

研究トピックス

上皮膜アニオン輸送と膵臓病

CFTR 遺伝子多型-汗の塩分濃度-単離膵管の膵液分泌-コンピュータ・シミュレーションからのアプローチ

健康栄養医学研究室 総合保健体育科学センター保健科学部
(基礎研究棟 2 F) 健康増進医学講座 健康栄養医学分野 教授 石黒 洋

はじめに

嚢胞性線維症と慢性膵炎では、膵管上皮のアニオン輸送の障害が原因で膵液分泌が減り消化栄養不良をきたします。健康栄養医学研究室では、教員2名、非常勤研究員1名、外国人研究員1名、大学院生4名が、多角的に病態の分子生理の解明に取り組んでいます。

上皮膜アニオン輸送の障害と疾病

消化管や気道などの管腔臓器の内面を覆う上皮膜では、様々なイオンチャンネル/トランスポーターがイオンと水の輸送を担っている。例えば、大腸粘膜でCl⁻チャンネルが異常に活性化される、あるいはCl⁻-HCO₃⁻交換輸送体機能が低下すると、下痢になる。上皮膜におけるアニオン輸送障害で最もよく知られているのは、CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 遺伝子変異によって発症する嚢胞性線維症 (cystic fibrosis) である。CFTRは、apical membrane (管腔膜) に存在しcAMP刺激で活性化されるアニオンチャンネルである (図1A)。嚢胞性線維症では、気道、腸管、膵管、胆管、汗管、輸精管のイオン・水輸送が障害される。そのため、管腔内の粘液/分泌液が過度に粘稠となり、管腔が閉塞したり感染し易くなる。典型例では、新生児期にイレウスを起こし、その後、気道感染症を繰り返し、膵外分泌機能不全による消化不良を起こす。

CFTRは、膵臓では腺房に近い末梢の細い膵管 (pancreatic duct) に存在しHCO₃⁻の分泌を担い、汗腺では汗管 (sweat duct) に存在しCl⁻の再吸収を担う (図2AC)。嚢胞性線維症ではCFTRの機能が失われるため、膵液の分泌量が減ってpHは低下し、一方、汗中のCl⁻濃度が高くなる¹⁾。

CFTR チャンネル機能の低下と膵炎

嚢胞性線維症は白人では最も多い遺伝病であるが、日本人を含むアジア人種では稀であるため、わが国ではあまり研究されていなかった。しかし、最近になって遺伝子変異や多型の組み合わせによるCFTRの機能低下 (嚢胞性線維症を発症するほどではない) が、慢性膵炎、男性不妊症、び慢性汎細気管支炎の発症リスクになることが分かってきた¹⁾。

健康栄養医学研究室では、CFTRのチャンネル機能を簡便に評価するために、親指の指腹から採取した汗中のCl⁻濃度を測定する方法を確立した²⁾。図2Bは、健康者の汗中のCl⁻濃度の分布であり、年齢と相関していた。この方法を用いて、慢性膵炎患者の汗中Cl⁻濃度を測定したところ約半数で高値となり、わが国の慢性膵炎の多くがCFTRの機能異常を背景に発症していると考えられた。CFTR遺伝子の全27エクソンおよびその前後のイントロンとの境界領域のシーケンスを行ったところ、CFTR機能が失われる遺伝子変異は認められなかったが、エクソンをスキップしやすいと報告されている

