用は、 $\text{PGE}_2$  投与により上昇する cAMP が関与していると考えられた。

## (2) 単離 crypt を用いた SP 刺激による細胞内カルシウム動態の検討

単離した crypt の底部 5 分の 1 に存在している単一の粘膜上皮細胞を選択し、SP による単一上皮細胞での細胞内カルシウム動態を検討した。Fig. 3 に示したように、単一の Crypt 上皮細胞では、非刺激時には  $[Ca^{2+}]_i$  は、殆ど変化しなかった。このような標本を SP ( $10^{-7}M$ ) で刺激すると、Fig. 3 に示すように、Crypt 底部の上皮細胞では、一過性の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が観察された。また、各細胞間で、SP に対する反応性の違いも観察された。しかしながら観察した全ての細胞において、SP による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は、灌流液中に SP が存在しているにも関わらず、ほぼ 3 分以内で基線にまで回復した。

哺乳類中に存在する SP 以外の tachykinin 類である neurokinin A (NKA) および neurokinin B (NKB) についても  $[Ca^{2+}]_i$  に及ぼす影響について検討した。SP, NKA および NKB は用量依存性に  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させた。 $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させる最低量は、約  $10^{-9}M$  であり最大反応は、 $10^{-6}M$  で得られた。これら tachykinin の中では、SP および NKA が反応性が最も高く、NKB は反応性が低かった。また非興奮性の細胞では、多くの場合 tachykinin 刺激は周期性を持つ  $[Ca^{2+}]_i$  変動を誘発するが、本研究においてはこのような現象は観察されなかった。

次に、SP による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に対する細胞外カルシウムの影響について検討を加えた。細胞外カルシウムイオンを除去しても、SP により  $[Ca^{2+}]_i$  は上昇した。すなわち、SP による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は、頂値については細胞外カルシウムイオンの影響を受けなかったが、明らかに基線に回復するまでの時間は、細胞外のカルシウムイオンを除去することにより短縮した。

細胞外のカルシウムイオンを除去しても、SP による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が観察されたため、次に細胞内カルシウムイオンプールの影響について検討を加えた。本研究では、細胞内カルシウムイオンプールの影響を阻害する薬物として thapsigargin ( $10^{-5}M$ ) を使用した。まず初めに、thapsigargin ( $10^{-5}M$ ) そのものの  $[Ca^{2+}]_i$  に与える影響について検討を加えた。細胞外カルシウムイオン存在下では、thapsigargin ( $10^{-5}M$ ) は crypt 上皮細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  を徐々に上昇させた。この上昇は細胞外のカルシウムイオンを除去することにより消失した。Thapsigargin ( $10^{-5}M$ ) 存在下でも SP は thapsigargin そのものによる  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に重畳するように  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させた (Fig. 4)。Thapsigargin の前処置においても SP により  $[Ca^{2+}]_i$  は上昇したため、thapsigargin の前処置と細胞外カルシウムイオン除去を同時に行った場合の、SP の crypt 粘膜上皮細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  に及ぼす影響について検討を加えた。Thapsigargin の前処置と細胞外カルシウムイオン除去を同時に行うことで、SP による  $[Ca^{2+}]_i$  は完全に消失した。

次に SP による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に、tachykinin 類のどのような受容体が関与してかを、NK1 受容体特異的阻害薬である FK888 を用いて検討した。FK888 は  $10^{-10}M$  か

ら  $10^{-6}\text{M}$  の範囲で用量依存的に SP による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を抑制した。また、 $10^{-6}\text{M}$  の FK888 は SP による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を完全に抑制した。

### (3) T84 細胞を用いた Ussing chamber 法による検討

単層培養した T84 の基底膜側へ  $\text{PGE}_2$   $10^{-5}\text{M}$  を単独投与すると、短絡電流は一過性に増大し、その値は投与後約 15sec で最大に達した。その時の上昇値は  $24.2 \pm 1.0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  であった ( $n=22$ )。同様に、ACh  $10^{-4}\text{M}$  を基底膜側に単独投与すると、短絡電流は緩やかに増大し、約 55sec で最大に達した。その時の上昇値は  $12.9 \pm 5.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  であった ( $n=4$ )。  $\text{PGE}_2$  と ACh との相互作用を検討するために、  $\text{PGE}_2$  投与 10 分後に ACh を投与した。すると、短絡電流の上昇は、単独投与時と比較して飛躍的に増大した。すなわち、その上昇は、3 相に分かれたピーク (phase-1, phase-2, phase-3) を示し、それぞれのピーク値は、  $46.5 \pm 2.0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (Phase1)、  $41.0 \pm 1.5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (phase-2) 及び  $86.6 \pm 2.9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (phase-3) を示した (Fig. 5B,  $n=4$ )。

次に、  $\text{PGE}_2$  と ACh の相乗作用による短絡電流の上昇に関与しているイオン種を決定するため、定法に従って標本を bumetanid ( $10^{-4}\text{M}$ ) で前処置して実験を行った。その結果、phase-1 は control 時の  $46.0 \pm 5.5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  から  $6.1 \pm 1.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  に減少した。また、phase-2 は control の  $42.2 \pm 1.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  から  $6.9 \pm 1.8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  へ ( $n=4$ ,  $P < 0.001$ )、phase-3 は control 時の  $96.7 \pm 2.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  から  $1.1 \pm 0.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  へ、それぞれ減少し phase-3 ではピークはほぼ消失した。これらのことより、phase-1, phase-2 では、  $\text{Cl}^-$  の分泌以外の要素が非常に少ないながらも含まれている可能性が示唆された。一方、phase-3 は bumetanide の前処置により完全に抑制されたため、その短絡電流の増大の全てが  $\text{Cl}^-$  の分泌によるものと考えられた。そこで、本研究では、短絡電流の上昇が最大を示し、なおかつ  $\text{Cl}^-$  分泌を明確に示した phase-3 での相乗的な  $\text{Cl}^-$  分泌に関する細胞内情報伝達系について解析を行った。

$\text{PGE}_2$  と ACh の相乗作用による短絡電流の上昇は、  $\text{Cl}^-$  分泌によるものであると考えられたため、頂端膜側からの  $\text{Cl}^-$  分泌に関与する  $\text{Cl}^-$  チャネルについて検討を行った。T84 単層培養標本の頂端膜側に、  $\text{Cl}^-$  チャネルの阻害剤である NPPB または DIDS を投与し、その 10 分後に基底膜側に  $\text{PGE}_2$ 、更に 10 分後に ACh  $10^{-4}\text{M}$  を投与し Phase-3 の変化を観察した。NPPB ( $10^{-4}\text{M}$ ) は、相乗的な  $\text{Cl}^-$  分泌を control の  $80.5 \pm 1.0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  から  $9.4 \pm 0.9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  へと減少させた (Fig. 6A, B,  $n=4$ ,  $P < 0.001$ )。しかしながら、カルシウム依存性  $\text{Cl}^-$  チャネルやいくつかの電位依存性チャネルに対する非選択的な阻害剤である DIDS ( $10^{-4}\text{M}$ ) の処置では、相乗的な  $\text{Cl}^-$  分泌は抑制されなかった (Fig. 6  $n=4$ ,  $P > 0.05$ )。これらの結果から、相乗的な  $\text{Cl}^-$  分泌には、Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator,

(CFTR)が関与していることが示唆された。

細胞内での  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は、様々な細胞内情報伝達系に影響し  $\text{Cl}^-$  の分泌を誘導する。そのため、細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入に関与しそれ自身も  $\text{Ca}^{2+}$  によって活性化を受ける  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent Protein Kinase (PKC) の相乗的な  $\text{Cl}^-$  分泌への関与を検討した。PKC の阻害剤である Chelerythrine Chloride (ChCl,  $10^{-5}\text{M}$ ) の投与によって、 $\text{PGE}_2$  と ACh の投与による Phase3 の反応は、control の  $79.8 \pm 6.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  から  $38.5 \pm 7.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  へと減少した。細胞内で上昇した  $\text{Ca}^{2+}$  が、続いてその情報をどの物質に伝達しているのかについて、代表的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパクのひとつである Calmodulin が、相乗的な  $\text{Cl}^-$  分泌に影響を与える可能性を、W-7 を用いて検討した。W-7 ( $10^{-4}\text{M}$ ) の前投与により、 $\text{PGE}_2$  と ACh 投与により誘発される Phase3 の反応は、control の  $86.6 \pm 7.5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  から  $45.6 \pm 15.0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  へと有意に減少した。このことは、 $\text{PGE}_2$  と ACh による相乗的な  $\text{Cl}^-$  分泌へ  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin が関与していることを示唆するものであった。相乗的な  $\text{Cl}^-$  分泌への  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin ( $\text{Ca}^{2+}$ /CaM) の関与が明らかになったため、更に CaM が次にどの物質と結合して  $\text{Cl}^-$  分泌に影響を与えているのかについて検討を行った。細胞内で CaM が結合する可能性のある物質である  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin -dependent Protein Kinase II (CaMKII), Nitric Oxide Synthetase (NOS), Myosin Light Chain Kinase (MLCK) の 3 種について、それぞれの阻害剤である KN-93, N-nirto-L-arginine methyl ester (L-NAME), ML-7 を用いて、それぞれの関与を検討した。KN-93 ( $10^{-5}\text{M}$ ) や L-NAME ( $10^{-4}\text{M}$ ) の前処置においては、相乗的な短絡電流の増大は抑制されなかった (control:  $85.3 \pm 4.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; KN-93 ( $10^{-5}\text{M}$ ) pretreatment,  $73.3 \pm 4.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; L-NAME ( $10^{-4}\text{M}$ ) pretreatment,  $69 \pm 5.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$   $n=4-13$ ,  $P > 0.05$ )。その一方で、ML-7 ( $10^{-4}\text{M}$ ) は  $52.1 \pm 9.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  と有意な減少を示した。従って、相乗的な  $\text{Cl}^-$  分泌に Myosin Light Chain Kinase (MLCK) が関与している可能性が示唆された。

MLCK は myosin をリン酸化することによって、Myosin と結合している actin に影響を与えている可能性が考えられたため、細胞骨格を構成する actin の相乗的な  $\text{Cl}^-$  分泌に対する関与について検討を行った。Actin 分子は、細胞内で重合して Actin filaments (F-actin) を形成する。そこで、F-actin に特異的に結合する phalloidin ( $10^{-5}\text{M}$ ) を用いて、相乗的な  $\text{Cl}^-$  分泌への F-actin の影響を検討した。しかしながら、phalloidin は相乗的な  $\text{Cl}^-$  分泌に影響しなかった (control:  $77.4 \pm 3.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; Phalloidin pretreatment:  $79.6 \pm 7.8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ )。一方で、actin 分子の重合する部分に結合し F-actin の形成を阻害する試薬である cytochalasin D ( $2 \times 10^{-5}\text{M}$ ) は、相乗的な  $\text{Cl}^-$  分泌を、control の  $77.4 \pm 3.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  から  $34.6 \pm 4.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  へと有意に抑制した ( $n=5$ ,  $P < 0.01$ )。

## 【考 察】

大腸におけるクロライドイオン分泌は、管腔側への水分泌の駆動力を生む。この水分泌の生理学的な意義は、管腔側に存在する有害物質や非吸収性の物質を円滑に体外へ排出するための機構として作用することにある。特に細胞に対して障害性を持つ物質（細菌毒素等上皮細胞に直接作用する物質）が管腔側に存在する時に誘発される生体防御機構としての分泌性下痢は、消化管免疫系と壁内神経系によって協調的に調節されると考えられている。

本研究では、粘膜上皮での SP 及び  $\text{PGE}_2$  によるクロライドイオン分泌機構を検討するために、まず、モルモット下部大腸を用いて組織レベルで検討を行った。なお、本研究では、組織を TTX によって前処置することにより神経系の関与を除外し実験を行った。

