

# 角膜上皮におけるKチャンネルのアラキドン酸による調節

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード: Arachidonic Acid, Potassium Channels, 脂肪酸, パッチクランプ法, 角膜上皮, ヒト, ウシ, 動物 作成者: 櫻田, 規全 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4558">http://hdl.handle.net/2297/4558</a>

## 角膜上皮におけるKチャンネルのアラキドン酸による調節

金沢大学大学院医学系研究科脳医学専攻光情報伝達学  
(旧講座名: 眼科学)  
(主任: 河崎一夫教授)

櫻 田 規 全

角膜上皮におけるKチャンネルのこれまでの主な研究対象は、ウサギ角膜上皮に発現する大コンダクタンスK電流であった。このK電流は、シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase) 経路の阻害剤であるフェナメート (fenamates) の細胞外投与によって増大する。近年、角膜損傷治療の際、このフェナメートによって活性化されるK電流が消失することが報告された。本研究は、角膜上皮細胞のK電流を同定し、アラキドン酸 (arachidonic acid) あるいはその代謝産物によるKチャンネル調節の解明を目的とした。屠殺直後摘除されたウシ角膜、あるいは臨床において角膜移植の際に摘除されたヒト角膜から、角膜上皮細胞を単離した。形態上、2種類のウシ角膜上皮細胞が認められた。すなわち、極性に乏しい球状細胞と極性を有する円柱状細胞であった。細胞を5 mM K<sup>+</sup>含有リンゲル液にて灌流し、パッチクランプ法を用いてホールセル電流を測定した。ウシ角膜上皮には2種類のK電流が発現していた。1つめは、膜電位開口型K電流であり、長い脱分極状態で不活性化した。この不活性化K電流は、円柱状細胞においてより多く発現していた。2つめは、不活性化しないノイズ様の外向きK電流であった。この持続型K電流は、フェナメートにより増大し、ジルチアゼム (diltiazem) により阻害されることから、ウサギ角膜上皮の大コンダクタンスK電流に相同と考えられた。持続型K電流は、細胞外アラキドン酸 (5~10 μM) により著明に増大した。アラキドン酸カスケードの基質となりえない他の脂肪酸であるパルミトオレイン酸 (palmitoleic acid), リノール酸 (linoleic acid), リノレライック酸 (linoleic acid) など同様のチャンネル刺激作用を有したことから、アラキドン酸が直接チャンネルに作用して、これを活性化することが示唆される。アラキドン酸や上記の脂肪酸は、不活性化K電流には抑制的に作用した。ヒト角膜上皮においては、不活性化電流は認められなかった。アラキドン酸 (20 μM), パルミトオレイン酸およびリノール酸によって活性化されたノイズ様の電流は、+10 mVより陽性の電位で強い整流作用を示し、その作用はジルチアゼムによって阻害されなかった。一方、100 μMアラキドン酸は、ジルチアゼムにより阻害されるK電流を増大させた。すなわち、ヒト角膜上皮における持続型K電流の発現が示唆される。

**Key words** potassium channel, corneal epithelium, arachidonic acid, fatty acid, patch clamp

眼珠の最外層の屈折面である角膜において、上皮細胞は、機械的・化学的損傷に対する眼珠の防御壁としての役割を担い、また水やイオン輸送の調節によって角膜の透明性を維持している。角膜上皮細胞は、約7日間で、細胞分裂、移動、分化、層状配列、老化、脱落の過程をたどる<sup>1)</sup>。この細胞サイクルの調節には、細胞内のcAMP, cGMP, イノシトールリン脂質 (inositol phosphate) の代謝産物、Ca濃度などに加えて、膜輸送体やイオンチャンネルによるイオンの細胞内外への移動も関与すると考えられている<sup>2)</sup>。近年、Watskyら<sup>3)</sup>は、ウサギ角膜上皮において、角膜損傷の際にKチャンネル活性が消失することを報告した。このKチャンネルは、従来、Raeの研究グループが報告したウサギ角膜上皮の大コンダクタンスKチャンネルであり、アラキドン酸 (arachidonic acid) カスケード・シクロ

オキシゲナーゼ (cyclooxygenase) 経路の阻害剤として知られているフェナメート (fenamates) により活性化される<sup>4)~10)</sup>。Bockmanら<sup>11)</sup>は、培養ヒト角膜上皮細胞においても、フェナメートにより活性化されるK電流の存在を報告したが、これが大コンダクタンスKチャンネルであるかは不明である。

アラキドン酸自体がイオンチャンネルに直接作用して、これを活性化させることが平滑筋で報告されて以来<sup>12)</sup>、数多くの同様のイオンチャンネルが同定されている<sup>13)</sup>。また近年、アラキドン酸代謝産物によるイオンチャンネル活性の消長も報告されている<sup>13)</sup>。ただし、これまでに、アラキドン酸、その代謝産物あるいは脂肪酸の角膜上皮イオンチャンネルへの作用を調べた報告はない。

本報では、ウシおよびヒト新鮮単離角膜上皮細胞において、

平成13年11月21日受付, 平成13年12月25日受理

Abbreviations: 4-AP, 4-aminopyridine; C<sub>m</sub>, membrane capacitance; DMSO, dimethylsulfoxide; E<sub>K</sub>, equilibrium potential of potassium; ETI, cis-5,8,11-eicosatrienoic acid; NDGA, nordihydroguaiaretic acid; R<sub>s</sub>, series resistance; TEA, tetraethylammonium; TRAAK, Tandem of P domains in weak inward rectifier K<sup>+</sup> channels-related arachidonic acid-stimulated K channel; TREK, Tandem of P domains in weak inward rectifier K<sup>+</sup> channels-related K channel

Kチャンネル由来の電流 (K電流) を同定し, さらにアラキドン酸および他の脂肪酸のK電流への作用を調べた。

## 対象と方法

### I. 溶液

細胞外を灌流する標準リングル液は, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM グルコース, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>の組成とし, pHをNaOHにて7.4に設定した。異なった濃度のK<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, テトラエチルアンモニウムイオン (tetraethylammonium, TEA) を持つ細胞外溶液は, それらの塩酸塩を標準リングル液に加えて調製したが, その際加える塩と等しい濃度のNaClを減じた標準リングル液を用いた。Ba<sup>2+</sup>を含む細胞外溶液は塩化バリウムを標準リングル液に溶解し調製した。4-アミノピリジン (4-aminopyridine, 4-AP) を含む溶液は, NaClと4-APとの置換によって調製したが, その際pHを7.4に保つためにHClを加える必要があった。ジルチアゼム (diltiazem), アラキドン酸, アラキドン酸代謝産物, アラキドン酸代謝酵素阻害剤, 他の脂肪酸は, ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) またはメタノールを溶媒とした高濃度溶解液として, -20℃あるいは-80℃で保存し, 実験の直前にその適量をリングル液に添加した。すべての実験を通じてDMSOとメタノールの灌流液中の濃度はそれぞれ容量で0.2, 0.1%以下であり, これらはホールセル電流に影響しなかった。すべての細胞外溶液の浸透圧を288 ± 5 Osm/lに保った。

標準のピペット内充填液は, 30 mM KCl, 83 mM K-グルコネート, 5 mM HEPES, 5.5 mM EGTA-KOH, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>の組成とし, そのpHをKOHで7.2に設定した。この溶液の浸透圧は244 ± 1 Osm/lであった。このピペット内充填液, および標準リングル液のK<sup>+</sup>濃度から, Nernstの式を用いて計算される理論的なK平衡電位 (equilibrium potential of potassium, E<sub>K</sub>) は-86 mVであった。ホールセルパッチ (whole cell patch) 法では2~4 mM ATP (Mg塩) を, 穿孔パッチ (perforated patch) 法ではアンホテリシンB (240 μg/ml, 1% DMSO) をピペット内充填液に加えた。すべてのピペット内充填液は予めシリジフィルター (孔径0.2 μm) により濾過した。

細胞分離用溶液は, 135 mM N-メチルD-グルタミン (N-methyl-D-glutamine) -Cl, 5.0 mM KCl, 10 mM HEPES, 3.0 mM EDTA-KOH, 10 mM グルコース, 3 mM システイン, 1.0 mM グルタチオン, 1.0 mM L (+)-アスコルビン酸, 1.0 mM タウリン, 0.2 mg/ml パパイン (Type III) の組成とし, そのpHをNaOHで7.4に設定した。

NaCl, KCl, L (+)-アスコルビン酸は和光純薬 (大阪), 他の試薬はすべてシグマ (Sigma, St.Louis, USA) から購入した。

### II. 細胞の分離

#### 1. ウシ角膜上皮

食肉加工処理場において屠殺直後に摘出されたウシの眼球を, 直ちに氷にて保冷し, 30分以内に研究室へ運んだ。研究室において, 角膜中心部の全層角膜片を5~8 mm径の大きさで切り出し, デスメ膜より内側を剥離・除去した。角膜上皮と実質片を, パパインを含有する細胞分離用溶液に10分間浸し, ついで0.1%のウシ血清アルブミンを含有する標準リングル液に3分間浸してパパインの反応を停止させた。最後に角膜片を標準リングル液に10分間浸した。角膜上皮が単離されるまでこの作業を2~3回繰り返した。細胞の単離には, 通常20~30分

のパパインの作用時間を要した。標準リングル液中に浮遊した単離角膜上皮細胞を4℃にて保存し, 24時間以内に実験に用いた。

#### 2. ヒト角膜上皮

円錐角膜症例において角膜移植手術の際に, 切除を余儀なくされた角膜片から, 手術後直ちに角膜上皮細胞を分離した。分離方法は, 上記のウシ角膜上皮細胞の分離と同様であった。切除された角膜片を研究に使用する際には, 予め患者に説明し同意を得た。尚, ヒト角膜上皮を研究目的に使用することは金沢大学医学部等医の倫理委員会において平成12年9月11日に承認された。

### III. 細胞の設置, 灌流

約0.5 mlの単離角膜上皮細胞浮遊液をチェンバー内に入れ, 多くの細胞が沈殿してスライドガラスに接着するまで10~20分間をおいた後, 標準リングル液の灌流を開始した。灌流液を50 ml注射シリンジ外套からチューブを用いて, 自然落下で毎分3 mlの流速にてチェンバーに導いた。チェンバー内の灌流液容積が常に約0.5 mlに保たれるように, 吸引用注射針からチューブを通して吸引・排液した。チェンバー内の灌流液の交換はチューブの途中に設置した灌流スイッチを用いて2分以内に行った。

