

大腸におけるアクアポリン 3 の機能解析とその発現制御機構の解明

五十嵐信智

The Elucidation of the Function and the Expression Control Mechanism of Aquaporin-3 in the Colon

Nobutomo Ikarashi

Department of Clinical Pharmacokinetics, Hoshi University; 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan.

(Received May 29, 2013)

Aquaporins (AQPs) are membrane channels that transport water within the human body and are therefore important for the regulation of water homeostasis. However, little is known regarding the details of the physiological role of AQP3, which is predominantly expressed in the colon. Thus, we investigated the role of AQP3 in the colon using laxative agents (magnesium sulfate and bisacodyl). The results suggest that the laxative effect produced by magnesium sulfate, which is classified as an osmotic laxative, is not simply a result of the changes in osmotic pressure but is also associated with the increased expression of AQP3 in the mucosal epithelial cells of the colon. In addition, magnesium sulfate increased colonic AQP3 expression through adenylate cyclase activation, which is caused by an increase in the intracellular Mg^{2+} concentration. This effect may trigger CREB phosphorylation through PKA activation and promote AQP3 gene transcription. Meanwhile, bisacodyl, which is classified as a stimulant laxative, decreases the expression level of AQP3 in the mucosal epithelial cells of the colon, resulting in the inhibition of water transfer from the intestinal tract to the vascular side of the epithelium, eventually leading to the development of diarrhea. It was also observed that the direct activation of colon macrophages by bisacodyl increases the secretion of PGE_2 , which acts as a paracrine factor and decreases AQP3 expression in colon mucosal epithelial cells. Future studies of the enteric AQP3 expression level and water transport may aid in the development of new laxative and antidiarrheal agents that target AQP3.

Key words——aquaporin-3; colon; magnesium sulfate; bisacodyl; prostaglandin E_2 ; diarrhea

1. はじめに

近年、食の欧米化や高齢化社会の到来に伴い、便秘症の患者が急増している。特に、60歳以上の女性では約50%が便秘症で苦しんでいるとされており、世界中で便秘症の治療や緩和がクローズアップされている。また、緩和ケアを目的としてモルヒネなどのオピオイドを服用している患者が増加しているが、服用患者のほぼ100%に便秘が認められる。現在、このような便秘症患者に対しては瀉下剤を用いた対症療法が行われている。しかしながら、その治療効果は十分なものとは言えず、便秘症に対してこれまでにない新しい対策を講じることが急務とな

っている。

一方、最近、体内の水の輸送にアクアポリン (aquaporins; AQPs) が重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。¹⁾ AQPsは浸透圧勾配により、水やグリセロールを選択的に透過させる水チャネルである。ヒトにおいては現在、AQP0からAQP12までの13種類が様々な臓器に発現し [Fig. 1(A)], 種々の疾患の発症に関与していることが明らかとなってきた。²⁻⁴⁾

腸管には多数のAQPsファミリーの発現が認められている。便の水分量を最終的にコントロールしている大腸には、AQP3が粘膜上皮細胞に優位に発現している [Fig. 1(B)]。これまでに、便の水分量とAQP3との関連性が示唆されているにもかかわらず、AQP3の大腸における生理的役割やその発現制御機構の詳細についてはほとんどわかっていなかった。本総説では、大腸におけるAQP3の機能と

The author declares no conflict of interest.

星薬科大学薬動学教室 (〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41)

e-mail: ikarashi@hoshi.ac.jp

本総説は、平成24年度日本薬学会関東支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

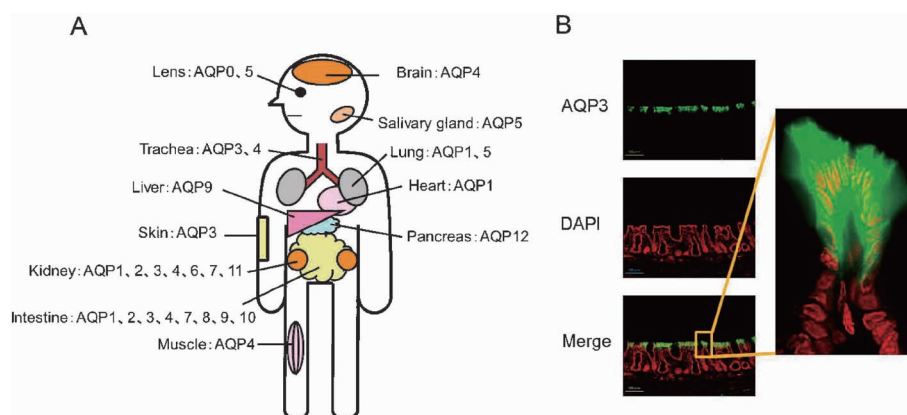


Fig. 1. Distribution of AQPs in Human (A) and the Distribution of AQP3 Expression in the Colon of Rats (B)