大腸粘膜上皮標本において、SP を漿膜側に投与することにより短絡電流は増大した。短絡電流の増大は、投与直後に一過性に上昇する phase 1 (P-1) とその後、持続性に上昇する phase 2 (P-2) の 2 相性を示した。なお、TTX 非投与群での SP による短絡電流の増大は、TTX 投与群と比較して差はなかった。このことから SP が、粘膜上皮標本に存在する神経線維に作用し、短絡電流の増大を誘発している可能性はないと考えられた。一方 piroxicam の前投与により、SP による短絡電流の増大は、対照群と比較して有意に減少した。この piroxicam による短絡電流の減少は、粘膜/粘膜下神経叢標本における作用と同様であった。すなわち、神経系の影響を除去した粘膜標本においても SP によって prostaglandin 類あるいは thromboxane 類の産生が刺激され、産生されたこれら prostanoid によって短絡電流の増大が誘発されていると考えられた。Prostanoid は、主に粘膜下の mast cell 細胞において産生されるが、最近、線維芽細胞においても prostaglandin が産生されると報告されている。さらに、上皮細胞においても cyclooxygenase が存在し prostaglandin が産生されることが報告されている。本研究において SP によって誘発される prostanoid が粘膜下の細胞に由来するのか、あるいは上皮細胞そのものに由来するのかは確認できなかった。しかしながら piroxicam の前投与により SP による短絡電流の増大は殆ど抑制されたことから、SP が直接上皮細胞に作用してクロライドイオン分泌を誘発している要素は非常に少ないと考えられた。これらの結果から、生体内においては粘膜下神経叢から放出された SP は prostanoid を介して、粘膜上皮でのクロライドイオン分泌を誘発することが示唆された。

前述の実験結果から SP によるクロライドイオン分泌に、prostanoid が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。消化管における prostanoid の産生と分布は多くの研究により検討がなされている[3]。中でも、 $\text{PGE}_2$  は大腸においてクロライドイオンを分泌することが報告されている[4]。 $\text{PGE}_2$  のクロライドイ



オン分泌に対する作用機構は、細胞内 cAMP を上昇させることにより protein kinase A(PKA) を活性化し、管腔側の cyclic fibrosis transmembrane conductance regulator type Cl<sup>-</sup> channel (CFTR) が活性化されることが知られている(2, 3)。また、この PGE<sub>2</sub> によるクロライドイオン分泌作用は、divalent cation ionophore (A23187) やカルシウムイオンを介したクロライドイオン分泌促進物質である bethanechol を同時に作用させることにより、相乗的にクロライドイオン分泌を刺激することが知られている。本研究においても、PGE<sub>2</sub> の前処理により、TTX 及び piroxicam 存在下における SP による短絡電流の増大は、PGE<sub>2</sub> の濃度に依存して増大した。この SP (10<sup>-7</sup>M) と PGE<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup>M) による短絡電流の増大 (387.8 μA/cm<sup>2</sup>) は、それぞれの単独投与時に発現する短絡電流の増大 [SP (10<sup>-7</sup>M; 15.3 μA/cm<sup>2</sup>)、PGE<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup>M; 135.4 μA/cm<sup>2</sup>)] を加算した値 (15.3+135.4=150.7 μA/cm<sup>2</sup>) より大きかった。従ってこの短絡電流の増大は、粘膜上皮での SP 及び PGE<sub>2</sub> による相乗作用によるものであることが考えられた。

この相乗作用による短絡電流の増大がクロライドイオン分泌によるものなのか、あるいはそれとは異なったイオン種によるものなのかを検討するため、溶液中のクロライドイオンを除去して実験を行った。その結果、SP と PGE<sub>2</sub> による短絡電流の増大は、漿膜側のクロライドイオン除去により著しく減少した。従って、SP と PGE<sub>2</sub> による短絡電流の増大は、大部分がクロライドイオン分泌によるものであることが示唆された。[5]

前述したように、prostaglandin によるクロライド分泌機構には細胞内 cAMP の上昇が関与している。そこで、SP 及び PGE<sub>2</sub> の相乗的なクロライドイオン分泌機構に対する細胞内 cAMP の関与について、adenylate cyclase を活性化することによって細胞内 cAMP を上昇させる forskolin と cAMP の誘導体であり、細胞膜を透過して細胞内に取り込まれる 8-bromo-cAMP を用いて検討を行った。Forskolin の漿膜側への投与により、短絡電流は上昇した。一方、8-bromo-cAMP 投与では、短絡電流は減少した。モルモット下部大腸において 8-bromo-cAMP を漿膜側に投与すると、カリウムイオンが分泌されるとする報告がある。従って、本研究の結果も同様の作用であろうと考えられた。しかしいずれにしても細胞内 cAMP を上昇させるような前処置をした後に、SP を投与すると、PGE<sub>2</sub> 前投与の際と同様に、短絡電流は相乗的に増大した。従って、SP と PGE<sub>2</sub> の相乗的なクロライドイオン分泌作用は、PGE<sub>2</sub> 投与による細胞内 cAMP の上昇によることが示唆された。

モルモット下部大腸を用いた組織レベルの研究により、SP は大腸粘膜上皮においてクロライドイオン分泌とそれに伴う水分分泌の誘発物質として機能し、その作用は prostanoid の存在下で発現されることが示唆された。すなわち、消化管では、炎症性の修飾物質である prostanoid と神経伝達物質である SP は協調して水分分泌を制御していると考えられた。そこで、次にこの相乗効果によるク

ロライドイオン分泌機序の細胞内機構を解明していくために、SP の細胞内情報伝達機構について、単離した crypt 底部に位置する単一の粘膜上皮細胞を用いて、共焦点レーザー顕微鏡により検討した。

現在までの粘膜上皮での  $[Ca^{2+}]_i$  変化の研究の多くは、単離した粘膜上皮細胞を用いるか、あるいは単離した crypt を用いて幾つかの細胞を含むある範囲での  $[Ca^{2+}]_i$  動態を研究したものが殆どであり、技術的困難さもあり極性を維持しながら 1 個の粘膜上皮細胞を用いて  $[Ca^{2+}]_i$  動態を検討した研究は殆どないのが現状である。そこで、本研究では、より生理的な状態での  $[Ca^{2+}]_i$  変化を研究するため、単離した crypt 底部に位置する単一の粘膜上皮細胞を用いた。その結果、SP は用量に比例して  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させること、さらにその  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は、細胞外からのカルシウムイオン流入と thapsigargin-sensitive な細胞内カルシウムプールからのカルシウムイオン放出が関与していることが明らかとなった。また、SP による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇には NK1 受容体が関与していることを明らかにした。

現在までの報告では、粘膜上皮細胞を含む多くの非興奮性細胞では、アゴニスト刺激により周期性の  $[Ca^{2+}]_i$  変動が誘発されることが報告されている [6]。しかしながら、本研究では、SP による周期性の  $[Ca^{2+}]_i$  変動は観察されなかった。なぜこのような相違が観察されたかについての正確な原因については現在のところ不明である。

本研究においては、細胞外のカルシウムイオンを除去しても、SP は  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させた。この時の頂値は、細胞外にカルシウムイオンが存在している時と殆ど変わらなかった。しかしながら、刺激により放出されたカルシウムイオンの総量は、細胞外カルシウムイオンの除去により対照時（細胞外にカルシウムイオンが存在する時）の 57% にまで減少していた。これらの結果は、SP による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇には細胞内からのカルシウムイオンの遊離と細胞外からのカルシウムイオン流入の 2 つが関与していることを示唆していた。そこで、細胞内カルシウムイオン遊離にどのような機構が関与しているのかを検討するため、本研究では、細胞内カルシウムイオンを遊離させるために thapsigargin を用いた。Thapsigargin の投与により  $[Ca^{2+}]_i$  は徐々に上昇したが、このような状態で SP 刺激を加えるとは thapsigargin による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に重畳するように  $[Ca^{2+}]_i$  は上昇した。そこで、細胞外カルシウムイオン除去と thapsigargin の前処置とを同時に行った場合の、SP の  $[Ca^{2+}]_i$  に及ぼす影響について検討を加えた。その結果、細胞外カルシウムイオン除去と thapsigargin の前処置により SP による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は、完全に抑制した。従って、SP による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇には細胞外からのカルシウムイオン流入と thapsigargin-sensitive な細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウムイオン遊離の両者が関与していることが示唆された。

現在までのところ、tachykinin 類には 3 種類の異なる受容体の存在が明らかになっている。そこで、本研究でも SP による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇にどのような受容体が

関与しているかを検討した。その結果、SP による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は、NK1 受容体特異的阻害薬である FK888 により完全に抑制された。従って、SP による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇には NK1 受容体が関与していることが示唆された。

本研究により、SP は大腸粘膜上皮において  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させることが明らかとなった。しかしながら、 $Ca^{2+}$  がその他にどのような細胞内機構に影響を与えるのかについては、殆ど明らかにされていない。また、細胞内の cAMP の上昇と  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が同時に発生したとき、多量の  $Cl^-$  の分泌を起こすことは以前より知られていたが、相乗的な  $Cl^-$  の分泌がどのような細胞内機構を介して情報を伝達しているのかについて検討した研究はほとんど無く、詳細は不明である。

本研究では細胞内の cAMP 量を増加させる agonist として  $PGE_2$  を、また細胞内カルシウム濃度を上昇させる agonist として ACh を用いた。これら両者の連続投与により相乗的な  $Cl^-$  分泌が発生した。そこで、本研究では、まずこの相乗的な  $Cl^-$  分泌への CFTR 及び PKA の関与を検討した。CFTR の阻害剤である NPPB と PKA の阻害剤である H-89 は共に  $PGE_2$  と ACh により誘発される相乗的な  $Cl^-$  の分泌を有意に抑制した。従って、 $PGE_2$  と ACh による相乗的な  $Cl^-$  分泌には PKA と CFTR が関与していることが示唆された。

細胞内 cAMP 量の増加は PKA を活性化するが、活性化した PKA は CFTR のリン酸化部位 (R domain) をリン酸化し、CFTR を開口すると考えられている [7-10]。Picciotto MR らは、*in vitro* の実験系で精製した CFTR は PKA, PKC, PKG, CaMK によってリン酸化されることを報告している ([11]。この報告は、PKA による CFTR のリン酸化が可能であることを示している。従って、本研究においても  $PGE_2$  の投与によって活性化された PKA は、CFTR を活性化し  $Cl^-$  の分泌を誘発したものと考えられる。さらに、CFTR の発現は PKA によって調節されているとの報告もある (4)。このことから、PKA は CFTR の発現調節も含めて  $Cl^-$  の分泌を活性化を促す役割を有していると考えられる。更に、近年発見された ezrin は、protein kinase A anchoring protein (AKAP) であり、T84 での発現が確認されている [12]。Ezrin は PKA による CFTR のリン酸化において、CFTR と PKA の連結を補助していると考えられる。これらのことは、PKA が CFTR をリン酸化する可能性をさらに示唆しているものと考えられる。

細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は、様々な細胞内情報伝達系を活性化させることが知られている。しかしながら、 $Ca^{2+}$  依存性のシグナル伝達については、未だ不明瞭な点が多い。そこで、まず  $PGE_2$  と ACh により誘発される相乗的な  $Cl^-$  の分泌に対して、主要な  $Ca^{2+}$  結合タンパクである calmodulin の関与を検討した。 $Ca^{2+}$ /Calmodulin の阻害剤である W-7 の前投与は、相乗的な  $Cl^-$  分泌を抑制した。従って、 $PGE_2$  と ACh により誘発される相乗的な  $Cl^-$  分泌に対して、calmodulin が関与していることが示唆された。そこで、calmodulin の結合によって活性化されることで知られる細胞内情報伝達系に関与する物質 3 種、CaMKII, NOS, MLCK