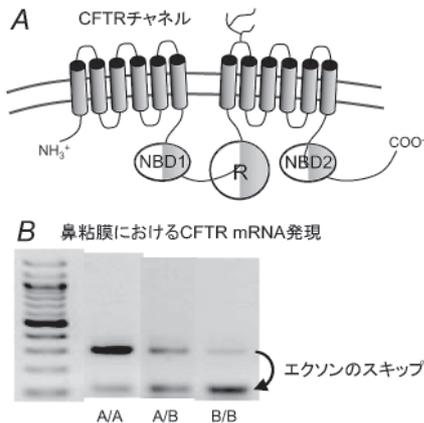


図1. CFTR チャンネルの構造と上皮膜発現

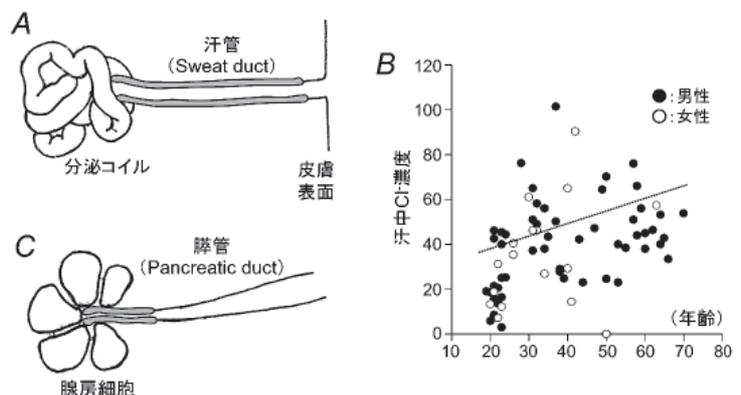


図2. 汗腺および膵臓における CFTR

学術欄

多型の頻度が高かった³⁾。そこで、CFTR チャンネルが生理的に発現している(気道粘膜から連続している)鼻粘膜の拭い液から mRNA を抽出して解析した。図1B に示すように、遺伝子多型によってエクソンのスキップの頻度が変わる。

膵管上皮細胞からの HCO₃⁻ 分泌の解析

当研究室では、嚢胞性線維症や慢性膵炎といった膵 HCO₃⁻ 分泌が障害される難病の治療法を見出すことを目的として、膵管上皮細胞(膵導管細胞)を介する HCO₃⁻ 輸送を解析している(図3)¹⁾⁴⁾。実体顕微鏡下で小動物(マウス、ラット、モルモット)の膵臓を針でほぐしていくと、図3Aのような膵管(直径100ミクロン前後)を、管腔構造を保ったまま単離することができる。膵管はほぼ均一な細胞(膵導管細胞)で構成された一層の上皮なので、single cell にすることなくそのまま実験に用いる。図3Bのように、管腔内を表層とは別個の組成の溶液で灌流する(microperfusion)ことにより生体内の環境を再現でき、上皮膜としての構造と生理機能(HCO₃⁻ のベクトル輸送)が保たれた状態で細胞レベルのシグナル(細胞内の各種イオン濃度、pH、電位)を測定することができる利点がある。

また、単離した膵管を数時間培養すると、両端が自然に閉じて管腔が閉鎖腔になる。Micropuncture(図3C)により管腔内に pH 感受性蛍光色素を導入して、管腔内の pH 変化と管腔が膨らむスピードを解析することによって、HCO₃⁻ 分泌を測定することができる。食後の血中濃度に相当する生理的濃度の消化管ホルモン(secretin など)の反応を見るには、顕微鏡ステージ上の精密な温度管理(37°C)が必要である。

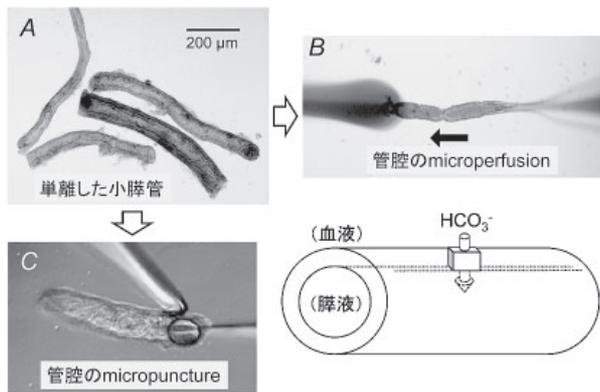
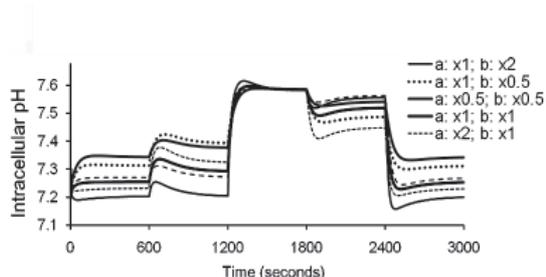