### IV. ホールセル電流記録

パッチピペットにはガラス微小管 BF150-110-10 (Sutter Instruments, San Rafael, USA) を用い, プログラム式水平型ピペットプレー P-97 (Sutter Instruments) にてピペット先端部を作製した。ピペット抵抗値は1~3 MΩであった。細胞膜全体のイオンチャンネルに由来する電流, すなわちホールセル電流を記録するパッチクランプの手法としては, 下記のように穿孔パッチ法あるいはホールセルパッチ法を用いた。穿孔パッチ法 (37例) では, アンホテリシンBをまずDMSOに溶解し (1.5 mg アンホテリシンB/25 μl DMSO), その適量を標準ピペット内液にて希釈し, 最終のアンホテリシンB濃度240 μg/mlを得た。このアンホテリシンB含有ピペット内充填液は冷蔵庫内 (4℃, 暗所) に保存し, 作成してから1時間以内に使用した。アンホテリシンB分子が細胞膜に触れるとギガオームシール (下記) の形成が困難である。従って, まず先端開口部からアンホテリシンBを含まない標準ピペット内液を液コラムの長さにして200~300 μm吸引し, 次いでアンホテリシンB含有ピペット内液をピペット後端から充填した。一方, ホールセルパッチ法 (169例) では, 標準ピペット内充填液に2~4 mMのATP (Mg塩) を加え, ピペット内には先端と後端の両側から同じ組成の溶液を充填した。

パッチピペットの電位は, パッチクランプ用アンプ EPC-8 (Heka, Lambrecht, Germany) を介してコンピューター Macintosh (Apple Computer Inc, Cupertino, USA) のソフトウェア Pulse + Pulse Fit\_8.11 (Heka) にて制御した。この電位固定時にピペットに流れる電流は同アンプにて増幅され, コンピューター画面にて観察した。不関電極には銀・塩化銀電極 EP-2 (WPI, Sarasota, USA) を用いた。

内液を充填した後, 直ちにパッチピペットをピペットホルダーに装着し, ピペット先端をチェンバーの灌流液に浸した。これ以降, ホールセル記録の状態を確立するまで, 電圧+10 mVの矩形波刺激によって惹起される電流 (シールテスト電流) を観察した。まず, その基線をゼロに補正し, シールテスト電流

が矩形波状となることを確認した。次いで倒立顕微鏡 Eclipse TE300 (日本光学, 東京) 下でマイクロマニピュレーター MP-285 (Sutter Instruments) を操作し, ピペット先端を目的とする角膜上皮細胞の細胞膜に接触させた。さらにシールテスト電流の振幅から計算されるピペット・細胞膜間の抵抗が十分に大きくなるまで (通常  $10\text{ G}\Omega$  以上), すなわちギガオームシールが得られるまで, ピペット内に徐々に陰圧をかけ細胞膜を吸着させた。

その後, 以下の2通りの方法によりホールセル記録の状態を確立した。まず穿孔パッチ法では, アンホテリシンBの作用によりパッチ膜の透過性が十分に大きくなるまで, すなわちピペットおよびパッチ膜に由来する抵抗 (series resistance,  $R_s$ ) が徐々に減少して  $30\text{ M}\Omega$  以下になるまで, 通常  $10\sim 20$  分間待機した。一方, ホールセルパッチ法では, さらにピペット内に大きな陰圧をかけてパッチ膜を破碎した。これは矩形波状のシールテスト電流が急峻なピークを有する波形に突然に変化することによって確認された。

その後, 膜電位を  $-10\text{ mV}$  あるいは  $-70\text{ mV}$  の保持電位からある刺激電位に矩形波様に変化させる膜電位固定のプロトコルを用いた。刺激電位は  $+50\sim -60\text{ mV}$  の範囲内で,  $10\text{ mV}$  毎に変化させて,  $5\sim 15$  秒間隔にて反復させた。これら異なる刺激電位により惹起されるそれぞれの電流は刺激開始時にそろえて重ね合わせて描出した。

灌流液の交換の際には, 保持電位を  $-10\text{ mV}$  とし,  $+40\sim -110\text{ mV}$  の範囲で傾斜状に電位が変化するプロトコルを用いた。

すべての実験は室温 ( $20\sim 25^\circ\text{C}$ ) 下で行った。

#### V. 電流波形および測定値の解析

ピペット先端における液相電位は標準液使用時に  $10\text{ mV}$  であり, その値によって膜電位を補正した。測定値の理論式への近似には, 波形解析用ソフトウェアである IGOR Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) を用いた。

#### VI. チャンネルの不活性化と非活性化

膜電位依存性に開口するチャンネルは閉じた状態 (closed state), 開いた状態 (open state) あるいは不活性化状態 (inactivated state) のいずれかの状態にある。本報では, 不活性化状態に至る過程を不活性化 (inactivation), また閉じた状態に至る過程を非活性化 (deactivation) と記載し, これらを区別した。

## 結 果

### I. ウシ角膜上皮

#### 1. 細胞の形態

単離されたウシ角膜上皮細胞のうち, 最も多くみられた細胞は, 極性に乏しく, 径が  $10\sim 15\text{ }\mu\text{m}$  の球状の細胞であった (図1A)。一方, 極性を有する円柱状 (長径が短径の2倍以上) の細胞もみられた (図1B)。細胞膜が薄く, 比較的大きい ( $20\text{ }\mu\text{m}$  以上) 細胞は表層細胞由来と考えられ対象から除外した。実験に用いた206個のウシ角膜上皮細胞のうち, 円柱状の細胞は48個, 球状の細胞は158個であった。円柱状の細胞は, 形態上は組織切片にみる角膜上皮基底細胞に類似していた。一方, 球状の細胞が, 角膜上皮の扁平上皮細胞, 翼細胞, 基底細胞のいずれに由来するかは不明である。

#### 2. 電気生理学的パラメーター

$R_s$  と膜容量 (membrane capacitance,  $C_m$ ) は, 膜容量依存電流

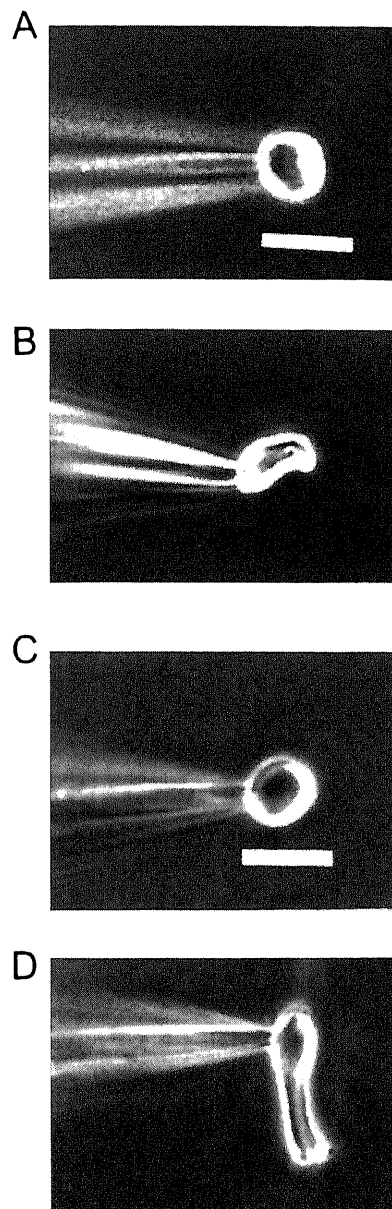


Fig. 1. Photomicrograph of isolated bovine and human corneal epithelial cells. (A, B) Bovine corneal epithelial cells were clamped by a patch pipette. Bar,  $10\text{ }\mu\text{m}$ . (A) Round cell. (B) Columnar cell. (C, D) Human corneal epithelial cells obtained from a 14-years-old keratoconus patient. Bar,  $10\text{ }\mu\text{m}$ . (C) Round cell. (D) Columnar cell.

から計算され, 穿孔パッチ法では, それぞれ  $33 \pm 14\text{ M}\Omega$ ,  $14 \pm 4\text{ pF}$  であった ( $n=37$ )。一方, ホールセルパッチ法 ( $n=169$ ) では,  $R_s$  は通常  $10\text{ M}\Omega$  以下であったが, 膜容量依存電流の時間経過が速すぎるので ( $< 0.1$  ミリ秒),  $C_m$  を正確に計算することは不可能であった。標準リンゲル液灌流下でのゼロ電流電位 ( $V_0$ ) は, 円柱状細胞 ( $n=48$ ) では  $-30.6 \pm 9.5\text{ mV}$ , 球状細胞 ( $n=158$ ) では  $-21.3 \pm 8.8\text{ mV}$  であり, 有意差が認められた (student- $t$  test,  $p = 2.2 \times 10^{-9}$ )。

#### 3. ホールセル電流

ウシ角膜上皮において, 膜電位を  $-70\text{ mV}$  の保持電位から  $0\text{ mV}$  より陽性電位にまで脱極させると, 時間とともに外向きに立ち上がり頂点に至った後, ゆっくりと減衰する電流成分と細

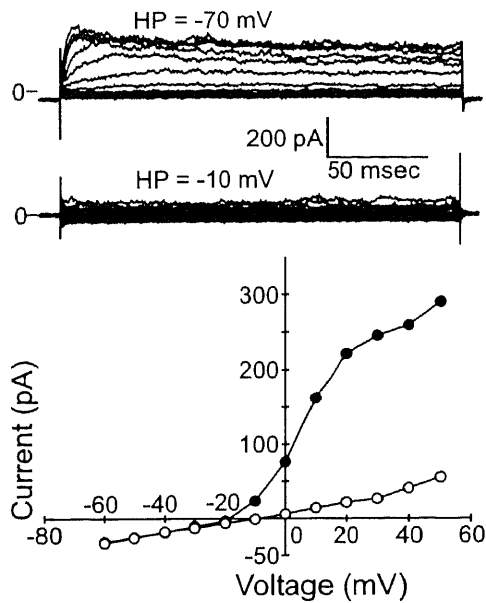


Fig. 2. Representative whole cell currents expressed in the bovine corneal epithelial cells. Families of whole cell currents were elicited by 200-msec voltage steps ranging from +50 to -60 mV in 10 mV increments from holding potentials (HP) of -70 or -10 mV. The Current-voltage (I-V) relationships are depicted for the cell (bottom panels) with HP of -70 (●) and -10 mV (○). Current amplitudes were averaged between 100 and 200 msec for the I-V plots when HP was -10 mV. For the I-V plots in the case with HP of -70 mV, the peak amplitudes were measured when the inactivating K<sup>+</sup> currents were activated. Otherwise, steady state current amplitudes (180-200 msec) were used.