について検討を加えた。その結果、MLCK の阻害剤 ML-7 は、PGE<sub>2</sub> と ACh による短絡電流の上昇を抑制し、MLCK が相乗的な Cl<sup>-</sup>分泌に影響を与えていることが考えられた。相乗的な Cl<sup>-</sup>分泌への MLCK 関与については、今まで報告がなくその関与は全く不明であった。Hecht. G らは、forskolin や CCh をそれぞれ単独で処置したときに生じる短絡電流の上昇に、MLCK や F-actin が関与することを報告しているが、MLCK を活性化する因子について Ca<sup>2+</sup> や GMP の関与が疑われるが、明確には不明であると述べている (11)。しかしながら、本研究の結果は、MLCK を活性化する因子は Calmodulin であることを明確に示している。この結果から MLCK は細胞骨格を構成する actin との相互作用によって、Cl<sup>-</sup>分泌に影響を与えていることが示唆された。相乗的な Cl<sup>-</sup>分泌への actin 関与について、Matthews JB らは、forskolin と CCh の投与による相乗的な Cl<sup>-</sup>の分泌が actin を安定化させる試薬である jasplakinolide (0.1~1μM) で抑制されることを報告している [13]。彼らは以前に forskolin により誘導される Cl<sup>-</sup>分泌には NKCC1 の活性化が関係し、この NKCC1 の活性化は phalloidin によって抑制されることも報告している [14]。さらに、彼らは jasplakinolide は phalloidin と同じく、NKCC1 の活性化を抑制すると結論づけている。これらの報告から、本研究では actin の安定化が相乗的な Cl<sup>-</sup>の分泌に影響を与えるかを phalloidin を用いて検討した。しかしながら、phalloidin は PGE<sub>2</sub> と ACh による短絡電流の上昇に対して抑制を示さなかった。この理由については、phalloidin の細胞浸透性が弱く、十分な F-actin の安定作用が得られなかったことが原因として考えられる。また、Shapiro. M らは、細胞内 Ca<sup>2+</sup> を上昇させる CCh によって発生する Cl<sup>-</sup>分泌が、phalloidin では抑制されないことを報告している [15]。彼らは、その理由として、phalloidin は F-actin に平行に密着することで安定化の働きを示すが、細胞内に高い濃度の Ca<sup>2+</sup> が存在すると、phalloidin は F-actin から解離してしまい、F-actin は再構成が可能になるためであると報告している。また、本研究では F-actin の形成を阻害する試薬である Cytochalasin D を用いて、相乗的な Cl<sup>-</sup>分泌への F-actin の形成の影響を検討した。その結果、Cytochalasin D によって相乗的な Cl<sup>-</sup>分泌は抑制した。これは actin の重合による F-actin の形成が、相乗的な Cl<sup>-</sup>分泌に必要なことを示唆している。これらの結果は、細胞内 Ca<sup>2+</sup> の増加、Ca<sup>2+</sup>/CaM の産生、MLCK の活性化、F-actin の形成、NKCC1 の調節からなる経路の関与を示唆している。また、F-actin からなる細胞骨格は、CFTR を細胞膜に裏打ちしている NHERF (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulatory factor)-Ezrin 複合体と結合すると言ったモデルが提唱されており、PKA の項で述べた ezrin が関係している可能性もある [16]。

本研究では、PGE<sub>2</sub> と ACh による相乗的な Cl<sup>-</sup>分泌に細胞内 Ca<sup>2+</sup> が重要な役割を果たしていることを明らかにしたが、cAMP と細胞内 Ca<sup>2+</sup> が細胞内情報伝達系のどのレベルで、あるいはどの空間的位置で相互作用を及ぼして相乗的な Cl<sup>-</sup>分泌

を誘発しているかを明確に示すことは出来なかった。従って、今後はこの点について詳細に検討する必要がある。

#### 【謝辞】

本研究を遂行するに当たり、本プロジェクトへの参加を認めて下さいましたソルト・サイエンス研究財団に深謝するとともに、色々な御助言を下さいましたプロジェクト・メンバーの皆様に感謝いたします。

#### 【参考文献】

1. Cooke HJ, Sidhu M, Fox P, Wang YZ, Zimmermann EM, Substance P as a mediator of colonic secretory reflexes. *Am J Physiol* 1997;272: G238-G245.
2. Kuwahara A, Cooke HJ Tachykinin-induced anion secretion in guinea pig distal colon: role of neural and inflammatory mediators. *J Pharmacol Exptl Ther* 1990;252: 1-7.
3. Ding M, Kinoshita Y, Kishi K, Nakata H, Hassan S, Kawanami C, et al. Distribution of prostaglandin E receptors in the rat gastrointestinal tract. *Prostaglandins* 1997;53: 199-216.
4. Frieling, T, Rupprecht C, Dobрева G, Schemann M, Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)-evoked chloride secretion in guinea-pig colon is mediated by nerve dependent and nerve-independent mechanisms. *Neurogastroenterol. Motil* 1994;6: 95-102.
5. Hosoda Y, Karaki S-I, Shimoda Y, Kuwahara A, Substance P-evoked Cl<sup>-</sup> secretion in guinea pig distal colonic epithelia: interaction with PGE<sub>2</sub>. *Am J Physiol* 2002;283: G347-G356.
6. Chew CS, Safsten B, Flemstrong G, Calcium signaling in cultured human and rat duodenal enterocytes. *Am J Physiol* 1998;275: G296-G304.
7. Keely SJ, Barrett KE. Integrated signaling mechanisms that regulate intestinal chloride secretion. In: Barrett KE, Donowitz M editors. *Gastrointestinal Transport: Molecular Physiology* (Vol. 50 from the series *Current Topics in Membranes*) San Diego, Academic Press 2001;249-99.
8. Calderaro, V, Rossi F. Intestinal chloride secretion cyclic AMP and Ca<sup>2+</sup> interaction. In: Gaginella TS, editor. *Regulatory Mechanisms in Gastrointestinal Function* New York, CRC Press, 1995;27-97.

9. Yu Y, Chadee K, Prostaglandin E2 stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. *J Immuno* 1998;161: 3746-52.
10. Picciotto MR, Cohn JA, Bertuzzi G, Greengard P, Nairn AC, Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 1992;267: 12742-52.
11. Bruce JI, Shuttleworth TJ, Giovannucci DR, Yule DI. Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in parotid acinar cells. A mechanism for the synergistic effects of cAMP on Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Biol Chem* 2002;277: 1340-8.
12. Steagall WK, Kelley TJ, Marsick RJ, Drumm ML. Type II protein kinase A regulates CFTR in airway, pancreatic, and intestinal cells. *Am J Physiol* 1998;274: C819-26.
13. Matthews JB, Smith JA, Hrnjez BJ, Effects of F-actin stabilization or disassembly on epithelial Cl<sup>-</sup> secretion and Na-K-2Cl cotransport. *Am J Physiol* 1997;272: C254-62.
14. Matthews JB, Awtrey CS, Madara JL, Microfilament-dependent activation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransport by cAMP in intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1992;90: 1608-13.
15. Shapiro M, Matthews J, Hecht G, Delp C, Madara JL, Stabilization of F-actin prevents cAMP-elicited Cl<sup>-</sup> secretion in T84 cells. *J Clin Invest* 1991;87: 1903-9.
16. Sun F, Hug MJ, Lewarchik CM, Yun CH, Bradbury NA, Frizzell RA, E3KARP mediates the association of ezrin and protein kinase A with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway cells. *J Biol Chem* 2000;275: 29539-46.

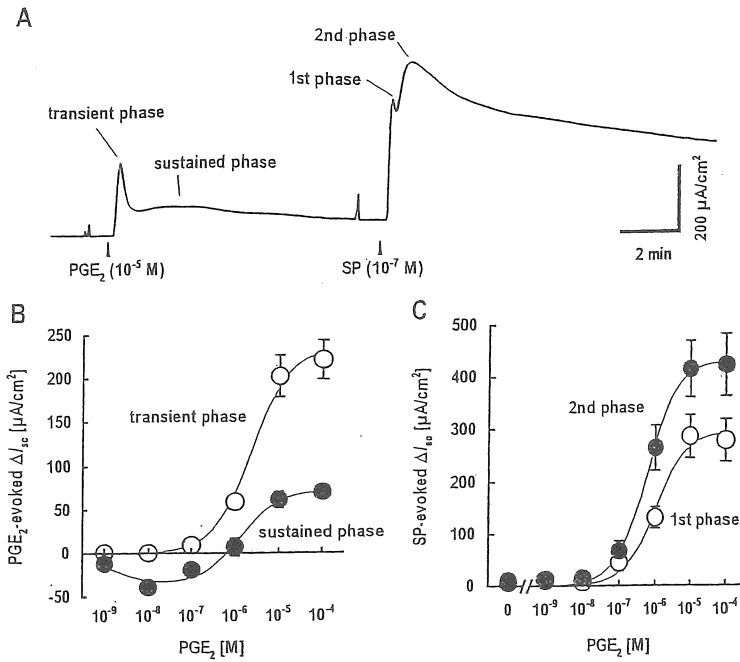


Fig. 1 Effects of PGE<sub>2</sub> and the further addition of SP on I<sub>sc</sub> in the presence of TTX and piroxicam. Various concentrations (10<sup>-9</sup> – 10<sup>-4</sup> M) of PGE<sub>2</sub> were added to the serosal bathing solution, and SP (10<sup>-7</sup> M) was added to the serosal bathing solution 10 min after the addition of PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> and the further addition of SP-evoked changes in I<sub>sc</sub> were measured. A: representative trace of effects of PGE<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup> M) and the further addition of SP (10<sup>-7</sup> M) on I<sub>sc</sub>. B and C: concentration-response curves of PGE<sub>2</sub> (B) and the further addition of SP (C)-evoked changes in I<sub>sc</sub>. Peak values were expressed as means ± SE, n= 4-15

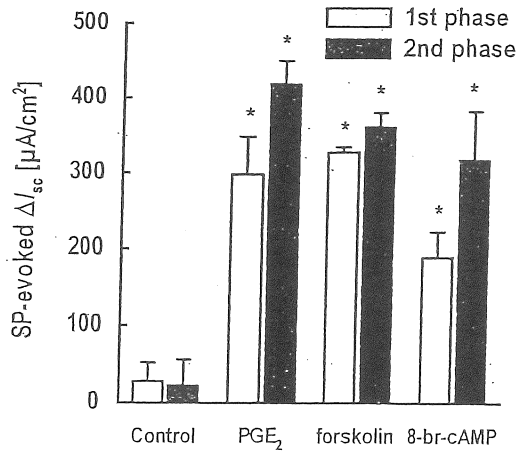


Fig. 2 Effects of PGE<sub>2</sub>, forskolin and 8-bromoadenosine cAMP (8-br-cAMP) on the SP-evoked increase in I<sub>sc</sub>. PGE<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup> M), forskolin (10<sup>-5</sup> M) or 8-br-cAMP (10<sup>-3</sup> M) were added to the serosal bathing solution 10 min before the addition of SP (10<sup>-7</sup> M) and the SP-evoked increase in I<sub>sc</sub> was measured. All tissues were pretreated with TTX and piroxicam. Peak values were expressed as means + SE, n=3 – 4, \* p<0.05 vs. control

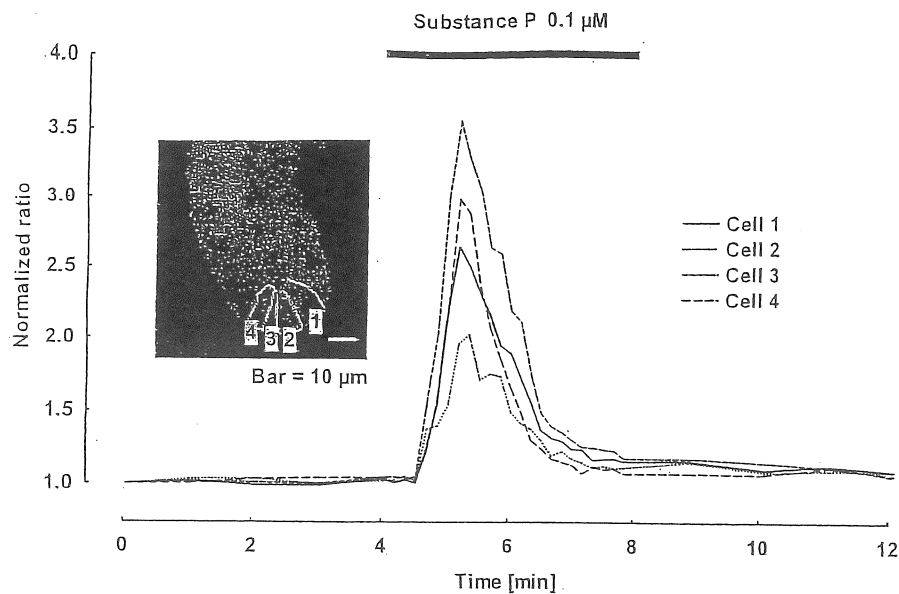


Fig. 3 : Effects of SP on  $[Ca^{2+}]_i$  of isolated crypt cells. Graph shows time course of SP-induced changes in  $[Ca^{2+}]_i$  of individual four crypt cells (No. 1-No. 4 as shown in inset, digital pseudocolor images). SP containing Krebs-Ringer solution was perfused starting from 4 to 8 minutes., then SP was washed out. Lower panel shows of  $0.1 \mu M$  SP-induced changes in  $[Ca^{2+}]_i$  in isolated crypt cells. Solid line indicated presence of  $0.1 \mu M$  SP in the perfusate.

