

氏 名 眞 鍋 健 一

学位 (専攻分野) 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第639号

学位授与の日付 平成14年9月30日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Mechanisms of the Regulatory Volume Increase after a
Secretory Volume Decrease in Colonic Epithelial Cells
under Muscarinic Stimulation

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 河西 春郎
教授 岡田 泰伸
教授 永山 國昭
教授 鈴木 裕一 (静岡県立大学)
助教授 挾間 章博 (岡崎国立共同研究機構統合バイ
オサイエンスセンター)

論文内容の要旨

Volume regulation is one of the most important cell functions to maintain cell homeostasis in a variety of physiological and pathological conditions, where cells are subject to osmotic perturbation. Although colon crypts have been reported to shrink during Cl^- secretion in response to secretagogue stimulation, it is not yet clear whether or how individual secretory cells located in colon crypts restore their cell volume. To study this, we visualized individual cells in the crypt isolated from the guinea pig distal colon using two-photon laser scanning microscopy, and their volume changes in response to carbachol (CCh), a cholinergic agonist, were compared with those of a human colonic epithelial T84 cell line. Both T84 cells and fundus crypt cells, but not upper crypt cells, showed shrinkage (termed a secretory volume decrease: SVD) after CCh stimulation, and surprisingly, even under continuous stimulation by CCh, they recovered their original cell volume (called a regulatory volume increase: RVI) after SVD. The SVD response to CCh was antagonized by atropine, indicating that the response is mediated by stimulation of muscarinic receptors. An increase in the intracellular free Ca^{2+} concentration was found by fura-2 fluorometry during these volume changes in both cell types. Chelation of intracellular Ca^{2+} by BAPTA abolished the SVD in T84 cells. The RVI, but not the preceding SVD, was found to be thoroughly abolished by bumetanide in T84 and crypt enterocytes. Also, removal of either Na^+ , K^+ , or Cl^- from the extracellular solution abolished the RVI. These results suggest that the RVI process is accomplished by ionic osmolyte influx via bumetanide-sensitive $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporters. It is suggested that the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter is NKCC1, because this isoform was originally cloned from T84 cells and is known to be expressed in a wide variety of secretory epithelial cells, while another isoform, NKCC2, is known to be expressed exclusively in the kidney.

When cells change their volume, water must move across the plasma membrane. Both the CCh-induced SVD and the RVI after SVD were inhibited by methylmethanethiosulfonate (MMTS), a sulfhydryl non-mercury aquaporin blocker, in T84 cells and colonic enterocytes, suggesting that the water transport is mediated by a certain aquaporin water channel. Studies by RT-PCR and immunocytochemistry both showed abundant expression of AQP3 in T84 cells. Antisense knockdown of AQP3 was found to block the SVD-RVI responses to CCh in T84 cells. These results indicate that the AQP3 water channel is involved in both the SVD and following RVI processes in T84 cells. It is also suggested that AQP3 water channels are essential for the SVD in guinea pig colon crypts, since AQP3 is the most abundantly expressed aquaporin isoform in the gastrointestinal tract.

The RVI after SVD is a distinct type of cell volume regulation in secretory cells, and it is supposed to be important in maintaining the secretory function in colonic epithelial cells. The present study elucidated the ionic mechanism and demonstrated an involvement of water channel in this volume regulation process.

論文の審査結果の要旨

動物細胞の容積は、通常、一定になるように調節されており、この細胞容積調節能は細胞が恒常性を保つ為の重要な細胞機能の内の一つである。細胞容積調節能の喪失は、細胞死をもたらす。細胞内外に浸透圧負荷がかかるような環境下では、浸透圧性容積変化が一時的に生じるが、多くの細胞は、その後元の正常容積へと回復する能力を有している。この容積調節は、主として、KClを流出させたり、NaClを流入させて、水輸送を駆動することによって達成される。大腸での電解質及び粘液分泌は、大腸内容物の移動や外因性毒物の排泄に欠かせない。本研究では大腸上皮の分泌刺激時における細胞容積調節機構を解明する目的で、水チャンネルに着目した。その結果、Cl分泌とその後の容積調節に伴う水輸送の経路に水チャンネルが関与していることを発見したものである。

大腸クリプト上皮が分泌刺激に応答して容積変化を示すことは、クリプト総体の観察によって示唆されてきたが、個々の上皮細胞の容積変化についての報告は、技術的困難さから皆無であった。そこで、蛍光色素の退色が少なく組織標本深部の探索も可能な2光子レーザー顕微鏡法を用いることにより、クリプト内部の個々の細胞容積変化を捉える事に成功した。モルモット大腸からクリプトを単離し、これにカルバコール刺激すると主としてクリプト基底細胞が縮小し、その後時間経過と共に元の容積にまで回復することが分った。同様の分泌性容積減少(secretory volume decrease: SVD)とそれに続く調節性容積増加(regulatory volume increase: RVI)はヒト大腸上皮由来の培養細胞 T84 においてもコールターカウンター法で確認された。モルモット大腸クリプト及び T84 細胞、いずれにおいても、SVDはニフルミン酸によって抑制され、RVIはブメタニドによって抑制された。このことから、SVDは、ニフルミン酸感受性 Ca 依存性 Clチャンネル、RVIは、ブメタニド感受性 Na-K-2Cl コトランスポーターの関与が示唆された。

細胞容積の変化は、最終的には水輸送によって引き起こされるので、水チャンネルの役割を検討した。RT-PCR法と免疫染色法で T84 細胞における水チャンネル AQP3 の発現を確認したので、AQP3 のアンチセンス処理を行ったところ SVD が抑制された。水チャンネルブロッカー MMTS の前投与及び後投与によってそれぞれ SVD と RVI が抑制された。モルモット大腸クリプトでも、同様に MMTS の前投与及び後投与によってそれぞれ SVD と RVI が抑制された。

以上の結果から、大腸クリプト上皮細胞の分泌刺激に応答した細胞縮小にも、その後の調節性容積増加にも水チャンネルが重要な役割を果たす事が結論された。本研究はこれまで解析されなかった、分泌刺激時における大腸クリプト内部の個々の上皮細胞容積変化を捉え、イオンチャンネルやトランスポーターの活性化のみならず水チャンネルの関与を示したものであり、この分野の今後の発展に寄与する研究である。よって本研究は博士論文として十分に価値のあるものと考えられる。

審査委員会において発表を行い、委員からのさまざまな質問に適切に答えたので、専門及び周辺分野の基礎知識や理解については、博士号取得に十分と判断した。

英語の実力は、英語要旨の他に眞鍋君が書いた英文の学位論文を審査委員全員で見て、十分と判断した。