

氏名 たかはし ゆうじ
高橋 佑司

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博乙第 63 号

学位授与年月日 平成 29 年 1 月 18 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 4 項該当

学位論文題目 胃プロトンポンプの活性調節機構と大腸がんに関与するイオン輸送タンパク質の研究
(Studies on regulatory mechanisms of gastric proton pump and on the ion transporters involved in colorectal cancer)

論文審査委員

(主査)	教授	水口 峰之
(副査)	教授	細谷 健一
(副査)	教授	酒井 秀紀 (紹介教員)

論文内容の要旨

胃や腸などの消化管は、浸透圧変化や pH 変化等の激しい外的環境に曝されている。胃では細菌感染防御や食物消化のため、胃酸 (HCl) やペプシンが分泌され、大腸では水分・塩分の吸収が行われており、これら組織においてはイオン輸送タンパク質の機能が重要である。

胃酸は胃酸分泌細胞から胃の内腔に分泌される。胃酸の H^+ 分泌を担っているのは胃プロトンポンプ (H^+, K^+ -ATPase) で、胃酸分泌細胞の頂端膜と細管小胞膜の両方に存在している。酸分泌休止時における基礎胃酸分泌は、頂端膜の H^+, K^+ -ATPase によって行われている。一方、酸分泌刺激時においては、細胞内の細管小胞が互いに融合し、頂端膜に連結し、細管小胞と頂端膜の両方の H^+, K^+ -ATPase により大量の胃酸が分泌される。刺激状態でも、細管小胞と頂端膜は、混ざり合わず、互いに独立しているものと考えられている。他方、胃酸の Cl^- 分泌を担う膜輸送タンパク質については、これまで KCC4、CFTR、SLC26A9 などの候補分子が報告されているが、胃酸分泌機構の全容は未だ明らかになっていない。

近年、大腸がんの死亡者数は増加の一途にあり、特に女性では、2014 年の死亡率が第一位となっている。 K^+ チャネルは、がんのバイオマーカー及びがん治療のための標的分子の一つとなり得る可能性が考えられており、大腸がんにおいても、いくつかの電位依存性 K^+ チャネルの病態生理学的な機能が報告されている。

本論文では、胃酸分泌細胞の細管小胞と頂端膜の酸分泌メカニズムの差異に着目して H^+, K^+ -ATPase の機能に関連するタンパク質の解明を目指し、第一部から第三部の研究を行った。また、第四部と第五部では、新たな大腸がん治療につながる基礎研究として、それぞれ機能未知の非胃型プロトンポンプ ATP1A1 と K^+ チャネルの Kv7.1 (KCNQ1) に着目した研究を行った。

【第一部】胃プロトンポンプと CIC-5 クロライド-プロトン交換輸送体の機能カップリング

Cl^-/H^+ 交換輸送体 CIC-5 は、腎近位尿細管において液胞型 H^+ -ATPase と共役し、エンドソームの酸性化に寄与していることが報告されている。しかし、胃における発現および機能についての報告はなかった。本研究では、CIC-5 が胃腺の上部において活発に酸分泌を行う胃酸分泌細胞の細管小胞に発現していることを見出した。一方、頂端膜における CIC-5 の有意な発現はなかった。CIC-5 は、細管小胞サンプルにおいて、 H^+, K^+ -ATPase と免疫共沈降した。小胞への ATP 依存的 $^{36}Cl^-$ 取り込みが H^+, K^+ -ATPase 阻害剤の SCH28080 によって消失したことにより、CIC-5 の機能的発現が示唆された。CIC-5 のテトラサイクリン発現誘導システムが導入された H^+, K^+ -ATPase 安定発現 HEK293 細胞において、CIC-5 は H^+, K^+ -ATPase と免疫共沈降したが、内在の Na^+, K^+ -ATPase とは免疫共沈降しなかった。SCH28080 感受性 $^{36}Cl^-$ 輸送活性が、CIC-5 発現細胞には見られ、CIC-5 未発現細胞には見られなかった。 H^+ 輸送能をなくした

E211A-CIC-5 変異体は、SCH28080 感受性 $^{36}\text{Cl}^-$ 輸送活性を持たなかった。一方、CIC-5 と E211A-CIC-5 変異体は、 H^+, K^+ -ATPase 活性を有意に上昇させた。これらの結果から、CIC-5 と H^+, K^+ -ATPase は、細管小胞膜において機能的に関連し、刺激時の胃酸分泌に関与している可能性が示唆された。