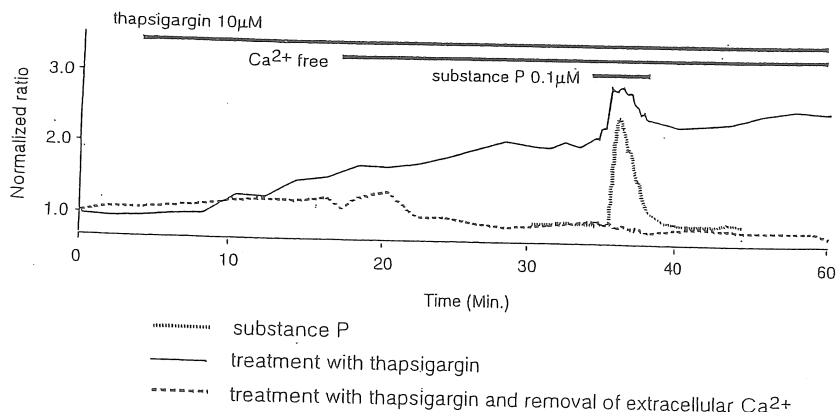


Fig. 4: Effects of thapsigargin and extracellular  $Ca^{2+}$  free conditions on SP-induced changes in  $[Ca^{2+}]_i$  in isolated crypt cells. Representative traces of SP-induced changes in  $[Ca^{2+}]_i$  in the presence of thapsigargin (solid line), combination of thapsigargin pretreatment and extracellular  $Ca^{2+}$  free solution (dashed line) or SP alone (control; dot line). The Cells were exposed to thapsigargin (time 2 min.-60 min.;  $10 \mu M$ ) then cells were stimulated with  $0.1 \mu M$  SP (time 34 min.-38 min.). Thapsigargin reduced the SP-induced increase in  $[Ca^{2+}]_i$  (\*  $p < 0.05$ , vs control;  $n=6$ ). Combination of thapsigargin pretreatment and extracellular  $Ca^{2+}$  free condition abolished the substance P-induced increase in  $[Ca^{2+}]_i$  on isolated crypt cells from distal colon (\*\*  $p < 0.005$  vs control;  $n=6$ ).



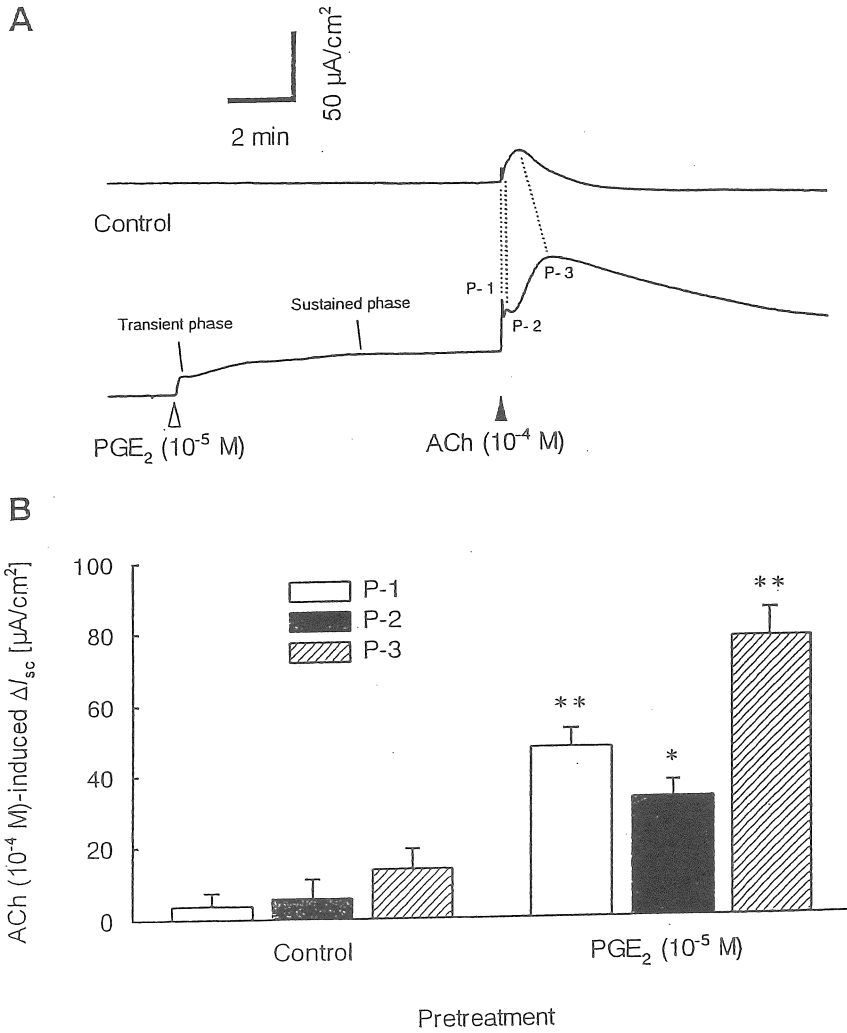


Fig. 5 Effect of PGE<sub>2</sub> and the further addition of ACh on I<sub>sc</sub> in T84 cell monolayer. 10<sup>-5</sup>M PGE<sub>2</sub> was added to the serosal bathing solution, and 10<sup>-4</sup>M ACh was added to the serosal bathing solution 10 min after the addition of PGE<sub>2</sub>. A: Representative traces of the effects of PGE<sub>2</sub> on ACh-evoked changes in I<sub>sc</sub>. Lower trace shows a representative trace of the ACh-evoked response 10 min after the addition of PGE<sub>2</sub> in the presence of piroxicam. B: Effect of PGE<sub>2</sub> and the further addition of ACh on I<sub>sc</sub>. All tissues are pretreated with piroxicam. Peak values were expressed as means ± SE, n=4, \* p<0.05, \*\* p<0.01.

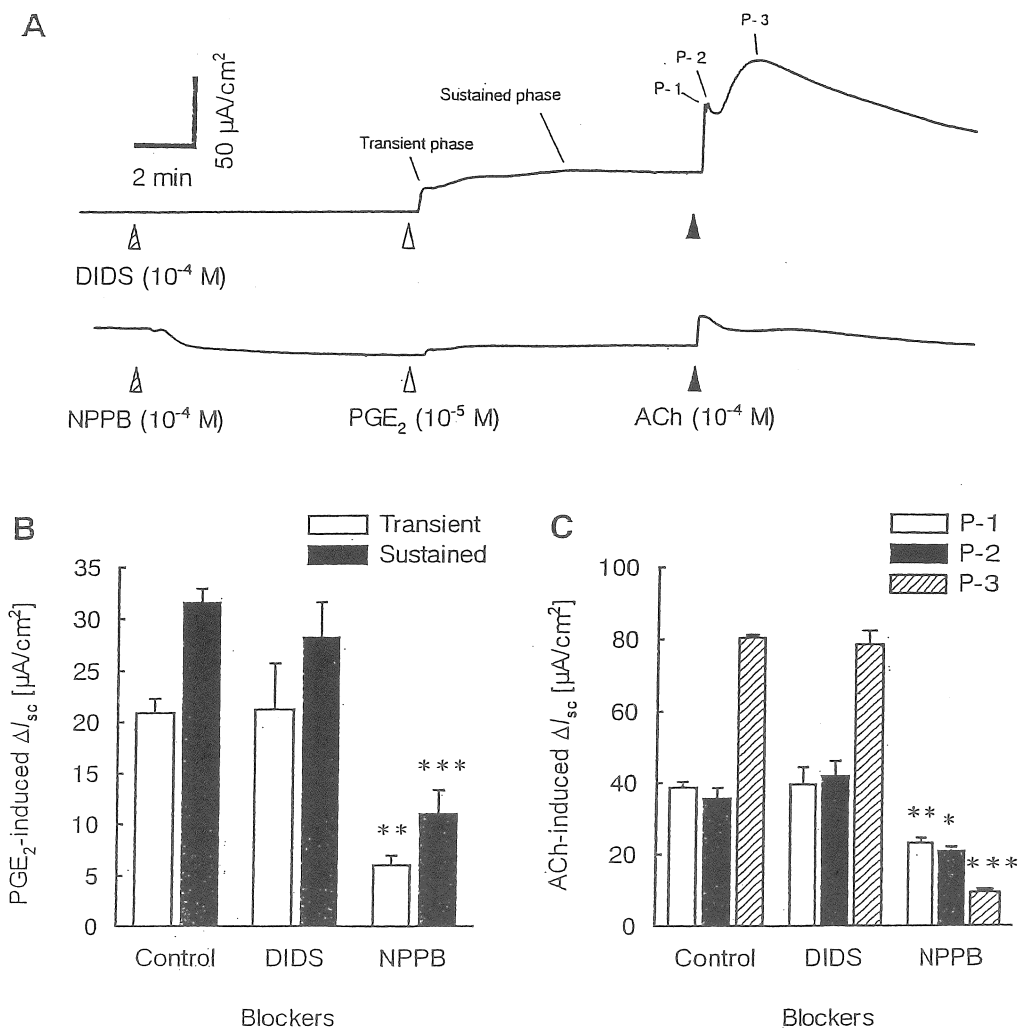


Fig. 6 Effects of a Ca<sup>2+</sup> dependent Cl channel blocker, DIDS and an anion channel (including CFTR) blocker, NPPB on PGE<sub>2</sub>-dependent ACh-evoked increase in I<sub>sc</sub>. NPPB 10<sup>-4</sup>M or DIDS 10<sup>-4</sup>M was added to the apical side 10 min before addition of ACh. Even in the presence of DIDS, PGE<sub>2</sub>-dependent ACh-evoked increase in I<sub>sc</sub> did not change; the values of ΔI<sub>sc</sub> were similar to those of control (Fig. 6A lower trace & B). DIDS also did not affect PGE<sub>2</sub>-evoked an increase in I<sub>sc</sub> (Fig. 3B). On the other hand, NPPB significantly reduced the transient and sustained PGE<sub>2</sub>-induced response from 20.89 ± 1.40 μA/cm<sup>2</sup> and 31.59 ± 1.36 μA/cm<sup>2</sup> to 5.97 ± 0.93 μA/cm<sup>2</sup> (p<0.01) and 10.95 ± 2.36 μA/cm<sup>2</sup> (p<0.001), respectively as shown in Fig. 3B. In the presence of NPPB, PGE<sub>2</sub>-dependent ACh-evoked an increase in I<sub>sc</sub> significantly decreased from the control values of 38.76 ± 1.62 μA/cm<sup>2</sup> (P-1), 35.66 ± 3.02 μA/cm<sup>2</sup> (P-2) and 80.53 ± 0.92 μA/cm<sup>2</sup> (P-3) to 23.12 ± 1.39 μA/cm<sup>2</sup> (p<0.01), 20.80 ± 1.24 μA/cm<sup>2</sup> (p<0.05) and 9.40 ± 0.89 μA/cm<sup>2</sup> (p<0.001) respectively (Fig.3A and C, n=4).

