

## 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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791041

研究課題名(和文) 肺胞上皮細胞における ABCA3 トランスポータとイオンチャネルの機能連関の検討

研究課題名(英文) Relation of ion channel function of transporter and ABCA3 in alveolar epithelial cells

研究代表者

松崎 陽平 (MATSUZAKI YOHEI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60327583

研究成果の概要(和文): ATP依存性チャネルゲート駆動のない変異体G551D-CFTRにGenisteinを投与し、さらにCurcuminを負荷すると、チャネルの活性はGenisteinで負荷した場合よりさらに高く、WT-CFTRの50%まで増強した。この発見は同じABC蛋白質であり、共にNBDを駆動エンジンとして持つABCA3トランスポータとCFTRチャネルの機能的連関を示唆した。また、Coherent Anti-Stokes Raman Scattering(CARS)顕微鏡を用い、初代培養した肺胞型上皮細胞内を観察した。肺胞型上皮細胞内にはABCA3トランスポータの発現しているlamellar bodyが多数存在し、今回のCARS顕微鏡によりlamellar bodyへの脂質のpacking、細胞外へのexocytosisを観察した。

研究成果の概要(英文): Curcumin increased G551D-CFTR whole-cell and single-channel currents less than genistein did at their maximally effective concentrations. However, curcumin further increased the channel activity of G551D-CFTR that had been already maximally potentiated by genistein, up to 50% of the WT-CFTR level. The additive effects between curcumin and genistein not only support the hypothesis that multiple mechanisms are involved in the action of CFTR potentiators, but also suggests pharmaceutical relation between CFTR and ABCA3, because CFTR and ABCA3 are ABC protein family member and having NBD as a driving engine. Since primary culture of type alveolar epithelial cells from the mouse, was able to made stable, we observed lamellar bodies in type alveolar epithelial cells, using Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) microscope. We could observe a lot of lamellar bodies expressing ABCA3, packing lipids to lamellar body and exocytosis to the outside of these cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：新生児医学

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内の物質輸送は、チャネル、トランスポータと呼ばれる膜輸送蛋白質により選択的に行われ、その機構の一つとして ATP-Binding Cassette (ABC) 蛋白質が知られている。ABC 蛋白質は細胞形質膜上または細胞内でトランスポータ、チャネル、レギュレーターとして機能し、それぞれの生物で重要な生理機能を果たしている。ABC タンパク質はいずれも類似の 2 次構造をもち、膜貫通型ドメインと ATP 結合ドメインを 1 つまたは 2 つ持つ膜蛋白質スーパーファミリーである。ABC 蛋白質の 1 つである ABCA3 は肺胞型上皮細胞にきわめて特異的に発現しており、lamellar body の限界膜に存在している。

サーファクタントは約 90% のリン脂質と 10% のサーファクタント蛋白より構成され、出生時に新生児が外界に適応する際、肺の表面張力を下げ、肺呼吸を可能にする。サーファクタントは肺胞型上皮細胞で産生され、lamellar body に層状に蓄積されている。稲垣らは ABCA3 の発現が出生直前に増大すること、グルココルチコイド投与で ABCA3 の発現が著明に増大することを示しており、ABCA3 が肺サーファクタントの分泌に深く関与している可能性が示唆されている。肺サーファクタントは妊娠週数 36 週ごろから急速に合成・分泌されるため、早産児ではサーファクタント欠乏による呼吸窮迫症候群 (RDS) が知られている。しかし、正期産児でもサーファクタント蛋白である SP-B の欠損では致死性の RDS 症状を

呈することが知られている。さらに Shulenin らの臨床研究で ABCA3 の遺伝子異常による肺疾患の病態が示され、ABCA3 の様々な遺伝子変異による新生児期の呼吸窮迫から慢性肺疾患まで多様な病態が報告されている。

Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) も、同じく ABC 蛋白質スーパーファミリーのメンバーで、呼吸上皮や膵管上皮に発現して陰イオンチャネルとして機能しており、その機能不全は慢性気管支炎や慢性膵炎、さらにその発現不全は欧米では最も発生頻度の高い致死性遺伝病である嚢胞性線維症を引き起こす。