その発現制御機構の解明並びに AQP3 をターゲットとした便秘症に対する治療戦略へのアプローチについて、筆者らの研究を中心に報告したい。

2. 硫酸マグネシウムの瀉下作用における大腸 AQP3 の役割

便秘症の第一選択に用いられる浸透圧性下剤は、消化管ではほとんど吸収されず、腸管内の浸透圧を上昇させるため、水を血管側から管腔側へと移動させ、瀉下作用を示すと考えられている。われわれはまず、浸透圧性下剤として硫酸マグネシウム (MgSO_4) を用いて、 MgSO_4 をラットに経口投与した際の糞中水分量の変動と大腸内浸透圧あるいは AQP3 発現量の変動との関係について検討した。⁵⁾ その結果、糞中水分量は MgSO_4 投与 2 時間目以降から有意に増加し、投与 4 時間後から 8 時間後にかけて重度の下痢が発生することがわかった [Fig. 2 (A)]. それに対して、大腸における浸透圧調節関連遺伝子 (sodium *myo*-inositol transporter)^{6,7)} を指標に大腸内浸透圧を調べた結果、大腸内浸透圧は 2 時間後にはピークに達し、浸透圧の変動パターンと下痢発生のパターンが異なることが明らかとなった [Fig. 2(B)]. 一方、大腸の AQP3 のタンパク質発現量は MgSO_4 投与後、経時的かつ著明に増加し、投与 8 時間後では投与直後に比べ、約 8 倍有意に増加することが明らかとなった [Fig. 2(C)]. また、この AQP3 の発現パターンは、糞中水分量の経時変化と符合することがわかった。

これまで、 MgSO_4 を含む浸透圧性下剤は、腸管内の浸透圧が上昇することにより下痢が発症するものと考えられていた。しかし、 MgSO_4 投与 2 時間

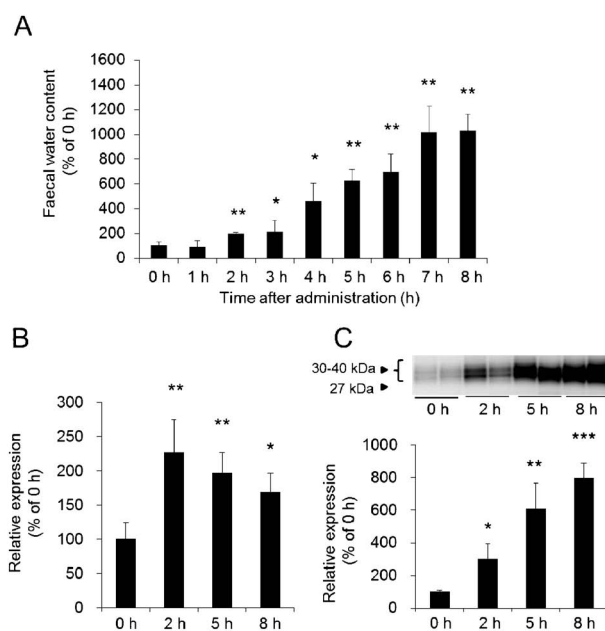


Fig. 2. Effect of MgSO_4 on Faecal Water Content (A), Sodium *myo*-inositol Transporter mRNA Expression Level (B), and AQP3 Protein Expression Level (C) in the Rat Colon

Rat faecal samples were collected at various times for up to 8 h beginning immediately after the administration of MgSO_4 , and the faecal water content was measured (A). The mRNA expression levels of sodium *myo*-inositol transporter in the colon were analyzed by real-time RT-PCR (B). The protein expression levels of AQP3 in the colon were analyzed by Western blotting (C). Data represent means \pm S.D. for 6 rats. Dunnett's test: * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001 vs. 0 h. Modified from Ikarashi *et al.*⁵⁾

