

ATP 受容体を介するモルモット単離小葉間膵管の細胞内 Ca^{2+} 反応

Purinoceptors modulate intracellular Ca^{2+} in guinea-pig pancreatic duct cells

石 黒 洋* 成 瀬 達** 三 井 隆 弘*
高 開 屏* 藤 木 理 代* 近 藤 孝 晴*

Hiroshi ISHIGURO *, Satoru NARUSE **, Takahiro MITSUI *
Kai-ping GAO *, Kotoyo FUJIKI *, Takaharu KONDO *

抄録

The subtypes of purinoceptors in the pancreatic duct have been investigated by applying ATP, UTP and benzoylbenzoyl-ATP (BzATP) to basolateral and luminal surfaces of pancreatic ducts isolated from the guinea-pig pancreas. Changes in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were measured by microfluorometry in microperfused interlobular duct segments. Both ATP and UTP caused biphasic concentration-dependent increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in pancreatic duct cells when applied to either the basolateral or luminal membrane. Cross desensitization between ATP and UTP did not occur. BzATP increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ when applied to the luminal membrane. These data suggest that multiple P2Y receptors are localized to both the basolateral or luminal membranes, while P2X receptor is localized to the luminal membrane.

はじめに

細胞外に放出された ATP は、細胞膜上の ATP 受容体 (プリン受容体) を介して、様々な生体反応を引き起こす。ATP 受容体は、G タンパク共役型受容体である P2Y タイプ¹⁾と、陽イオンチャンネル内臓型受容体である P2X タイプ²⁾とに分かれ、それぞれ、さらに多くのサブタイプに分類される。上皮細胞においては、細胞外 ATP は主に P2Y₂ 受容体に結合し細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇を介して Cl^- イオン輸送を引き起こすとされ、特に気道上皮でよく研究されている³⁾。膵液分泌においては、イヌの単離膵の secretin 刺激による膵液分泌を、ATP が増強させたという報告⁴⁾がある。

膵臓の外分泌腺は、消化酵素を分泌する腺房細胞と、高濃度の HCO_3^- を含む等張液を分泌する導管細胞から

構成されている。膵液中の HCO_3^- は、secretin の刺激により、末梢の膵管 (小葉内~小葉間膵管) から分泌される⁵⁾。モルモットの膵から単離した小葉間膵管は、secretin 刺激により、その内腔に 130mM 以上の HCO_3^- を含む溶液を分泌する⁶⁾。我々は以前に、細胞外 ATP がこの HCO_3^- および水の分泌に及ぼす影響を検討し⁷⁾、血管側 (基底膜側) に加えた ATP は secretin 刺激による分泌を抑制し、管腔内 (管腔膜側) に加えた ATP は逆にこれを増強すると報告した。本研究では、管腔内微量灌流した単離膵管を用いて、細胞外 ATP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を測定し、基底膜および管腔膜の ATP 受容体のタイプ/サブタイプを検討した。

* 名古屋大学総合保健体育科学センター

** 名古屋大学医学部第2内科

* Research Center of Health, Physical Fitness and Sports, Nagoya University

** Internal Medicine II, Nagoya University School of Medicine

方 法

(1) 単離小葉間腺管の作成

単離小葉間腺管は既報⁸⁾に準じて作成した。体重約350gのHartley系モルモットから腺を摘出し、約1mm立法に分割した。この組織をコラゲナーゼで処理した後、実体顕微鏡下で、鋭利な針を用いて径100–150 μ mの小葉間腺管を単離した。

(2) 灌流液の組成

標準重炭酸塩緩衝液を用いた。組成 (mM) は、115NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10D-glucose, 25NaHCO₃で、混合ガス (95% O₂ + 5% CO₂) と平衡させ、37°C で pH を7.4に調整した。Ca²⁺-free 溶液は、CaCl₂の代わりにEGTA(2mM)を加えて作成した。

(3) 管腔内微量灌流 (図1)