ABCA3 は肺胞型上皮細胞内で、肺サーファクタントの脂質輸送、すなわち、肺胞型上皮細胞での lamellar body へのリン脂質のリクルート、パッキングに大きな役割を果たしているが、その詳細なメカニズムについてはまだ知られていない。一方、CFTR チャネルは、肺胞型上皮細胞の管腔側膜に発現しており、管腔内への水・電解質輸送の中心的役割を果たしていることが知られているが、

型上皮細胞での存在を含め、まだその生理・病態生理について未知な部分が多い。さらに、これら 2 つの ABC 蛋白質は、異なるタイプの細胞に発現しているが、共に肺胞上皮にあって協調して肺胞液の産生、肺サーファクタントの産生・分泌、肺でのガス交換に大きな機能を果たしていると予想される。このように、肺胞環境における ABCA3 トランスポータの役割と動作メカニズムを、他のイオンチャ

ネルとの相互関係を含めて、分子レベルで理解することが、この分野の今後に重要と考えている。

## 2. 研究の目的

本研究では、

### (1) lamellar body 限界膜に発現しているイオンチャンネルの同定

lamellar body 限界膜には ABCA3 の他に様々なイオンチャンネルが発現して、サーファクタント輸送に協調的に働いていると予想される。lamellar body 限界膜を抽出し、平面二重脂質膜法を用いて、そこに発現しているイオンチャンネル群の同定を行なう。

### (2) lamellar body 形成膜に上のイオンチャンネルと ABCA3 トランスポータとの機能的連関

同定されたイオンチャンネルは ABCA3 トランスポータと協調し、脂質輸送を行っている可能性があり、これらの相互作用について検討する。

### (3) ABCA3 トランスポータと CFTR チャンネルの機能的連関

ABCA3 トランスポータと CFTR チャンネルの機能調節相互作用の有無を検証する。両者の直接的、あるいは肺胞表面におけるサーファクタントや Cl<sup>-</sup> 濃度および pH などを経介した間接的な相互作用について調べる。さらにステロイドホルモンによる ABCA3 トランスポータおよび CFTR チャンネルの発現・機能調節について検討する。

以上により、本研究は ABCA3 トランスポータ自体のみではなく、それと協調的に機能しているイオンチャンネルシステムの存在の可能性に着目して、Lamellar body

の限界膜上での ABCA3 とその関連イオンチャンネルの同定、およびそれらの相互作用について検討する。さらに同じ ABC 蛋白質ファミリーである CFTR チャンネルとの相互作用を解析し、ABCA3 と CFTR による肺胞上皮でのホメオスタシス形成について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用する細胞系

プライマリ細胞はマウス、ラット肺をコラゲナーゼ処理、さらに 20 $\mu$ l のフィルターで濾過後、CD16/32、CD45 の接着したプレートに巻き、前述の表面マーカーのない肺胞型上皮細胞のみを回収する。また、肺胞型上皮細胞由来の培養細胞 (A549) および HEK 細胞の強制発現系などを使用する予定である。

### (2) upward flotation による Lamellar body (限界膜) の抽出

肺胞型上皮細胞 (初代培養および細胞株) から lamellar body を抽出方法については、1972 年に Page-Roberts により報告され<sup>7)</sup>、変法もいくつか報告されている。Chander らは血液を除去した肺を 1.0 M sucrose でホモジナイズし、非連続生の sucrose gradient (0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, and 0.8 M) との遠心により lamellar body 分画を抽出する。本研究では、この手法を野性型および ABCA3 ノックアウトマウスのプライマリ細胞および ABCA3 をトランスフェクションにより発現させた細胞系に応用する。

### (3) 平面二重脂質膜法による lamellar body 限界膜に発現しているイオンチャンネルの電流測定

lamellar body のような細胞小器官膜上にあるチャンネルやトランスポータに通常の

パッチクランプ法でアクセスするのは容易ではない。そこで、lamellar body 限界膜からジャイアントリポソームを作成して、平面二重脂質膜法を用いたイオンチャンネルの同定を試みる。また、ペインティング法や張り合わせ法