後の時点では既に、腸管内の浸透圧は血管内のそれに比べ、高くなっているものと考えられるが、下痢は発症しなかった。これは、浸透圧勾配から考えると、水の移動は血管側から管腔側方向であったにもかかわらず、AQP3 の発現量が十分ではなかったため、水の移動量が少なく、下痢を発症するには至らなかったものと考えられる。それに対して、 MgSO_4

投与4時間目以降では、浸透圧は2時間後に比べ、いくぶん低下したものの、AQP3の発現量が著明に増加したため、大量の水が血管内から管腔内に移動し、下痢が発症したものと考えられる。以上の結果から、MgSO₄の瀉下作用が単に浸透圧の変化のみによってもたらされるものではなく、大腸粘膜上皮細胞のAQP3の発現増加を伴って、極めて合理的に生じている可能性が示唆された。

3. 硫酸マグネシウムによる大腸 AQP3 発現増加メカニズムの解明

次に、MgSO₄による大腸 AQP3 の発現増加メカニズムをヒト結腸がん由来 HT-29 細胞を用いて調べた。⁸⁾

MgSO₄ は水溶液中で Mg²⁺ と SO₄²⁻ に解離する。そこで、MgSO₄ による AQP3 の発現増加作用が Mg²⁺ あるいは SO₄²⁻ に起因するものであるか否かについて、種々のマグネシウム塩及び硫酸塩を用いて検討した。その結果、MgSO₄ による AQP3 の発現増加には SO₄²⁻ は関与せず、Mg²⁺ のみが重要な役割を担っていることが明らかとなった。⁸⁾

細胞内に取り込まれた Mg は、アデニル酸シクラーゼを活性化することが知られている。さらに、アデニル酸シクラーゼの活性化は cAMP を増加させ、プロテインキナーゼ A の活性化を介して転写因子 cAMP-response element-binding protein (CREB) をリン酸化することが知られている。リン酸化された CREB は、AQP3 の転写を促進し、発現量を増加させる。そこで、MgSO₄ による AQP3 発現増加メカニズムについて、この経路に焦点を当て、検討した。⁸⁾ その結果、MgSO₄ は細胞内 Mg 濃度を増加させること、アデニル酸シクラーゼ及びプロテインキナーゼ A を活性化させること、及び CREB のリン酸化を亢進させることが明らかとなった。

以上の結果から、MgSO₄ は細胞内 Mg 濃度を増加させることにより、アデニル酸シクラーゼ活性、プロテインキナーゼ A 活性及び CREB のリン酸化を亢進させ、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 を増加させることが明らかとなった (Fig. 3)。

4. ビサコジルの瀉下作用における大腸 AQP3 の役割

ビスコジルは大腸刺激性の瀉下剤に分類され、単独あるいは浸透圧性下剤との併用により、便秘症の改善に広く用いられている。ビスコジルは、大腸の

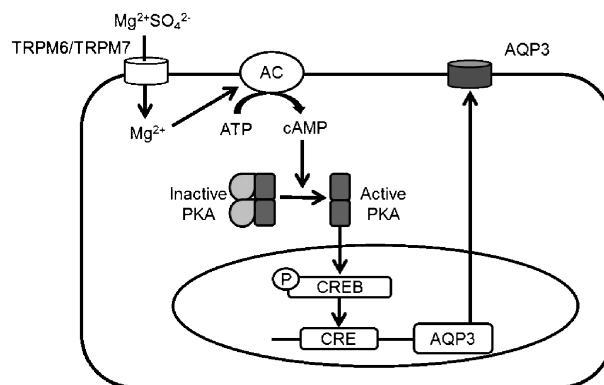


Fig. 3. Suggested Main Mechanisms of the Laxative Effect of MgSO₄⁸⁾

prostaglandin E₂ (PGE₂) の産生を促進し、Na⁺, K⁺-ATPase の活性を阻害する。その結果、腸管内浸透圧が高まり、腸管側から血管側への水の吸収を減弱させるため、瀉下作用を発現すると考えられている。^{9,10)} そこで次に、浸透圧性下剤とは異なるメカニズムを有する瀉下剤としてビスコジルを用いて、ビスコジルの瀉下作用における大腸 AQP3 の役割を検討した。¹¹⁾