かいノイズ様の振れが重なった電流成分とが観察された(図2)。この電流の減衰はチャンネルの不活性化に由来するものである。一方、膜電位を-10 mVに保持すると、同様の脱分極刺激によっても不活性化する電流成分は観察されず、細かいノイズ様の振れが重なった電流成分のみが観察された。ノイズ様の振れが重なった電流成分は、膜の保持電位には無関係で、不活性化しない持続型電流であった。従って、ウシ角膜上皮細胞においては、2種類の異なる電流成分、すなわち、不活性化電流および持続型電流が優位に発現していると考えられた。これら2種類の電流の大きさは細胞によって異なっていた。

4. 不活性化K電流の電気生理学的特性

-70 mVの保持電位から+50 mVへの電位ステップにより惹起されたピーク電流が500 pA以上(リーク補正はなし、平均944 ± 333 pA)の40個の細胞では、不活性化電流が優位を占め、持続型電流は相対的に無視できるほど小さかった(図3A)。同様の不活性化電流は206個の細胞中144個に認められた。不活性化電流は、およそ-30 mVより陽性の電位で活性化する外向き電流であることから、膜電位開口型Kチャンネル(voltage-gated K channel)に由来することが推察される。これがK電流であることを確認するために、この電流成分の逆転電位を以下の如く調べた。まず、標準灌流液の下で不活性化電流を活性化し、頂点振幅に達した直後、すなわち不活性化が進行しないうちに膜電位を再分極させると、チャンネルの非活性化によるテール電流が観察された(図3B)。そのテール電流と再分極電位との関係から、テール電流の逆転電位を求めた(図3C)。3個の

細胞において、逆転電位は-70.4 ± 0.5 mVであり、E<sub>k</sub>(-86 mV)に近似していた。次に、140 mM K<sup>+</sup>を含有する細胞外液灌流下(E<sub>k</sub>は約0 mV)においても、逆転電位はE<sub>k</sub>に近似した(n=3, 1.3 ± 4.2 mV)(図3D)。これらの結果から、この不活性化電流はKイオン選択性の高いチャンネルに由来することが判明した。

不活性化K電流の各膜電位におけるコンダクタンスは以下の式より算出した。

$$G = \frac{I_p}{V_m - E_k}$$

V<sub>m</sub>は膜電位、I<sub>p</sub>はV<sub>m</sub>における電流の頂点振幅、E<sub>k</sub>はKの平衡電位をあらわし、-80 mVとした。(V<sub>m</sub>-E<sub>k</sub>)はチャンネルの駆動電圧(driving force)を意味する。コンダクタンスと膜電位の関係は、以下のようなBoltzmannの式に、よく近似した。

$$G = \frac{G_{max}}{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k_n]}$$

G<sub>max</sub>は最大(飽和)コンダクタンス、V<sub>1/2</sub>はコンダクタンスが最大の50%となる膜電位、k<sub>n</sub>は膜電位への依存度を意味する定数(単位はmV)をそれぞれあらわす。

不活性化K電流のコンダクタンス・電圧関係(図4)に示すように、不活性化K電流の閾値電位は-30 mVであり、V<sub>1/2</sub>は0.8 mVであった。+30 mVより陽性の膜電位ではコンダクタンスは低下した(n=7, G<sub>max</sub>=7.9 ± 1.6, V<sub>1/2</sub>=0.8, k<sub>n</sub>=-8.0)。

不活性化K電流の時間経過は1次指数関数曲線によく近似した(図5A)。2秒間の+40 mVの電圧刺激での不活性化時定数の平均はホールセルパッチ法で615 ± 135 ミリ秒であった(n=7)。不活性化過程と膜電位の関係を明らかにするため、膜電位を様々な電位で30秒間保持し(刺激前電位-80 ~ +20 mV)、そこから+40 mVの刺激を与えたときの、不活性化電流の最大振幅と刺激前電位との関係を調べた(n=4)(図5B)。この結果、保持電位が-70 mVの時に不活性化K電流のコンダクタンスは最大となり、保持電位が-10 mVの時にほぼ完全に不活性化することが判明した。

Kチャンネルの阻害剤の1つTEA<sup>14)</sup>は、5 mMの濃度にて不活性化K電流をほぼ完全に阻害した(n=7/7)。0.5 mMのTEA灌流下では不活性化K電流の最大振幅は減少したが、不活性化の時間経過は変化しなかった(n=3)(図6A)。他のKチャンネル阻害剤である2 mM 4-AP<sup>14)</sup>は、不活性化K電流を完全に阻害した(n=4/4)。また、A-type Kチャンネルの阻害剤の1つである20 μM アパミン<sup>14)</sup>は、不活性化K電流をほとんど阻害しなかった(n=3, 7 ± 7%の阻害)。ウサギ角膜上皮の大コンダクタンスK電流を完全に阻害する20 μM ジルチアゼム<sup>7)</sup>は、不活性化K電流の最大振幅を36.0 ± 9.5%阻害し、不活性化を速めた(n=3)(図6B)。2 mM Ba<sup>2+</sup>は不活性化K電流を100%阻害した(n=2)。2 mM Cs<sup>+</sup>は不活性化K電流をほとんど阻害しなかった(n=3, 1 ± 2%の阻害)。

5. 持続型K電流

62個の細胞では不活性化電流は惹起されず、ノイズ様の持続型K電流のみが観察された(図7A)。Raeら<sup>6)</sup>によると、ウサギ角膜上皮では、大コンダクタンスK電流として知られているノイズ様外向き整流電流がホールセル電流の優位を占め、フェナメートの細胞外投与により増大した。ウシ角膜上皮においても、

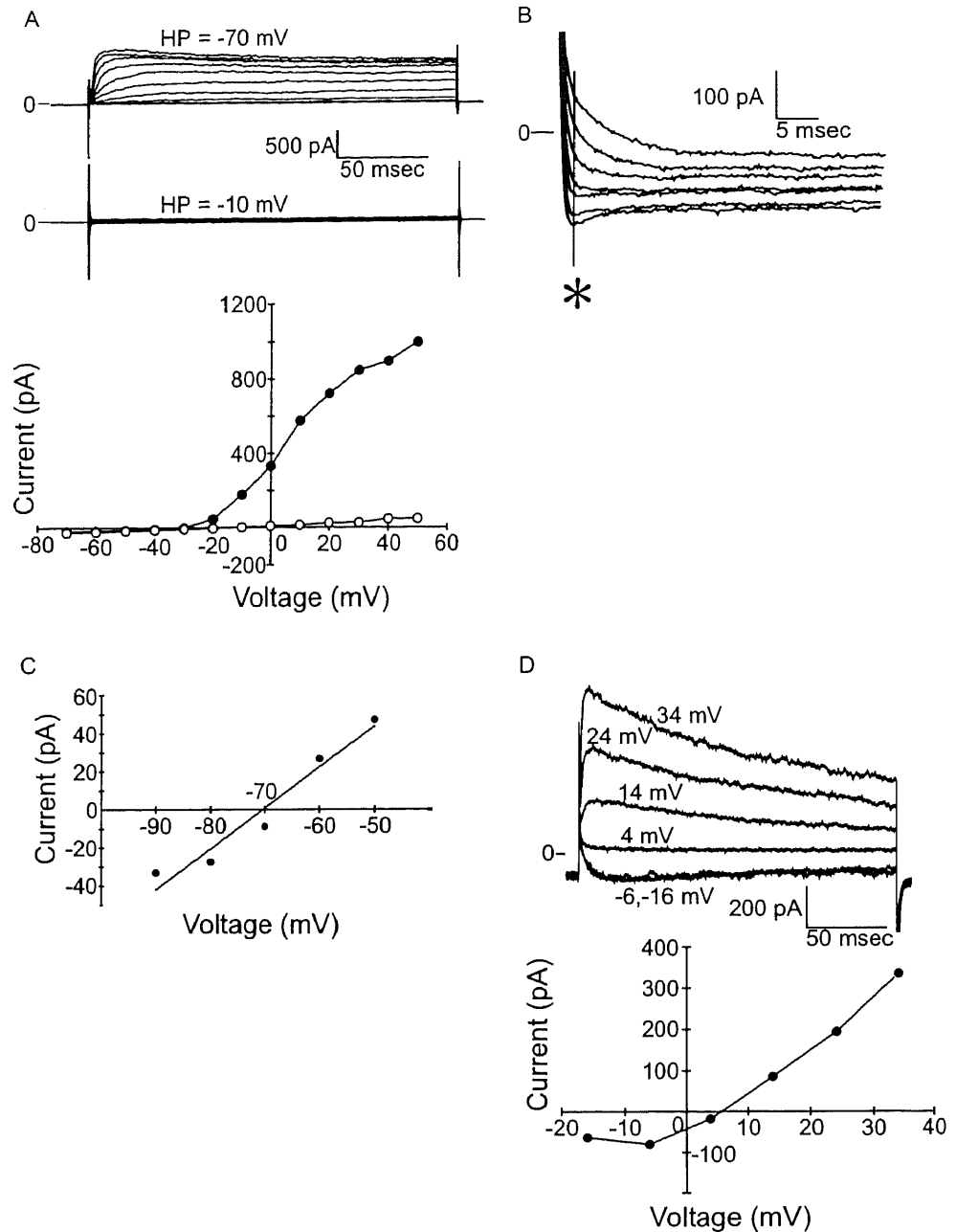


Fig. 3. The inactivating K<sup>+</sup> current. (A) Representative inactivating K<sup>+</sup> currents expressed in the bovine corneal epithelium. Whole cell currents were elicited by 200-msec voltage steps ranging from +50 to -70 mV in -10 mV increments from HP of -70 and -10 mV. The I-V relationships are depicted for the cell (*bottom panels*) with HP of -70 (●) and -10 mV (○), in which currents were measured as in Fig. 2. (B) Tail currents due to channel deactivation. Tail currents were produced by membrane repolarization (range: -90 to -50 mV) after a brief depolarization (+60 mV, 100 msec) that fully activated the channel. The filter was set to 5 kHz. (C) Tail current amplitudes depicted as a function of voltage. Magnitudes of the tail currents in (B) were measured between 1 msec after repolarization (\*) and the steady-state. The straight line is the linear regression of the data points, which crossed with the x-axis at -71 mV indicating the reversal potential. (D) Whole cell currents in 140 mM K<sup>+</sup> Ringer solution. The apparent membrane potential was corrected by -6 mV when the cell was perfused with 140 mM K<sup>+</sup> solution. Currents were elicited by voltage steps ranging from +34 to -16 mV increments from a HP of -66 mV. In this cell, the reversal potential was +5.5 mV, which is near the  $E_K$  in 140 mM [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>.

