

平成22年 5月17日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700429

研究課題名（和文） 呼吸器におけるプロトン感受性イオンチャンネルの分布と発生

研究課題名（英文） Distribution and development of the proton-gated ion channel in respiratory system

研究代表者

菊池 真 (KIKUCHI SHIN)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：20404585

研究成果の概要（和文）：Acid sensing ion channel 2 (ASIC2)は上皮性ナトリウムチャンネルの1つで、酸性領域で活動することが報告されている。本研究では、ラットを用い、以下の2点の結果を得た。①呼吸器線毛細胞の線毛部に ASIC2 の発現が観察された。②呼吸器線毛細胞の ASIC2 の発現は胎仔期より観察された。以上のことから、呼吸器の線毛細胞には出生時より ASIC2 が発現しており、気道内における酸性環境を感知する機能を有していることが推察された。

研究成果の概要（英文）：Acid sensing ion channel 2 (ASIC2) is a member of epithelial sodium channels and works in low pH. Our study revealed that ASIC2 expressed at respiratory cilia and the expression was observed during fetus period in rat. These results suggested that respiratory ciliated cells had ability to sense an acidic environment in airway from the birth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：理学療法学・解剖学

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：ASIC2・線毛・呼吸器・発生

1. 研究開始当初の背景

患者QOLを維持・向上させるために、排痰を効率よく行うことは重要であり、近年、リハビリテーション分野における呼吸理学療法が注目されている。呼吸理学療法の主たる目的は体位変換や、徒手的な介助により排痰を促すことである。一方、組織学的には排

痰は気道にある線毛の働きによって起こるとされている。培養細胞などの実験から、気道上皮における線毛細胞には、外部環境を感知する受容器が存在することが知られており、結果的に線毛の運動を引き起こすことが報告されている。効率的な排痰を行う上で呼吸器の微細な構造を把握することは重要で

あり、将来的に、呼吸理学療法を中心とするリハビリテーション分野の一助となると考え、本研究を企画した。

2. 研究の目的

(1)上皮性ナトリウムチャンネルの1つである ASIC2 が呼吸器に存在していることを明らかにする。

(2)ASIC2 が発生時期のどの段階で発現するかを明らかにする。

3. 研究の方法

動物の使用にあたり、札幌医科大学動物実験委員会の承認を得た。

(1)成熟ラット気管における ASIC2 発現部位の同定

①試料

成熟ラット気管を試料とした。深麻酔下にあるラットの心臓より4%パラホルムアルデヒド(PFA)または4%PFA+0.1%グルタルアルデヒドで灌流固定を行い、気管を採取後、さらに同固定液で4℃にて一晩、浸漬固定を行った。さらに、リン酸緩衝液(PBS)で洗浄後、ショ糖溶液で脱水し、包埋剤(O. C. T. Compound)で包埋し、液体窒素で急速凍結し、凍結ブロックを得た。

切片の作成はクライオスタットを用い、厚さ12μmの切片を作成し、スライドガラス上で乾燥後、後述の実験に用いた。

②免疫組織化学染色法

一次抗体は抗 ASIC2 抗体(札幌医科大学医学部麻酔科学講座の川股先生より供与)、抗 Acetylated tubulin(AT)抗体(Sigma Aldrich)を用いた。二次抗体はDAB発色にはビオチン化抗 guinea pig IgG 抗体(Jackson)を、蛍光色素を用いた2重染色には蛍光色素488と594で標識された抗 guinea pig IgG 抗体と抗 mouse IgG 抗体(Invitrogen)を用いた。

作成された切片をPBSで洗浄し、ヤギ血清でブロッキング後、一次抗体を4℃で一晩反応させ、PBSで洗浄した。その後、二次抗体を暗所、室温で90分間反応させ、洗浄、封入後、光学顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡(FLUOVIEW, Olympus)を用い、観察した。

③透過型電子顕微鏡による観察

一次抗体に ASIC2 抗体、二次抗体に1.4nm金コロイドで標識された抗 guinea pig 抗体(Nanoprobes)を用い、前述3(1)②と同じように免疫組織化学染色を行った。その後、を用いて銀増感を行い、2.5%グルタルで後固定し、エタノール上昇系列を用いて脱水後、エポキシ樹脂を用いて包埋した。エポキシ樹脂包