倒立顕微鏡上で、単離腺管を、マイクロピペットを用いて管腔内を表層灌流とは別個に灌流した。外側のくびれのある holding pipette (径120 μ m) で腺管を保持し、その中通した perfusion pipette を管腔内に進め留置した。圧縮窒素ガスを用いて管腔内灌流液に約100pKaの圧をかけて灌流した。容積700 μ lの perfusion chamber (bath) 内を、37°C で管腔内灌流液と同じ方向に灌流 (表層灌流) した。実験終了後、管腔内が確実に灌流されているかを確かめるために、図1のように管腔内灌流液に色素 (Amido Black、片山化学、名古

屋) を混ぜた。単離腺管の左側から出た管腔内灌流液は表層灌流によって左方へ押し流されている。

(4) 腺導管細胞の [Ca²⁺]_i の測定

単離腺管に、細胞膜透過性の Ca²⁺ 感受性蛍光色素である fura-2 を負荷し、顕微蛍光測光により [Ca²⁺]_i を経時的に測定した。単離腺管を fura-2 AM (acetoxymethyl ester) 3–5 μ M と室温で60–90分間インキュベートした後に bath に移し、10–20個の細胞を含む範囲で蛍光測光した。図1のように範囲を設定すれば、表層と管腔内の灌流液にはほとんどコンタミネーションはないと考えられる。340nm と380nm で交互に励起し、510nm での蛍光強度を測定した。[Ca²⁺]_i の変化を蛍光強度の比 (F₃₄₀/F₃₈₀) で表した。

(5) 試薬

fura-2 AM (同仁堂、熊本)、ATP および UTP (Boehringer Mannheim)、benzoylbenzoyl-ATP (BzATP、Sigma)。

結 果

(1) 基底膜側 (図2 A) あるいは管腔膜側 (図2 B) に、ATP (0.1、1、10 μ M) を加えると、どちら側に加えても、ATP の濃度依存的に [Ca²⁺]_i を増加させた。[Ca²⁺]_i の変化は peak & plateau の2相性であった。