フェナメートの1つである500  $\mu$ M ニフルム酸 (niflumic acid) の灌流により、ノイズ様電流が著しく増加した (n=6) (図7B)。増大した電流成分の電流・電圧 (I-V) 関係からその逆転電位は  $E_K$  に近似した。すなわち、増大した電流成分はK電流であることが示唆される。また、他のフェナメートである100  $\mu$ M フルフェナミン酸 (flufenamic acid) も同様にノイズ様K電流を増大

させた (n=4)。

#### 6. アラキドン酸によるK電流の調節

フェナメートはアラキドン酸カスケードにおけるシクロオキシゲナーゼ経路の阻害剤であるので、フェナメートによる持続型K電流の増大作用には、アラキドン酸あるいはその代謝産物が関与している可能性がある。ウシ角膜上皮細胞において、10

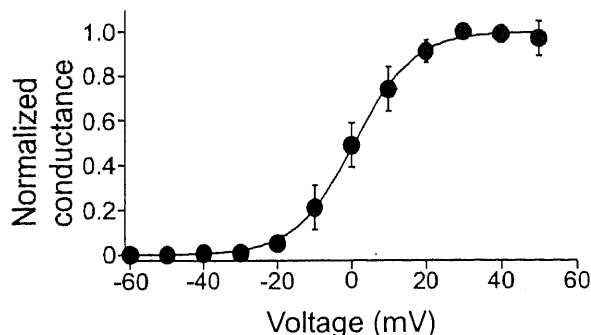


Fig. 4. Conductance-voltage relationship. Conductance ( $G$ ) of the inactivating  $K^+$  channel in each cell was calculated using the equation:  $G = I_p / (V - E_k)$ , where  $I_p$  was the peak current and  $E_k$  was  $-80$  mV. Conductance-voltage plots were well fitted by a Boltzmann function:

$$G = \frac{G_{max}}{1 + \exp [(V - V_{1/2}) / k_n]}$$

Each point depicts the average conductance for 7 cells ( $G_{max} = 7.91 \pm 1.62$  nS). The smooth curve is the least-square fit of the Boltzmann equation, with  $V_{1/2}$  of 0.84 mV and  $k_n$  of  $-8.03$  mV.

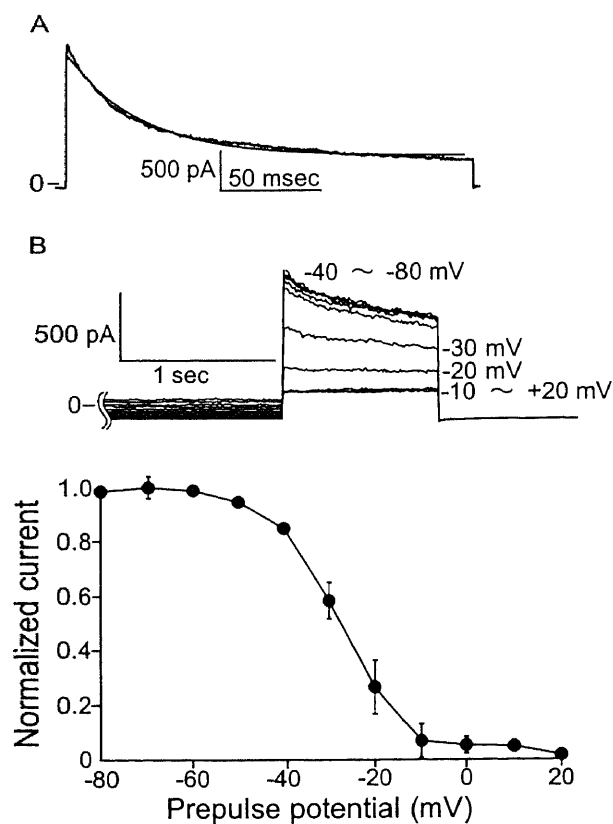


Fig. 5. Inactivation of the inactivating  $K^+$  current. (A) Inactivation kinetics. The smooth curve is exponential fit of the data at voltage of  $+40$  mV with  $\tau_{inact}$  of 349 msec, (B) Steady state inactivation of the inactivating  $K^+$  current. The membrane potential was clamped at prepulse potentials for 30 sec ranging from  $-80$  to  $+20$  mV and then stepped to  $+40$  mV to activate the current. Peak currents elicited by a series of prepulse voltages were measured. The normalized mean values for 4 cells were plotted.

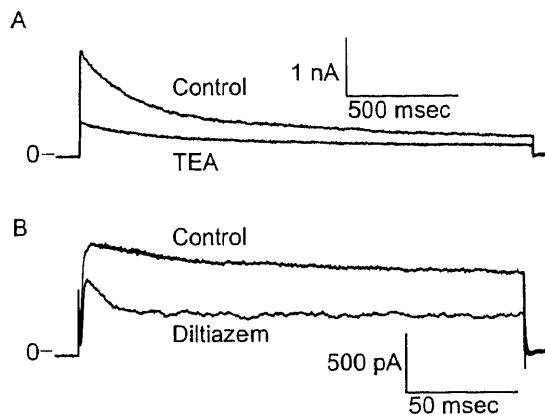


Fig. 6. Inhibition of the inactivating  $K^+$  current. (A) TEA-induced inhibition of the inactivating  $K^+$  current. Currents were generated by membrane depolarization to  $+50$  mV from a HP of  $-70$  mV in the absence and the presence of  $0.5$  mM TEA. TEA had no influence to the inactivating kinetics of the inactivating  $K^+$  current. (B) Diltiazem-induced inhibition. Currents were generated by an identical voltage-clamp protocol in (A) in the absence and the presence of  $20$   $\mu$ M diltiazem. Diltiazem partially inhibited the peak current and accelerated the inactivating time course.

$\mu$ M アラキドン酸を細胞外に灌流したところ、持続型K電流が増大した (図8A)。同様の結果は、5あるいは10  $\mu$ M アラキドン酸を加えた23個のすべての細胞で得られ (表1)、 $+50$  mVの刺激電圧における電流は、5あるいは10  $\mu$ Mのアラキドン酸細胞外投与 (10~13分、平均  $10.0 \pm 2.5$ 分)により、対照の  $99 \pm 79$  pAから  $491 \pm 424$  pAに増大した。この増大は、一対の値による  $t$ 検定により有意であった ( $P=0.000046$ )。アラキドン酸による持続型K電流の増大作用は、保持電位が $-10$  mVであるか、あるいは $-70$  mVであるかには無関係であった。

ウサギ角膜上皮の大コンダクタンスK電流の阻害剤として知られる20  $\mu$ M ジルチアゼムは<sup>7)</sup>、アラキドン酸により活性化される持続型K電流を完全に阻害した ( $n=6$ ) (図8B)。不活性化K電流の阻害剤である5 mM TEA<sup>14)</sup>は、持続型K電流を阻害しなかった ( $n=6$ )。

不活性化K電流が発現している細胞では、細胞外に10  $\mu$ Mのアラキドン酸を加えると、不活性化K電流が完全に阻害された後に、持続型K電流が増大した ( $n=7$ ) (図8C)。2  $\mu$ Mのアラキドン酸灌流下では、不活性化K電流の頂点振幅が減少し、不活性化の時間経過が速くなった ( $n=4$ ) (図8C)。このアラキドン酸の不活性化K電流に対する阻害作用は、不活性化の時間経過には影響しないTEAのそれとは異なっていた (図6)。

アラキドン酸カスケードのリポキシゲナーゼ (lipoxygenase) 経路の阻害剤である10  $\mu$ M エイコサトリエン酸 (cis-5,8,11-eicosatrienoic acid, ETI) ( $n=4$ ) および10  $\mu$ M ノルジヒドログアヤレチン酸 (nordihydroguaiaretic acid, NDGA) ( $n=3$ )、またチトクローム P-450 (cytochrome P-450) の阻害剤である10  $\mu$ M クロトリマゾール (clotrimazole) ( $n=3$ )は、いずれも持続型K電流を変化させなかった。

#### 7. 他の脂肪酸によるK電流の調節

アラキドン酸代謝の基質になり得ない脂肪酸の、2種類のK電流への効果について以下のように調べた。20  $\mu$ M パルミトオレイン酸 (palmitoleic acid) は、不活性化K電流の頂点振幅を減

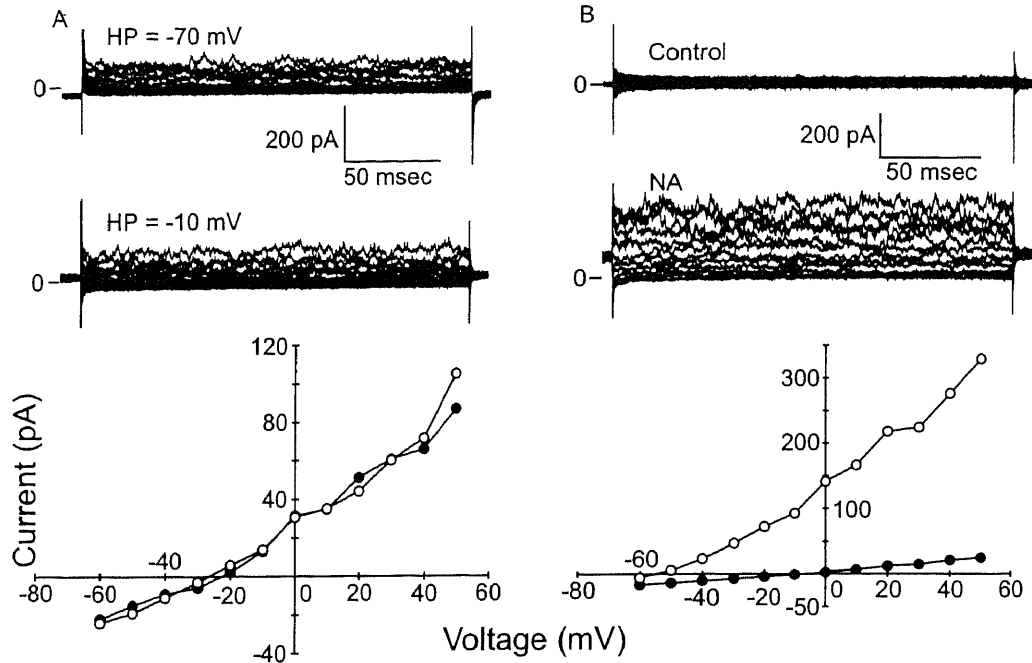


Fig. 7. The sustained  $K^+$  current in the bovine corneal epithelium. (A) Representative sustained  $K^+$  currents expressed in the bovine corneal epithelium. Whole cell currents were elicited by 200-msec voltage steps ranging from +50 to -60 mV in -10 mV increments from a HP of -70 mV (upper traces) or -10 mV (lower traces). For the I-V relationships with HP of -70 (●) and -10 mV (○), currents were averaged between 100 and 200 msec. (B) Augmentation of the sustained  $K^+$  currents by niflumic acid (NA). Families of whole cell currents were elicited by an identical voltage protocol in (A) in the absence (●) and the presence (○) of 500  $\mu$ M NA.

