

平成 21 年 4 月 6 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790526
 研究課題名（和文） 内因性NOによる生理的および病的条件下での気道電解質分泌における調節機構
 研究課題名（英文） A potentiating effect of endogenous NO in the physiologic and pathologic secretion from airway submucosal glands.
 研究代表者
 玉田 勉 (TAMADA TSUTOMU)
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：80396473

研究成果の概要：

本研究は難治性の慢性気道炎症疾患における病的分泌機序の解明と新たな治療戦略の確立を目的として行われた。研究代表者らによって気道分泌腺細胞内での分泌調節機構に NO が重要な意義を持つことが明らかとされた。本研究によって、病的分泌が病態の中心をなす難治性疾患に対する今後の新たな治療戦略の対象として細胞内 NO が候補となりうることを示したことになり、非常に有意義なものと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	700,000	0	700,000
2007年度	200,000	0	200,000
2008年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	1,100,000	60,000	1,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器病学、気道分泌

1. 研究開始当初の背景

慢性気管支炎や気管支喘息など種々の炎症性気道疾患では気道上皮細胞で NO 産生が亢進していることが知られているが、NO が気道分泌の細胞内調節に対してどのような関与をするのかについてはいまだ明らかにされていない。

2. 研究の目的

生理的刺激下および慢性炎症性気道疾患における病的過分泌状態においてNOが気道電解質分泌に対して及ぼす影響を確認する。

これらの細胞内メカニズムが明らかになり将来的に治療薬として応用できる可能性を探ることも本研究の目的のひとつである。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的手法について

我々がこれまで使用してきたパッチクランプ法を用いた実験の関連設備の多く（実体顕微鏡、倒立顕微鏡、マニピュレーター、ピペットホルダー、灌流装置、膜電流および膜電位測定用アンプ[EPC-9]、データ解析用パソコン、ディスプレイ、ペンレコーダー、DAT

記録装置等)を用いて、物理的および酵素的に単離したブタ気道粘膜下腺を研究対象とする。ガラス電極で感知される電気信号が膜電位を調節することで目的のイオンのみの電流として記録される。はじめに NOS 阻害剤存在下での細胞で NO の関与しない電流を観察し、通常の細胞で NO が関与する電流と比較し、NO 非存在下では同じ大きさの電流を得るのにより高濃度の ACh が必要であることを確認する。次に生理的に近い低濃度の 30nM の ACh 溶液で刺激して得られる持続するイオン電流に対して、膜透過性 PKG 阻害剤である KT-5823 1 μ M および Rp-8-Br-cGMP 1 μ M を上乗せしその抑制効果を確認する。また、同様に NOS 阻害剤である L-NAME 1mM および 7-NI 1mM も用いる。この際 NO 合成の基質である L-Arginine 1mM によってこの抑制効果が解除されることも確認する。データ解析には単位時間あたりの平均電流を指標として用いる。統計学的処理に必要な例数が出るよう、各実験のデータを十分に集積する。次に PKG がどのような機序で関わっているかを確認するために、細胞内 Ca²⁺測定装置を用いて NO が[Ca²⁺]_iを上昇させない、かつイオンチャンネルのカルシウム感受性を高めることも確認する。前者は蛍光色素 Fura-2 を用いるが、十分に細胞内 Ca²⁺測定が感度以下の時には Ca²⁺イオン選択的微小電極を用いる。後者はパッチクランプによる単一チャンネル解析法にて評価可能である。

(2) 蛍光発色法による細胞内 NO 合成および定量化について

NO 特異的蛍光発色基質である膜透過性 DAF-2DA をあらかじめ十分に (40 分間以上) 細胞内に浸透させておくと細胞内 Esterase により速やかに膜非透過型の DAF-2 に変換され細胞外に流出しなくなる。この処理により細胞内で発生した NO が全て DAF-2 と結合し DAF-2T という形で存在し 495nm の紫外線で励起し 515nm の波長で発色する。単離細胞を低濃度 ACh(30-100nM)で刺激することによりその発色の程度から経時的に NO の合成が観察される。これを定量化するために、あらかじめ発色輝度と NO 濃度の定量曲線を作成し、これと照らし合わせることで細胞内 NO 濃度の定量化が可能である。ACh による NO 合成およびこれが NOS 阻害剤で抑制されることを証明する。