ビスコジルをラットに経口投与した結果、ビスコジルは MgSO₄ 投与時とは異なり、大腸内浸透圧を変化させずに、投与4時間後から激しい下痢を引き起こすことが確認できた [Fig. 4(A)]。一方、大腸の AQP3 のタンパク質発現量は投与2時間後から著明に低下し、この AQP3 の発現低下と下痢発生の経時変化が相関していた [Fig. 4(B)]。また、AQP3 阻害剤である塩化水銀及び硫酸銅を用いた実験から、腸管内浸透圧を変動させずに大腸の AQP3 の活性が阻害されると、下痢が発症することがわかった。¹²⁾ 以上の結果から、ビスコジルによる瀉下作用は、AQP3 の発現低下が起因して生じている可能性が示唆された。すなわち、生理的条件下においては、大腸の管腔内の浸透圧は血管側のそれに比べて低いため、水は腸管側から血管側に移動し、糞の濃縮が行われる。ビスコジルは大腸の AQP3 の発現量を減少させることにより、腸管側から血管側への水の移動を減少させ、瀉下作用を示すと考えられた。

5. ビサコジルによる大腸 AQP3 発現低下メカニズムの解明

次に、ビスコジルがどのようなメカニズムで AQP3 の発現量を低下させたのかを調べた。¹¹⁾

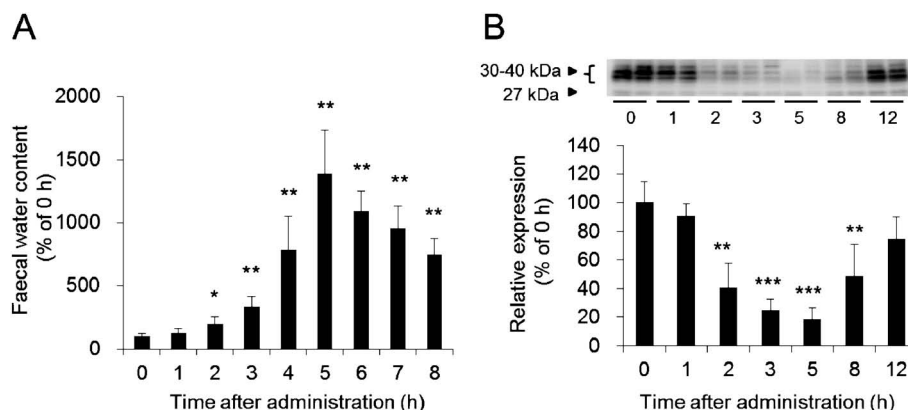


Fig. 4. Effect of Bisacodyl on Faecal Water Content (A) and AQP3 Protein Expression Level in the Rat Colon (B)

Rat faecal samples were collected at various times for up to 8 h beginning immediately after the administration of bisacodyl, and the faecal water content was measured (A). The protein expression levels of AQP3 in the colon were analyzed by Western blotting (B). Data represent means \pm S.D. for 6 rats. Dunnett's test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. 0 h. Modified from Ikarashi *et al.*¹¹⁾

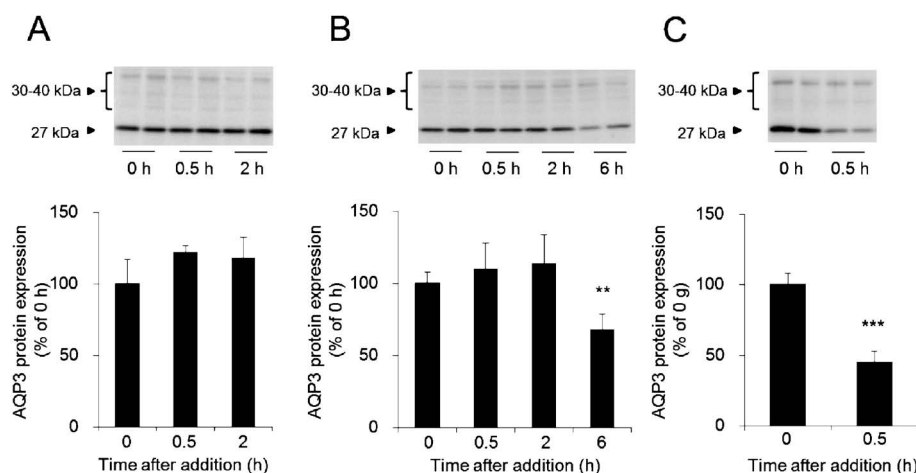


Fig. 5. Effect of Bisacodyl (A), TNF- α (B), and PGE₂ (C) on the Expression of AQP3 in HT-29 Cells