少させ、不活性化を速めた (図9A)。すなわちアラキドン酸の不活性化K電流の阻害作用に類似していた。20  $\mu$ M パルミトオレイン酸灌流下によって、+50 mVの刺激による不活性化K電流の頂点振幅は対照の  $45 \pm 13\%$  に減少し、不活性化の時定数は50 ミリ秒以下に減少した (n=8)。アラキドン酸と他の脂肪酸の不活性化K電流に対する作用を表1に示す。パルミトオレイン酸、リノール酸 (linoleic acid)、リノレライック酸 (linolelaidic acid) は、アラキドン酸と同様に頂点振幅を減少させ不活性化を速めた。一方、ミスチン酸 (myristic acid) やオレイン酸 (oleic acid) は頂点振幅を減少させたが、不活性化は速めなかった。

一方、これらの脂肪酸はアラキドン酸と同様に持続型K電流の刺激作用を呈した。例えば、20  $\mu$ M (n=3/7) または50  $\mu$ M (n=3/3) のパルミトオレイン酸の細胞外投与によって持続型K電流は増大した (図9B)。他の脂肪酸の持続型K電流に対する作用を表1にまとめて示す。不活性化K電流の不活性化を速める脂肪酸は、不活性化を速めない脂肪酸と比べより強い持続型K電流の増大作用を有する傾向があった。

#### 8. 持続型K電流を増大させる他の物質

持続型K電流は、アラキドン酸や他の脂肪酸により増大するK電流であることから、近年同定された2孔性Kチャンネル (two pore domain K channel) に由来する可能性がある<sup>15)~17)</sup>。2孔性Kチャンネル活性を増大させる他の薬剤としては、筋萎縮性側索硬化症の治療薬であるリルゾール (riluzole)<sup>18)19)</sup> や、脱髄性疾患に用いられるリゾフォスファチジルコリン (lysophosphatidylcholine)<sup>20)21)</sup> が知られている。ウシ角膜上皮においても、100  $\mu$ M リルゾール (n=9) および10  $\mu$ M リゾフォスファチジルコリン (n=8) (図10) は持続型K電流を増大させた。

さらに、リルゾールあるいはリゾフォスファチジルコリンによって増大した持続型K電流は、100  $\mu$ M ジルチアゼムによってほぼ完全に阻害された (リルゾール, n=2; リゾフォスファチジルコリン, n=4) (図10)。

## II. ヒト角膜上皮

### 1. 細胞の形態

ウシ角膜上皮細胞と同様に、単離したヒト角膜上皮細胞は、形態的に極性が乏しい球状の細胞 (図1C) と、極性が顕著な円柱状の細胞 (図1D) とに大別することができた。実験には前者を20個、後者を10個用いた。ただし、ヒト角膜上皮細胞においては、発現している電流の種類は形態に依存しないと考えられた (下記)。ヒト角膜上皮細胞の  $V_0$  は、 $-6.3 \pm 5.8$  mV (n=30) であった。

### 2. ホールセル電流

ヒト角膜上皮細胞においても、ウシ角膜上皮細胞での実験と同様な膜電位刺激プロトコールによって、ホールセル電流を記録した。-10 mVあるいは-70 mVの保持電位から、+50~-60 mVの範囲の電位刺激により惹起されるホールセル電流は、小振幅で (<500 pA)、脱分極側でノイズ様であり、保持電位に依存しなかった (図11)。従って、ヒト角膜上皮細胞においては、ウシ角膜上皮の不活性化K電流に相当するK電流の発現はないと考えられる。また、細胞形態によって発現電流の種類が異なる傾向はみられなかった。

### 3. フェナメートによる電流刺激作用

ヒト角膜上皮細胞においても、フェナメート、アラキドン酸および他の脂肪酸の、ホールセル電流に対する作用を以下のように調べた (表2)。100  $\mu$ M フルフェナミン酸は、調べた8個の細胞のうち5個において外向きにノイズ様の電流を増大させた

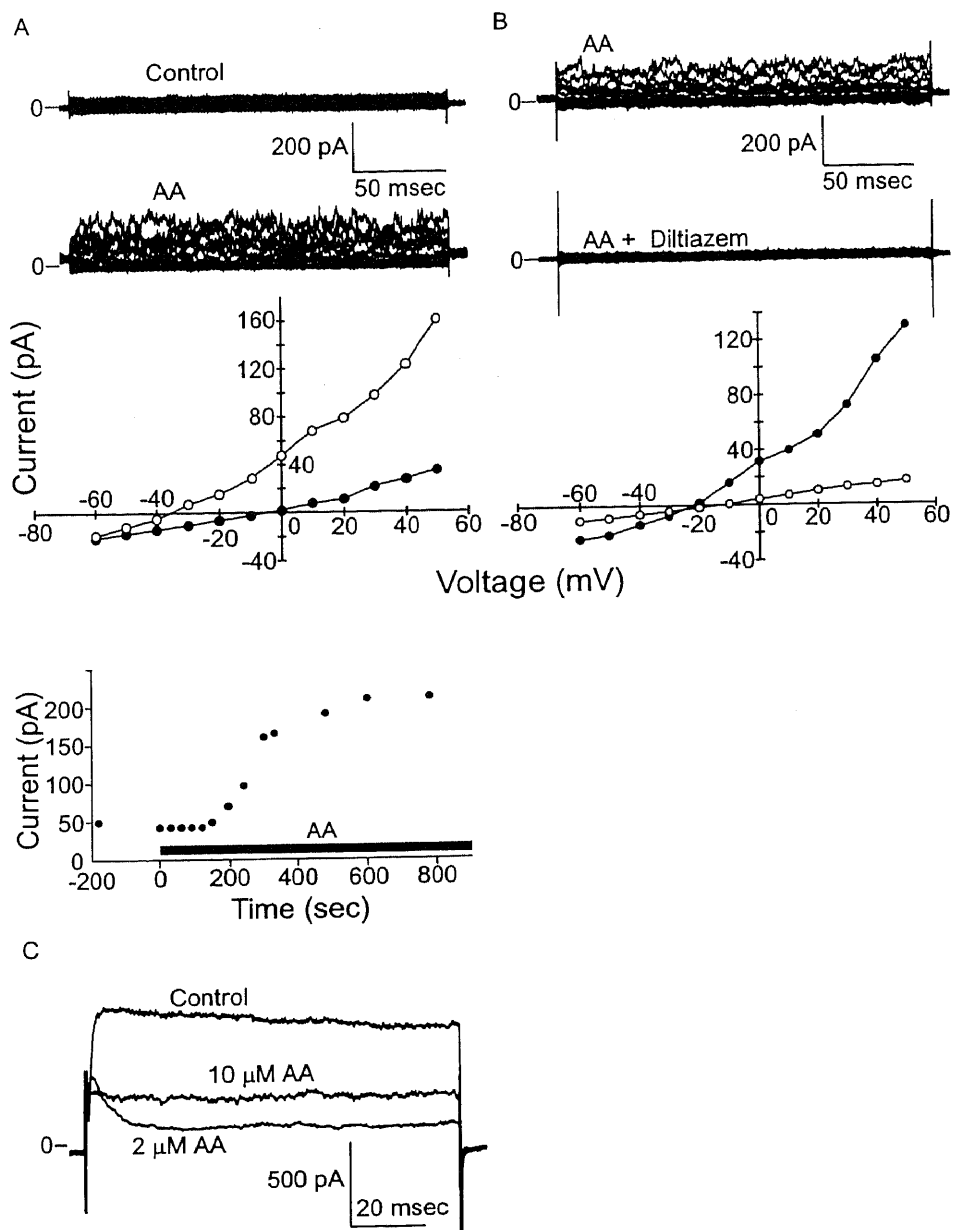


Fig. 8. Effects of arachidonic acid (AA) on K<sup>+</sup> currents in the bovine corneal epithelial cells. (A) Augmentation of the sustained K<sup>+</sup> current. Families of whole cell currents were elicited by voltage steps (range: +50 to -60 mV) from a HP of -10 mV and the I (100-200 msec) -V relationships are depicted in the absence (●) and the presence (○) of 10 μM AA. Time course of AA-induced augmentation of the sustained K<sup>+</sup> current is shown in bottom panels. In the cell shown in upper panels, current at +40 mV was monitored after exposure to AA. (B) Diltiazem-induced inhibition of the sustained K<sup>+</sup> current. Currents were elicited by an identical voltage step used in (A). The sustained K<sup>+</sup> current augmented by 5 μM AA in the 80 mM K<sup>+</sup> Ringer solution was inhibited by application of 20 μM diltiazem. I (100-200 msec) -V relationships are depicted in the absence (●) and the presence (○) of diltiazem. (C) Superimposed currents elicited by voltage steps to +50 mV from a HP of -70 mV in the absence and the presence of 2 and 10 μM AA.

(図 12A, 表 2). また, 500 μM ニフルム酸は, 調べた 3 個の細胞のうち 2 個において同様の電流成分を増大させた (表 2). ただし, 増大したノイズ様電流成分は, +10 mV 付近より陰性の刺激電位では活性化されにくかった. I-V 曲線からも +10 mV 付近で外向き整流作用が著しく変化していることがわかり (図 12A), 見かけ上, ウシ角膜上皮でのフェナメートによる持続型 K 電流の活性化とは異なる. また, 逆転電位も不明瞭であり, フェナメートによる膜電位の脱分極はわずかであった (n=5, -8 ± 7 mV から -10 ± 6 mV). さらに, フェナメー

トで活性化されたノイズ様電流成分は, 調べた 5 個の細胞すべてにおいて 100 μM ジルチアゼムにより全く阻害されなかった (図 12A). 以上から, フェナメートで活性化されたノイズ様電流成分は, ウシ角膜上皮の持続型 K 電流とは異なるチャンネルに由来することが示唆される.

#### 4. アラキドン酸および他の脂肪酸による電流刺激作用

調べた 18 個の細胞のうち 11 個において, 20 μM アラキドン酸によりホールセル電流が増大した (図 13A, 表 2). 増大したノイズ様電流成分は, フェナメートによる活性化と同様に,

Table 1. Modulation of K<sup>+</sup> channels by fatty acids in bovine corneal epithelial cells

Fatty acid	Inactivating K <sup>+</sup> current			Sustained K <sup>+</sup> current	
	Concentration (μM)	Peak current* % inhibition	Inactivation acceleration	Concentration (μM)	Stimulation / Total trials
Arachidonic acid (20: 4 cis-5,8,11,14)	2	27 ± 6 (n=4)	Yes	5, 10	23 / 23
	10, 20	~100 (n=7)	—		
Palmitoleic acid (16: 1 cis-9)	5	24 ± 10 (n=4)	Yes	20, 50	6 / 10
	20	45 ± 13 (n=8)	Yes		
	50	65 ± 9 (n=4)	Yes		
Linoleic acid (18: 2 cis-9, 12)	20	33 ± 4 (n=4)	Yes	20	5 / 5
Linolelaidic acid (18: 2 trans-9, 12)	20	20 ± 10 (n=5)	Yes	20	5 / 7
Myristic acid (14: 0)	50	37 ± 21 (n=3)	No	20, 50	0 / 10
Oleic acid (18: 1 cis-9)	40	85, 83 (n=2)	No	20, 40	2 / 5

\* Peak current at +50 mV.

