

胃のイオンチャネル、トランスポーターの新規生理機能と創薬への可能性

富山大学 大学院医学薬学研究部 薬物生理学研究室

酒 井 秀 紀

1. はじめに

消化性潰瘍治療薬の代表的なものとしてヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬やプロトンポンプ阻害薬があげられる。両薬物はともに胃酸分泌細胞に作用するが、ターゲットが存在する細胞膜は異なる。ヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬は基底側 (basolateral) 膜に存在する H₂ レセプターに作用し、プロトンポンプ阻害薬は分泌側 (apical) 膜に存在する胃プロトンポンプ (H⁺,K⁺-ATPase) に作用する。

我々は、これまでに胃酸分泌細胞の基底側膜に細胞防御機構に関わる新規の塩素イオンチャネル (Cl⁻チャネル) を見出した。このチャネルはプロスタグランジン E₂ により活性化されインターロイキン-1β により阻害された。

一方、分泌側膜において、胃酸 (HCl) のプロトン (H⁺) は胃プロトンポンプ により分泌されることはよく知られているが、塩素イオン (Cl⁻) 分泌を担う分子実体が何であるのかについては確定されていない。

我々は、胃酸分泌細胞において Cl⁻チャネルファミリーの ClC-2、ClC-5、K-Cl 共輸送体の KCC3a、KCC4 が酸分泌機構に関与する可能性について検討した。

2. ClC-2 は Cl⁻分泌を担う分子実体ではない

ClC-2 が、胃酸分泌機構に関与するの否かについてこれまで議論がある。米国のグループが胃酸分泌細胞において ClC-2 タンパク質の発現を報告し、ClC-2 が胃酸の分泌を担う Cl⁻チャネルであることを主張してきた。その一方で、ドイツのグループは ClC-2 ノックアウトマウスにおいて胃酸分泌に変化がみられなかったことから、この説を疑問視してきた。そこで我々は、胃酸分泌に関与する Cl⁻輸送タンパク質の分子実体が ClC-2 であるのかどうかについて検討した。その結果、胃酸分泌細胞では ClC-2 mRNA が発現しているものの、タンパク質レベルでは有意に発現していないものと考えられた。したがって ClC-2 は胃酸分泌の Cl⁻輸送タンパク質の分子実体ではないことが明らかになった。

3. ClC-5 は胃プロトンポンプ活性を調節する

ClC-5 は、主に腎臓に発現しており、その発現の大半は、近位尿細管の vacuolar-type H⁺-ATPase の分布と一致する。胃酸分泌細胞において、酸分泌休止時には、H⁺,K⁺-ATPase は細管小胞膜に局在しており、酸分泌刺激時に細管小胞は分泌膜につながる。これまで胃における ClC-5 については報告されておらず、我々は、胃酸分泌細胞における ClC-5 の分

布と機能について検討した。

まず、 H^+,K^+ -ATPase に富むブタ胃細管小胞に ClC-5 が多量に発現していることを見出した。また、ClC-5 はブタ胃粘膜において H^+,K^+ -ATPase と細胞内局在部位が一致し、胃細管小胞を用いた免疫沈降で、 H^+,K^+ -ATPase と分子会合していることを見出した。 H^+,K^+ -ATPase を安定発現させた HEK293 細胞における、ClC-5 Tet-on system を用いた免疫沈降実験においても、ClC-5 は H^+,K^+ -ATPase と免疫共沈降することがわかり、両者は分子会合していることが示された。

H^+,K^+ -ATPase 安定発現 ClC-5 Tet-on system において、ClC-5 発現 (Tet-on) は H^+,K^+ -ATPase の酵素活性を有意に上昇させたが、 Na^+,K^+ -ATPase の酵素活性には全く影響を与えなかった。ClC-5 発現により、 H^+,K^+ -ATPase の $^{86}Rb^+$ 取り込み活性が上昇し、 H^+,K^+ -ATPase の ATP 依存性リン酸化レベル (EP レベル) も上昇した。膜画分における H^+,K^+ -ATPase の発現量は ClC-5 の発現によって変化しなかった。以上の結果より、ClC-5 は胃酸分泌細胞の分泌側膜において、胃プロトンポンプのアップレギュレーターとして機能しているものと考えられた。

