

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 4 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461199

研究課題名(和文)新規クロルイオンチャンネルTMEM16Aを標的とした気道過分泌の病態解明と治療

研究課題名(英文)The role of a newly discovered Cl ion channel TMEM16A and its targeted therapy in airway hypersecretory diseases

研究代表者

近藤 光子 (KONDO, Mitsuko)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50178430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：TMEM16Aは新規カルシウム活性化クロルイオンチャンネルであり、気管支喘息において気道分泌や気管支平滑筋収縮に関わっている。本研究では喘息モデルを用いて、抗原チャレンジやカルシウム依存性アゴニストによるクロルイオン輸送の増加がTMEM16A阻害薬によって抑制されること、また免疫染色により杯細胞のapical membraneや粘液周囲にTMEM16Aが局在していることを明らかにした。さらに、クラリスロマイシンによるインターロイキン13誘導培養杯細胞化生におけるTMEM16A抑制作用も見いだした。これらの結果はTMEM16Aが気道過分泌疾患治療における新しい標的となることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：TMEM16A has been recently discovered as Ca-activated Cl channel and regulates airway secretion and smooth muscle contraction in asthma. In this study, we showed that TMEM16A inhibitors inhibited the increases in Cl ion transport induced by antigen challenge and Ca-dependent agonist in an asthma model, and that TMEM16A was localized at apical membrane and around mucus in goblet cells. Furthermore, we showed that clarithromycin inhibited TMEM16A in IL-13-induced cultured goblet cell metaplasia. These data suggest that TMEM16A is a new target for the therapy of airway hypersecretory diseases.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：TMEM16A カルシウム活性化クロルイオンチャンネル 気管支喘息 杯細胞 インターロイキン13 気道分泌

1. 研究開始当初の背景

気道過分泌は気管支喘息や COPD などの気道疾患において、気道閉塞や換気不全をもたらす、その予後に大きく影響を与える。喘息死した患者の剖検所見では多量の粘液による気道閉塞が観察される (Fahy JV., NEJM 2010)。また COPD においても気道内に分泌物が観察され、予後に影響を与えることが報告されている (Hogg JC., Am J Respir Cell Care Med 2007)。これらの疾患では杯細胞化生が誘導され、過分泌の構造的異常を形成している。しかし、現在まで杯細胞からの分泌を直接制御する薬物療法は十分確立していない。

気道粘膜におけるクロルイオンチャネルは気道被覆層の水分調節や粘液分泌に深く関わっている。そのチャネルの構造的および機能的異常は粘液線毛輸送系の破綻を招き、気道系疾患の発症・成立や難治化に深く関わっている。TMEM16A 分子は 2008 年に発見された新しいカルシウム活性化クロルイオンチャネル(Ca activated Cl channel; CaCC)である (Caputo A., Science 2008)。従来、気管支喘息の杯細胞化生部位に CaCC の一つと想定された hCLCA1(mCLCA3, Gob5)が高発現していることが報告され (Nakanishi A., PNAS 2001)、過分泌との関わりが推測されてきた。しかしその後の研究から hCLCA1 はチャネル自体ではなく CaCC の調節因子や分泌蛋白であることが報告され(Gibson A., J Biol Chem 2005, Hamann M., J Physiol 2009)、喘息病態における CaCC の実態は不明なままであった。我々は抗原感作喘息モデルや IL-13 誘導培養杯細胞で、CaCC 阻害薬である niflumic acid が杯細胞の分泌顆粒からの脱顆粒を抑制することを報告し、CaCC の分泌反応への役割を証明した(Kondo M., Allergy Int 2012)。Huang らも TMEM16A が気管支喘息モデルの杯細胞や平滑筋に高発現し、ムチン分泌や平滑筋収縮に関わっていることを報告した

(Huang F., PNAS 2012)。このことから実態が不明であった CaCC のターゲット分子が明らかになり、CaCC を標的とした喘息治療ならびにその他の気道系疾患の過分泌に対する新しい治療戦略が見えてきた。しかし、TMEM16A による気道分泌の制御機構に関しては研究の途についたばかりで不明な点が多かった。

2. 研究の目的

(1)喘息の病態には TH2 サイトカインが中心的な役割を果たしているが、過分泌と最も関連する気道杯細胞化生には IL-13 の作用が強力である。本研究では抗原感作モルモット喘息モデルおよび IL-13 誘導培養杯細胞化生モデルを用いて、TMEM16A の発現および機能を形態学的、電気生理学的手法を用いて解析する。また低分子の TMEM16A activator や TMEM16A 阻害薬が開発されてきており、これらを用いて、病態解析や治療への応用の可能性を検討する。