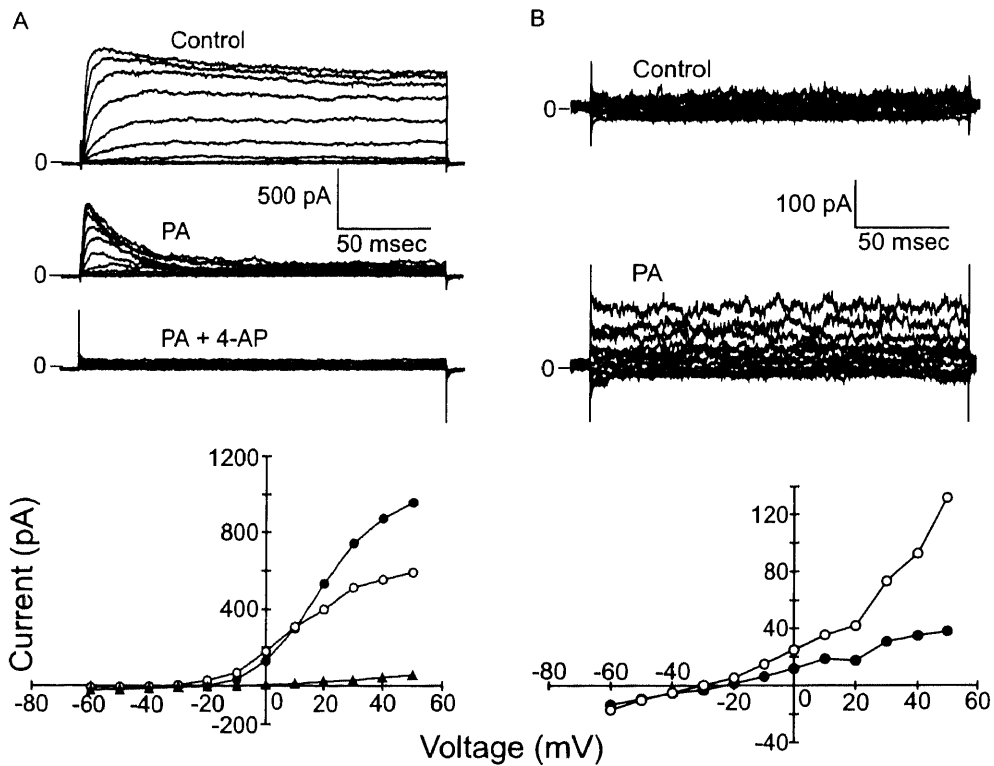


Fig. 9. Effects of palmitoleic acid (PA) on K<sup>+</sup> currents in the bovine corneal epithelium. (A) Effects of PA on the inactivating K<sup>+</sup> current. Families of currents were generated by voltage steps (+50 from -60 mV) from a HP of -70 mV in the control Ringer, in 20 μM PA and in PA plus 2 mM 4-AP. For the I-V plots in each solutions (●, control; ○, PA; ▲, PA + 4-AP), the peak amplitudes were measured when the inactivating K<sup>+</sup> currents were activated. Otherwise, currents were averaged between 100 and 200 msec. (B) PA-induced augmentation of the sustained K<sup>+</sup> current. Families of whole cell currents were generated by voltage steps (range: +50 to -60 mV) from a HP of -10 mV and the I (100-200 msec) -V relationships are depicted in the absence (●) and the presence (○) of 50 μM PA.

+10 mVより陽性側で外向き整流作用を有した。さらに、同電流成分は、電位開口型Kチャンネルの阻害剤である10 mM TEA<sup>10)</sup>により阻害された (n=3, 79 ± 3%の阻害) (図13A)。従って、アラキドン酸誘発電流成分はウシの持続型K電流とは異なることが示唆される。

20 μM パルミトオレイン酸は、調べた3個の細胞すべてにおいて、アラキドン酸と同様に+10 mVより陽性の電位で外向き整流型のノイズ様電流を誘発した (図12B, 表2)。同様の結果は、20 μM リノール酸の投与でも得られた (n=2) (表2)。従っ

て、脂肪酸により活性化される電流成分も持続型K電流とは異なる可能性がある。

しかしながら、2個の細胞において、より高濃度の100 μM アラキドン酸は、E<sub>k</sub>付近に逆転電位を有する電流成分を著しく活性化させた (図13B)。これらにおいて、V<sub>0</sub>は-17 mVから-59 mV、および-11 mVから-61 mVと著しく過分極した。すなわち、K電流の増大が示唆される。さらに、同活性化電流成分は、100 μM ジルチアゼムにより部分的に阻害された (n=2, 19%, 78%の阻害) (図13B)。これらの結果からは、ヒト角膜上

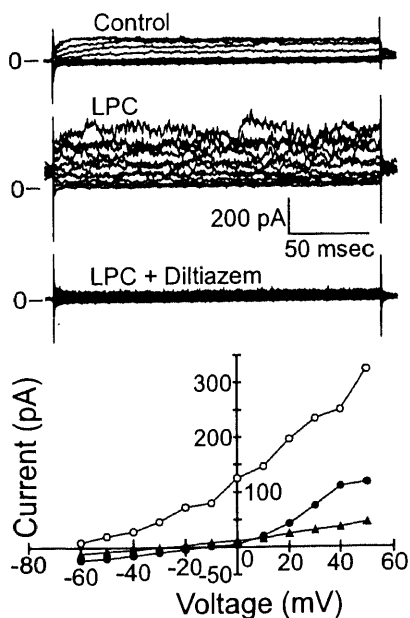


Fig. 10. Lysophosphatidylcholine (LPC)-induced augmentation of the sustained K<sup>+</sup> current. Families of whole cell currents were generated by voltage steps (range: +50 to -60 mV) from a HP of -10 mV and the I (100-200 msec) -V relationships are depicted in the control Ringer (●), in 10 μM LPC (○) and in LPC + 100 μM diltiazem (▲).

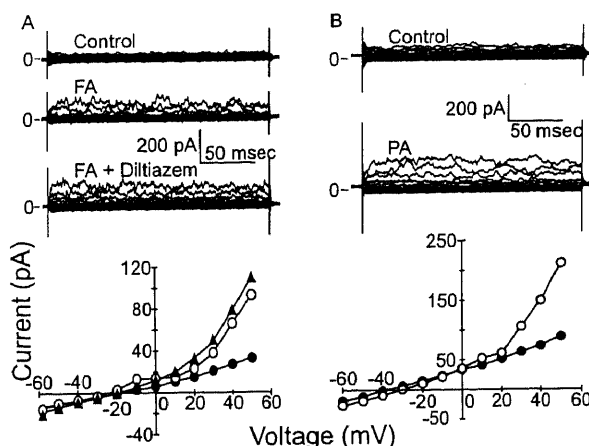


Fig. 12. Effects of fatty acids on whole cell currents of the human corneal epithelium. (A) Whole cell currents augmented by flufenamic acid (FA) in the human corneal epithelial cells. Families of whole cell currents were elicited by voltage steps (range: +50 to -60 mV) from a HP of -10 mV and the I (100-200 msec) -V relationships are depicted in the control Ringer (●), in 100 μM FA (○) and in FA + 100 μM diltiazem (▲). (B) Effects of palmitoleic acid (PA). Whole cell currents were generated by voltage steps (range: +50 to -60 mV) from a HP of -10 mV and the I (100-200 msec) -V relationships are depicted in the absence (●) and the presence (○) of 20 μM PA.

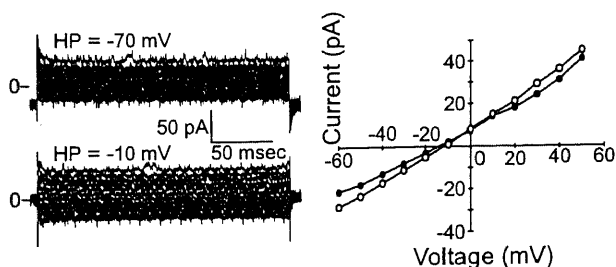


Fig. 11. Representative whole cell currents expressed in the human corneal epithelium. Whole cell currents were generated by 200-msec voltage steps ranging +50 to -60 mV from a HP of -70 and -10 mV. Current amplitudes were averaged between 100 and 200 msec for the I-V relationships with HP of -70 mV (●) and -10 mV (○).

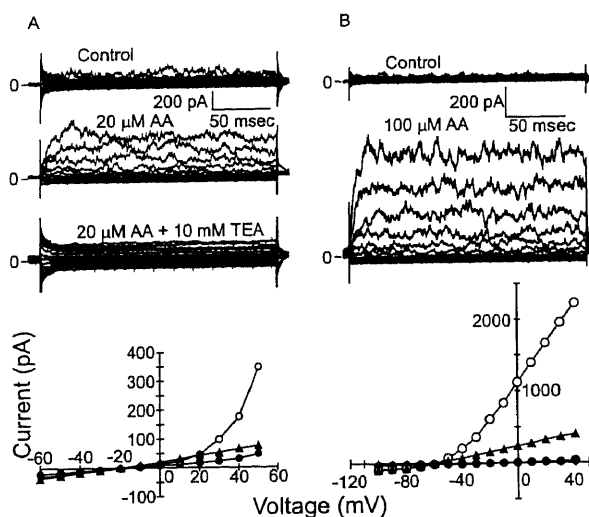


Fig. 13. Effects of arachidonic acid (AA) on the whole cell currents in human corneal epithelial cells. (A) Effects of 20 μM AA on whole cell currents. Families of whole cell currents were elicited by voltage steps (range: +50 to -60 mV) from a HP of -10 mV and the I (100-200 msec) -V plots are depicted in control Ringer solution (●), 20 μM AA (○) and 20 μM AA + 10mM TEA (▲). (B) Effects of 100 μM AA. Families of whole cell currents were elicited by voltage steps (range: +40 to -100 mV) from a HP of -10 mV in the absence and the presence of 100 μM AA. In the I-V plots, currents were measured by a voltage ramp protocol in the control Ringer (●), 100 μM AA (○) and AA + 100 μM diltiazem (▲).

Table 2. Modulation of whole cell currents in human corneal epithelial cells

Agent	Concentration (μM)	Stimulation* (%)	Stimulation / Total trials
Flufenamic acid	100	151 ± 109	5 / 8
Niflumic acid	500	430, 479	2 / 3
Arachidonic acid	10	(-)	0 / 3
	20	227 ± 202	11 / 18
	100	672, 1918	2 / 2
Linoleic acid	20	37, 183	2 / 3
Palmitoleic acid	20	71 ± 61	3 / 3

\* Peak current at +50 mV.

