

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09325

研究課題名(和文)細胞内外イオン環境の変化に対する鼻粘膜線毛細胞の応答性

研究課題名(英文)responsiveness of nasal ciliated cell for extra- or intracellular ionic environmental change

研究代表者

安田 誠 (Yasuda, Makoto)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60433273

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文):線毛運動は線毛運動頻度(CBF)と線毛運動振幅(CBAあるいはCBD)の二つのパラメータで表される。鼻粘膜線毛運動は、カルシウムや水素やクロライドなどの細胞内イオンによって制御されており、細胞内クロライド濃度の減少により増強する。ヒト鼻粘膜線毛培養細胞を用いてビデオ付き高速度カメラでCBFとCBAを測定する系を我々は確立した。その結果細胞内クロライド濃度の低下はCBFではなくCBDの増加をまた細胞内クロライド濃度の増加はCBFとCBD両者の低下を引き起こすことが判明した。軸糸構造は細胞内クロライドイオンのセンサーを有し細胞内クロライドイオンの増減により線毛運動を制御する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線毛運動は健全な鼻粘膜線毛輸送系を担う重要な細胞である。また線毛細胞を標的にした治療法はいまだにほとんど開発されておらず、未開拓の分野である。今回我々は細胞内クロライドイオン濃度の変化で線毛運動が変化することを示した。この制御機構をさらに詳細に研究することにより線毛運動の制御機構が明らかにできる。また細胞内クロライドイオンの低下を来たす薬剤を開発することにより線毛運動を活性化できる可能性が示唆された。慢性副鼻腔炎やアレルギー性鼻炎などの上気道炎症性疾患における今後の新たな薬剤開発のターゲットの一つになりうると考えられる。

研究成果の概要(英文):The functional activities of beating cilia are assessed by their frequency and the amplitude. Nasal ciliary beating is controlled by intracellular ions (Ca^{2+} , H^{+} and Cl^{-}), and is enhanced by a decreased concentration of intracellular Cl^{-} ($[\text{Cl}^{-}]_i$) in ciliated human nasal epithelial cells (chNECs) in primary culture, which increases the ciliary beat amplitude. A novel method to measure both ciliary beat frequency (CBF) and ciliary beat distance (CBD) in chNECs has been developed, which revealed that a decrease in $[\text{Cl}^{-}]_i$ increased CBD, but not CBF, and an increase in $[\text{Cl}^{-}]_i$ decreased both CBD and CBF. Thus, $[\text{Cl}^{-}]_i$ inhibits ciliary beating in chNECs, suggesting that axonemal structures controlling CBD and CBF may have Cl^{-} sensors and be regulated by $[\text{Cl}^{-}]_i$. These observations indicate that the activation of Cl^{-} secretion stimulates ciliary beating (increased CBD) mediated via a decrease in $[\text{Cl}^{-}]_i$ in chNECs. Thus, $[\text{Cl}^{-}]_i$ is critical for controlling ciliary beating in chNECs.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：線毛運動 鼻粘膜上皮細胞 細胞内イオン環境 細胞内クロライドイオン濃度 CBF CBA

1. 研究開始当初の背景

鼻粘膜上皮における粘液線毛輸送系の重要性は以前から知られており、杯細胞や腺細胞が分泌する airway surface liquid (ASL) と呼ばれる気道粘液と線毛細胞の相互作用により維持されている。その作用としては気道粘膜の加湿や潤滑に加え、微生物・粒子などの補足、排泄するための輸送系としての役割が挙げられる。したがって線毛細胞は粘液線毛輸送系を構成する重要な細胞と考えられる。感染やアレルギーなどの病的状態で生じる低酸素状態や血管透過性の変化などにより細胞外のイオン組成や PH などの細胞外環境は容易に変化することが知られている。しかしながらこういった細胞外環境に対する線毛細胞の機能変化についてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

細胞外環境の変化に対する気道上皮細胞の反応性を線毛細胞に着目して検討することにした。細胞外環境変化に対する線毛細胞の反応を明らかにすることで炎症発生時の線毛細胞の機能回復に着眼した新たな治療法開発につなげたい。

3. 研究の方法

ヒト培養鼻粘膜上皮細胞の作製とその線毛運動の観察

手術時に得られた組織を使用する。まずディッシュ上で一次培養を行い次に culture insert 内に継代し、細胞がほぼコンフルエントになった時点で apical 面の培地を除去し air liquid interface (ALI) culture で細胞を発育させる。培養細胞は ALI culture で 2~3 週発育させる。なお本法により上皮は分化を開始し極性をもった杯細胞や線毛細胞といった in vivo に近い種々の形態の細胞を観察することが出来る。

