

氏名(本籍)	伊藤明彦(滋賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第430号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成15年3月27日
学位論文題目	Enhancement of aquaporin 3 by VIP in a human colonic epithelial cell line (ヒト腸上皮細胞株におけるVIPによるアクアポリン3の発現増強)

審査委員	主査 教授	谷 徹
	副査 教授	岡村 富夫
	副査 教授	柏木 厚典

論文内容要旨

【背景と目的】

水分の透過性が高い腎尿細管や消化管上皮の細胞膜においては、水の輸送はある種のチャネルを通過して促進される。1992年はじめてクローニングされたこのチャネルは、Aquaporin (AQP) と呼ばれるが、その後いくつかのタイプが存在することが報告され、主として腎臓において、その役割についての研究が進められている。腸管においても、その存在および発現調節についての報告が散見されるが、いまだ不明な点が多い。

一方、VIP、PYY、NPYなどの消化管ホルモンは、神経系と密接に関係しており、下痢や便秘などの病態に深く関与している。特にVIPは、WDHA症候群をはじめとする分泌性下痢の原因物質であるだけでなく、下痢型の過敏性腸症候群との関連も報告されており、腸管における水分出納調節との関連が示唆される。

そこで今回我々は、腸上皮細胞株を用いて、消化管ホルモンVIPによる、水チャネルAQP3の発現調節について検討した。

【方法】

腸上皮細胞株としてAQP3mRNAおよびVIP receptor mRNAの発現を確認したヒト大腸癌細胞株HT-29、T-84、Caco-2を用いた。各々の細胞株は、静置培養の後、コンフルエントの状態、以下の実験を行った。

1) VIPを1pMから1 μ M添加、6時間後にAGPC法にてtotal RNAを抽出し、AQP3mRNAの発現をNorthern blot法にて検討した。2) VIPを10nM添加し、1h、3h、6h、9h、12h後にRNAを抽出、その発現をNorthern blot法にて検討した。3) VIPレセプターからのシグナル伝達経路についての検討では、プロテインキナーゼA阻害剤としてH-9およびH-89、Cl⁻チャネル阻害剤としてDPCおよびNPPBを用い、VIP10nMまたはcAMP1mMを同時に投与し、AQP3mRNAの発現をNorthern blot法にて解析した。4) AQP3蛋白の発現は、10%SDS-PAGEによるWestern blot法にて、VIP10nM添加後の経時的变化を解析した。5) cAMP依存性シグナル伝達経路の転写因子であるCRE/ATFの転写活性については、10nM VIPあるいは1mMcAMP添加6時間後の核タンパクを抽出し、CREB consensus oligonucleotideを用いて、Gel shift assay法にて検討した。

【結果】

HT-29細胞、Caco-2細胞にはVIP1Rレセプターの発現を、T-84細胞には、VIP1RおよびVIP2Rレセプターの発現を認めた。HT-29細胞にVIPを添加すると、100pM以上の濃度でAQP3mRNAの

発現が増強した。またその発現は、経時的にはVIP添加6時間後にピークとなり、添加前の約3倍を示した。PK-A阻害剤H-9、H-89を加えた検討では、VIP添加によるAQP3mRNAの発現増強は著明に抑制されたが、逆にCl⁻チャンネル阻害剤を加えた検討では、AQP3mRNAの発現は抑制されず、むしろ増強した。T-84細胞、Caco-2細胞においてもほぼ同様の結果が得られた。また、AQP3蛋白についても、VIP10nM添加3h後よりその発現が増強した。転写因子CRE/ATFの転写活性の検討では、VIPおよびcAMPの添加により、転写活性は1.2倍に増強した。

【考 察】

現在までにAQP3は、肺胞上皮ではcorticosteroid、腎尿細管ではvasopressinなど種々の物質により調節を受けることが報告されている。一方、腸管上皮細胞では、基底膜側にAQP3が存在することが明らかにされているが、消化管ホルモンによる調節機構については報告がない。今回我々は、腸上皮細胞株において、AQP3の存在と、VIPおよびcAMPによる発現増強を見出した。ヒトAQP3遺伝子は、そのpromoter領域に転写因子CRE/ATFと1塩基だけ異なる結合部位が存在することがわかっており、AQP3の発現増強はその転写活性を介したものと考えられた。従って、腸上皮細胞における水の移動は、細胞間やイオンやチャンネルといった既存の輸送路を濃度勾配によって受動的に通るだけでなく、水チャンネルAQP3の発現増強によって促進されることが明らかとなった。

以上により、臨床的には、WDHA症候群をはじめとする分泌性下痢や下痢型過敏性腸症候群の機序の一つとして、大腸粘膜局所でのVIPによる水チャンネルの発現増強が関与していることが示唆された。

【結 語】

VIPによる腸管での水分分泌を促進する機構に、水チャンネルAQP3の発現増強が関与していることが明らかとなった。また、VIPレセプターからの刺激は、cAMP依存性のシグナル伝達により、AQP3遺伝子の転写を促進していることが示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

腸管における水チャンネルAquaporin (AQP) の存在および発現調節については、いまだ不明な点が多い。今回著者は、腸上皮細胞株を用いて消化管ホルモンVIPによる水チャンネルAQP3の発現調節について検討した。

その結果、VIPの添加によりAQP3の発現がmRNAレベル、蛋白レベルで増強した。その発現増強はPK-A阻害剤で著明に抑制されたが、Cl⁻チャンネル阻害剤では抑制されなかった。転写因子CRE/ATFの転写活性の検討では、転写活性は1.2倍に増強した。ヒトAQP3遺伝子は、そのpromoter領域に1塩基だけ異なるCRE/ATF相同領域が存在することがわかっており、AQP3の発現増強はcAMP依存性シグナル伝達を介したものと考えられた。

本研究は、分泌性下痢や下痢型過敏性腸症候群の発症機序の一つとして、大腸粘膜局所においてVIPが水チャンネルの発現増強に関与していることを分子生物学的手法により示唆したもので、博士(医学)の学位授与に値するものと評価された。