

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24年 4月 1日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590238

研究課題名（和文）呼吸上皮に存在する新規 CO₂ 受容体の単離と機能解析研究課題名（英文）Isolation and functional expression of novel putative carbon dioxide (CO₂) receptors in respiratory epithelium.

研究代表者

植田 高史 (UEDA TAKASHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90244540

研究成果の概要（和文）：マウス鼻腔上皮細胞において一部の細胞が CO₂ に応答し細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こした。この細胞は、水素イオンにはそれほど応答せず、水素イオンに反応する陽イオンチャネルである一過性受容体電位型チャネルバニロイド 1 (TRPV1)、酸感受性イオンチャネル (ASIC) 1a, 1b, 2a, 2b および 3 の発現は認められなかった。低 pH よりも NaHCO₃ に応答する細胞が多いことから、重炭酸イオンによる活性経路が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Mouse nasal epithelial cells partially exhibited CO₂-induced intracellular calcium mobilization. These cells did not respond to the ligands that activate proton-sensitive cation channels, such as transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), acid-sensing ion channel (ASIC) 1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b and ASIC3. Since the nasal epithelial cells responded to NaHCO₃ solution rather than acidic pH solution, a mechanism for detection of HCO₃⁻ may be involved in nasal CO₂ perception.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：受容体、細胞内シグナル伝達、化学感覚

1. 研究開始当初の背景

生物は呼吸を調節するための化学受容体を備える。現在分かっているのは循環器系に属する血液中 CO₂ 感知機構であり、哺乳類では頸動脈小体、大動脈体、延髄の細胞が、血液中の pH の低下を感知し、その情報を呼吸中枢に伝えている。その一方吸い込んだ空気中の化学情報を直接感知する機構については不明であった。しかしながら、(1)哺乳類

の鼻粘膜上皮には CO₂ に応答する細胞が存在すること (Coates, *Respir Physiol*, 129-219, 2001; Ferris *et al*, *Chem Senses*, 32, 263-71, 2007)、(2)哺乳類の肺神経上皮小体や特定の肺胞上皮細胞が吸い込んだ空気から化学情報を受容しているという報告から、我々は呼吸器系にも循環器系に類似した未知の化学受容機構が存在するのではないかと考え、本研究を計画した。研究計画当初、頸動脈小体

では酸感受性 4 回膜貫通型カリウムチャネルである Twik-related acid-sensitive K(+) channel 1 (TASK-1) が血液中の CO₂ 濃度を感知していると報告されたことから、生体が CO₂ の濃度を水素イオンの形で検出していることが示唆されていた (Trapp *et al.*, *J Neurosci*, 28, 8844-50, 2008)。また、消化器系の食道上皮細胞にも CO₂ を感知する能力があり、これに一過性受容体電位型チャネル (transient receptor potential; TRP) や酸感受性イオンチャネル (acid-sensing ion channel; ASIC) などの酸感受性陽イオンチャネルが関与していることが報告されていた (Akiba *et al.*, *Gut*, 57, 1654-1664, 2008)。我々は、この点に鑑み、鼻腔上皮の CO₂ 受容機構と同機構における酸感受性イオンチャネルの関与について研究することにした。

2. 研究の目的

従来から知られている循環器系の呼吸機能に影響する CO₂ 受容機構が、呼吸器系自体、特に鼻腔にも存在するかを検索し、その分子基盤を明らかにすることを本研究の目的とした。頸動脈小体では CO₂ が接触すると carbonic anhydrase により水素イオンと重炭酸イオンに分解され、その水素イオンが TASK-1 などの酸感受性イオンチャネルに作用しているという報告があった。加えて、消化器系の食道上皮細胞でも水素イオンにより活性化される酸感受性イオンチャネル (TRPV1 や ASIC) が CO₂ の受容に関わっていると報告されており、酸感受性イオンチャネルが鼻腔 CO₂ 受容の第 1 候補分子であった。鼻腔上皮には多くの G タンパク質共役型嗅覚受容体が発現しており、これらの一部が水素イオンの受容に関わっていることも考えられるが、今回は前者についての解析を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス鼻腔上皮細胞を単離して CO₂ に対するカルシウム応答をカルシウムイメージング法にて観察し、鼻腔上皮細胞における CO₂ 感受性細胞の存否を確認した。