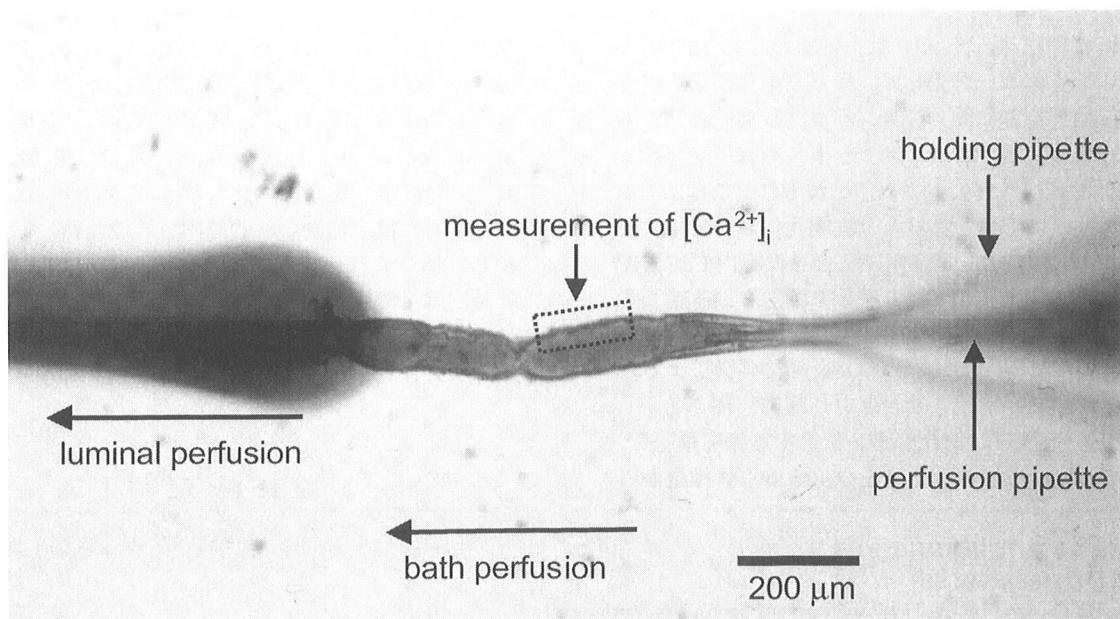


Figure 1

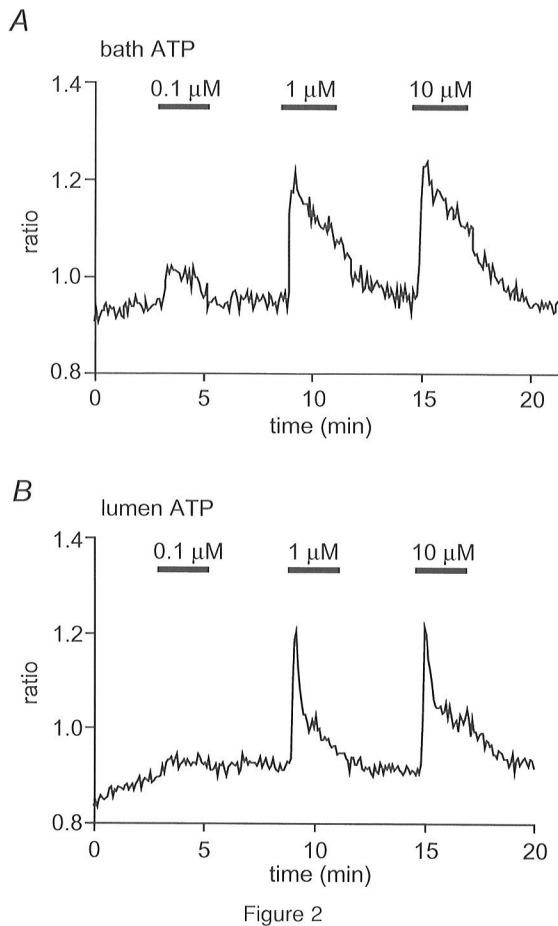


Figure 2

(2) 基底膜側に ATP ($1\mu\text{M}$) を加え $[Ca^{2+}]_i$ の反応が plateau になった時点で、管腔膜側に ATP ($1\mu\text{M}$) を加えると、 $[Ca^{2+}]_i$ はさらに増加した (図 3 A)。UTP でも同様の結果が得られた (図 3 B)。基底膜と管腔膜の両方に ATP および UTP と結合する受容体が存在することを示している。

(3) 基底膜側の灌流液を Ca^{2+} -free 溶液に切り替えた後で、基底膜側に ATP ($1\mu\text{M}$) を加えると $[Ca^{2+}]_i$ は一過性に増加したが、ATP の投与中に基線に戻り plateau は認められなかった (図 4 A)。基底膜側と管腔膜側の灌流液をともに Ca^{2+} -free 溶液に切り替えた後、まず管腔膜側、次に基底膜側に ATP を加えると、どちらも $[Ca^{2+}]_i$ の増加が見られた (図 4 B)。細胞外 ATP による $[Ca^{2+}]_i$ の増加には、細胞外からの Ca^{2+} の流入と細胞内 Ca^{2+} ストアからの放出の両方の成分があると考えられる。基底膜と管腔膜の両方に G タンパク共役型受容体である P2Y タイプの受容体が存在することを示している。