HT-29 cells were treated with bisacodyl, TNF- α , or PGE₂ for 0.5 h, 2 h, or 6 h. The protein expression level of AQP3 was measured by Western blotting. Data represent means \pm S.D. for 6 experiments. Dunnett's test or Student's *t*-test: ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. 0 h. Modified from Ikarashi *et al.*¹¹⁾

まず、ビスコジルが直接、大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3の発現量を低下させた可能性について、HT-29細胞を用いて調べた。HT-29細胞にビスコジルを添加し、AQP3の発現量を解析した結果、ビスコジルはAQP3の発現に影響を及ぼさないことがわかった [Fig. 5(A)]。したがって、ビスコジルが直接、大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3の発現量を低下させている可能性は低いことが考えられた。

続いて、ビスコジルが間接的に、大腸のAQP3の発現量を低下させた可能性について調べた。ビスコジルは大腸マクロファージを活性化することが知られている。^{13,14)} マクロファージが活性化すると、tumor necrosis factor- α (TNF- α) などの炎症性サイトカインの発現及び分泌が亢進し、cycloo-

xylase-2 (COX2) の発現増加を介して PGE₂ を分泌する。一方、TNF- α ¹⁵⁾ 及び PGE₂¹⁶⁾ は、AQP3の発現量を低下させることが知られている。そこで、ビスコジルが直接マクロファージを活性化し、TNF- α 及び PGE₂ を分泌させるか否かをマウスマクロファージ由来細胞株 Raw264.7 細胞を用いて調べた。Raw264.7細胞にビスコジルを添加した結果、TNF- α の分泌量の増加、COX2の発現量の増加及び PGE₂ の分泌量の増加が認められた。一方、ラットにビスコジルを投与し、下痢が発生した際の大腸においても、TNF- α などの炎症性サイトカイン及び COX2 の発現増加、並びに PGE₂ の分泌増加が認められた。また、下痢発生時における COX2 の発現増加はマクロファージにおいて特異的に認めら

れた。以上のことから、ビスコジルはマクロファージを活性化し、TNF- α 及び PGE₂ の産生及び分泌を亢進することがわかった。

次に、マクロファージから分泌された TNF- α 及び PGE₂ がパラクライン因子として大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現を低下させているかどうかを調べた。その結果、HT-29 細胞に TNF- α を添加しても、添加 2 時間後では AQP3 の発現量に変化はみられず、6 時間後になって初めて、低下することがわかった [Fig. 5(B)]。一方、HT-29 細胞に PGE₂ を添加すると、AQP3 の発現量が著明に低下し、この発現低下は PGE₂ 添加後 30 分以内には起きることがわかった [Fig. 5(C)]。ビスコジルの投与による大腸 AQP3 の発現低下が極めて速やかに生じていたことから、TNF- α よりもむしろ、マクロファージから分泌された PGE₂ がパラクライン因子として大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現量を低下させたと考えられた。

最後に、COXs 阻害剤インドメタシンをラットに前処置することにより、ビスコジルの瀉下作用が減弱するかどうかについて調べた。その結果、インドメタシンを前投与することにより、ビスコジルの瀉下作用が抑制されるとともに、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 タンパク質発現量の低下及び PGE₂ 濃度の上昇がいずれも抑制されることがわかった (Fig. 6)。このことより、ビスコジル投与による大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の急速かつ著明な発現低下には、PGE₂ が関与している可能性が確認できた。

以上の結果より、ビスコジルは、直接、大腸のマクロファージを活性化させることにより、マクロファージの PGE₂ の産生及び分泌を亢進すること、及び PGE₂ はパラクライン因子として大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現を低下させていることが明らかとなった (Fig. 7)。