4. 研究成果

気道分泌腺細胞内での NO の合成を確認するため、NO 特異的蛍光発色基質である

DAF-2DA を用いた。単離細胞を低濃度 ACh(100nM)で刺激することによりその発色の程度から経時的に NO の合成が観察された。合計 7 細胞塊から同様に時間依存性に発色強度が増強することが確認された。平均すると刺激前に比べて約 2.3 倍増加することが分かった(図 1)。細胞内 NO の産生量を推測するために、既知の NO 濃度が設定できる NO ドナーを用いて同様に測定した。NOC-5 は 1 分子から 2 分子の NO を放出しその半減期は 10 数分と比較的短いためこれを用いた。その結果、100nM の ACh による発色強度は 0.5 μ M の NOC-5 による発色強度と 10 μ M の NOC-5 による発色強度の間であることが判明し、これらから細胞内 NO 合成量は数 μ M 程度であると推測された。これは血球成分や脳神経細胞内の既知の合成量 (2-30 μ M) とほぼ一致しており、生理的範囲内で妥当な値であることも確認できた。さらに、この NO 産生はカルシウムイオノフォアであるイオノマイシンでも同様に認められたことから細胞内カルシウム濃度上昇に依存していることも確認できた。

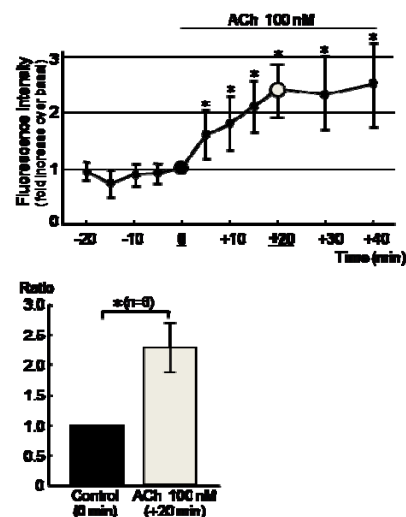


図 1 腺細胞内での NO の合成

さらに 2 種類の NOS 阻害剤(非特異的な阻害剤である L-NAME と nNOS 特異的な阻害剤である 7-NI) であらかじめ前処置しておくとも ACh 刺激下でも発色強度が上昇せず、L-arginine を上乗せして初めて発色強度が上昇し始めることも確認され、細胞内 NOS、特に nNOS の活性化を介していることも明らかにされた (図 2)。

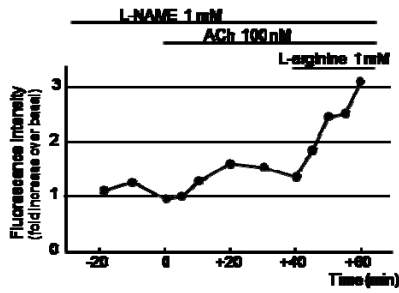


図2 NO合成におけるNOSの関与

次に気道粘膜下腺で内因性に合成されるNOが、生理活性物質であるAChによって生じる電解質分泌に対して持つ影響を検討した。非特異的NOS阻害剤であるL-NAME 1mMを投与するとACh 30nMで刺激して確認されるイオン電流が減弱した。さらにnNOSの特異的阻害剤である7-NI 1mMの場合も同様に減弱した。しかしながら完全には消失してはいないことから、AChによる電解質分泌の維持には細胞内のnNOSの活性化が重要であることが確認された(図3)。

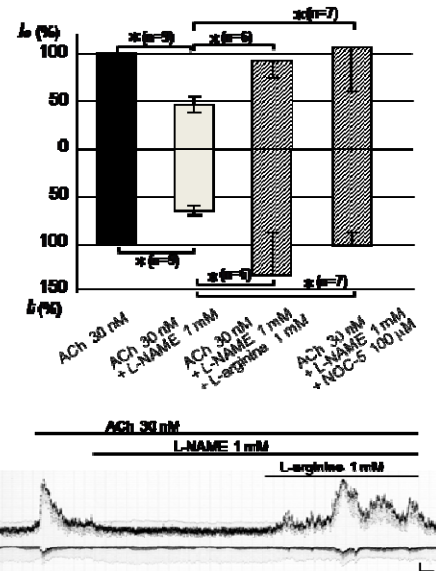


図3 電解質分泌に対するNOS阻害剤の抑制効果

さらに、PKGの阻害剤であるKT-5823 1 μ MおよびRp-8-Br-cGMP 1 μ MのnNOS阻害剤同様に部分的にイオン電流を減弱した(図4)ことでnNOSの活性化以降の下流にあるPKGの活性化を介した情報伝達機構に至るまでの系が重要であることが確認された(図5)。