(2)臨床で広く用いられているクラリスロマイシン(CAM)はクロルイオン分泌やムチン分泌への抑制を通して過分泌に対する抑制効果が知られている。しかし TMEM16A を介した CAM の作用機序は明らかではない。IL-13 誘導高分化杯細胞化生モデルを用いて、CAM の TMEM16A に与える影響を検討し、難治性喘息治療への応用の可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)抗原感作喘息モルモットモデルの作成

ハートレー系モルモットに卵白アルブミン(OVA)を Day 1, 8 に腹腔内投与して感作し、喘息モデルを作成した。Day 22 に感作モデルの気管を摘出し実験に供した。対照群として非感作モルモットを用いた。

(2)IL-13 誘起性培養杯細胞化生モデルの作成
Kondo の方法¹⁾により、モルモット気管をプロテアーゼ処理にて上皮細胞を単離し、

Transwell に撒き、DMEM/Ham F12 培地で培養した。Confluence の後、air-liquid interface 法に変換して IL-13(10ng/ml)存在下で約 10 日間培養し、高分化誘導杯細胞化生モデルを作成した。

(3)電気生理学的検討

摘出気管または培養気管上皮細胞を Ussing chamber にマウントして、Voltage clamp 法を用いて短絡電流 (Isc) を測定した。また 1mV のパルスを与えて、電流の変化量から組織抵抗を算出した。実験は Na チャネル阻害薬の amiloride を前処置して OVA チャレンジ、またはカルシウム依存性アゴニストである UTP、cAMP 依存性アゴニストである isoproterenol で誘発される Isc の変化を記録した。また TMEM16A 阻害薬として TAinh-A01、benzbromarone、niflumic acid によるカルシウム依存性短絡電流の抑制効果を検討した。

(4)組織学的検討

組織を固定後、PAS/Alcian blue 染色を行い顕微鏡観察した。また抗 TMEM16 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。培養組織は抗 TMEM16A 抗体、抗 MUC5AC 抗体、抗 α -Tubulin 抗体による蛍光三重免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(5)TMEM16A 蛋白量の測定

細胞を凍結融解により破碎し、その上清を用いて、モルモット特異的 TMEM16A 蛋白用 ELISA キットを用いて測定した。

4. 研究成果

(1)研究成果

抗原感作モデルによる TMEM16A の発現と機能

抗原感作気管粘膜は PAS/Alcian blue 陽性の杯細胞化生が生じており、非感作と比較して免疫染色では TMEM16A が高発現していた。特に粘膜面の apical membrane に発現が高度であった。電気生理学的には OVA でチャレンジを行うと感作気管ではクロルイオン輸送が亢進したが、非感作気管では反応が見られな

かった。また、TMEM16A 阻害薬の T16Ainh-A01、niflumic acid を前処置するとこのクロルイオン輸送は高度に抑制された。一方、DPC の前処置では抑制効果はほとんど認められなかった。このことは感作気管では OVA チャレンジによりカルシウム依存性クロルイオン輸送が亢進し、その反応は TMEM16A を介していること、またその阻害薬の抑制作用は T16Ainh-A01 や niflumic acid が強く、DPC は弱いことが判明した。これは、従来の報告を支持する結果となった (Pedemonte N., *Physiol Rev* 2014)。

IL-13 誘起性培養気道上皮細胞における TMEM16A の発現と機能

抗 TMEM16A 抗体を用いた免疫染色では IL-13 存在下で培養した気道上皮細胞において TMEM16A が高度に発現し、特に MUC5AC 陽性の杯細胞に強く染色された。一方、 α -Tubulin 陽性の線毛細胞では TMEM16A の発現は弱かった。IL-13 を添加せず培養したコントロールの気道上皮細胞では TMEM16A の発現が弱く、線毛上皮細胞に分化していた。電気生理学的検討ではカルシウム依存性のアゴニストの UTP や TMEM16A activator により Cl⁻ イオン輸送が亢進し、この反応は T16Ainh-A01、benzbromarone、niflumic acid で強く抑制された。このことから IL-13 は TMEM16A の発現を促し、杯細胞化生と関連することが判明した。

CAM による TMEM16A 発現への影響

CAM 存在下では IL-13 誘導杯細胞化生が抑制され、線毛上皮細胞への分化誘導が生じた。また TMEM16A の発現も CAM により抑制され、MUC5AC 陽性、TMEM16A 陽性杯細胞は CAM により減少した。また ELISA による TMEM16A の蛋白発現も CAM により低下した。電気生理学的検討においても CAM 存在下では TMEM16A activator や UTP 誘起性クロルイオン輸送の亢進が抑制されていた。