## 7. 腎における役割：新生児早期の尿濃縮機構形質転換における腎

### 髓質部尿細管クロールイオン輸送機序の解析

助成研究者 根東 義明（東北大学大学院医学情報学分野）  
共同研究者 飯沼 一字（ 同 小児病態学分野 ）  
森本 哲司（ 同 上 ）  
西尾 利之（ 同 上 ）

#### 【要 約】

尿濃縮機構は、出生を境にして出現する重要な生体機能だが、その発生過程はいまだ不明の部分が多い。本研究では、尿濃縮機構の発生過程で質的転換を起こすことがこの間の研究成果で明らかとなったヘンレの細い上行脚の詳細な検討を行った。

とくに胎児期に存在し、出生後急速に消失するNKCC2クロール輸送体の消失過程を詳細に検討し、新生児初期には哺乳類の種を超えてヘンレの太い上行脚と同様のNaCl再吸収機序が存在し、その消失過程が出生自体を契機としない発生プログラム上の過程であることを明らかにした。また、NKCC2ノックアウトマウスでの検討結果からは、輸送体機能の発現調節が、ちょうどクロールチャンネルCLC-K1と同様に、mRNAの産生量だけではなくposttranscriptionalに調節される複雑な機構であることが証明された。

#### 【はじめに】

哺乳類では、出生を契機として、胎生期の羊水・胎盤を基本とする母体依存環境から、哺乳・肺呼吸による新生児期の自立環境へと急激な環境変化がおこる。また、出生後は離乳に向けて、尿濃縮による水分代謝の急激な変化への適応が要求される。

新生児では、胎児期に発達した糸球体での本格的なる過量の増加と尿細管機能の成熟度の低さによる事実上の腎性尿崩症とも呼べる機能上の特徴が見られる。哺乳に要求される低浸透圧尿の排泄能力は出生時よりすでに成熟し、成人と同程度の低張尿が排泄できる[1]、尿濃縮力は著しく低いため、哺乳中断などが著しければ容易に脱水に陥る。

こうした尿の希釈・濃縮力の成熟度の不均衡について、これまでの研究成果は、腎髄質部やヘンレループの長さ、抗利尿ホルモン感受性の低さ、腎髄質部におけるプロスタグランディンの過剰産生などをその原因として指摘してきた [1, 2]。

最近我々は、Kimらの新知見である新生児ラットの細いヘンレの上行脚の形態変化に強い関心をもち [3, 4]、新生児ラットの腎髄質部尿細管の水・電解質輸送特性を、分子生物学的・形態学および生理学的手法のすべてを用いて解析した結果、単に腎髄質部の機能が量的に低いということではなく、それ以上に質的にその機能構成が異なっていることを見出した。この「新生児型」の髄質部尿細管の機能構成は、あるいは「鳥類型」とも呼べるほど成熟時とは異なるもので、具体的には、(1) ヘンレループ全体に渡って水透過性が存在しない、(2) ヘンレの上行脚全体に渡って、クロールイオンの能動輸送が存在する、(3) ヘンレの上行脚には、成熟時に見られる高度な受動的クロールイオン透過性が存在しない、(4) 髄質部集合尿細管には、能動的かつ起電的なアミロライド感受性ナトリウム再吸収能が存在する、(5) 髄質部集合尿細管では、抗利尿ホルモンの存在の有無にかかわらず、尿素を利用した水の再吸収能が見られない、などがその特徴として挙げられた。

実は、これらの観察結果は、すべて鳥類の腎臓に共通する特徴と同じであり [5-7]、結果的に、新生児では腎髄質部に NaCl のみを貯留させて高浸透圧環境を構築する尿濃縮機構が存在し、尿素を用いた哺乳類独特の尿濃縮機構が出現していないという事実を示唆するものだった。

さらに興味深いことには、ラット新生児の腎髄質部尿細管機能の成長過程を詳細に観察していくと、これらの鳥類と類似した特徴のすべてが生後 2 週間のうちに哺乳類本来のシステムに置き換えられることが明らかとなってきた。

今回、こうした新しい尿濃縮機構の質的転換という成熟過程のコンセプトを樹立するにあたり、重要な疑問が生じた。それは、まず第一に今回の腎髄質部尿細管における機能転換の過程がラットだけに起こる特徴ではないかどうかという疑問、また、どのようにして出生時にこのような著しくダイナミックな各種尿細管機能の転換が起こるのかという点である。心・循環器系の成熟過程では、出生時には、酸素分圧の上昇にしたがって、動脈管の閉鎖と器質化が進行するというのは周知の事実だが、果たして同様の機転が腎髄質部の形質転換においても起こっているのかも、これまでには知見がない。

今回のプロジェクト研究では、この形質転換上、特に重要で特徴的な役割を果たすヘンレの細い上行脚でのクロールイオン輸送機構の成熟過程に着目し、初年度（平成12年度）にはその基本的現象を複数の動物種を含めて観察し、その質的転換過程の *in vitro* における観察実験系の確立を試みた。第2年度（平成13年度）には、形質転換における各種クロールイオン輸送体の発

現および機能の変化の過程と、それらを調節する因子を詳細に検討した。第3年度（平成14年度）には、視点をこの能動的クロール輸送にとってもっとも重要なNKCC2輸送体の発現調節にむけ、NKCC2遺伝子ターゲティングマウス[8]におけるNKCC2遺伝子と蛋白機能の発現を詳細に検討するなかで、その発現調節のメカニズムの解析を進め、新生児期におけるさまざまな輸送体発現調節機構との関連性に関する考察を試みた。

## 【研究 方 法】

上述のような尿濃縮システムの発達過程の検討を行うため、単離尿細管微小灌流法による尿細管機能の検討により、研究を遂行した。取り分けて、クロールイオン輸送が出生後大きく変化すると考えられたヘンレの細い上行脚に焦点を絞り、さらにNKCC2遺伝子ターゲティングマウスにおける各種の機能解析も最終年度に行った。

### ■ 研究プロジェクト（平成12年度） 周産期における腎髄質部尿細管各部機能の検討

従来の研究方法と同様に[9-11]、胎生・新生期および成熟ラットの腎髄質内層の各尿細管を、実体顕微鏡下に微小単離し、倒立顕微鏡に設置されたチャンバー内で、マニピュレータを用いて管腔を灌流した。管腔内外の溶液組成を変更して経上皮電位を測定したり、管腔内に投与したアイソトープラベルの水・尿素の管腔外への流出を測定することにより、電解質および水・尿素の透過性を測定し、日齢による変化を観察した。また、ラットのみでなく、種差による影響を排除するため、マウスおよびハムスターの新生仔を用いて、同様に経上皮電位を測定し、能動的なクロールイオンの再吸収がヘンレの細い上行脚において行われているかどうかを明らかにし、哺乳類に普遍的な現象として新生児期に尿濃縮機構の転換が起こっているかどうかを検討した。

### ■ 研究プロジェクト（平成13年度） 新生児期の腎髄質部形質転換における転換因子の検討

初年度と同様に、新生児期および胎児期のヘンレの細い上行脚における能動的クロールイオン輸送機構の消失過程を単離尿細管微小灌流法を用いて検討した。第2年度プロジェクトでは、質的転換が出生自体と直接連携された過程なのか、あるいはすでに発生過程でプログラムされた現象なのかを明らかにし、質的転換に直接関与する因子を今後さらに詳細に検討していく上での方向性を明らかにすることを目的としてプロトコールを作成した。具体的には、妊娠日齢17日のラットにおいてプロゲステロンを連日筋注するか、ある

いは子宮頸部を手術的に結紮することにより、出産時期を3日間延長した胎仔において、ヘンレの細い上行脚の能動的クロールイオン輸送電位が、胎生で日齢を同じくする正常出生新生仔ラット日齢3日の電位と比較し、いまだ未成熟のまま高値を示すかどうかを検討した。また、免疫蛍光染色法を用いて、両者のNKCC2蛋白の発現状況を組織学的に検討し、出生の延長が質的転換過程をも延長させるかどうかを解析した。

#### ■研究プロジェクト（平成14年度） NKCC2遺伝子ターゲティングマウスを用いた輸送体機能発現の検討

NKCC2遺伝子ターゲティングマウスの正常個体とヘテロ個体について、それぞれに血圧などをはじめとする各種の生理学的な計測を行い、尿量などについても測定を行った。また、腎における各種イオン輸送体mRNAの発現をこれらの正常とヘテロ個体において比較検討した。さらに、本研究の焦点となったNKCC2蛋白の腎における発現についても解析を行った。また、従来の研究方法と同様に[9-11]、マウスの腎髄質外層に存在するヘンレの太い上行脚を、実体顕微鏡下に微小単離し、倒立顕微鏡に設置されたチャンバー内で、マニピュレータを用いて管腔を灌流した。管腔内外の溶液組成を変更して経上皮電位を測定し、能動的なクロールイオンの再吸収がヘンレの細い上行脚において行われているかどうかを明らかにし、新生児期の尿濃縮機構の転換が出生とどのような関連をもって起こっているかもを検討した。

### 【成 績】

#### ■研究プロジェクト1 周産期における腎髄質部尿細管各部機能の検討

細いヘンレの上行脚では、生後5日までの間、管腔側が正の電位が認められた。管腔側正の電位は、日齢1日のラットでは、管腔内溶液の灌流速度が2 nl/min以下では、+15 mV前後だった。管腔内が正の電位は、灌流速度依存性が極めて高く、灌流速度を20 nl/min以上とすると大きく低下し、5mV前後で安定化した。管腔内溶液の灌流速度の変化による経上皮電位の著しい変化については、図1にその代表例を図示する。ラットにおける実験結果では、これらの電位はいずれも管腔内のbumetanideに抑制されるほか、管腔側のバリウム、血液側のouabainなどにより抑制され、ヘンレの太い上行脚とほぼ同様の機序によりNaClが再吸収されていることが明らかとなった。図1では、当初、管腔内灌流速度が20 nl/min以上の速さで見られた管腔内正の経上皮電位の約5 mVが、灌流速度を生理的状態に近い2 nl/min前後に低下させることにより、大きく増強され、約20 mVにも達すること、さらにその電位が血液側に加

えられた1mMのouabainで抑制され、Naポンプにより維持される能動的な再吸収機序であることを明確に示している。以上の実験結果は、ヘンレの細い上行脚における新生児期の自発経上皮電位が従来の成熟した太いヘンレの上行脚において観察されたNaCl能動輸送と同等のものであることを明らかに示したものである。

管腔内正の電位が、ヘンレの太い上行脚同様に抗利尿ホルモンで促進されるかどうかを明らかにするため、ラットの日齢1日の新生仔より単離灌流したヘンレの細い上行脚において、血液側溶液中に $10^{-9}$  Mの抗利尿ホルモン (AVP) を投与し、およそ20分間にわたって経上皮電位を観察したが、成熟ラットのヘンレの太い上行脚で見られるような経上皮電位の増強は観察されず、新生仔ラットのヘンレの細い上行脚におけるNaClの能動的再吸収機序には、ヘンレの太い上行脚で見られるような抗利尿ホルモンによる調節機序は働かないことが明らかとなった。