6. 硫酸マグネシウムとビスコジルの併用効果

臨床において、重度な便秘症患者には、第一選択薬として浸透圧性下剤（酸化マグネシウムや硫酸マグネシウム）が処方され、効果が認められない場合には大腸刺激性下剤（ビスコジルやセンノシド）など、作用メカニズムが異なる瀉下剤が併用される。しかし、瀉下剤の併用により、瀉下作用が増強するかどうかについての明確なエビデンスはなく、経験的に使われているのが現状である。そこで、作用機

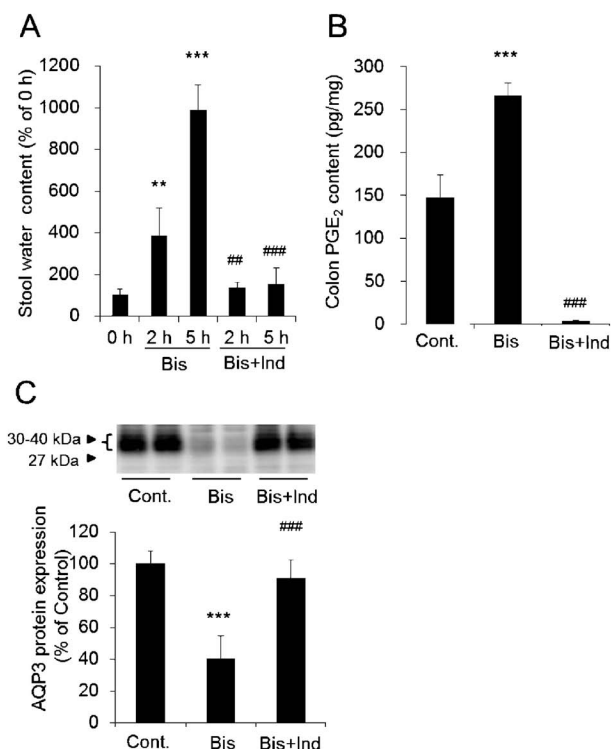


Fig. 6. Changes in the Faecal Water Content (A), PGE₂ Concentration (B), and the Protein Expression Level of AQP3 (C) in the Colon Caused by Bisacodyl Administration to Rats Pretreated with Indomethacin

Indomethacin was intraperitoneally administered to rats. Bisacodyl was orally administered to rats 15 min after the administration of indomethacin. The faecal water content was measured 2 h and 5 h after the administration of bisacodyl (A). The colon was removed 2 h after the administration of bisacodyl, and the PGE₂ content was measured (B). The protein expression level of AQP3 was analyzed by Western blotting (C). Data represent means \pm S.D. for 6 rats. Tukey's test: ** p < 0.01 and *** p < 0.001 vs. 0 h or control. ## p < 0.01 and ### p < 0.001 vs. rats treated bisacodyl alone at each hour. Modified from Ikarashi *et al.*¹¹⁾

序が異なる瀉下剤（MgSO₄ 及びビスコジル）を併用した場合、瀉下作用がどのように変化するかをラットを用いて調べた。¹⁷⁾

MgSO₄ あるいはビスコジルをそれぞれ単独で経口投与した際には、いずれも糞中水分量が投与 2 時間後から有意に増加し、投与 4 時間後から 8 時間後にかけて、激しい下痢が認められた。一方、MgSO₄ とビスコジルを併用した場合、糞中水分量の変動パターン及び変化率には両薬剤の相加効果あるいは相乗効果はみられず、ビスコジル単独投与時のそれらとほぼ同様であることが明らかとなった [Fig. 8 (A)]。

次に、MgSO₄ とビスコジルを併用しても瀉下作用が増強しなかった理由について、大腸内浸透圧及び AQP3 に着目し、調べた。その結果、併用群の

大腸内浸透圧は Control 群に比べて高く、この値は MgSO_4 単独群とほぼ同程度であった [Fig. 8(B)]. 一方、併用群の大腸 AQP3 の発現量は著明に低下し、この発現低下はビスコジル単独群とほぼ同程度であった [Fig. 8(C)].

