



## Vasopressin Stimulates K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> Secretion and Inhibits Na<sup>+</sup> Absorption via V<sub>1</sub>-receptor in Guinea Pig Distal Colonic Epithelium

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 佐藤, 嘉彦 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1050">http://hdl.handle.net/10271/1050</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 197号	学位授与年月日	平成 8年 3月26日
氏名	佐藤嘉彦		
論文題目	<p>Vasopressin Stimulates <math>K^+</math> and <math>Cl^-</math> Secretion and Inhibits <math>Na^+</math> Absorption via <math>V_1</math>-receptor in Guinea Pig Distal Colonic Epithelium          (バソプレシンのモルモット遠位大腸粘膜における <math>V_1</math> レセプターを介したカリウムとクロライドの分泌作用ならびにナトリウム吸収の抑制作用)</p>		

博士(医学) 佐藤嘉彦

論文題目

Vasopressin Stimulates  $K^+$  and  $Cl^-$  Secretion and Inhibits  $Na^+$  Absorption via  $V_1$ -receptor in Guinea Pig Distal Colonic Epithelium

(バソプレシンのモルモット遠位大腸粘膜における  $V_1$  レセプターを介したカリウムとクロライドの分泌作用ならびにナトリウム吸収の抑制作用)

論文の内容の要旨

【目的】バソプレシンは水・電解質のホメオスタシスの維持に重要な役割を果たしているが、消化管において水・電解質代謝に重要な大腸の粘膜輸送に対するバソプレシンの効果は明らかにされていない。そこで我々は大腸粘膜イオン輸送に対するバソプレシンの作用を電気生理学的に検討し、その細胞内情報伝達機構について検討した。

【方法】モルモット遠位大腸の粘膜を剝離し、ユッシング型のチェンバーを用いて短絡電流 ( $I_{sc}$ ) と経上皮伝導度 ( $Gt$ ) を経時的に測定し、大腸粘膜における能動輸送へのバソプレシンの効果を検討した。さらに細胞内カルシウム画像解析システムを用いて細胞内カルシウム感受性色素である fura-2 にて大腸粘膜上皮細胞の細胞内カルシウム濃度への影響を検討した。

【結果】バソプレシンの漿膜側への投与により  $10^{-8}M$  では  $I_{sc}$  はマイナス側へ変化し  $10^{-7} - 10^{-6}M$  の高濃度では  $I_{sc}$  のプラス側への変化が見られた。まず漿膜側にブメタニド (0.1mM, 漿膜側) を投与してカリウムとクロライドの分泌を抑制した条件で観察されるプラスの電流はアミロリド (0.1mM, 粘膜側) 感受性のナトリウムの吸収と考えられたが、バソプレシンはこの電流を濃度依存性に抑制し、 $Gt$  も減少させ、アミロリド感受性の起電性ナトリウム吸収を阻害すると考えられた。つぎにあらかじめアミロリド (0.1mM, 粘膜側) を投与し起電性ナトリウム吸収を阻害した上で検討すると、バソプレシン  $10^{-8}M$  では  $I_{sc}$  はマイナス側へ変化し  $10^{-7} - 10^{-6}M$  の高濃度では  $I_{sc}$  のプラス側への変化が見られ、 $Gt$  は両方で増加していた。

これらの変化は共にブメタニド (0.1mM, 漿膜側) で抑制され、マイナス側への電流変化は粘膜側高カリウム液 ( $[K^+]_o = 105.4mM$ ) で消失することからカリウムの分泌によると考えられ、プラス側への変化はクロライドチャネルブロッカーである diphenylamine-2-carboxy-late (30  $\mu M$ , 粘膜側) により抑制されることからクロライドの分泌と考えられた。これらの変化はすべてバソプレシン  $V_1$  レセプター拮抗剤で抑制され、漿膜側溶液を低カルシウムとするとカリウム分泌とクロライド分泌は著明に低下した。ナトリウム吸収抑制に対しては漿膜側の低カルシウムの条件で影響されなかった。バソプレシンと細胞内カルシウムの関わりを明らかにするために陰窩細胞および表層上皮細胞においてバソプレシンが細胞内カルシウムイオンを変化させうるかを検討した。陰窩細胞においてバソプレシンにより細胞内カルシウム濃度は急速に上昇してピークに達した後に緩徐に低下していくという二相性の経過を示した。バソプレシンによる細胞内カルシウム上昇のピークは濃度依存性があり、 $10^{-6}M$  のバソプレシンにより細胞内カルシウム濃度は最大  $160.3 \pm 4.7nM$  の上昇がみられた。このカルシウム濃度変化はバソプレシン  $V_1$  レセプター拮抗剤で抑制された。還流液を低カルシウムとすると細胞内カルシウムの急速な上昇は比較的保たれていたが、緩徐に低下していく相は低下が急速で持続時間が短縮され、この部分は細胞外からのカルシウム流入に依存しているものと推測された。表層上皮細胞においても類似した細胞内カルシウム上昇反応が認められた。

【結論】バソプレシンはモルモット遠位大腸粘膜において  $V_1$  レセプターを介してナトリウム吸収抑制、カリウム分泌刺激、クロライド分泌刺激を起こすと考えられた。バソプレシンの  $V_1$  レセプター刺激により大腸粘膜上皮細胞の細胞内カルシウム濃度は上昇し、バソプレシンは細胞内カルシウムイオンをセカンドメッセンジャーとして大腸粘膜イオン輸送へ作用していると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

【目的】下垂体神経葉のつくるペプチドホルモンの一つであるアルギニンバソプレシン (AVP) は 9 アミノ酸残基からなり、一つのジスルフィド結合をもつ。AVP は一価鉍質イオンおよび水の輸送に関係することが知られている(「抗利尿ホルモン」ともよばれた)。