【第二部】胃酸分泌細胞に発現する分子シャペロン ERp57 による H^+, K^+ -ATPase 活性の調節

ERp57 は、ジスルフィドイソメラーゼ活性を有するユビキタス ER シャペロンである。本研究で、ERp57 と H^+, K^+ -ATPase の両者が、胃酸分泌細胞の頂端膜サンプルに発現し、免疫共沈降することを見出した。一方、細管小胞膜サンプルにおいては、ERp57 の有意な発現は見られなかった。 H^+, K^+ -ATPase を安定発現する HEK293 細胞における ERp57 の過剰発現は、 H^+, K^+ -ATPase の発現レベルを変化させることなく、 H^+, K^+ -ATPase 活性を増加させた。興味深いことに、ERp57 のシャペロン機能を消失させる変異体 (C57S / C60S / C406S / C409S) の過剰発現も同様に H^+, K^+ -ATPase 活性を増加させた。対照的に、 H^+, K^+ -ATPase 発現細胞における、内在性 ERp57 のノックダウンは、 H^+, K^+ -ATPase の発現レベルを変化させることなく、有意に H^+, K^+ -ATPase 活性を減少させた。ERp57 の過剰発現及びノックダウンは、 Na^+, K^+ -ATPase の発現及び機能には有意な影響を及ぼさなかった。これらの結果から、ERp57 はそのシャペロン機能とは異なるメカニズムで胃 H^+, K^+ -ATPase 活性をアップレギュレーションすることが考えられた。

【第三部】細胞容積調節性アニオンチャネル阻害剤である DCPIB による胃 H^+, K^+ -ATPase の阻害

4-(2-Butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentylindan-1-on-5-yl)oxybutyric acid (DCPIB) は、ほとんどの細胞にユビキタスに発現する容積調節性アニオンチャンネル (VRAC) の阻害剤として使用されている (IC_{50} 値は約 $4 \mu\text{M}$)。本研究では、胃細管小胞サンプル及び H^+, K^+ -ATPase 発現細胞由来の膜サンプルにおいて、DCPIB が、胃 H^+, K^+ -ATPase の活性を阻害し、その IC_{50} 値が約 $9 \mu\text{M}$ であることを見出した。細管小胞サンプルにおいて、VRAC の必須構成因子と考えられている leucine rich repeat containing 8 family A (LRRC8A) の有意な発現は認められなかった。DCPIB の阻害効果は、LRRC8A がノックダウンされた細胞から得られた膜サンプルにおいても見出された。一方、DCPIB は、 Na^+, K^+ -ATPase や Ca^{2+} -ATPase の活性に有意な影響を及ぼさなかった。 H^+, K^+ -ATPase 発現細胞において、DCPIB は H^+, K^+ -ATPase による $^{86}\text{Rb}^+$ 輸送活性を阻害したが、 Na^+, K^+ -ATPase には影響を与えなかった。DCPIB は、細胞膜の全 Cl^- チャンネル電流に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、DCPIB は、 H^+, K^+ -ATPase に直接作用して、その活性を阻害する可能性が考えられた。DCPIB は、*in vitro* における H^+, K^+ -ATPase 機能を研究するための有益なツールになるものと考えられる。

第一部から第三部より、細管小胞膜では CIC-5 が H^+, K^+ -ATPase と機能連関することで、酸分泌刺激時の酸分泌を担っていること、また、ERp57 が頂端膜において H^+, K^+ -ATPase と分子会合し、 H^+, K^+ -ATPase 活性を正に調節することで、酸分泌休止時における基礎分泌を制御していることを見出した。これらの研究成果は、細管小胞と頂端膜における異なる酸分泌調節メカニズムを明確に示したものである。

【第四部】ヒト結腸・直腸における非胃型プロトンポンプ ATP1A1 の発現

ヒト非胃型プロトンポンプ (ATP1A1) は、生理機能の同定がまだ研究段階にあり

不明である。本研究では、ATP1AL1 mRNA の結腸・直腸における発現を調べた。半定量的 PCR により、ATP1AL1 mRNA は、ヒト結腸の遠位部及び直腸のみならず、結腸近位部にも発現していることがわかった。興味深いことに、ATP1AL1 mRNA は、20 例のヒト結腸・直腸がん組織のうち 12 例において、近傍の非がん組織に比べて、発現上昇していた。そのうちの 4 例においては、ノーザンブロットにおいても検出できるほどの過剰発現が観察された。以上の結果から、大腸がん組織における ATP1AL1 の高発現は、これまでに未解明の大腸がんの病態生理機能に参与している可能性が示唆された。