皮における持続型K電流の発現が示唆されるが、その薬理特性はウシ角膜上皮のそれとは異なる可能性がある。

### 考 察

ウシ角膜上皮およびヒト角膜上皮から新鮮単離された細胞は、形態上、極性が乏しい球状細胞と、極性を有する(長径が短径の2倍以上)円柱状細胞とに大別された。本報では、それらが角膜上皮のいずれの層に由来するかを同定する実験、例えば、特異的タンパク抗体による標識などは行っていない。ただし、その形態から、円柱状細胞は角膜上皮基底細胞に由来すると考えられた。ウシ角膜上皮細胞の $V_0$ は $-23$  mV、ヒト角膜上皮細胞の $V_0$ は $-6$  mVであった。これらの違いは、持続型K電流が全細胞電流に占める割合が異なるためと考えられる。ウサギ角膜上皮の $V_0$ は、Raeらの研究では $-38 \sim -48$  mV<sup>(6)~(9)</sup>、一方、Watanabeら<sup>(22)</sup>によると $-6 \sim -7$  mVであり、ばらつきがある。この原因として、Watanabeら<sup>(22)</sup>は細胞分離や保存法の違いを挙げている。

ウシ角膜上皮における不活性化K電流は、開口閾値電位( $-30$  mV付近)を有することや、TEA等チャンネル阻害剤に対する薬理特性から、Shaker型に代表されるような電位開口型Kチャンネルに由来すると考えられる<sup>(14)</sup>。コンダクタンス・電圧関係で求めた $V_{1/2}$  ( $0.8$  mV) (図4)や定常状態不活性化の膜電位依存性は、他の組織での電位開口型Kチャンネルのそれに近似した<sup>(14)</sup>。従来ウサギ角膜上皮の報告によると、角膜上皮には不活性化K電流は発現していない。また、Bockmanら<sup>(11)</sup>が報告した培養ヒト角膜上皮細胞におけるTEA感受性K電流は、膜電位依存性が不明でありチャンネルの種類を同定するにいたっていない。すなわち、初めて角膜上皮細胞における電位開口型Kチャンネルの機能発現が確認された。

電位開口型Kチャンネルのサブユニット構造については、Shaker型ではじめて同定されて以来、数多くのサブファミリーが発見され、それぞれを機能発現させたK電流の電気生理・薬理特性が明らかにされている<sup>(14)(23)</sup>。このうち、ウシ角膜上皮不活性化Kチャンネルは、以下の観点から、Kv3.xサブファミリーに属すると考えられる。すなわち、5 mM TEAおよび2 mM 4-APによって完全に阻害されること、コンダクタンス・電圧関係において $V_{1/2}$ が0 mV付近にあること(図4)、ならびに、+20 mVより陽性の膜電位においてコンダクタンスが減少したこと(図4)、などである<sup>(14)</sup>。さらに、不活性化の時定数が比較的遅い( $615 \pm 135$  ミリ秒)ことから、なかでもKv3.1あるいはKv3.2が示唆される。しかしながら、電位開口型Kチャンネルは、異なるサブユニットによって構成されるヘテロマルチマーである場合があり<sup>(14)(23)</sup>、これは電位開口型Kチャンネル蛋白の同定をきわめて複雑にしている。

ウシ角膜上皮の持続型K電流が、従来報告されているウサギ角膜上皮の大コンダクタンスK電流と相同であると判断した根拠は、以下のような両者の共通点による。すなわち、フェナメートにより活性化されること、深い過分極電位( $-70 \sim -80$  mV付近)でチャンネルが開いていること、脱分極の持続による不活性化がないこと、ジルチアゼムによって阻害され、TEAでは阻害されないこと、などである<sup>(4)(9)(7)(10)</sup>。

フェナメートによるウサギ角膜上皮大コンダクタンスK電流の活性化の詳しい機構は明らかでない。これに細胞内伝達物質が関与すると仮定した場合、フェナメートはアラキドン酸カス

ケード・シクロオキシゲナーゼ経路を阻害するので、その候補としては遊離アラキドン酸か、あるいはシクロオキシゲナーゼ経路以外の代謝産物が挙げられる。果たして、アラキドン酸の細胞外投与は、ウシ角膜上皮の持続型K電流を増大させた。アラキドン酸のKチャンネルへの直接作用が初めて提唱されたのは、平滑筋細胞においてアラキドン酸誘発K電流が、アラキドン酸代謝の基質となり得ない他の脂肪酸によっても同様に活性化されたことによる<sup>(12)</sup>。その後、他の様々な組織において、アラキドン酸を含む脂肪酸により活性化されるKチャンネルが報告されている<sup>(13)</sup>。ウシ角膜上皮においても、表1のごとく、パルミトオレイン酸、リノール酸、リノレライク酸の脂肪酸によって持続型K電流が増大したことから、アラキドン酸のKチャンネルへの直接作用が示唆される。

ウシ角膜上皮持続型K電流の活性化にシクロオキシゲナーゼ経路以外の代謝産物が関与する可能性は以下のことより否定的である。すなわち、リポキシゲナーゼ阻害剤(10  $\mu$ M ETI,  $n=2$ ; 10  $\mu$ M NDGA,  $n=3$ )あるいはチトクロームP-450阻害剤(10  $\mu$ M クロトリマゾール,  $n=3$ )はアラキドン酸による持続型K電流の活性化を阻害しなかった。一方で、アラキドン酸はウシ角膜上皮の不活性化K電流の頂点振幅を減少させ不活性化を速めた。パルミトオレイン酸などの脂肪酸もアラキドン酸に類似の不活性化K電流抑制作用を示すことから(表1)、アラキドン酸のKチャンネルへの直接作用が示唆される。また、通常、この抑制作用がアラキドン酸や脂肪酸を灌流してから1分以内に始まったことも、これらのKチャンネルへの直接作用説を支持する。

持続型K電流が、不活性化、開口閾値などの電位依存性がないK電流であり、かつアラキドン酸を含む脂肪酸によって活性化されるKチャンネルであることから、近年報告された4つの膜貫通領域と2つのポアからなるサブユニットで構成される2孔性KチャンネルファミリーのTREK (Tandem of P domains in weak inward rectifier K<sup>+</sup> channels(TWIK)-related K channel)あるいはTRAAK (TWIK-related arachidonic acid-stimulated K channel)に由来する可能性がある<sup>(15)~(17)</sup>。この仮説は、TREKおよびTRAAKを活性化する100  $\mu$ M リルゾール<sup>(18)(19)</sup> ( $n=9$ )あるいは10  $\mu$ M リゾファチジルコリン<sup>(20)(21)</sup> ( $n=8$ )により、ウシ角膜上皮の持続型K電流が増大し、100  $\mu$ M ジルチアゼムによってほぼ完全に阻害された(リルゾール,  $n=2$ ; リゾフォスファチジルコリン,  $n=4$ )ことから支持される。これを確定するには、分子生物学的手法によって、角膜上皮でのチャンネル蛋白の発現を調べる必要がある。

ウシ角膜上皮の2種類のK電流が、ヒト角膜上皮においても発現しているか否かの検証は臨床応用の点で極めて重要である。近年、Bockmanら<sup>(11)</sup>は、培養ヒト角膜上皮細胞において、フェナメートにより活性化される2種類のKチャンネルを報告した。その1つは、ウサギ角膜上皮の大コンダクタンスKチャンネルと相同であるとされているが、ジルチアゼムには阻害されなかった。彼らは、単に薬理特性が変化した可能性を挙げているが、大コンダクタンスKチャンネルを同定したとは言い難い。もう1つは、上記のごとくTEAによって阻害されるKチャンネルであり、電位開口型Kチャンネルに属する可能性があるが、電位依存性などの詳細については検証されていない。

新鮮単離ヒト角膜上皮においてホールセル電流を記録した研究は、本報が初めてである。ウシ角膜上皮でみられたような不

活性化K電流は発現していなかった。フェナメート、アラキドン酸あるいは脂肪酸により活性化される電流成分は、+10 mV付近に開口閾値電位を有するようなI-V曲線を呈することや、TEAによって阻害されることから、Ca活性化型Kチャンネルに由来する可能性がある。Ca活性化型Kチャンネルはチャンネルコンダクタンスの大きさにより、大コンダクタンス型のBK<sub>Ca</sub>、中コンダクタンス型のIK<sub>Ca</sub>ならびに小コンダクタンス型のSK<sub>Ca</sub>に分類されるが<sup>24)25)</sup>、このうちアラキドン酸を含む不飽和脂肪酸で活性化されるのはBK<sub>Ca</sub>である<sup>26)</sup>。一方、2個の細胞において、100 μMアラキドン酸は、E<sub>k</sub>付近に逆転電位を有する電流成分を著しく活性化させ、V<sub>0</sub>は-17 mVから-59 mV、および-11 mVから-61 mVと著しく過分極した。さらに、同活性化電流成分は、100 μMジルチアゼムにより阻害された。これらの結果から、ヒト角膜上皮における持続型K電流の発現が示唆される。

角膜において、アラキドン酸は、創傷治癒、感染防御、血管新生の機構において重要な役割を担っている<sup>2)27)~32)</sup>。しかし、アラキドン酸以外の脂肪酸の角膜における生理作用の研究は少なく、カエル角膜上皮におけるCl輸送体の刺激作用<sup>33)</sup>や、ウサギ角膜における角膜内皮の角膜含水量調節に対する阻害作用<sup>34)</sup>の報告があるのみである。脂肪酸が角膜のKイオン輸送に関与することを示したのは、本報が初めてである。

ウサギ角膜上皮の大コンダクタンスKチャンネルは、細胞膜静止電位を保持し、細胞容積や細胞内pHを調節している<sup>6)8)9)</sup>。本研究により、これらの役割を担う持続型Kチャンネルの活性をアラキドン酸が直接刺激することが示された。炎症や損傷治癒など、細胞内アラキドン酸濃度が変化する状態においては、Kチャンネル活性の制御により細胞の微細環境が維持されている可能性がある。

一方、不活性化Kチャンネルの角膜上皮における生理学的作用は不明である。不活性化Kチャンネルは、過分極電位では開口していないので、静止膜電位には関与しない。一般に、膜電位開口型Kチャンネルは、興奮性の細胞に広く発現し、膜電位の再分極を担っている<sup>14)35)~37)</sup>。一方、非興奮性細胞においても電位開口型Kチャンネルが発現し、細胞の移動、増殖、分化に関与すると考えられている<sup>14)38)~40)</sup>。電位開口型Kチャンネルは、上皮細胞での発現は少ないとされているものの、実際には、他の眼上皮組織である水晶体上皮や網膜色素上皮にも発現している<sup>14)41)42)</sup>。ウシ角膜上皮の見かけ上の基底細胞(円柱状細胞)において、不活性化K電流の振幅がより大きく、また発現頻度が高い傾向がみられた。すなわち、角膜上皮細胞がより表層になるほど不活性化Kチャンネルの発現が消失することが示唆され、このチャンネルが角膜上皮細胞の分化に関与している可能性がある。

## 結 論

新鮮角膜から単離されたウシおよびヒト角膜上皮細胞のホールセル電流についてパッチクランプ法を用いて検討し、以下の結論を得た。

1. 新鮮単離ウシ角膜上皮細胞は形態的に極性のない細胞(n=158)、極性を有する細胞(n=48)に分類された。ウシ角膜上皮の平均V<sub>0</sub>は-23 mVであった。
2. ウシ角膜上皮細胞において2種類のK電流が認められた。すなわち、1つは不活性化K電流であり、もう一方はウサギ角