(2) 応答細胞に発現する関連タンパク質を免疫組織化学により探索した。酸感受性イオンチャネルの発現について調べるために RT-PCR 法、必要があるものに関してはさらに *in situ* ハイブリダイゼーション法、ウエスタンブロット、免疫染色を行った。

(3) 水素イオンや重炭酸イオンに対する細胞応答を、低 pH 溶液や NaHCO₃ 溶液を使い解

析した。また酸感受性イオンチャネルの活性化薬および阻害薬 (ブロッカー) の、応答もしくは応答に対する抑制効果を生理学的に観察した。

(4) マウスの食道上皮細胞およびヒト食道上皮細胞の細胞株においても同様の実験を行った。

4. 研究成果

(1) マウス鼻腔上皮の CO₂ に対する応答を嗅電図 (electroolfactogram; EOG) で観察することは困難であったので、単離した細胞におけるカルシウム応答をカルシウムイメージング法により観察した。鼻腔上皮を酵素処理により単細胞にしたあとの解析では、頻度は少ないものの CO₂ に応答する細胞が観察された。ただ CO₂ を負荷すると泡が発生して解析を邪魔するため、同一細胞で一回の投与しかできず再現性などの点で改良の余地が残された。パッチクランプ法による電気生理学的解析は、発現している細胞が少なかったために十分解析できるだけのデータが取れず、その電気生理学的性質については未だ不明である。

(2) CO₂ 受容細胞には carbonic anhydrase II (CAII) や guanylyl cyclase-D (GC-D) に対する免疫陽性反応が見いだされるとの報告があった。これは、CAII により産生される水素イオンまたは重炭酸イオンが CO₂ 受容機構を解き明かすための鍵であることを示していた。水素イオンに感受性のあるイオンチャネル型受容体遺伝子として transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)、TRPV4、acid-sensing ion channel (ASIC) などがよく知られている。そこで我々はマウス鼻腔上皮細胞における TRPV1、TRPV4、ASIC1、ASIC2、ASIC3 遺伝子の発現を RT-PCR 法にて検索したが、TRPV4 以外ではその遺伝子発現が上皮細胞には認められず、三叉神経節の神経節細胞およびこの細胞から投射している知覚自由神経終末に局在していた。

(3) (2) の結果を機能的に裏付けるため、マウス鼻腔上皮細胞の低 pH (pH 4.2) に対する応答をカルシウムイメージング法により解析した。マウス鼻腔上皮細胞は低 pH にはそれほど応答しなかった。一方、一部の細胞は 40mM NaHCO₃ 溶液に反応し細胞内カルシウム濃度を上昇させた。また、マウス鼻腔上皮細胞の CO₂ に対するカルシウム応答は、TRPV1 と TRPV4 のブロッカーであるルテニウムレッドでは抑制されなかった。ASIC のブロッカー

としてはアミロライドが頻用されているが、蛍光を発するためにカルシウムイメージング解析では使用できず効果は不明である。

(4) 以上より、マウス鼻腔上皮 CO₂ 受容細胞での CO₂ に対するカルシウム応答に TRPV1、ASIC (ASIC1a, 1b, 2a, 2b, 3) は関与しないことが明らかとなった。Akiba らはラット食道の重層扁平上皮細胞に CO₂ 感受性があり、これに TRPV1 や ASIC が関与していることを報告しているが (Akiba *et al*, Gut, 57, 1654-1664, 2008)、我々がマウス食道にて RT-PCR や *in situ* ハイブリダイゼーション法により検索した限りにおいては、上皮細胞に TRPV1 や ASIC の遺伝子発現は認められず、TRPV4 のみが発現していた。TRPV4 は食道上皮細胞の細胞内カルシウム調節分子として機能するものの (Ueda *et al*, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 301, G138-G147, 2011)、このカルシウム応答は pH の低下 (水素イオン) によって抑制されたため (Shikano *et al*, Neurogastroenterol Motil, 23, 1020-1028, e497, 2011)、TRPV4 が上皮細胞の CO₂ 受容体とは考えにくい。またマウスにおいてラットとは異なる所見が得られたことは、同じ齧歯類でも動物種間で遺伝子の発現が異なる可能性がある。