【第五部】トロンボキサン A₂ で誘導される大腸がん細胞増殖には Kv7.1 チャネルのアップレギュレーションが関与している

これまでに、トロンボキサン A₂ (TXA₂) が、大腸がん細胞の増殖を促進することが、共同研究者のグループから報告されている。しかしそのメカニズムについては未解明である。本研究では、TXA₂ によるがん細胞増殖促進機構に Kv7.1 K⁺チャネルが関与することを見出した。ヒト結腸直腸がん組織と付随する非がん組織間の Kv7.1 の発現レベルを比較したところ、Kv7.1 タンパク質は、異なる患者からのがん組織において一貫してアップレギュレーションされていることがわかった。Kv7.1 は、ヒト大腸がん細胞株でも発現していた。TXA₂ の安定アナログ 9,11-epithio-11,12-methano-thromboxane A₂ (STA₂) による大腸がん細胞株の処理により、Kv7.1 タンパク質の発現増加と並行して、Kv7.1 チャネルの阻害剤 chromanol 293B に感受性のホールセル K⁺電流が増加した。対照的に、TXA₂ の不活性代謝物である TXB₂ は、Kv7.1 の発現レベル及び機能には影響を及ぼさなかった。TXA₂ 受容体アンタゴニスト (SQ29548) 及び cAMP 依存性プロテインキナーゼ阻害剤 (RP-8-BR-MB-cAMP) は、STA₂ による Kv7.1 の発現量の増加、及び STA₂ による chromanol 293B 感受性 K⁺電流の増加を阻害した。興味深いことに、大腸がん細胞株の STA₂ による増殖効果は、chromanol 293B によって阻害された。以上の結果は、Kv7.1 チャネルが TXA₂ 誘導性のがん細胞増殖に寄与し、このアップレギュレーション機構には、TXA₂ 受容体を介する cAMP 経路が関与していることが示唆された。

第四部および第五部より、大腸がんにおいて異常に高発現する分子として ATP1AL1 および Kv7.1 を新たに見出した。ATP1AL1 や Kv7.1 は、大腸がんの新たなバイオマーカーもしくは治療標的になる可能性が考えられる。

以上、本研究では消化管においてイオン輸送タンパク質（イオンポンプ、トランスポーターおよびイオンチャネル）の関与する新しい生理機能および病態生理機能について明らかにした。本知見は、消化性潰瘍、逆流性食道炎、大腸がんなど消化器疾患の新たな治療法開発につながる基盤の一つになるものと思われる。

学位論文審査の要旨

胃酸 (HCl) は胃酸分泌細胞から胃の内腔に分泌される。胃酸の H⁺分泌を担っているのは胃プロトンポンプ (H⁺, K⁺-ATPase) で、胃酸分泌細胞の頂端膜と細管小胞膜の両方に存在している。他方、胃酸の Cl⁻分泌を担う膜輸送タンパク質については、これまで KCC4、CFTR、SLC26A9 などの候補分子が報告されているが、胃酸分泌機構の全容は未だ明らかになっていない。

近年、大腸がんの死亡者数は増加の一途にある。K⁺チャネルは、がんのバイオマーカー及びがん治療のための標的分子の一つとなり得る可能性が考えられており、大腸がんにおいても、いくつかの電位依存性 K⁺チャネルの病態生理学的な機能が報告されている。

申請者の高橋佑司氏は、胃酸分泌細胞の細管小胞と頂端膜の酸分泌メカニズムの差異に着目して H⁺, K⁺-ATPase の機能に関連するタンパク質の解明を目指し、第一部から第三部の研究を行った。また、第四部と第五部では、新たな大腸がん治療につながる基礎研究として、非胃型プロトンポンプ ATP1A1 と K⁺チャネルの Kv7.1 (KCNQ1) に着目した研究を行った。

1. 胃プロトンポンプと ClC-5 クロライド-プロトン交換輸送体の機能カップリング

Cl⁻/H⁺交換輸送体 ClC-5 が、胃腺の上部において活発に酸分泌を行う胃酸分泌細胞の細管小胞に発現していることを見出した。頂端膜における ClC-5 の有意な発現はなかった。ClC-5 は、細管小胞サンプルにおいて、H⁺, K⁺-ATPase と免疫共沈降した。小胞への ATP 依存的 ³⁶Cl⁻取り込みが H⁺, K⁺-ATPase 阻害剤の SCH28080 によって消失した。ClC-5 のテトラサイクリン発現誘導システムが導入された H⁺, K⁺-ATPase 安定発現 HEK293 細胞において、ClC-5 は H⁺, K⁺-ATPase と免疫共沈降したが、内在の Na⁺, K⁺-ATPase とは免疫共沈降しなかった。SCH28080 感受性 ³⁶Cl⁻輸送活性が、ClC-5 発現細胞には見られ、ClC-5 未発現細胞には見られなかった。これらの結果から、ClC-5 と H⁺, K⁺-ATPase は、細管小胞膜において機能的に関連し、刺激時の胃酸分泌に関与している可能性が示唆された。