図3. 単離膵管からの HCO₃⁻ 分泌の測定



上皮膜イオン輸送のコンピュータ・シミュレーション

膵導管の上皮細胞には、basolateral membrane(血液側)に Na⁺-K⁺-ATPase、K⁺ チャンネル、Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter、Na⁺-H⁺exchanger などが、apical membrane(膵液側)に CFTR アニオンチャンネル、Cl⁻-HCO₃⁻ exchanger などのイオンチャンネル/トランスポーターが発現している。CFTR が活性化されると、これらのイオン輸送分子が協調して働き、血液⇒膵液への HCO₃⁻ のベクトル輸送が実現される。各イオン輸送分子の輸送活性/速度は、細胞内外のイオン濃度と膜電位を介して互いにリンクしている(イオンの電気化学勾配を共有している)ため、実験データを個別に解析するだけでは理論づけに限界がある。例えば、一つの輸送分子を阻害した時に、他の輸送分子の輸送速度が間接的に影響を受ける場合がある。そこで、当研究室では、図4のようなシミュレーションモデルを用いている。イオン輸送分子を介するイオン輸送の一般式を導き、basolateral membrane と apical membrane それぞれにおいて各イオンの流束が統合され、細胞モデルが構築されている。設定した条件で HCO₃⁻ 分泌が起こっている時の、各イオン輸送分子の輸送速度、細胞内イオン環境の経時的変化を同時に見ることが可能である。この細胞モデルを、膵管モデル、さらに膵臓全体のモデルへと進化させることができれば、どの輸送分子を活性化するか、あるいは抑制すれば、効果的に HCO₃⁻ 分泌を増やすことができるかを解析することができる。

〈参考文献〉

1. 石黒 洋、ほか 膵の重炭酸イオン分泌障害と膵嚢胞線維症/慢性膵炎 膵臓 21:13-25, 2006.
2. 中壘みゆき、ほか 汗中クロライド濃度の簡便な測定法の開発 膵臓 23:486-493, 2008.
3. Fujiki K, *et al.* Genetic evidence for CFTR dysfunction in Japanese: background for chronic pancreatitis. *J Med Genet* 41: e55, 2004.
4. Ishiguro H, *et al.* CFTR functions as a bicarbonate channel in pancreatic duct cells. *J Gen Physiol* 133: 315-26, 2009.
5. Yamaguchi M, *et al.* Apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger stoichiometry in the modeling of HCO₃⁻ transport by pancreatic duct epithelium. *J Med Invest* 56 Suppl: 325-8, 2009.

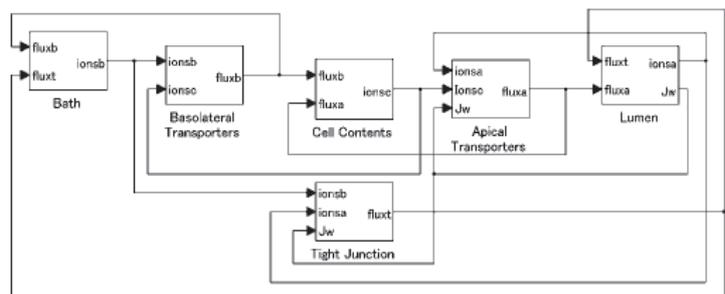


図4. HCO₃⁻ 輸送のコンピュータ・シミュレーション