管腔側正の自発電位の種差による影響を明らかにするため、日齢1のマウスおよびハムスターより細いヘンレの上行脚を単離し、その経上皮電位を測定した。管腔内灌流速度が2 nl/min以下の状態では、管腔内正の15 mV前後の電位が、マウスおよびハムスターのいずれにおいても見られ、いずれの場合にも、管腔側正の自発電位は灌流速度を増加させることにより低下し、20 nl/min以上の灌流速度では定常化し、5 mV前後で安定した。

図2には日齢1ハムスター新生仔のヘンレの細い上行脚における経上皮電位の代表的観察結果、図3には日齢1マウス新生仔より単離灌流したヘンレの細い上行脚における経上皮電位の観察結果を示す。いずれの種においても、ラットと同様に能動的クロール輸送によると言える管腔側正の経上皮電位が明確に観察されている。

以上のデータより、新生仔に見られる能動的なNaCl再吸収機序は、ラットに限定されない普遍的な哺乳類新生仔のヘンレの細い上行脚の機能であることが強く示唆された。

## ■研究プロジェクト2 新生児期の腎髄質部形質転換における転換因子の検討

ラットの在胎期間を変化させた場合に起こるヘンレの細い上行脚の成熟度の変化を観察するため、在胎期間の短縮ないしは延長が考えられるが、短縮についてはこれまで1日を越えて短縮させる技術を確立したとの報告がなく、在胎日数の短縮によりヘンレの細い上行脚の成熟が促進されるかどうかを検討することが困難であることから、在胎日数の延長により成熟が遅延するかどうかの検討を行った。在胎日数の延長は、2つの方法により行った。第1の方法としては、妊娠17日目の母親ラットの子宮頸部を手術的に結紮し、妊娠

日数を3日間延長した上で、ジエチルエーテル麻酔下に帝王切開で胎児を摘出し、腎髄質部からヘンレの細い上行脚を微小単離し、倒立顕微鏡下にて微小灌流をおこない経上皮電位を観察した。第2の方法としては、妊娠17日目の母親ラットにプロゲステロンを連日筋注し、妊娠日数を3日間延長した上で、第1法と同様に帝王切開にて胎児を摘出した上で、ヘンレの細い上行脚の機能を検討した。また、第1法にて摘出した腎髄質内層については、クロール共輸送体であるNKCC2の発現状況を蛍光抗体法により観察し、レーザーシザーズ法により組織切片より微小摘出した腎髄質内層組織片においても、NKCC2のmRNA発現をRT-PCR法により検討した。

まず、経上皮電位については、図4に示したごとく、正常分娩にて出生した日齢0の新生児ラットの経上皮電位が平均13.8mVで日齢3には2.9mVに低下したのに対し、子宮頸部の結紮により3日間在胎日数を延長した胎児ラットでも経上皮電位は4.9mVに低下し、同日齢のプロゲステロン処理の場合にも、経上皮電位は3.4mVと大幅に低下していた。

さらに、第1法により3日在胎日数を延長した胎児ラットでは、腎髄質部におけるNKCC2蛋白の発現は、むしろ正常分娩の日齢3の新生児ラットと比較してもさらにその発現量が低下していると考えられる蛍光抗体の染色結果を示した。また、RT-PCR法による検討では、NKCC2の発現は、蛍光抗体法と同様に、正常分娩日齢3でも在胎日数23でも同程度の発現量と考えられた。

以上の結果から、ヘンレの細い上行脚における出生直後の形質転換は、胎児の発生プログラムに従った発達過程であり、出生を契機とした環境変化とは直接関係を持たないプロセスであることが明らかとなった。

### ■研究プロジェクト3 NKCC2遺伝子ターゲティングマウスを用いた輸送体機能発現の検討

まず、正常 (NKCC2+/+) およびヘテロ (NKCC2+/-) マウスの基本的生理機能を比較するため、血圧・血漿レニン活性・尿量・尿浸透圧・絶飲14時間後の最大尿浸透圧・体重の4%分の水分負荷時の最小尿浸透圧をそれぞれで測定した。その結果、これらの値はいずれも正常とヘテロにおいて差がないことが証明された。

次に、NKCC2の発現をメッセージおよび蛋白レベルで解析するため、NKCC2のmRNA・蛋白量をそれぞれRT-PCR法およびイムノブロット法により測定した。また、NKCC2抗体を用い、腎髄質外層におけるNKCC2の発現を形態学的に解析した。その結果、mRNA発現量は、NKCC2+/-ではNKCC2+/+の55%とおよそ半減していた。しかし、蛋白量は、想定される半減ではなく、ほぼ同量の発現がNKCC2+/-とNKCC2+/+で見られ、結果的にmRNAが少ないにもかかわらず蛋白は正常量が発現されており、posttranscriptional に輸送体蛋白の産生が調節



されていることが明らかとなった。

次に、発現したNKCC2蛋白が実際にヘンレの太い上行脚でのNaCl再吸収を支えているかどうかを機能面から明らかにするため、微小単離尿管灌流法による経上皮電位の測定を行った。NKCC2+/-とNKCC2+/+の両方のマウスの腎髄質外層より単離したヘンレの太い上行脚において、自発的経上皮電位の比較を行うとともに、管腔側に0.1mMブメタニドを投与したときをはじめ、管腔側に1mMバリウム、血液側にウアバイン、Cl輸送阻害薬NPPB、さらには1nM vasopressinを投与した際の電位変化の違いを観察した。図5に示すように、NKCC2+/-マウスとNKCC2+/+マウス間ではいずれの条件下でも経上皮電位の変化量に有為な差が認められず、ヘテロマウスでもヘンレの太い上行脚が正常と同等のNaCl再吸収能をもち、NKCC2輸送体が正常と同程度に機能していることが強く示唆された。

また、腎内において他のイオン輸送体がNKCC2のmRNAの発現量減少に対して代償的に発現量を変化させている可能性がないかどうかを検討するため、腎全体におけるNaCl共輸送体NCC・ENaCの3サブユニットのそれぞれ、NaKATPaseの $\alpha$ 1および $\beta$ 1サブユニットのそれぞれ、さらにKチャンネルROMKと水チャンネルAQP2のmRNA発現量をNKCC2+/-とNKCC2+/+の間で比較検討した。この結果、いずれの輸送体のmRNAの発現量も両者間で違いを認めなかった。

この他、免疫ブロット法により、同様にNa/H交換輸送体NHE3・Na/リン酸共輸送体NaPi-2・NCC・ENaC各サブユニット・NaKATPase・AQP1・AQP2・AQP3のそれぞれの蛋白発現量を検討したが、いずれもヘテロマウスと正常マウス間には差が見られなかった。

以上のことから、NKCC2の新生児期における発現調節が、すでにCLC-K1の発現の検討の際にも明らかになってきたように、mRNAの発現量だけから類推することはできず、posttranscriptionalな調節機構が実際の機能発現の時期に重要な意味をもち、こうした視点からの尿濃縮機構の発達過程の詳細な検証が必要であることが明らかとなった。

## 【考 察】

プロジェクト1の研究成果の主要な到達点は、ラット新生児のヘンレの細い上行脚で見られる管腔側正の自発電位が、管腔内バリウムでも抑制されて、最終的にはヘンレの太い上行脚のそれとほぼ同じ機序によると解釈されることと、その電位が灌流速度に著しい依存性をもつことを明らかにした。また、ラットのみでなく、マウスやハムスターなどの他の哺乳類でも同様に観察さ

れる哺乳類に普遍的な現象であることを確定させた。

実は、形態学的な検討報告を文献的に検証してみると、すでに1927年にはPeterにより、ヒトの新生児のヘンレループでも、細い上行脚が太い上行脚の形態をとっていることが確認されており[12]、新生児期における尿濃縮機構の質的転換過程は、ヒトにまで及ぶ広い範囲での腎髄質部の発達過程であることが明らかとなってきた。さらに古い文献を紐解いていくと、ラット腎髄質部が新生児期に髄質内層(乳頭部)を持たないとする観察結果がすでに1890年に報告されていることすら明らかとなり[13]、腎髄質部の新生児期における形質転換の可能性自体は、大変古くから知られていたことが改めて確認された。

また、ヘンレの細い上行脚において、経上皮電位が抗利尿ホルモンにより促進されなかった事実は、Ostrowskiらが報告しているようなV2レセプターがヘンレの太い上行脚では出生前には発現しないという結果[14]と一致するものであり、今後さらに詳細な検討を必要とするものの、ヘンレの上行脚における抗利尿ホルモンの生理的作用の出生後の出現と言う点で、尿濃縮機構の質的転換過程と一致する重要な所見と思われた。今後の研究成果により、さらにこれらの点も明らかにしたい。

プロジェクト2の研究では、当初予想していた出生に関連する形質転換促進因子の存在を否定する結果を得ることとなった。本来、尿濃縮機構は在胎時には存在せず、出生後に著しい発達過程をたどることは周知の事実であるが、今回の研究成果が示すことは、尿濃縮機構の出現時期は、出生に規定されたものではなく、何らかの必然は予想されるものの、出生時期に大まかに重なって発達しているということである。したがって、在胎日数の延長した過熟児においては、すでに胎内において尿濃縮力を持ち、出生時には尿濃縮力も発達過程を先に進めていると理解できるものと思われる。言い換えれば、尿濃縮力の出現が胎生期には必ずしも障害となるものではなく、尿濃縮力の出生直後の出現も、新生児においては出生と厳格にリンクしなければならない現象ではないことを示唆している。

これらの研究成果では、早産などで腎髄質部の発達過程がより未熟である新生児の観察により、尿濃縮力の出現を促す直接的な因子を解明するという意味では、残念ながら有用な情報を得られなかった。しかし一方で、腎髄質部における尿濃縮機構の質的転換による成熟過程が、単に尿細管の発生プロセスの一段階としてプログラムされたものであり、出生自体とは無関係に起こる現象として捕らえなおすことができた。このことは、新たに形質転換因子の解明を進める上ではたいへん重要な情報であり、今後の研究を大きく方向付けたと言える。

このほか、むしろ在胎期間が長いラットの方が正常在胎期間で出生した場

合よりもヘンレの細い上行脚の形質転換が早く進んでいるという印象を受ける結果を得た。残念ながら、検討したラットの数が制限されているために、最終的な結論を出すことは現時点では不可能であるが、あるいは胎内のほうが成熟過程にとって有利な条件がそろっているために、むしろ形質転換が早く起こっているのではないかと予想される点が興味深い。

最後にプロジェクト3の研究では、これまでにすでに明らかにすることの出来た腎髄質部の形質転換過程におけるNKCC2の発現変化の概要をさらに掘り下げ、NKCC2の発現が単にmRNAの発現のみにより調節されるものではなく、mRNA発現後のposttranscriptional processにおいても大きくその蛋白と機能の発現が調節されていることが明らかとなってきた。これまでの我々の研究成果においても、新生児早期にすでにクロールチャンネルCLC-K1が腎髄質内層のヘンレの細い上行脚においてmRNAの検討上は発現しているにもかかわらず、その蛋白および機能の発現がまったくみられず、その後徐々に発現量を増していることを明らかにしてきたが、今回のNKCC2遺伝子ターゲティングマウスにおけるmRNA発現量とその機能発現との相関関係は、我々がCLC-K1で見出した調節とはちょうど逆の関係において、実際の輸送体蛋白機能発現が調節されていることを指し示している点で極めて興味深い。

この点からこれまでの研究成果を振り返った場合、たとえば AQP2 の発現は、新生時期のラットではその機能発現と併行し、AQP 1 でもやはり同様に mRNA の出現とともにその機能の発現が見られていた。また、新生児期のヘンレの細い上行脚における NKCC2 の発現消失過程についてみると、まず機能の消失が先に起こり、さらに mRNA の発現もわずかに遅れて消失するようにも思われる。これらの点を総合的に考えるならば、必ずしもこうした posttranscriptional regulation による機能発現調節は一定したものではなく、その輸送体のおかれている状況によって大きな役割を演じたり、ほとんど見られなかったりするものであることがわかる。こうした差がどのような意味を持つのかについては、それぞれの状況により異なるものであり、現時点ではその意味を総合的に位置付けることは大変難しいと思われるが、今後この分野での検討が腎尿細管機能の解析の中でもさらに詳細に進むことにより、新生児期の発達過程における輸送体の発現調節の全体像がさらに明らかになってくるものと考えられる。