(4) UTP と結合するサブタイプは P2Y₂、P2Y₄ および P2Y₆ である。P2Y₂ に対する作用強度は ATP = UTP であるのに対し、P2Y₄ と P2Y₆ に対する作用強度は UTP > ATP である⁹⁾。P2Y₂ 以外に、P2Y₄ あるいは P2Y₆ が存在するかどうかを検討するために、cross desensitization を行った。受容体が単一であれば、高濃度の ATP で刺激中あるいは刺激した直後に UTP を加えると反応は減弱するはずである。基底膜側に ATP ($10\mu\text{M}$) を投与中にさらに UTP ($10\mu\text{M}$) を同側に加えた場合 (図 5 A)、基底膜側に UTP ($10\mu\text{M}$) を加えた直後に ATP ($10\mu\text{M}$) を同側に加えた場合 (図 5 B)、管腔膜側に ATP ($10\mu\text{M}$) を投与中にさらに UTP ($10\mu\text{M}$) を同側に加えた場合 (図 5 C)、管腔膜側に UTP ($10\mu\text{M}$) を加えた直後に ATP ($10\mu\text{M}$) を同側に加えた場合 (図 5 D)、いずれも cross desensitization は見られなかった。また、管腔膜側に P2X のアゴニストである BzATP ($10\mu\text{M}$) を加えると $[Ca^{2+}]_i$ の増加が見られた。

考 察

本研究では、モルモット腺管細胞の基底膜および管腔膜に P2Y₂ を含む 2 種類以上の P2Y タイプ受容体が存在すること、管腔膜側に P2X タイプの受容体が存在することを示した (図 6)。いずれのサブタイプに作用しても $[Ca^{2+}]_i$ は増加する。しかし、腺管細胞の生理機能である HCO_3^- と水の分泌に及ぼす影響は異なり⁷⁾、基底膜側に加えた ATP は secretin 刺激による分泌を抑制し、管腔膜側に加えた ATP は逆にこれを増強する。メカニズムとしては、① ATP を基底膜側に加えた場合には、 Ca^{2+} 以外の細胞内情報伝達系 (protein kinase C など) が抑制性に働く可能性、② ATP が作用した基底膜あるいは管腔膜の細胞膜近傍でのみ $[Ca^{2+}]_i$ が増加し、同側のイオン輸送担体に作用する可能性、などが考えられる。ラットの腺管細胞の電気生理学的研究では、P2Y は K^+ チャンネルを抑制し、P2X は非選択的陽イオンチャンネルを活性化すると報告されており¹⁰⁾、やはり機能は単一でないことを示している。

細胞外 ATP の生理的役割については、①基底膜へは抑制性の神経伝達物質として、②管腔膜へは autocrine あるいは paracrine 的に分泌刺激物質として、作用していると推定される。腺液中のヌクレオチドあるいはその分解産物を測定した報告はいまだ無いが、最近、単離した腺房細胞が acetylcholine の刺激によって ATP を分泌すると報告された¹¹⁾。腺管細胞が ATP を分泌するかどうかを将来検討する必要がある。