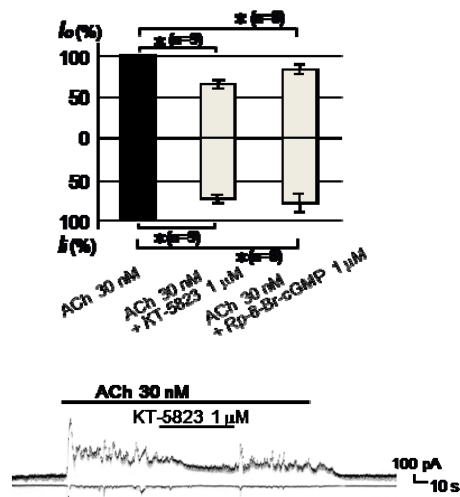


図4 電解質分泌に対するPKG阻害剤の抑制効果

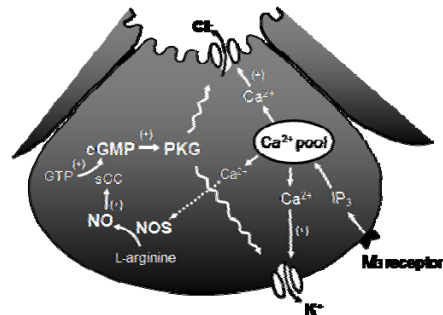


図5 電解質分泌の細胞内情報伝達機構におけるNOの位置づけ

内因性NOは生理的である低濃度ACh刺激下でのみイオン電流の維持に寄与していた。この意義としては以下のように考えられる。すなわち、本来細胞内カルシウムの過度の上昇は細胞毒性が顕著になり細胞にとって不利である。気道分泌腺細胞は基礎分泌を常に行っており、また必要に応じて速やかな追加分泌を要求される。このため、なるべく低濃度の細胞内カルシウム上昇で効率よく分泌活動を行えるように、内因性NOの増強効果を利用しているものと考えられる。慢性気道炎症疾患の病態における内因性NOの意義として、気管支喘息の気道上皮ではNOが過剰に産生されていることおよび嚢胞性線維症では逆にNO産生が低下していることは以前より知られているが、今回の我々の結果を踏まえて考えると、それぞれの疾患においてNOの過剰および不足がそれぞれ気道の過分泌または気道表面の脱水状態を招き、病態をさらに悪化させている可能性も示唆された。

以上の研究成果は、ヨーロッパ呼吸器学会年次総会にてポスター発表し、さらにア

メロカ呼吸器学会機関誌に報告し掲載された。

(3) 連携研究者

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- 1) Tamada, T., M. Nara, H. Kanatsuka, R. Koshida, M. Nagaoka, G. Tamura and T. Hattori. : A potentiating effect of endogenous NO in the physiological secretion from airway submucosal glands. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 37, 357-365, 2007 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 玉田 勉 『 気管支粘膜下腺細胞の単離と分泌活動の機能解析について 』

第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会ワークショップ 1 「基礎：構造細胞の分離と機能的解析」(東京) 2008 年 11 月 27 日 東京国際フォーラム

- 2) Tamada, T., M. Nara, H. Kanatsuka, K. Murakami, W. Hida and T. Nukiwa. A Potentiating Effect of Endogenous Nitric Oxide in the Physiologic Secretion from Airway Submucosal Glands. European Respiratory Society Annual Congress, October 7, 2008, Berlin, Germany, 313-P3568.

- 3) 玉田 勉、奈良 正之、服部 俊夫. 内因性NOの気道分泌における調節機構. 第 47 回日本呼吸器学会総会 (東京) 2007 年 5 月 12 日 東京国際フォーラム

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉田 勉 (TAMADA TSUTOMU)

東北大学・病院・助教

研究者番号：80396473

(2) 研究分担者