埋後、マイクロトームを用いて厚さ約70μmの切片を作成し、透過型電子顕微鏡(H7500, HITACHI)を用いて観察した。

(2)線毛細胞における ASIC2 発現時期の同定

①試料

妊娠ラットより、胎仔を採取し、実験に用いた。胎生日数(E)14からE21のラットと出生直後(P0)のラットと日齢14日(P14)のラットを用い、免疫組織化学染色法とリアルタイム RT-PCR 法を用い、各時期における ASIC2 の発現を観察した。

②免疫組織化学染色法

各時期における胎仔ラットおよび幼弱ラットの鼻中隔を前述3.(1)①と同様に採取し、凍結ブロックを得た。

一次抗体に抗 ASIC2 抗体、抗 AT 抗体、二次抗体に蛍光色素488と594で標識された抗 guinea pig 抗体と抗 mouse 抗体を用い、前述3.(1)②と同じように染色し、観察した。

③リアルタイム RT-PCR 法

十分な麻酔深度の妊娠ラットから胎仔を取り出し、迅速に鼻中隔を採取後、液体窒素で凍結した。幼弱ラットも同様に十分な麻酔深度であることを確かめたうえで、鼻中隔を取り出し、液体窒素で凍結したのち、実験に用いた。

total RNAはTRIzol(Invitrogen)を用いて抽出した。cDNAの合成はSuperscript III(Invitrogen)およびRandom Hexamer(Invitrogen)を用いた。

リアルタイム RT-PCRはTaqMann Gene Expression Assay kit(Applied Biosystems)を用いた。内在性コントロールはribosomal RNA(Hs99999901)を用い、ASIC2はRn00563654を用いた。解析はE14でのASIC2の発現レベルを1とした、 $\Delta\Delta Ct$ 法により行った。

統計による比較は一元配置分散分析(ANOVA)とBonferroniを用いた。有意水準は5%未満とした。

4. 研究成果

(1)一次抗体に抗 ASIC2 抗体を用いた免疫組織化学染色法を行った結果、DABによる発色は気管の管腔に接した部分に確認された(図1)。また、二次抗体に蛍光抗体を用い、線毛の指標である抗 acetylated-tubulin(AT)抗体と二重染色した結果、ASIC2はacetylated tubulinと共発現を示した(図2)。また、二次抗体に金コロイドを用い、免疫組織化学染色を行い、透過型電子顕微鏡で観察すると、ASIC2の発現は線毛の細胞膜に限局していることが分かった(図3)。

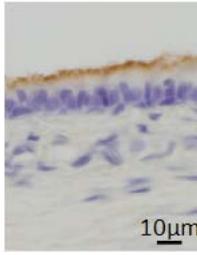


図1. 気管における ASIC2 の発現
DAB 発色により ASIC2 が気管上皮の管腔側に同定された。

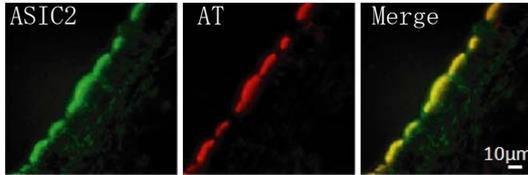


図2. 気管における ASIC2 の発現
線毛の ASIC2 は線毛のバイオマーカーである Acetylated tubulin (AT) と同部位に発現していた。

