

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791598

研究課題名（和文）

気管上皮に発現する酸素センサー分子の同定と機能解析

研究課題名（英文）

Clarification of oxygen sensor system of the mouse trachea epithelia

研究代表者

石田 雄介（ISHIDA YUSUKE）

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30381809

研究成果の概要（和文）：酸素は生きる為に欠かせないものであるが、吸い込んだ空気、即ち外気の酸素のセンサーもその伝達システムもわかっていない。我々は気管上皮ですでに酸素が感知されると仮説をたて、気管上皮における酸素センシングシステムに関する研究を開始した。我々の研究では気管上皮に存在する味蕾様構造物が酸素センサーであると考えられ、さらに気管上皮の酸素センシングシステムでは ATP および ATP 受容体が重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Oxygen is essential for life, however, oxygen sensor and the transmission system are still unknown. We hypothesized that oxygen is sensed on trachea epithelia and began to research on oxygen-sensing system of the mouse trachea epithelia. Our results indicated that taste bud-like structure in the trachea epithelia is oxygen sensor. Furthermore, it was indicated that ATP and ATP receptor play crucial roles on oxygen-sensing systems of the mouse trachea epithelia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：酸素センサー、低酸素、味蕾様構造物、気管上皮、*in situ* hybridization

1. 研究開始当初の背景

酸素は生きるために欠かせないものであり、低酸素状態は即 生命が危険にさらされるこ

とになる。生体には低酸素状態を回避するために低酸素感受性器官が備わっている。

低酸素感受性器官としては頸動脈小体、大

動脈小体などが有名であるが、その中には味蕾様の低酸素感受性化学受容器が含まれ、血液中の酸素を感知するのに役立っている。

いっぽう気管上皮には外気中の酸素を感知する低酸素感受性化学受容器の存在が以前から指摘されていた。その受容器の中には未知のいわゆる酸素センサーが存在していると考えられているが詳細は不明であった。

我々は以前から感覚器とくに味覚に関して研究をしてきた (Ishida Y, Shimada S et al., J Comp Neurol. 514(2):131-144 (2009), Shimada S, Ishida Y, et al. Arch Histol Cytol. 69(4):227-231 (2006), Ugawa S, Ishida Y, Shimada S et al., J Neurosci. 23(9): 3616-3622 (2003)、他)。最近では味蕾に特有とされてきた G タンパク gustducin が腸管などにも存在し、糖センサー等に関連して機能することが報告されるようになった。我々も gustducin の全身における分布検索を行ったところ気管の上皮に gustducin の存在が示唆された。それは口蓋の粘膜上皮に埋まる味蕾に似通っていた。現在 gustducin 陽性細胞は感覚器細胞とされており、さらに特徴ある逆三角形のかたちもまた同様に感覚器細胞であることを示唆していた。

加えて頸動脈小体の低酸素感受性化学受容器も味蕾様の構造物であることから、我々は直感的にこの気管上皮に分布する感覚器細胞は、外気中の酸素濃度 (酸素分圧) を感知する低酸素感受性化学受容器ではないかと考え着想に至った。

さらに我々は予備実験的にラットを低酸素状態で飼育したところ、この気管の感覚器細胞は増加し、低酸素感受性化学受容器の候補であることが確認された。

2. 研究の目的

我々は味覚とくに味蕾の研究を行って来たが、気管上皮にも味蕾に似通った細胞が存

在することを発見した。興味深いことに 1. この細胞 (群) は低酸素で増加する、 2. 頸動脈小体の低酸素感受性化学受容器が味蕾様であるように構造的にも酸素センサーの候補にふさわしい、ことがわかった。頸動脈小体は血中酸素濃度をモニターするが、気管上皮のこれは我々の調べる限り世界で初の「外気の酸素濃度 (分圧) のセンサー」と思われる。我々の研究の目的は気管上皮に存在する酸素のセンサーおよびその神経伝達システムに関して明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) マウス気管上皮における gustducin の発現の検討 Gustducin は舌や消化器においてしばしば化学受容細胞に見られるためここでも化学受容細胞のマーカーとして用いた。