今回の研究で検討し得なかったことで、とりわけ興味深いことは Angiotensinogen をはじめとするレニン・アンジオテンシン系の遺伝子ターゲティング動物において、腎髄質部の発達が著しく阻害されるという研究結果が見られることである[15]。今回の研究に際してこうした遺伝子ターゲティングマウスを入手できなかったことは大変残念だが、今後こうした動物を入手し、その詳細を検討することにより、どのような機序が腎髄質部における尿濃縮機構の構築を導いているのかについての新しい知見が明らかになってくるものと予

想される。また鳥類では、新生児期の哺乳類と同様の尿濃縮機能が見られることがこの間の我々の研究成果により明確となってきたが[5-7, 16]、こうした形質転換因子がどのように発現しているのかをめぐって比較生理学的に検討されることも、系統発生と個体発生の両者を結びつける新しい考え方を明らかにしていく上で重要な意義を持つものと考えられる。

#### 【謝 辞】

本研究にあたり、ソルト・サイエンス研究財団の助成及び、研究成果への批評や研究の方向性について適切かつ懇切丁寧なご指導をいただいた自治医科大学今井正教授に心よりお礼申し上げます。また、アシスタントとして大変ご協力をいただいた佐藤直子さんに感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Spitzer A, Schwartz G. The kidney during development. In Windhager E, editor. Handbook of Physiology: Renal Physiology (vol Vol 1.), edited New York, Oxford University Press, 1992:475-544.
2. Edwards BR, Mendel DB, LaRochelle FT, Jr., Stern P, Valtin H. Postnatal development of urinary concentrating ability in rats: changes in renal anatomy and neurohypophysial hormones. In Spitzer A, editor. The Kidney During Development: Morphology and Function, New York, Masson, 1981:233-40.
3. Kim J, Lee GS, Tisher CC, Madsen KM. Role of apoptosis in development of the ascending thin limb of the loop of Henle in rat kidney. Am J Physiol 1966;271: F831-45.
4. Cha JH, Kim YH, Jung JY, Han KH, Madsen KM, Kim J. Cell proliferation in the loop of henle in the developing rat kidney. J Am Soc Nephrol 2001;12: 1410-21.
5. Nishimura H, Imai M, Ogawa M. Diluting segment in avian kidney. I. Characterization of transepithelial voltages. Am J Physiol 1986;250: R333-40.
6. Nishimura H, Koseki C, Imai M, Braun EJ. Sodium chloride and water transport in the thin descending limb of Henle of the quail. Am J Physiol 1989;257: F994-1002.
7. Nishimura H, Koseki C, Patel TB. Water transport in collecting ducts of Japanese quail. Am J Physiol 1996;271: R1535-43.
8. Takahashi N, Chernavvsky DR, Gomez RA, Igarashi P, Gitelman HJ, Smithies O. Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97: 5434-9.
9. Imai M, Kokko JP. Mechanism of sodium and chloride transport in the thin ascending limb of Henle. J Clin Invest 1976;58: 1054-60.
10. Kondo Y, Fromter E: Axial heterogeneity of sodium-bicarbonate cotransport in proximal straight tubule of rabbit kidney. Pflugers Arch 1987;410: 481-6.
11. Kondo Y, Abe K, Igarashi Y, Kudo K, Tada K, Yoshinaga K. Direct evidence for the absence of active Na<sup>+</sup> reabsorption in hamster ascending thin limb of Henle's loop. J Clin Invest 1993;91: 5-11.
12. Peter K: Untersuchungen uber Bau und Entwicklung der Niere. Fischer Jena 1927;2: 522-647.
13. Hamburger O: Uber die Entwicklung der Säugetierniere. Arch Anat Physiol

1890;Suppl. : 15-51.

14. Ostrowski NL, Young WS, Knepper MA, Lolait SJ: Expression of vasopressin V1a and V2 receptor messenger ribonucleic acid in the liver and kidney of embryonic, developing, and adult rats. *Endocrinology* 1993;133: 1849-59.
15. Niimura F, Labosky PA, Kakuchi J, Okubo S, Yoshida H, Oikawa T, et al. Gene targeting in mice reveals a requirement for angiotensin in the development and maintenance of kidney morphology and growth factor regulation. *J Clin Invest* 1995;96: 2947-54.
16. Miwa T, Nishimura H: Diluting segment in avian kidney. II. Water and chloride transport. *Am J Physiol* 1986;250: R341-7.

図1 日齡1ラット新生仔tALの経上皮電位灌流速度依存性

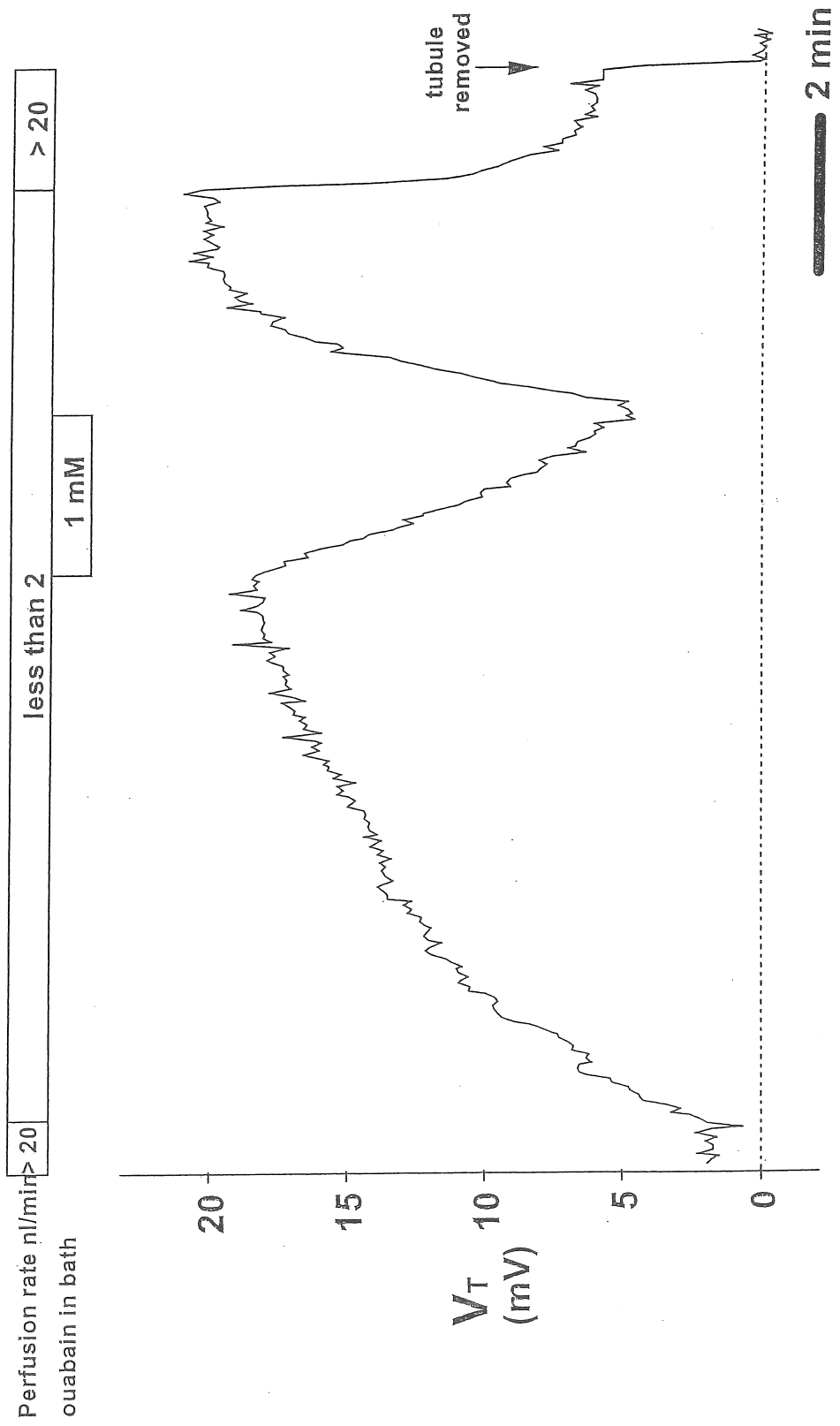


図2 日齡1ハムスタ—新生仔tALの経上皮電位灌流速度依存性

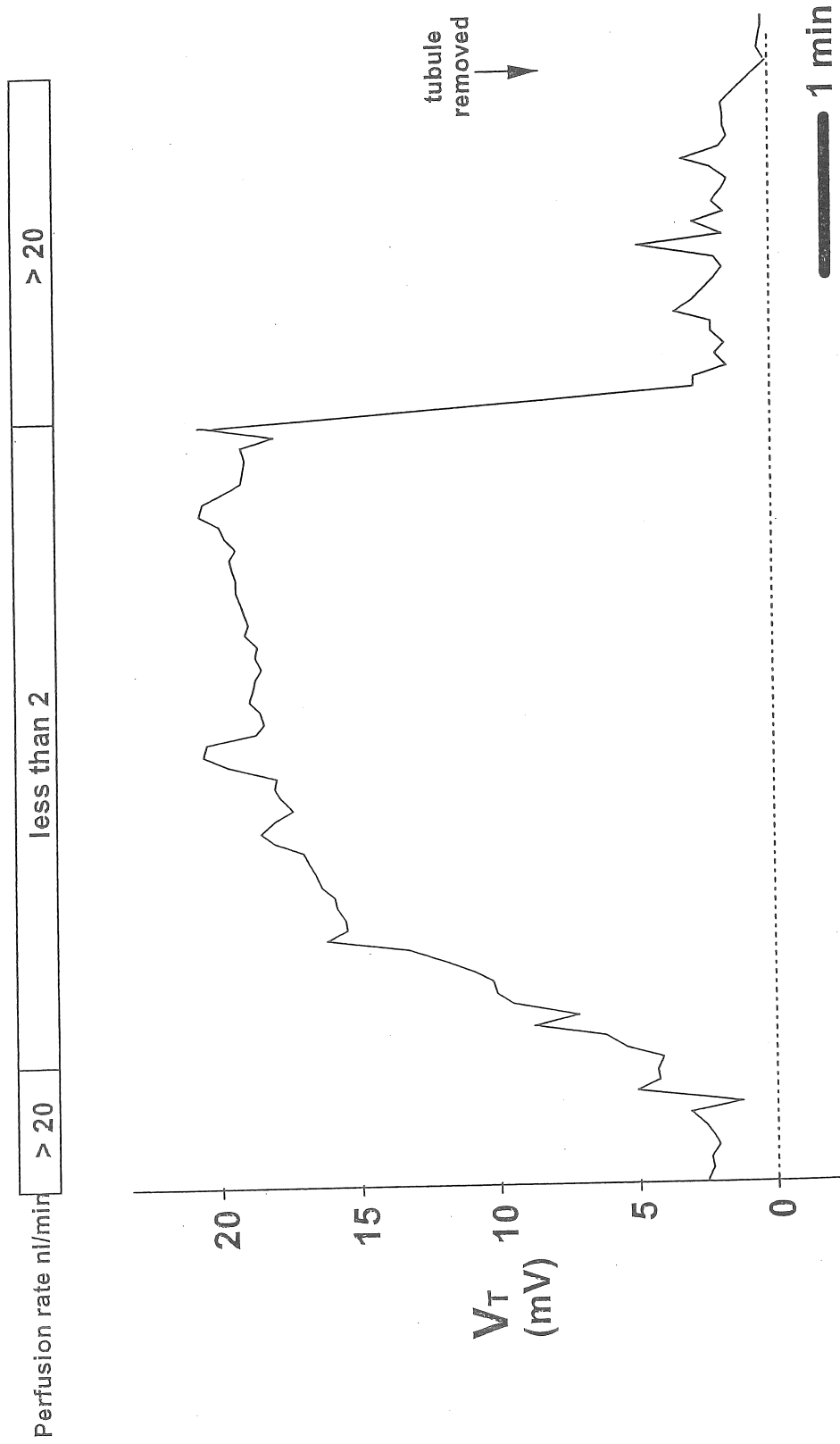




図3 日齢1マウス新生仔tALの経上皮電位灌流速度依存性

Perfusion rate nl/min > 20	less than 2	> 20
----------------------------	-------------	------