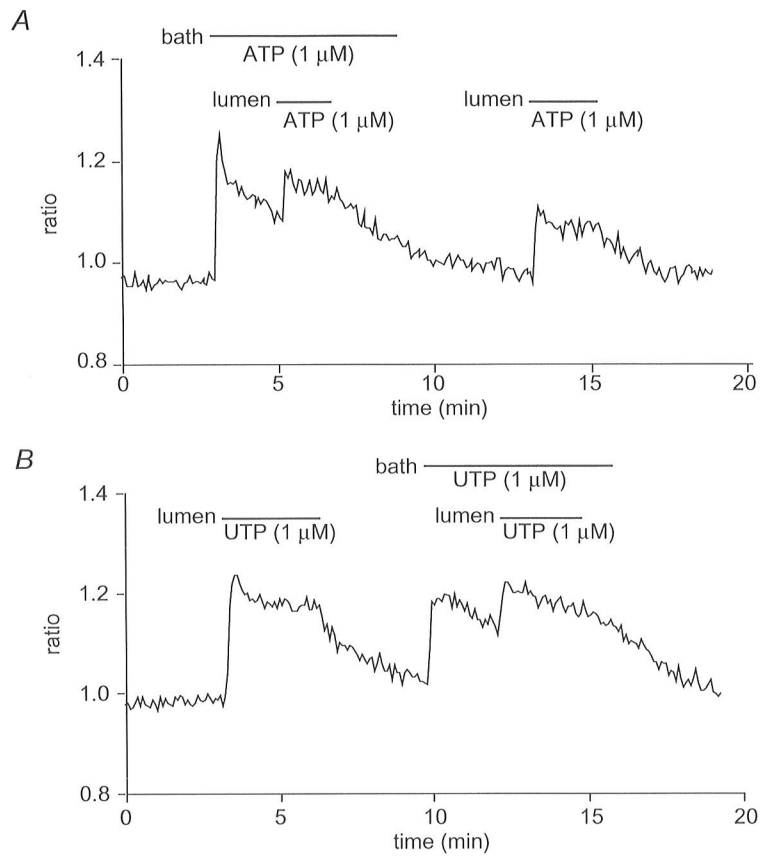


Figure 3

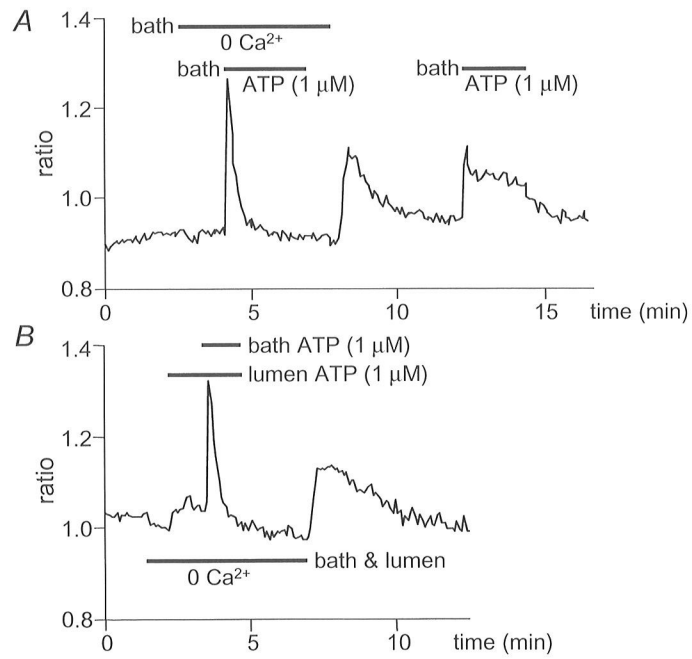


Figure 4

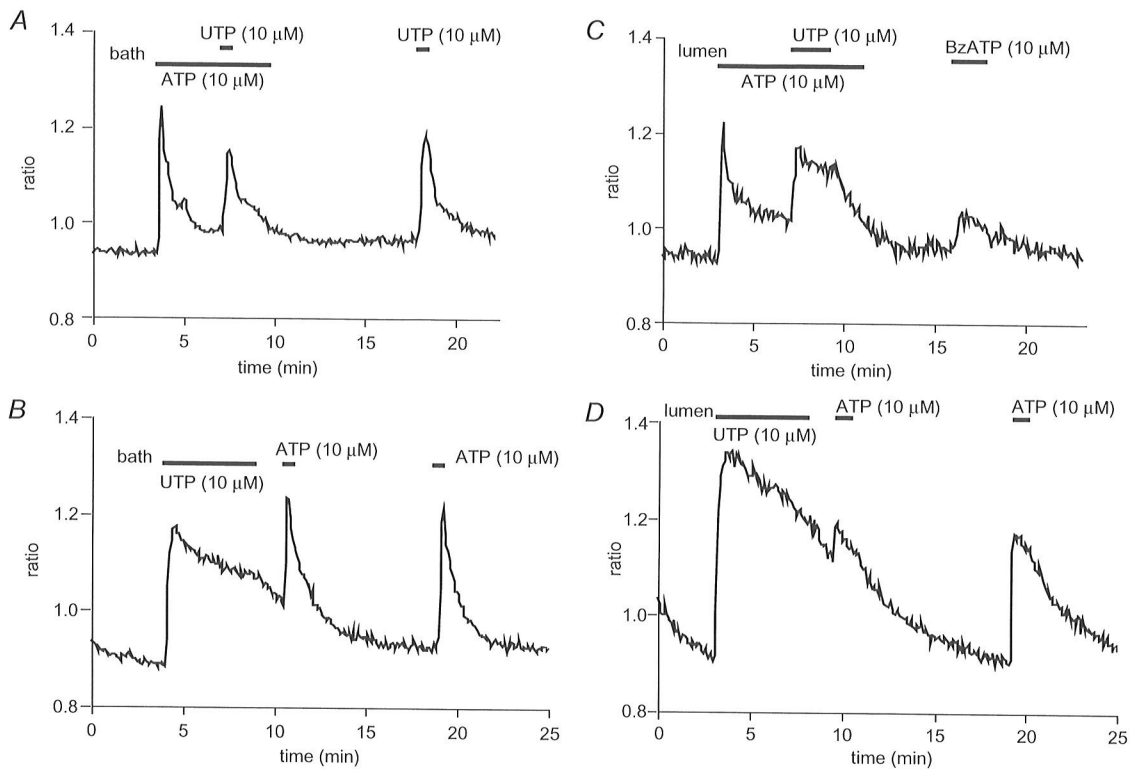


Figure 5

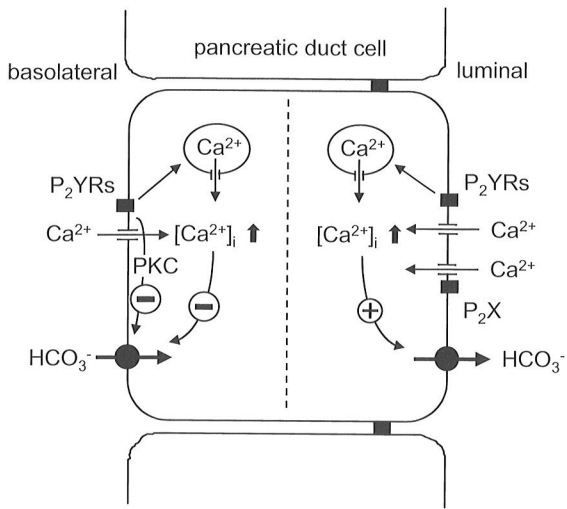


Figure 6

結 語

モルモット膵導管細胞には、 $P2Y_2$ を含む 2 種類以上の $P2Y$ タイプおよび $P2X$ タイプ受容体が基底膜と管腔膜に機能的に配置され、 HCO_3^- および水の分泌を調節している。

図の説明

Figure 1. Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ in microperfused interlobular duct segments

Interlobular duct segment isolated from guinea-pig pancreas and cannulated (from the right) for luminal microperfusion. In this image the lumen was perfused with a coloured solution which can be seen emerging from the left end of the duct where it is swept away by the flow of the bath solution from right to left.

Figure 2. Effects of basolateral and luminal ATP on $[Ca^{2+}]_i$

Changes in fura-2 fluorescence ratio (F340/F380) indicating changes in $[Ca^{2+}]_i$ in microperfused ducts stimulated with ATP. The bath and lumen were perfused separately with the standard HCO_3^- -buffered solution.

During the periods indicated, 0.1, 1 and 10 μM ATP were applied via the bath (A) or the lumen (B). Each trace is representative of four similar experiments.

Figure 3. Effects of basolateral and luminal ATP and UTP on $[Ca^{2+}]_i$

1 μM ATP (A) and 1 μM UTP (B) were applied via the bath and/or the lumen. Each trace is representative of four

similar experiments.