① *In situ* hybridization 法によるマウス気管上皮における gustducin の発現の検討
マウス舌 有郭乳頭・葉状乳頭から AGPC 法を用いて Total RNA を採取。Reverse transcription をして complimentary DNA (cDNA) を作製。次に gustducin に特異的なプライマーをデザインし、これを用いた Polymerase chain reaction (PCR) で、gustducin の特定領域 (約 1000 bp) を増幅した。これを適当なプラスミドにライゲーションし、大腸菌にトランスフォームして、今度は大腸菌を増やす事で、プラスミドを増幅した。次に大腸菌からアルカリミニプレップ法を用いて、プラスミドを回収し、これを鋳型にして RNA polymerase 反応を用いて *in situ* hybridization 法のプローブを作製した。実際にこのプローブを使用してマウス気管上皮における *in situ* hybridization 法を何度か行い、最適条件を検討した。その結果、確かにマウス気管上皮には gustducin を発現する細胞が確認された。

② 免疫組織化学法による gustducin タンパクの発現の検討 抗 gustducin タンパク抗体を用いてマウス気管上皮における gustducin タンパクの発現を検討した。その結果、マウス気管の上皮で gustducin 陽性細胞が確認された。さらにこの細胞は逆三角形の特徴ある形から化学受容細胞にふさわしいと考えられた。

(2) 気管上皮細胞のプライマリーカルチャー マウス気管上皮を酵素処理して丁寧にはぎ取り、プライマリーカルチャーができるようにさまざまな条件で検討した。このプライマリーカルチャーを行った気管上皮細胞をカルシウムイメージング法で評価した。

(3) カルシウムイメージング法を用いた酸素濃度刺激による細胞の活性化の評価 様々な酸素濃度刺激による気管上皮細胞の活性化をカルシウムイメージング法を用いて評価した。低酸素気体で刺激したところ一部の細胞でカルシウムの上昇が見られ、これらの細胞が酸素のセンシングに関与していると考えられた。

(4) ルシフェラーゼ活性を利用した ATP アッセイ さらにマウス気管上皮を低酸素気体で刺激してルシフェラーゼ活性を利用した ATP アッセイを行ったところ ATP の分泌が確認された。このことから酸素センサーシステムでは ATP が利用されていることが考えられた。次に我々は ATP 受容体の遺伝子操作動物を用いて検討を行った。その結果、このミュータントでは低酸素刺激による気管上皮の活性化が低下していると考えられた。これらのことから気管上皮の酸素センシングシステムでは ATP および ATP 受容体が重要な役割を担っていることが示唆された。

(5) 5-HT (セロトニン) 3 受容体の関与に

についての検討 気管上皮における酸素の感知に ATP および ATP 受容体が関与することが示唆されたが、これがすべてとは思われなかった。なぜならば多くの ATP 受容体ノックアウトマウスは明らかな異常なく成長するからである。我々は気管上皮を支配する迷走神経節に着目した。この神経節には特に 5-HT₃ 受容体が多く発現していることからその重要性が予想される。マウスの迷走神経節の cDNA を用いて (1) ① と同様に 5-HT_{3A} および B の *in situ* hybridization 法のプローブを作製した。まずはこの受容体の全身における発現を *in situ* hybridization 法を用いて検討した。その発現様式から 5-HT₃ 受容体の機能が予想されることを期待したからである。その結果、頭頸部の神経節に多く発現することがわかったが、その意義は未だ不明である。

4. 研究成果

言うまでもなく酸素は生きるために絶対に欠かせないものである。呼吸が止まるようなことになれば即 死に直面することになるので、救急の ABC の A (Airway) になっているほどである。

我々の研究では気管上皮に存在する味蕾様構造物が酸素センサーであることが示唆された。気管上皮の酸素センサーは血中酸素濃度を感知する頸動脈小体などのものとは異なり、世界で初めての直接外気の酸素濃度を感知するものである。

さらに我々の研究で ATP および ATP 受容体が気管上皮の酸素センシングシステムで重要な役割を担うことが示唆された。

いっぽう 5-HT₃ 受容体の関与については不明であるが、世界で初めての外気の酸素センサーおよびその神経伝達システムの重要性は明らかで、本研究に大きな意義があることは明白であると思われる。

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)

[学会発表] (計2件)

① 石田 雄介、 Double *in situ* hybridization 法を用いたラット膝神経節におけるセロトニン 3A と 3B 遺伝子の発現の検討、日本神経化学会、2011. 9. 26-28、金沢大学

② 石田 雄介、 Expression of serotonin 3A and 3B receptor in the rat geniculate ganglion、日本解剖学会、2012. 3. 26-28、山梨大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 雄介 (ISHIDA YUSUKE)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：303818809

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：