高速度カメラによる鼻粘膜線毛運動の観察

培養鼻粘膜上皮細胞をチャンバーに固定し、高速度カメラ (500fr/sec) を接続した顕微鏡下 (37 °C) に線毛運動を観察する。実験には 95%CO₂ と 5%O₂ を含気した溶液を使用する。線毛運動の指標として高速度カメラで撮影したビデオイメージ画像から周波数 (CBF) と振幅 (CBA or CBD) を測定する。

細胞内 Cl⁻ の測定

細胞内 Cl⁻ 濃度の測定はクロライドイオン蛍光色素である MQAE を用いて行う。培養細胞を単離した後に 40 分間 MQAE と incubate する。その後 2 光子励起レーザー顕微鏡システムを用いて細胞内 Cl⁻ 濃度を計測する。MQAE は 780nm で励起されるので発振波長である 510nm との蛍光強度の比を算出し計測する。

4. 研究成果

以下の 5 編の論文に成果を発表した。

(1) マウス鼻粘膜における線毛運動回数の自発的オシレーションは細胞内ストアからのカルシウム放出により制御される

マウス鼻粘膜線毛細胞において CBF Oscillation を認めた。Oscillation の原因は細胞内カルシウム Oscillation であった。CBF Oscillation は cAMP ではなく IP₃ 受容体を介した小胞体からのカルシウム放出が引き金になっていると考えられた。鼻粘膜における CBF は主に Ca²⁺ によって調整されており、他の気道部位とは異なる特徴を持っていることが明らかとなった 1)。

(2) ダイゼインの [Cl⁻]_i 減少を介したヒト鼻粘膜培養上皮における線毛運動振幅の増加

イソフラボン的一种であるダイゼインはヒト鼻粘膜培養線毛細胞の線毛運動において [Cl⁻]_i を低下させることにより CBD を増加させるが、CBF を変化させない。生理的条件下において CBD 増加は線毛輸送能の亢進に重要な役割を果たしている 2)。

(3) ヒト鼻粘膜線毛細胞における線毛運動振幅の細胞内クロライドと高 CO₂ 産生による制御

ヒト鼻粘膜上皮培養細胞を用いて線毛運動の [Cl⁻]_i による運動調節について検討した。CBD を用いて鼻粘膜線毛運動の評価を行った。[Cl⁻]_i の変化により CBD と CBF では異なる反応を認めた。ヒト鼻粘膜線毛細胞において [Cl⁻]_i は線毛運動の機能制御に関与すると考えられた 3)。

(4) ヒト鼻粘膜線毛細胞におけるカルボシステインの線毛運動振幅増強作用

ヒト鼻粘膜培養線毛細胞を用いて、カルボシステインの線毛運動に対する効果を調べた。カルボシステインは CBF には影響せず CBA を増加させた。CBA 増加作用は CFTR クロライドチャンネル活性化を介した [Cl⁻]_i 低下により引き起こされていると考えられた 4)。

(5) ヒト鼻粘膜線毛細胞における線毛運動の細胞内クロライド制御機構：高速度ビデオカメラを用いた CBF と CBA の観察

クロライドイオンは線毛運動を阻害する。このことは CBD と CBF を制御する線毛運動の軸系構造がクロライドイオンのセンサーを有している可能性がある。[Cl⁻]_i によって線毛運動は制御されている。クロライド分泌の増加は [Cl⁻]_i の低下を引き起こし CBD 増加による線毛運動を活性化する 5)。

1) Kuremoto T, Kogiso H, Yasuda M, Inui TA, Murakami K, Hirano S, Ikeuchi Y, Hosogi S, Inui T, Marunaka Y, Nakahari T. Spontaneous oscillation of the ciliary beat frequency regulated by release of Ca²⁺ from intracellular stores in mouse nasal epithelia.

Biochem Biophys Res Commun. Dec9;507(1-4): 211-216, 2018

2) Inui TA, Yasuda M, Hirano S, Ikeuchi Y, Kogiso H, Inui T, Marunaka Y, Nakahari T. Daidzein-Stimulated Increase in the Ciliary Beating Amplitude via an $[Cl^-]_i$ Decrease in Ciliated Human Nasal Epithelial Cells. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 26;19(12). pii: E3754. doi: 10.3390/ijms19123754.