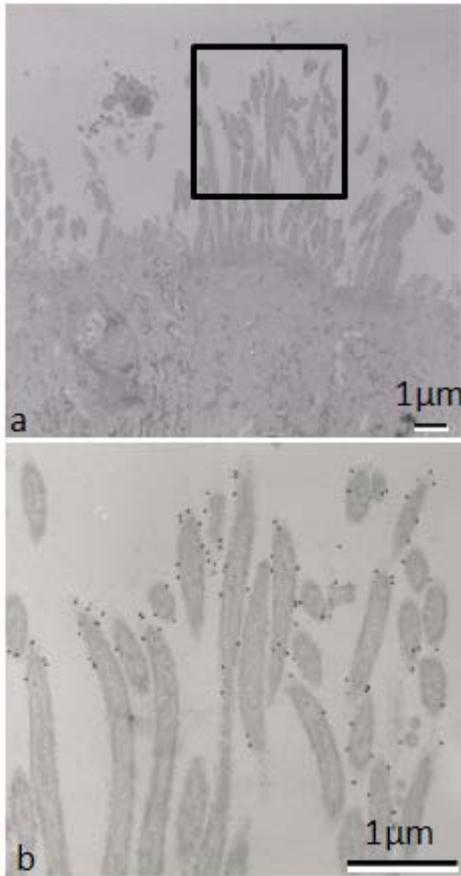


図3. 透過型電子顕微鏡による ASIC2 の局在
ASIC2 を標識した金粒子は線毛の膜に局在していた。

(2)免疫組織化学染色の結果、E17 のラット鼻中隔に存在する線毛において、ASIC2 の発現が観察されるものと、観察されないものが存在した。E18 以降は、観察したラット鼻中隔

の線毛全てに ASIC2 の発現を認めた(図4)。

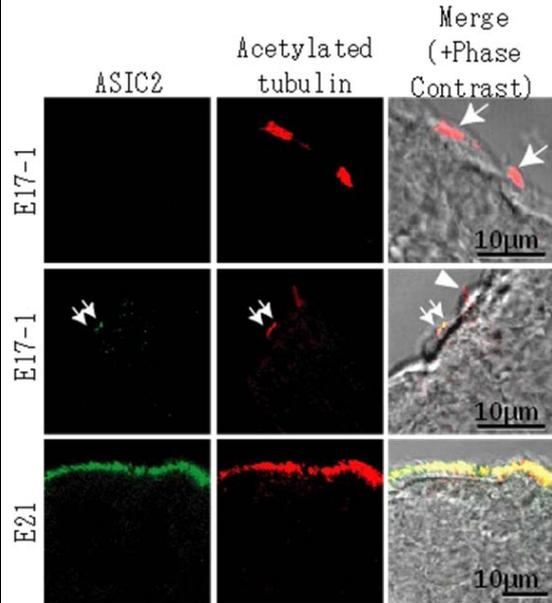


図4. 胎仔期の鼻中隔線毛細胞における ASIC2 の発現

E17 において、ASIC2 を発現していない線毛 (矢印) と ASIC2 を発現している線毛 (二重矢印) がみられた。また、単一线毛 (矢頭) には ASIC2 の発現はみられなかった。

また、リアルタイム RT-PCR の結果より、ASIC2 の mRNA の発現レベルは出生直前の E21 において高発現を認め、その後、mRNA の発現レベルは低下した (図5)。

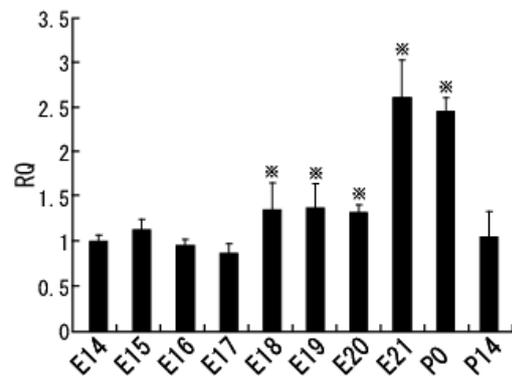


図5. 各時期における ASIC2 mRNA の発現レベル

RQ, Relative quantity ; ※, P<0.05

(3)以上の結果より以下の3点を明らかにした。

- ①ASIC2 は呼吸器線毛細胞の線毛の細胞膜に局限して存在している。
- ②ASIC2 は線毛自身を構成する構造タンパクではなく、何らかの機能的役割を果たす機能タンパクである。

③ASIC2 は胎仔期の時点で線毛に発現しており、ASIC2 の mRNA レベルは胎生 21 日に特に高値を示した。

(4)過去の報告より、ASIC2 は pH5 程度の酸性領域で興奮を引き起こすことが明らかになっている。このことから、呼吸器における線毛は出生前より、酸性領域を感受する機能を有していると考えられた。