(2)得られた成果の国内外への位置づけとインパクト、今後の展望

抗原誘発によるクロルイオン輸送の亢進がCaCCであるTMEM16Aを介していることが明らかになり、またその多くは杯細胞から由来するということが判明した。IL-13 誘導性気道上皮細胞にTMEM16Aが高発現することは鼻ポリープ由来の上皮細胞を用いた研究(Zang Y., *Allergy Asthma Immunol* 2015)があり、本研究もその結果を支持するものとなった。またCAMの実験結果は難治性喘息患者の過分泌に対する治療の理論的根拠を与え、マクロライドとTMEM16Aの関連性をみた初めての結果となった。特に過分泌病態におけるCAMのTMEM16Aを介した粘液線毛輸送系の分化調節という点は極めて新しい知見といえる。以上のようにTMEM16Aはムチン分泌、クロルイオン輸送、杯細胞化生のいずれにも関係することから、TMEM16Aをターゲットとした気道過分泌治療薬が今後期待される。

<引用文献>

1) Kondo M, Tamaoki J, Takeyama K, Nakata J, Nagai A. IL-13 induces goblet cell differentiation in primary cell culture from guinea pig tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 27:536-541,2002.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7件)

1. 近藤光子 TMEM16A をターゲットとした気道過分泌病態の解明と治療戦略 アレルギーの臨床 36(2):88-90, 2016. (査読無)
2. 近藤光子、原香織、辻真世子、有村健、武山廉、多賀谷悦子、玉置淳. IL-13 誘導培養杯細胞における Transmembrane protein 16A の発現と機能 東京女子医大学総研紀要 35: 40-41, 2015. (査読無)
3. 近藤光子、有村健、新井尚希、多賀谷

悦子、武山廉、玉置淳. モルモット喘息モデル Cl⁻イオン輸送における Transmembrane protein 16A の役割 東京女子医大学総研紀要 34: 35, 2014. (査読無)

4. 近藤光子、玉置淳: 咳嗽と喀痰: 成因・診断・治療: 咳嗽と喀痰の病態生理. *Cefiro* 20 : 3-8, 2014. (査読無)

5. 近藤光子、玉置淳. ガイドラインをふまえ、気管支喘息の病態研究・治療の最前線に迫る: ABPM 合併喘息の病態の最新知見と診断・治療の実際を探る. *Respiratory Medical Research* 1 (1) : 37-42, 2013. (査読無)

6. 近藤光子: 喘息の難治化因子. *呼吸と循環* 61(6) : 535-541, 2013. (査読無)

7. 近藤光子、玉置淳: 喘息治療の薬理遺伝学. *喘息* 26 (1) : 42-47, 2013. (査読無)

〔学会発表〕(計 7件)

1. 近藤光子 教育講演 気道上皮細胞の分化調節と過分泌 -IL-13, CLCA1, TMEM16A- 第65回日本アレルギー学会学術大会 2016年6月18日 東京

2. Kondo M., Hara K., Tsuji M., Takeyama K., Tagaya E., Tamaoki J.

Chloride Ion Transport and Localization of TMEM16A in IL-13-Induced Goblet Cell Metaplasia. American Thoracic Society International Conference San Francisco, CA. USA May 15, 2016.

3. 近藤光子 教育講演 マクロライドの基礎と臨床 第56回日本呼吸器学会学講演会 2016年4月9日 京都

4. 原香織、辻真世子、近藤光子、武山廉、多賀谷悦子、玉置淳 クラリスロマイシン(CAM)による気道上皮細胞Ca活性化Cl⁻イオンチャネル(CaCC)TMEM16Aに対する抑制効果 第56回日本呼吸器学会学術講演会 2016年4月9日 京都

5. 近藤光子、新井尚希、有村健、中田潤子、多賀谷悦子、武山廉、玉置淳 モルモット喘息モデルにおける Transmembrane protein

16A の発現 第 54 回日本呼吸器学会 2015
年 4 月 26 日 大阪

6. Kondo M., Tsuji M., Arimura K., Takeyama K., Teranishi K., Tagaya E., Tamaoki J. Antigen challenge increases Cl⁻ ion transport via CaCC-dependent pathway in a guinea pig asthma model. American Thoracic Society International Conference Denver, Co. USA May 15, 2015.

7. 近藤光子、有村健、武山廉、辻真世子、原香織、赤羽朋博、切土紗織、多賀谷悦子、玉置淳 喘息モデルにおける抗原誘発 Ca 活性化 Cl⁻ イオン輸送の亢進と TMEM16A の関与
第 64 回日本アレルギー学会学術大会 2015
年 5 月 26 日 東京

〔図書〕(計 1 件)

1. Kondo M., Nakata J, Arai N, Tagaya E, Takeyama K, Tamaoki J. The inhibitory effect of niflumic acid on goblet cell degranulation in asthma model of guinea pigs. Proceeding of Airway Secretion Research.15:1-9, 2014. Art Union Tokyo.

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 光子(KONDO Mitsuko)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号： 50178430