膜上皮の大コンダクタンスK電流に相同の持続型K電流であった。

3. ウシ角膜上皮細胞の不活性化K電流は、その膜電位依存性および阻害剤に対する感受性から、Shaker型に代表される膜電位開口型Kチャンネルのそれに類似していた。
4. アラキドン酸により、ウシ角膜上皮の持続型K電流は増大した。一方、不活性化K電流の頂点振幅は減少し、不活性化は速まった。
5. アラキドン酸代謝の基質にならない脂肪酸であるパルミトオレイン酸、リノール酸、リノレライック酸は、アラキドン酸と同様に、2種類のKチャンネルに作用した。よって、アラキドン酸は直接Kチャンネルに作用していると考えられる。
6. 新鮮単離ヒト角膜上皮細胞は、極性のない細胞(n=20)と、極性を有する細胞(n=10)とに大別され、平均V<sub>0</sub>は-6 mVであった。
7. ヒト角膜上皮細胞において、アラキドン酸(20 μM)、脂肪酸によって増大した電流は、刺激電位が+10 mVより陽性でより強い外向き整流作用を呈した。この電流はジルチアゼムには阻害されず、TEAによって阻害された。
8. ヒト角膜上皮において、100 μMアラキドン酸は、ジルチアゼム感受性のK電流を増大させた。この結果から、ヒト角膜上皮細胞においても、持続型K電流が発現している可能性がある。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科脳医科学専攻脳病態学講座光情報伝達学河崎一夫教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究に際し終始直接の御指導を戴きました同講座高比良雅之助手に心から感謝いたします。また、本研究の遂行に際し、多大な御助言と御協力を戴きました桜井真由美助手、ウシ眼球を提供して頂きました金沢市食肉検査所に感謝の意を表します。

なお、本研究の一部は、第64回日本中部眼科学会(1998年、三重)、1999 Annual Meeting, Association for Research in Vision and Ophthalmology(1999, Florida)、第104回日本眼科学会総会(2000年、京都)、および第67回日本中部眼科学会(2001年、金沢)において発表した。

## 文 献

- 1) Edelhauser HF, Geroski DH, Ubels JL. Physiology. In Smolin G, Thoft RA (eds), *The Cornea* 3rd ed, p25-46, Little, Brown and Company, Boston, 1994
- 2) Friend J, Hassell JR. Biochemistry of the Cornea. In Smolin G, Thoft RA (eds), *The Cornea* 3rd ed, p47-68, Little, Brown and Company, Boston, 1994
- 3) Watsky MA. Loss of fenamates-activated K<sup>+</sup> current from epithelial cells during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 1356-1363, 1999
- 4) Rae JL, Dewey J, Rae JS, Nesler M, Cooper K. Single potassium channels in corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1799-1809, 1990
- 5) Rae JL. Outwardly rectifying potassium currents in lens epithelial cell membranes. *Curr Eye Res* 13: 679-686, 1994
- 6) Rae JL, Farrugia G. Whole-cell potassium current in rabbit corneal epithelium activated by fenamates. *J Membr Biol* 129: 81-97, 1992
- 7) Farrugia G, Rae JL. Regulation of a potassium-selective current in rabbit corneal epithelium by cyclic GMP, carbachol

and diltiazem. *J Membr Biol* 129: 99-107, 1992

8) Rich A, Bartling C, Farrugia G, Rae JL. Effects of pH on the potassium current in rabbit corneal epithelial cells. *Am J Physiol* 272: 744-753, 1997

9) Farrugia G, Rae JL. Effect of volume changes on a potassium current in rabbit corneal epithelial cells. *Am J Physiol* 264: 1238-1245, 1993

10) Rae JL, Dewey J, Rae JS. The large-conductance potassium ion channel of rabbit corneal epithelium is blocked by quinidine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 286-290, 1992

11) Bockman CS, Griffith M, Watsky MA. Properties of whole-cell ionic currents in cultured human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 1143-1151, 1998

12) Ordway RW, Walsh JV Jr, Singer JJ. Arachidonic acid and other fatty acids directly activate potassium channels in smooth muscle cells. *Science* 244: 1176-1179, 1989

13) Conley EC. ILG K AA [native]. In Conley EC, (eds), *The Ion Channel Facts Book II* p571-606, Academic Press, San Diego, 1996

14) Conley EC. VLGK A-T, VLGK DR. In Conley EC, Brammar WJ (eds), *The Ion Channel Facts Book IV*, p196-274, Academic Press, San Diego, 1996

15) Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol* 279: 793-801, 2000

16) Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M, Lazdunski M. A neuronal two P domain K<sup>+</sup> channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* 17: 3297-3308, 1998

17) Patel AJ, Lazdunski M, Honore E. Lipid and mechano-gated 2P domain K<sup>+</sup> channels. *Curr Opin Cell Biol* 13: 422-427, 2001

18) Duprat F, Lesage F, Patel AJ, Fink M, Romey G, Lazdunski M. The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *Mol Pharmacol* 57: 906-912, 2000

19) Ettaiche M, Fillacier K, Widmann C, Heurteaux C, Lazdunski M. Riluzole Improves functional recovery after ischemia in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 729-736, 1999

20) Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honore E. Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* 275: 10128-10133, 2000

21) Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M. Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K<sup>+</sup> channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 275: 28398-28405, 2000

22) Watanabe S, Tanizaki M, Kaneko A. Two types of stretch-activated channels coexist in the rabbit corneal epithelial cell. *Exp Eye Res* 64: 1027-1035, 1997

23) 山根楨一, 古川哲史, 平岡昌和. 膜電位依存性カリウムチャンネル. 蛋白質 核酸 酵素 (三浦謹一郎, 高木俊夫編), 第40巻第15号, 2280-2287頁, 共立出版株式会社, 東京, 1995

24) Sah P. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in neurons: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* 19: 150-154, 1996

25) 東田陽博, 横山 茂. カリウムチャンネルについて. 蛋白質 核酸 酵素 (三浦謹一郎, 高木俊夫編), 第40巻第15号, 2275-2279頁, 共立出版株式会社, 東京, 1995

26) Denson DD, Wang X, Worrell RT, Eaton DC. Effects of fatty acids on BK channels in GH(3) cells. *Am J Physiol* 279: 1211-1219, 2000

27) Gupta AG, Hirakata A, Proia AD. Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal reepithelialization in the rat. *Exp Eye Res* 56: 701-708, 1993

28) Nakamura M, Fujihara T, Mibu H, Hikida M. Arachidonic acid stimulates corneal epithelial migration. *J Ocul Pharmacol* 10: 453-459, 1994

29) Ormerod LD, Garsd A, Abelson MB, Kenyon KR. Eicosanoid modulation and epithelial wound healing kinetics of the alkali-burned cornea. *J Ocul Pharmacol* 8: 53-58, 1992

30) Conners MS, Urbano F, Vafeas C, Stoltz RA, Dunn MW, Schwartzman ML. Alkali burn-induced synthesis of inflammatory eicosanoids in rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 1963-1971, 1997

31) Mieyal PA, Bonazzi A, Jiang H, Dunn MW, Schwartzman ML. The effect of hypoxia on endogenous corneal eicosanoids. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 2170-2176, 2000

32) Yamada M, Proia AD. 8(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid is the lipoxygenase metabolite of arachidonic acid that regulates epithelial cell migration in the rat cornea. *Cornea* 19: 13-20, 2000

33) Schaeffer BE, Zadunaisky JA. Stimulation of chloride transport by fatty acids in corneal epithelium and relation to changes in membrane fluidity. *Biochim Biophys Acta* 556: 131-143, 1979

34) Green K, Burns B, Hull DS, Livingston V, Van Horn DL. Inhibition of corneal deswelling during perfusion of fatty acids across the rabbit corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20: 490-496, 1981

35) Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 525: 285-298, 2000

36) Rehm H, Tempel BL. Voltage-gated K<sup>+</sup> channels of the mammalian brain. *FASEB J* 5: 164-170, 1991

37) Nick TA, Kaczmarek LK, Carew TJ. Ionic currents underlying developmental regulation of repetitive firing in Aplysia bag cell neurons. *J Neurosci* 16: 7583-7598, 1996

38) DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD. Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 307: 465-468, 1984

39) Lee SC, Sabath DE, Deutsch C, Prystowsky MB. Increased voltage-gated potassium conductance during interleukin 2-stimulated proliferation of a mouse helper T lymphocyte clone. *J Cell Biol* 102: 1200-1208, 1986

40) Konishi T. Voltage-dependent potassium channels in mouse Schwann cells. *J Physiol* 411: 115-130, 1989

41) Takahira M, Hughes BA. Isolated bovine retinal pigment

epithelial cells express delayed rectifier type and M-type K<sup>+</sup> currents. *Am J Physiol* 273: 790-803, 1997

42) Hughes BA, Steinberg RH. Voltage-dependent currents in

isolated cells of the frog retinal pigment epithelium. *J Physiol* 428: 273-297, 1990

**Potassium channels modulated by arachidonic acid in the corneal epithelium** Norimasa Sakurada, Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **110**, 390 — 403 (2001)

**Key words** potassium channel, corneal epithelium, arachidonic acid, fatty acid, patch clamp

#### Abstract

To date potassium (K) channels in the corneal epithelium have been studied mainly on the rabbit, large conductance K current. This K current is augmented by external fenamates which inhibit the cyclooxygenase pathway in the arachidonic acid (AA) cascade. Recently, some study showed that the fenamate-activated K current disappears during corneal wound healing. Final goals of the present research are to identify K currents exhibited in the corneal epithelium and to elucidate the channel regulation by AA and/or its metabolites. Corneal epithelial cells were isolated from the bovine cornea excised just after slaughter or from the human cornea removed in the penetrating keratoplasty. Under microscopy two types of corneal epithelial cells were observed: round cells without polarity and columnar cells with distinct polarity. Cells were perfused with 5 mM K<sup>+</sup> Ringer solution and the whole cell currents were recorded using the patch clamp technique. Two distinct types of K currents dominated the whole cell current in bovine corneal epithelial cells. The first was a voltage-gated K current that was inactivated during prolonged membrane depolarization. This inactivating K current was exhibited more frequently in the columnar cells. The second was a noisy, outward K current that never inactivated. This sustained K current was activated by fenamates and inhibited by diltiazem, indicating a counterpart of the rabbit large conductance K current. The sustained K current was markedly augmented by external AA (5 ~ 10  $\mu$ M). It is suggested that AA directly acts on the channel because this AA-induced channel activation was mimicked by other fatty acids that are not substrates for enzymes in the AA cascade: i.e. palmitoleic acid, linoleic acid and linoleic acid. AA and those fatty acids had inhibitory effects on the inactivating K current. In the human corneal epithelial cells, no inactivating currents were detected. AA (20  $\mu$ M), palmitoleic acid and linoleic acid activated a noisy current rectifying strongly at potentials more positive than +10 mV, which was insensitive to diltiazem. On the other hand, external 100  $\mu$ M AA activated a K current inhibited by diltiazem, indicating exhibition of the sustained K current in the human corneal epithelium.