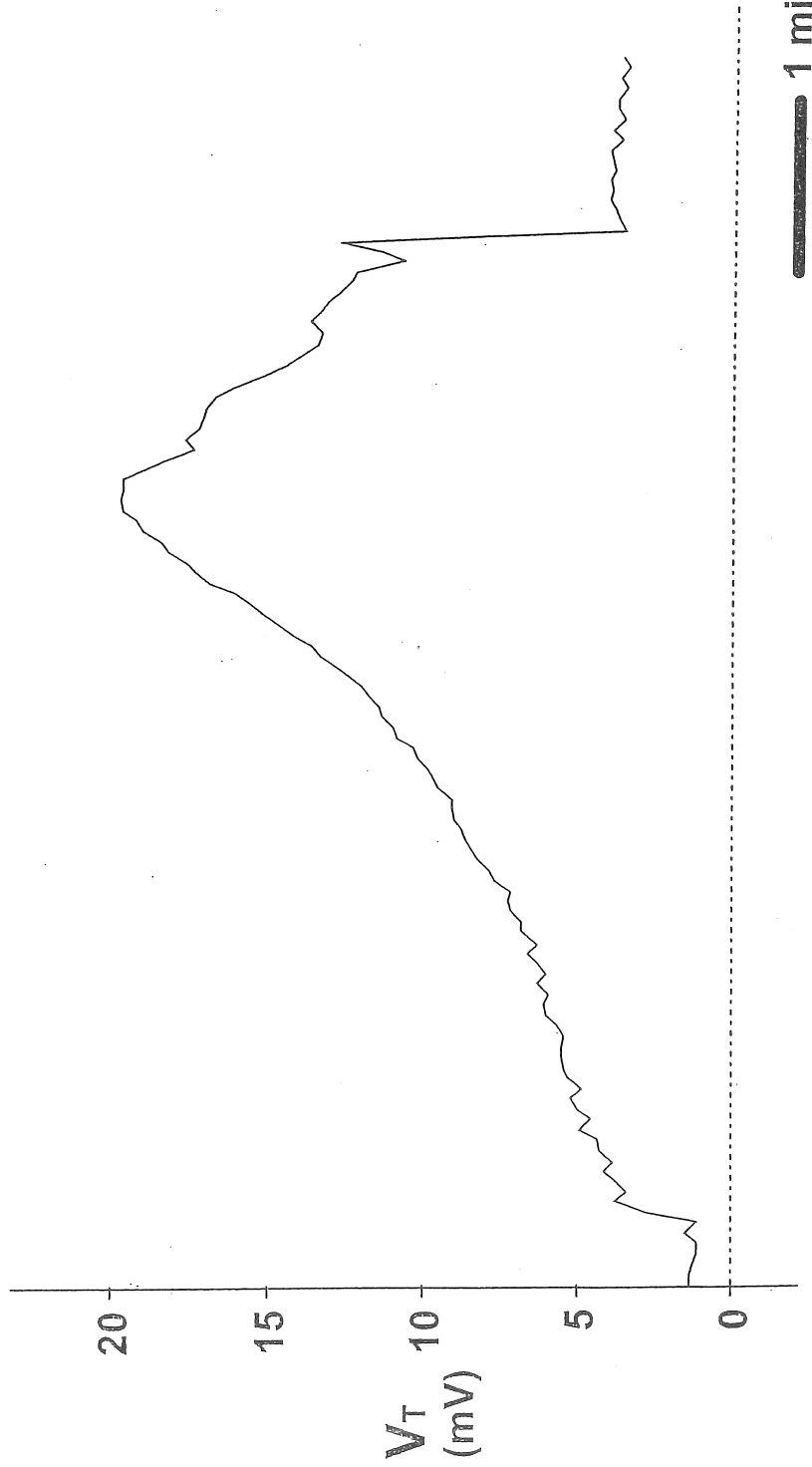
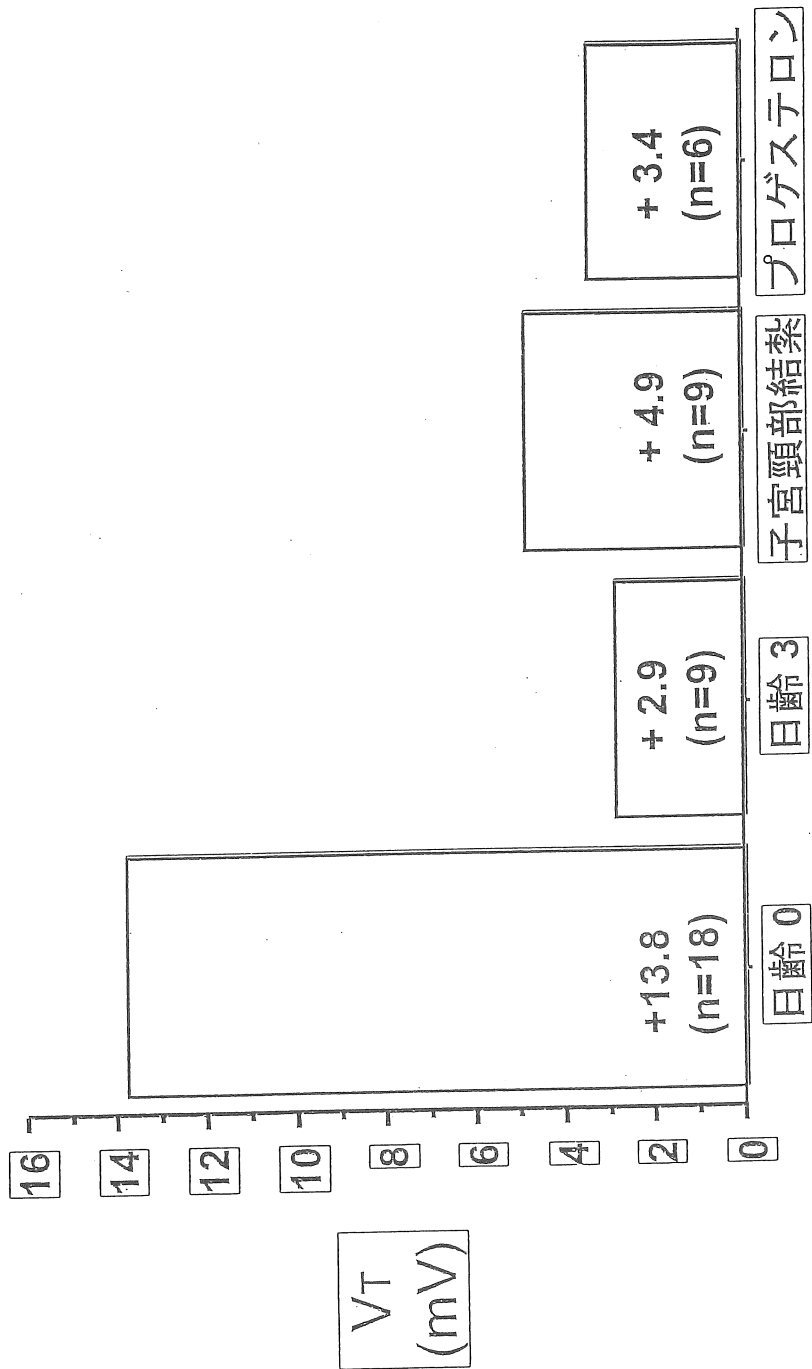
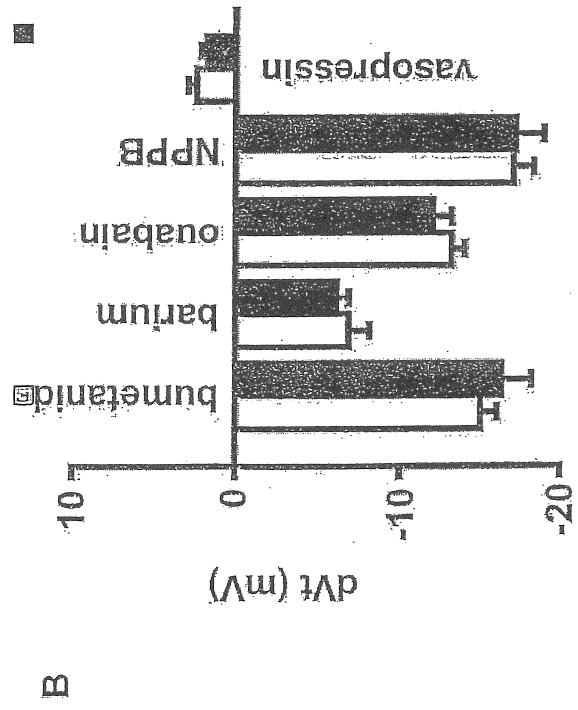
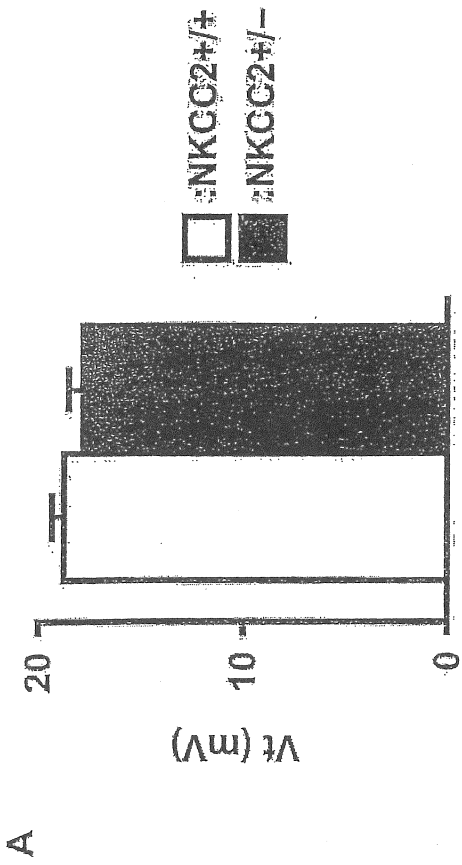


図4 経上皮電位の比較



# 図5 TALの 経上皮自発電位の解析



(A) ヘンレの太い上行脚における自発的経上皮電位  
 NKCC2<sup>+/+</sup>マウス:  $n = 22$   
 NKCC2<sup>+/-</sup>マウス:  $n = 21$

(B) 100  $\mu$ M bumetanide, 1 mM barium, 1 mM ouabain, 100  $\mu$ M 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid, NPPB ( $n = 8$  to 9), 1 nM vasopressin (+/+ の  $n = 12$ 、+/- の  $n = 13$ ) 投与時の経上皮電位の比較

プロジェクト 助成研究報告書 (医学)  
Project Research Report 2000-2002  
Medicine

---

---

平成16年3月  
March, 2003

財団法人 ソルト・サイエンス研究財団  
The Salt Science Research Foundation

〒106-0032 東京都港区六本木 7-15-14 塩業ビル  
Engyo Bldg. 7-15-14 Roppongi, Minatoku, Tokyo 106-0032 Japan

Tel. 03-3497-5711 / Fax. 03-3497-5712

URL <http://www.saltscience.or.jp>

---

---

ISBN 4-902192-04-7