2. 胃酸分泌細胞に発現する分子シャペロン ERp57 による H⁺, K⁺-ATPase 活性の調節

ERp57 と H⁺, K⁺-ATPase の両者が、胃酸分泌細胞の頂端膜サンプルに発現し、免疫共沈降することを見出した。細管小胞膜サンプルにおいては、ERp57 の有意な発現は見られなかった。H⁺, K⁺-ATPase を安定発現する HEK293 細胞における ERp57 の過剰発現は、H⁺, K⁺-ATPase の発現レベルを変化させることなく、H⁺, K⁺-ATPase 活性を増加させた。ERp57 のシャペロン機能を消失した変異体の過剰発現も同様に活性を増加させた。H⁺, K⁺-ATPase 発現細胞における、内在性 ERp57 のノックダウンは、H⁺, K⁺-ATPase の発現レベルを変化させることなく、活性を有意に減少させた。これらの結果から、ERp57 はそのシャペロン機能とは異なるメカニズムで胃 H⁺, K⁺-ATPase 活性をアップレギュレーションすることが示唆された。

3. 細胞容積調節性アニオンチャネル阻害剤である DCPIB による胃 H⁺, K⁺-ATPase の阻害

4-(2-Butyl-6, 7-dichloro-2-cyclopentylindan-1-on-5-yl) oxybutyric acid (DCPIB) が、胃細管小胞サンプル及び H⁺, K⁺-ATPase 発現細胞由来の膜サンプルにおいて、H⁺, K⁺-ATPase

の活性を阻害し、その IC₅₀ 値が約 9 μM であることを見出した。一方、DCPIB は、Na⁺, K⁺-ATPase や Ca²⁺-ATPase の活性に有意な影響を及ぼさなかった。H⁺, K⁺-ATPase 発現細胞において、DCPIB は H⁺, K⁺-ATPase による ⁸⁶Rb⁺ 輸送活性を阻害したが、Na⁺, K⁺-ATPase の輸送活性には影響を与えなかった。

4. ヒト結腸・直腸における非胃型プロトンポンプ ATP1A1 の発現

ATP1A1 は、生理機能の同定がまだ研究段階にあり不明である。半定量的 PCR により、ATP1A1 mRNA は、ヒト結腸の遠位部及び直腸に加え、結腸近位部にも発現していることがわかった。ATP1A1 mRNA は、20 例のヒト結腸・直腸がん組織のうち 12 例において、近傍の非がん組織に比べて、発現上昇していた。

5. トロンボキサン A₂ 誘導性の大腸がん細胞増殖における Kv7.1 チャンネルのアップレギュレーション

ヒト結腸直腸がん組織と近傍の非がん組織間の Kv7.1 チャンネルの発現レベルを比較したところ Kv7.1 タンパク質は、異なる患者からのがん組織において一貫してアップレギュレーションされていることがわかった。TXA₂ の安定アナログ 9,11-epithio-11,12-methano-thromboxane A₂ (STA₂) による大腸がん細胞株の処理により、Kv7.1 タンパク質の発現増加と並行して、Kv7.1 チャンネルの阻害剤 chromanol 293B に感受性のホールセル K⁺ 電流が増加した。大腸がん細胞株の STA₂ による増殖効果は、chromanol 293B によって阻害された。

以上、本研究では、消化管における新規のイオン輸送メカニズムおよびイオン輸送体の新たな病態生理機能の一部を明らかにした。食物の消化や栄養素の吸収、消化液の分泌や水分の吸収に伴う激しい外的環境変化に曝されている胃や腸の細胞においては、イオン輸送タンパク質による恒常性維持機能が極めて重要である。本論文は、イオン輸送体ならびに付随タンパク質をターゲットとし、新しい作用メカニズムを有する消化管疾患治療薬の開発に向けた重要な基礎的知見となり得るものと考えられる。主査および副査は、申請者高橋佑司氏に面接試験ならびに学力確認試験を行うとともに論文内容について審査を行い、博士（薬科学）の学位を授けるに値すると判定した。