3) Inui TA, Murakami K, Yasuda M, Hirano S, Ikeuchi Y, Kogiso, Hosogi S, Inui T, Marunaka Y, Nakahari T. Ciliary beating amplitude controlled by intracellular Cl^- and a high rate of CO_2 production in ciliated human nasal epithelial cells. *Pflugers Arch*. 2019 Aug;471(8):1127-1142.

4) Inui TA, Yasuda M, Hirano S, Ikeuchi Y, Kogiso H, Inui T, Marunaka Y, Nakahari T. Enhancement of ciliary beat amplitude by carbocysteine in ciliated human nasal epithelial cells. *Laryngoscope*. 2020 May;130(5):E289-E297. doi: 10.1002/lary.28185.

5) Yasuda M, Inui TA, Hirano S, Asano S, Okazaki T, Inui T, Marunaka Y, Nakahari T. Intracellular Cl^- Regulation of Ciliary Beating in Ciliated Human Nasal Epithelial Cells: Frequency and Distance of Ciliary Beating Observed by High-Speed Video Microscopy. *Int. J. Mol. Sci*. 2020, 21, 4052.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inui Taka aki, Murakami Kentaro, Yasuda Makoto, Hirano Shigeru, Ikeuchi Yukiko, Kogiso Haruka, Hosogi Shigekuni, Inui Toshio, Marunaka Yoshinori, Nakahari Takashi	4. 巻 471
2. 論文標題 Ciliary beating amplitude controlled by intracellular Cl ⁻ and a high rate of CO ₂ production in ciliated human nasal epithelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 1127-1142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgme.2018.11.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inui Taka aki, Yasuda Makoto, Hirano Shigeru, Ikeuchi Yukiko, Kogiso Haruka, Inui Toshio, Marunaka Yoshinori, Nakahari Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Enhancement of ciliary beat amplitude by carbocysteine in ciliated human nasal epithelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.28185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuremoto Toshihiro, Kogiso Haruka, Yasuda Makoto, Inui Taka-aki, Murakami Kentaro, Hirano Shigeru, Ikeuchi Yukiko, Hosogi Shigekuni, Inui Toshio, Marunaka Yoshinori, Nakahari Takashi	4. 巻 507
2. 論文標題 Spontaneous oscillation of the ciliary beat frequency regulated by release of Ca ²⁺ from intracellular stores in mouse nasal epithelia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 211 ~ 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inui Taka-aki, Yasuda Makoto, Hirano Shigeru, Ikeuchi Yukiko, Kogiso Haruka, Inui Toshio, Marunaka Yoshinori, Nakahari Takashi	4. 巻 19
2. 論文標題 Daidzein-Stimulated Increase in the Ciliary Beating Amplitude via an [Cl ⁻] _i Decrease in Ciliated Human Nasal Epithelial Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3754 ~ 3754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19123754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yasuda Makoto, Inui Taka-aki, Hirano Shigeru, Asano Shinji, Okazaki Tomonori, Inui Toshio, Marunaka Yoshinori, Nakahari Takashi	4. 巻 21
2. 論文標題 Intracellular Cl ⁻ Regulation of Ciliary Beating in Ciliated Human Nasal Epithelial Cells: Frequency and Distance of Ciliary Beating Observed by High-Speed Video Microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4052 ~ 4052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21114052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 乾 隆昭、平野 滋、安田 誠
2. 発表標題 ダイゼインの細胞内Cl ⁻ 濃度減少を介したヒト鼻粘膜培養細胞における線毛運動振幅の増加.
3. 学会等名 第58回日本鼻科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上賢太郎、乾 隆昭、細木誠之、中張隆司、丸中良典、平野 滋、安田 誠
2. 発表標題 細胞内Cl ⁻ 濃度依存的ヒト鼻粘膜線毛運動
3. 学会等名 第36回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 乾 隆昭、村上賢太郎、細木誠之、中張隆司、丸中良典、平野 滋、安田 誠
2. 発表標題 ヒト鼻粘膜線毛細胞における振動数・振幅の測定法:[Cl ⁻] _i による振幅調整
3. 学会等名 第125回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安田 誠、呉本年弘、村上賢太郎、乾 隆昭、平野 滋
2. 発表標題 細胞内カルシウムによるマウス鼻粘膜線毛運動の制御機構
3. 学会等名 第57回日本鼻科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安田 誠、乾 隆昭、平野 滋
2. 発表標題 ヒト鼻粘膜培養線毛細胞に対するカルボシステインの効果
3. 学会等名 第1回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関