以上の結果から、 MgSO_4 とビスコジルを併用しても瀉下作用が増強しない理由について以下のように

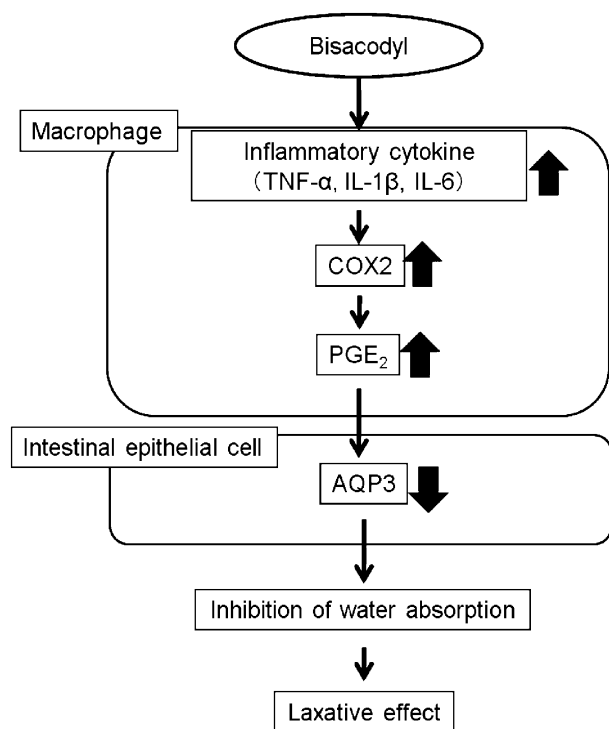


Fig. 7. Suggested Main Mechanisms of the Laxative Effect of Bisacodyl¹¹⁾

に考えられた。生理的条件下においては、大腸の管腔内の浸透圧は血管側のそれに比べて低いため、水は腸管側から血管側に輸送される。 MgSO_4 とビスコジルを併用した場合、管腔内の浸透圧は上昇するため、 MgSO_4 単独投与時と同様に、AQP3 を介して水は管腔側に移動する。しかし、ビスコジルによる作用が強くなり、AQP3 の発現量が著明に低下したため、水の移動量は極めて低く、ビスコジル単独投与の場合と同程度の瀉下作用を示したと考えられた。

7. おわりに

本研究の結果から、浸透圧性下剤及び大腸刺激性下剤の瀉下作用において、大腸の AQP3 の発現量が重要な役割を担っていることが明らかとなった。加えて、大腸 AQP3 の機能を阻害すると、下痢が発生することも明らかとなった。AQP3 はヒトの腸管において最も多く発現している AQP の一種である。今後、腸管 AQP3 の発現及び機能と水の移動について更なる研究を展開することにより、AQP3 をターゲットとした新たな瀉下剤や止瀉剤の開発が可能になるものと考えられる。

さらに、本研究により、瀉下剤の併用がかならずしも瀉下作用を増強しないことが初めて明らかとなった。現在、重度な便秘症患者に対して、エビデンスが希薄にもかかわらず、作用機序が異なる複数の瀉下剤が併用されている。薬物の服用数の増加は、薬物間相互作用の増加につながる。瀉下剤の併用がかならずしも瀉下作用を増強しないことから考えて

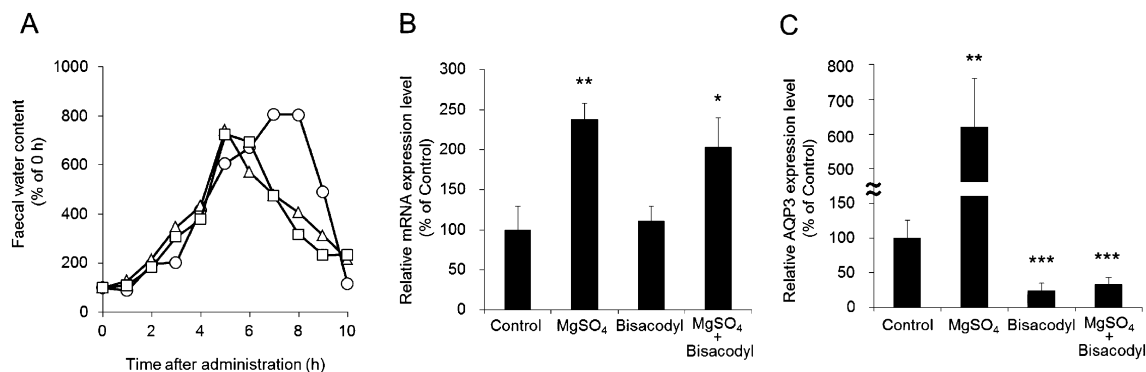


Fig. 8. Effect of Combination of MgSO_4 and Bisacodyl on Faecal Water Content (A), Sodium *myo*-inositol Transporter mRNA Expression (B), and AQP3 Protein Expression (C) in the Rat Colon