AVP に対する受容体には  $V_1$ ,  $V_2$  の 2 種が知られ、前者は  $Ca^{2+}$  依存性シグナル伝達系、後者はアデニル酸シクラーゼ系に共役するとされる。

従来、脊椎動物の尿細管における AVP の作用については多くの研究があるが、多くの点でその輸送系に共通性を示す腸管については研究が乏しい。そこで申請者はモルモット大腸における一価鉍質イオンの輸送に対して AVP がどのような影響を及ぼすのかを調べた。

【方法】粘膜の剝離片をユッシング・チェンバーに装着し、種々の条件下で短絡電流 (Isc) と経上皮伝導度 (Gt) を経時的に測定した。また、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を測定するためには単離した粘膜上皮細胞層に fura-2 を用いた。

【結果】漿膜側に添加した AVP の濃度に依存して Isc (粘膜→漿膜方向が正) は二相性 ( $10^{-10}$  M $\sim$  $10^{-9}$  M と  $10^{-7}$  M $\sim$  $10^{-6}$  M) の変化を示した。すなわち、 $10^{-9}$  M の AVP (低濃度 AVP) は Isc を減少させ、 $10^{-7}$  M の AVP (高濃度 AVP) はそれを増加させた。漿膜側ブメタニド存在下での Isc は粘膜側アミロリドで抑制され、AVP もこの Isc を抑制した。粘膜側  $10^{-4}$  M アミロリドの存在下で低濃度 AVP の添加により Isc は負の方向に転じたが、さらに高濃度 AVP を添加すると大きく正に転じた。粘膜側  $10^{-4}$  M アミロリド存在下での漿膜側  $10^{-4}$  M ブメタニドは AVP による Isc の変化を強く阻害した。粘膜側高  $K^+$  にすると Isc に対する低濃度 AVP の効果は消失したが、高濃度 AVP の Isc 促進作用はむしろ増大した。粘膜側  $30 \mu$  M ジフェニルアミン-2-カルボン酸 (DPC) は高濃度 AVP の Isc 促進効果を消失させた。EGTA 添加により漿膜側を低  $Ca^{2+}$  にすると、低濃度 AVP による Isc の減少も、高濃度 AVP による Isc の増加も消失した。このさい Gt は逆に増加した。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度は AVP 刺激で濃度依存的に一過性の増加を示した。 $V_1$  受容体拮抗薬は低濃度 AVP による Isc の減少、高濃度 AVP によるその増加の両方を消失させたが、 $V_2$  受容体拮抗薬は無効であった。 $V_1$  受容体拮抗薬はまた AVP による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の増加を濃度依存的に抑制した。

【考察】大腸粘膜上皮細胞の一価鉍質イオン輸送系については、頂膜にアミロリド感受性の  $Na^+$  チャネルと DPC 感受性  $Cl^-$  チャネルがあり、側底膜に  $Na^+/K^+$  交換能動ポンプ ( $Na, K$ -ATPase) と  $Na^+/K^+/2 Cl^-$  チャネルがあることが知られている。他に、頂膜には  $K^+$  と  $Cl^-$  のチャネルがあり、側底膜にも  $K^+$  チャネルがあるものと思われる。アミロリド阻害時の負の Isc の主体は  $K^+$  の分泌または  $Cl^-$  の吸収が考えられる。この効果は低濃度 AVP により増強され、粘膜側高  $K^+$  により消失し、高濃度 AVP により逆転して Isc は正に転じる。DPC 存在下では粘膜側の  $Cl^-$  チャネルがブロックされるので、このとき消失した高濃度 AVP 促進 Isc の主体は  $Cl^-$  の分泌であったと思われる。したがって、上の知見を参照することにより、低濃度 AVP の作用は  $K^+$  の分泌促進であって、高濃度 AVP のそれは  $Cl^-$  の分泌促進であると解釈することが可能である。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を低く抑えると、濃度によら

ず AVP の効果は消失するので、AVP の奏効は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の（一過性の）増加を介するものと解される。また、AVP 受容体の  $V_1, V_2$  サブタイプに特異的な拮抗薬を用いることにより、大腸粘膜上皮細胞の AVP 受容体サブタイプは  $V_1$  であり、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加も  $V_1$  受容体を介して生じるものようである。

以上の発表に際して以下のような質疑を行った。

- 1) 本研究と大腸の水吸収機構との関係について
- 2) Isc の成分について
- 3) Isc の測定装置
- 4) このような実験における種差
- 5) Isc の測定に用いた試料の細胞成分について
- 6) プメタニドの化学とそれを選んだ理由
- 7) 頂膜における  $\text{K}^+$  輸送機構と伝導度
- 8)  $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2 \text{Cl}^-$  輸送系の局在部位
- 9)  $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATPase}$  の役割
- 10) paracellular pathway の寄与
- 11) 試料の作製法、とくに crypt の単離法
- 12)  $\text{Ca}^{2+}$  の測定における「ふれ」または「振動」について
- 13) 細胞の viability と fura-2 の取り込みについて
- 14) AVP が神経系を介して作用する可能性

これらに対する申請者の解答は概ね適切で、本論文は大腸の一価鉍質イオン輸送機構について寄与するところがあり、本論文が博士（医学）の学位を授与するに十分な内容を有するものと全委員が一致して判定した。

論文審査担当者	主査	教授	藤田	道也			
	副査	教授	高田	明和	副査	教授	藤瀬 裕
	副査	助教授	小田	敏明	副査	講師	花井 洋行