4. 胃酸分泌機構における KCC の役割

KCC は cation-chloride cotransporter (CCC) に属し、これまでに4つのアイソフォーム(KCC1-4)が報告されている。KCC1 はコピキタスに存在し、調節性細胞容積減少(RVD)に関与している。KCC2 は神経系に特異的に発現しており、ニューロン内の Cl^- 濃度の調節に関与している。KCC3 は広く発現しており、 K^+ や Cl^- 濃度の調節、RVD に関与している。KCC3 には、KCC3 a, b, c の三種類のスプライシングバリエーションが存在していることが確認されている。KCC3 a は脳や種々の上皮細胞に発現しており、KCC3 b は腎臓に特異的に発現していると報告されている。KCC3 は胃において mRNA レベルでの発現は報告されているが、タンパク質レベルではこれまで確認されていない。KCC4 は主に脳や、心臓、腎臓などの上皮細胞に発現しており、RVD や Cl^- 輸送に関与している。我々は、胃酸分泌細胞における KCC の発現と機能について検討した。

まず、KCC3a がラット、マウス、ヒト胃粘膜およびウサギの胃腺にタンパク質レベルで発現していること、免疫組織染色により KCC3a が胃酸分泌細胞の基底側膜に高発現していることを明らかにした。興味深いことに KCC3a は、酸分泌能の高い胃腺頸部の胃酸分泌細胞に高発現していた。つぎに LLC-PK1 細胞において、KCC3a Tet-on system を構築した。KCC3a の発現誘導 (Tet-on) によって、内因性 Na^+,K^+ -ATPase の発現量は変化しないにもかかわらず、ウアバイン感受性の Na^+,K^+ -ATPase の酵素活性が上昇した。また KCC3a 発現細胞では EP レベルが上昇した。したがって基底側膜の KCC3a は Na^+,K^+ -ATPase の EP レベルの増大を介して酵素活性を上昇させるものと考えられた。KCC3a は、 Na^+,K^+ -ATPase と機能的にカップリングし、基底側膜から血液中に Cl^- 輸送を行うことにより、間接的に分泌側膜の胃酸分泌を抑制している可能性がある。

KCC4 は、ラット、マウス胃粘膜にタンパク質レベルで発現していた。KCC4 の胃粘膜

における局在を検討したところ、胃酸分泌細胞において H^+,K^+ -ATPase と同じ分泌側膜に局在し、基底側膜の Na^+,K^+ -ATPase とは局在が異なっていたことから、KCC4 は胃酸分泌細胞の分泌側膜に発現していることがわかった。KCC4 も KCC3a と同様に、酸分泌能の高い胃腺頸部の胃酸分泌細胞に高発現していた。したがって H^+,K^+ -ATPase と共役した二次性能動輸送体として、Cl⁻を分泌することが可能であると考えられる。ブタ胃ベシクルにおいて KCC4 の機能を阻害すると H^+,K^+ -ATPase の活性が抑制された。

5. まとめ

胃プロトンポンプは、胃腺の頸部から深部にいたるまでの全部位の胃酸分泌細胞に高発現しているにもかかわらず、胃酸分泌能力は頸部の細胞が高く、深部の細胞は低いという著しい差がある。この原因についてはこれまで解明されていないが、胃プロトンポンプに機能共役する Cl⁻分泌タンパク質 (ClC-5 や KCC4) の発現の部位による違いに起因している可能性がある。胃酸分泌細胞のプロトンポンプ機能が、共役する Cl⁻分泌タンパク質によってコントロールされているという考えは新しいアイデアであり、今後新しい消化管疾患治療薬のターゲットとしての可能性を探る研究を進めたい。

謝辞

本研究の遂行にあたりご協力いただいた富山医科薬科大学名誉教授の竹口紀晃先生ならびに富山大学薬物生理学研究室の森井孫俊先生、高橋佑司先生、藤井拓人氏をはじめとするすべての研究室員の皆様に厚く御礼を申し上げます。

略歴 酒井 秀紀 (SAKAI Hideki)

昭和 37 年 9 月生まれ

平成 4 年 3 月 富山医科薬科大学大学院薬学研究科博士後期課程修了

平成 4 年 4 月 日本学術振興会特別研究員

平成 4 年 8 月 富山医科薬科大学薬学部助手

平成 8 年 9 月 文部省長期在外研究員
(フランス共和国 CNRS 分子細胞薬理学研究所)

平成 10 年 5 月 富山医科薬科大学薬学部助教授

平成 17 年 2 月 富山医科薬科大学薬学部教授

平成 17 年 10 月 富山大学薬学部教授 (三大学統合による)

平成 18 年 4 月 富山大学大学院医学薬学研究部教授 (改組による)