(5) 本研究の結果は、マウス鼻腔上皮の CO₂ 受容が、水素イオンよりもむしろ、重炭酸イオンにより惹起される可能性を強く示唆するものである。このことは Sun らが PNAS 誌に報告した重炭酸イオンが直接 GC-D を活性化し、産生された cGMP が cGMP 感受性 CNG チャネルを開口させることにより CO₂ を感じ取るという仮説 (Sun *et al*, Proc Natl Acad Sci USA, 106, 2041-2046, 2009) を支持するものである。しかしながら、GC 活性化機構にはまだ不明な点があることに加え、ショウジョウバエや蚊では、G タンパク質共役型嗅覚受容体が CO₂ 受容に関与するとの報告 (Kwon *et al*, Proc Natl Acad Sci USA, 104, 3574-8, 2007) があり、哺乳類呼吸上皮の CO₂ 受容が嗅覚受容体を介して行われている可能性を否定できず、今後さらに解析していく必要がある。一方、ヒトでは GC-D 遺伝子が偽遺伝子で機能を持たないことから、GC-D 以外の CO₂ 受容機構の存在が示唆されており、これらの点に関しても今後検索していく予定である。

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 2 件)

- ① Shikano M, Ueda T, Kamiya T, Ishida Y, Yamada T, Mizushima T, Shimura T, Mizoshita T, Tanida S, Kataoka H, Shimada S, Ugawa S, Joh T. Acid inhibits TRPV4-mediated Ca²⁺ influx in mouse esophageal epithelial cells. Neurogastroenterol Motil., 査読あり, 23(11), 2011, 1020-8, e497. DOI:10.1111/j.1365-2982.2011.01767.x
- ② Ueda T, Shikano M, Kamiya T, Joh T, Ugawa S. The TRPV4 channel is a novel regulator of intracellular Ca²⁺ in human esophageal epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 査読あり, 301(1), 2011, G138-47. DOI:10.1152/ajpgi.00511.2010

[学会発表] (計 3 件)

- ① 植田高史, 鹿野美千子, 北條英ミレナ, 渡辺正哉, 鶴川真也. ヒト食道上皮細胞における機械刺激と ATP 放出. 第 71 回日本解剖学会中部支部学術集会、2011 年 10 月 15 日、名古屋
- ② 植田高史, 鶴川真也, 石田雄介, 島田昌二. 消化管上皮における thermoTRP チャネルの発現と機能解析 (シンポジウム). 第 116 回日本解剖学会総会、2011 年 3 月 誌上開催 (東日本大震災のため)、横浜 (予定開催地)
- ③ 植田高史, 鹿野美千子, 小山智士, 渡辺正哉, 鶴川真也. 食道上皮細胞における TRPV4 チャネルの発現と機能解析. 第 70 回日本解剖学会中部支部学術集会、2010 年 10 月 17 日、岐阜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 高史 (UEDA TAKASHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
准教授
研究者番号：90244540

(2) 研究分担者

島田 昌一 (SHIMADA SHOICHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20216063
(H21 研究分担者→H22：連携研究者)

鵜川 眞也 (UGAWA SHINYA)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20326135

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：30381809
(H21 研究分担者→H22：連携研究者)

(3) 連携研究者

島田 昌一 (SHIMADA SHOICHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20216063
(H21 研究分担者→H22：連携研究者)

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：30381809
(H21 研究分担者→H22：連携研究者)