Figure 4. Effects of basolateral and luminal ATP on $[Ca^{2+}]_i$ in the absence of extracellular Ca^{2+}

A. The bath was perfused with Ca^{2+} -free HCO_3^- -buffered solution and 1 μ M ATP was applied to the bath. **B.** Both the bath and lumen were perfused with Ca^{2+} -free HCO_3^- -buffered solution and 1 μ M ATP was applied to the bath and then to the lumen. Each trace is representative of four similar experiments.

Figure 5. Cross desensitization of $[Ca^{2+}]_i$ response to ATP and UTP

During the periods indicated, 10 μ M of ATP, UTP and BzATP were applied via the bath and/or the lumen. Each trace is representative of four similar experiments.

Figure 6. Hypothetical role of purinoceptors in guinea-pig pancreatic duct cells

P2Y receptors on the basolateral membrane increase $[Ca^{2+}]_i$ but also activate protein kinase C which inhibits HCO_3^- uptake. P2Y and P2X receptors on the luminal membrane increase $[Ca^{2+}]_i$ close to the membrane, which stimulates HCO_3^- secretion.

文 献

- 1) Barnard, E. A., G. Burnstock, and T. E. Webb: G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends. Pharmacol. Sci.* 15: 67-70, 1994.
- 2) Khakh, B.S., G. Burnstock, C. Kennedy, B.F. King, R.A. North, P. Seguela, M. Voigt, and P.P. Humphrey: International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* 53: 107-118, 2001.
- 3) Stutts, M. J., J. G. Fitz, A. M. Paradiso, and R. C. Boucher: Multiple modes of regulation of airway epithelial chloride secretion by extracellular ATP. *Am. J. Physiol.* 267: C1442-1451, 1994.
- 4) Yamagishi, F., N. Homma, K. Haruta, K. Iwatsuki, and S. Chiba: Effects of three purine-related compounds on pancreatic exocrine secretion in the dog. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 13: 425-432, 1986.
- 5) Case, R. M., and B. E. Argent: Pancreatic duct cell secretion: control and mechanisms of transport. In *The Pancreas: Biology, Pathophysiology, and Disease*, ed. V. L. W. Go, E. P. Dimagno, J. D., Gardner, E. Lebenthal, H. A. Reber, and G. A. Scheele, 2nd edn, pp.301-350. Raven Press, New York, 1993.
- 6) Ishiguro, H., S. Naruse, M. C. Steward, M. Kitagawa, S. B. H. Ko, T. Hayakawa, and R. M. Case: Fluid secretion in interlobular ducts isolated from guinea-pig pancreas. *J. Physiol. (Lond.)* 511: 407-422, 1998.
- 7) Ishiguro, H., S. Naruse, M. Kitagawa, T. Hayakawa, R. M. Case, and M. C. Steward: Luminal ATP stimulates fluid and HCO_3^- secretion in guinea-pig pancreatic duct. *J. Physiol. (Lond.)* 519: 551-558, 1999.
- 8) Arkle, S., C. M. Lee, M. J. Cullen, and B. E. Argent: Isolation of ducts from the pancreas of copper-deficient rats. *Q. J. Exp. Physiol.* 71: 249-265, 1986.
- 9) Communi, D., and J.-M. Boeynaems: Receptors responsive to extracellular pyrimidine nucleotides. *Trends. Pharmacol. Sci.* 18: 83-86, 1997.
- 10) Hede, S. E., J. Amstrup, B. C. Christoffersen, and I. Novak: Purinoceptors evoke different electrophysiological responses in pancreatic ducts. P2Y inhibits K^+ conductance, and P2X stimulates cation conductance. *J. Biol. Chem.* 274: 31784-31791, 1999.
- 11) Sorensen, C. E., and I. Novak: Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus. Use of fluorescent probes and confocal microscopy. *J. Biol. Chem.* 276: 32925-32932, 2001.

(2001年12月21日受付)