A: The rats were orally administered MgSO_4 alone (○), bisacodyl alone (△), or a combination of MgSO_4 and bisacodyl (□). Rat faecal samples were collected at various times for up to 10 h beginning immediately after the administration of bisacodyl, and the faecal water content was measured (A). Rat colons were harvested 5 h after treatment, and the mRNA expression levels of sodium *myo*-inositol transporter in the colon were analyzed by real-time RT-PCR (B). The protein expression levels of AQP3 in the colon were analyzed by Western blotting (C). Data represent means \pm S.D. for 6 rats. Dunnett's test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. 0 h. Modified from Ikarashi *et al.*¹⁷⁾

も、今後、瀉下剤に関しても、その治療効果に対するエビデンスを明確にし、適正使用を図ることが必要であると考ええる。

謝辞 本研究は星薬科大学薬動学教室で行われたものであり、終始ご指導及びご助言を賜りました杉山 清 教授に深く感謝致します。また、本研究の遂行に当たりご協力頂きました同教室の皆様に感謝致します。なお、この研究の一部は文部科学省科学研究費補助金（若手研究（B））の補助により行われました。

REFERENCES

- 1) Loo D. D., Wright E. M., Zeuthen T., *J. Physiol.*, **542**, 53–60 (2002).
- 2) Hara-Chikuma M., Verkman A. S., *Biol. Cell*, **97**, 479–486 (2005).
- 3) Loonen A. J., Knoers N. V., van Os C. H., Deen P. M., *Semin. Nephrol.*, **28**, 252–265 (2008).
- 4) Manley G. T., Fujimura M., Ma T., Noshita N., Filiz F., Bollen A. W., Chan P., Verkman A. S., *Nat. Med.*, **6**, 159–163 (2000).
- 5) Ikarashi N., Ushiki T., Mochizuki T., Toda T., Kudo T., Baba K., Ishii M., Ito K., Ochiai W., Sugiyama K., *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 238–242 (2011).
- 6) Burg M. B., Ferraris J. D., Dmitrieva N. I., *Physiol. Rev.*, **87**, 1441–1474 (2007).
- 7) Yamauchi A., Uchida S., Preston A. S., Kwon H. M., Handler J. S., *Am. J. Physiol.*, **264**, F20–F23 (1993).
- 8) Ikarashi N., Mochiduki T., Takasaki A., Ushiki T., Baba K., Ishii M., Kudo T., Ito K., Toda T., Ochiai W., Sugiyama K., *Life Sci.*, **88**, 194–200 (2011).
- 9) Rachmilewitz D., Karmeli F., Okon E., *Dig. Dis. Sci.*, **25**, 602–608 (1980).
- 10) Schreiner J., Nell G., Loeschke K., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **313**, 249–255 (1980).
- 11) Ikarashi N., Baba K., Ushiki T., Kon R., Mimura A., Toda T., Ishii M., Ochiai W., Sugiyama K., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **301**, G887–G895 (2011).
- 12) Ikarashi N., Kon R., Iizasa T., Suzuki N., Hiruma R., Suenaga K., Toda T., Ishii M., Hoshino M., Ochiai W., Sugiyama K., *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 957–962 (2012).
- 13) Mengs U., Rudolph R. L., *Pharmacology*, **47** (Suppl. 1), 172–177 (1993).
- 14) Riemann J. F., Schmidt H., Zimmermann W., *Scand. J. Gastroenterol.*, **15**, 761–768 (1980).
- 15) Horie I., Maeda M., Yokoyama S., Hisatsune A., Katsuki H., Miyata T., Isohama Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **387**, 564–568 (2009).
- 16) Zelenina M., Christensen B. M., Palmer J., Nairn A. C., Nielsen S., Aperia A., *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **278**, F388–F394 (2000).
- 17) Ikarashi N., Mimura A., Kon R., Iizasa T., Omodaka M., Nagoya C., Ishii M., Toda T., Ochiai W., Sugiyama K., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **45**, 73–78 (2012).