今回の研究において、呼吸器の線毛に酸感受性イオンチャンネルの 1 つである ASIC2 を世界に先駆け同定した。また、発生学的に ASIC2 が単なる構造タンパクではなく、機能タンパクであることが推測された。気道上皮には、種々の受容器が存在し、それらの働きによって、気道内の酸・塩基の平衡を保っている。今回、ASIC2 を気道の線毛に同定したことは、気道内の酸性環境を感受する受容器の 1 つを同定したことになり、この酸・塩基の平衡状態を維持するメカニズムを解明する上で重要だと考えられた。また、将来的に、排痰を含めた気道内の環境をコントロールするメカニズムが解明できれば、効率的な排痰手技の開発や、患者 QOL の向上につながるものと考えている。

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 6 件)

- ①Ohkuni T, Kojima T, Ogasawara N, Masaki T, Ninomiya T, Kikuchi S, Go M, Takano K, Himi T, Sawada N. Expression and localization of tricellulin in human nasal epithelial cells in vivo and in vitro. *Med. Mol. Morpho.* 42; 204-211, 2009 査読有
- ②Kikuchi S, Ninomiya T, Kawamata T, Tatsumi H. Expression of ASIC2 in ciliated cells and stereociliated cells. *Cell Tissue Res.* 333; 217-224, 2008 査読有
- ③Takano K, Kojima T, Ogasawara N, Go M, Kikuchi S, Ninomiya T, Kurose M, Koizumi J, Kamekura R, Murata M, Tanaka S, Chiba H, Himi T, Sawada N. Expression of tight junction proteins in epithelium including Ck20-positive M-like cells of human adenoids in vivo and in vitro. *J. Mol. Histol.* 39; 265-273, 2008 査読有
- ④Kikuchi S, Kozuka N, Uchida E, Ninomiya T, Tatsumi H, Takeda H, Tachi N. The change of grip strength in a patient with congenital myotonic dystrophy over

a 4-year period. *J. Jpn. Phys. Ther. Assoc.* 11; 23-27, 2008 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 菊池 真, 二宮孝文, 小島 隆, 辰巳治之. マウス末梢髄鞘における tricellulin の発現. 第 115 回日本解剖学会総会; 2010. 3. 28-30; 盛岡市 (岩手)
- ② 二宮孝文, 菊池 真, 舘 延忠, 辰巳治之. 脊髄神経根における Myelin Protein Zero の発現: 神経根と脊髄移行部における微細構造の観察. 第 115 回日本解剖学会総会; 2010. 3. 28-30; 盛岡市 (岩手)
- ③ 菊池 真, 二宮孝文, 市川量一, 新見隆彦, 辰巳治之. 胎生期ラット鼻中隔上皮線毛細胞における ASIC2 の発現. 第 114 回日本解剖学会総会; 2009. 3. 28-30; 岡山市 (岡山)
- ④ 二宮孝文, 菊池 真, 新見隆彦, 市川量一, 辰巳治之. 脊髄神経根における Myelin Protein Zero (MPZ) の発現と神経線維の形態的特徴. 第 114 回日本解剖学会総会; 2009. 3. 28-30; 岡山市 (岡山)
- ⑤ 市川量一, 菊池 真, 新見隆彦, 二宮孝文, 辰巳治之, 渡辺雅彦. 登上線維を除去した場合における小脳プルキンエ細胞の樹状突起のシナプス構築の発生過程. 第 114 回日本解剖学会総会; 2009. 3. 28-30; 岡山市 (岡山)
- ⑥ 堀本佳誉, 菊池 真, 小塚直樹, 舘 延忠. 変異 aprataxin 導入培養ラット末梢神経における髄鞘形成. 第 50 回小児神経学会総会. 2008. 5. 28-31; 港区 (東京)
- ⑦ 堀本佳誉, 菊池 真, 小塚直樹, 舘 延忠. 眼球運動失行を伴う失調症患者 (689insT) の臨床症状. 第 43 回日本理学療法学会大会. 2008. 5. 15-17; 博多市 (福岡)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 真 (KIKUCHI SHIN)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：20404585

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：