(Langmuir-Blodgett 法)を用いて平面脂質二重膜を形成し、抽出した lamellar body 限界膜を膜融合法(ベシクル融合法)、直接挿入法などで平面脂質二重膜へ取り込み、ABCA3 トランスポータやイオンチャンネルを人工脂質二重膜へ融合させる(図2)。これにより、人工脂質二重膜に膜タンパク質再構成後もある程度の蛋白質の機能が保持される。他にホールセルクランプ測定も必要に応じて行なう。

#### (4) ABCA3 トランスポータの活性測定

Lamellar body の限界膜を断片化し、輸送基質と ABCA3 トランスポータを含んだ脂質二重膜をインキュベーションし、ATP の加水分解反応で生ずる無機リン酸(Pi)を定量し、ATPase 活性反応を測定する。

#### 4. 研究成果

ATP 依存性チャンネルゲート駆動のない変異体 G551D を持った CFTR (G551D-CFTR) に genistein と curcumin を負荷し、チャンネルゲーティングの回復を観察した。Genistein による G551D-CFTR チャンネルの活性増強効果は 20 倍だったのに対し、Curcumin による G551D-CFTR のチャンネルの活性増強効果は 10 倍であったが、Curcumin を Genistein によって活性化された G551D-CFTR に負荷すると、チャンネルの活性はさらに 40 倍まで増強した[Yu, Miki et al 2011]。

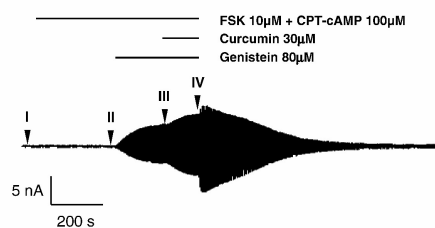


図1 G551D-CFTR を強制発現した CHO 細胞に Curcumin を Genistein を負荷し、while-cell current を観察した

さらに、この Curcumin と Genistein による相互増強作用は 5M 以下の低濃度領域で、遥かに大きな相乗増強効果を示した。

この発見は同じ ABC 蛋白質であり、共に NBD を駆動エンジンとして持つ ABCA3 トランスポータと CFTR チャンネルの機能的連関を示唆した。

また、マウスからの肺胞型上皮細胞を安定して培養できるようになったことから、Coherent Anti-Stokes Raman Scattering(CARS)顕微鏡を用い、肺胞型上皮細胞内を観察した。肺胞型上皮細胞内には ABCA3 トランスポータの発現している lamellar body が多数存在し、今回の CARS 顕微鏡により lamellar body への脂質の packing、細胞外への exocytosis を観察した。

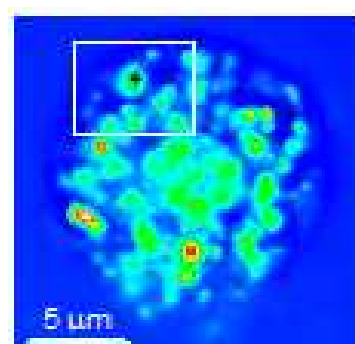


図2 CARS 顕微鏡(CHモード)下で観察した初代培養中の肺胞型上皮細胞

肺胞 型上皮細胞内の lamellar body を生きた細胞で観察できる手段は今までになく、培養液の浸透圧変化や薬剤投与により lamellar body の packing や exocytosis に関わる ABCA3 トランスポータを含めた調節因子研究への重要なツールになり得る。

本研究により肺胞 型上皮細胞には ABCA3 トランスポータと CFTR チャネルが存在し、NBD を駆動エンジンとして共通に持つ2つのABC蛋白質は機能的に連携している可能性が示唆された。今後、大気圧走査電子顕微鏡や CARS 顕微鏡を用いて、ABCA3 トランスポータの発現している lamellar body と CFTR チャネルの機能的連関についてさらに研究を進めたい。

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3件)

相馬 義郎、松崎 陽平 et al, CFTRチャネルのATP依存性ゲーティング機構と活性増強薬の作用機序、分子呼吸器病、査読なし、16巻、2012、130-134

Yu YC, Miki H, Matsuzaki Y, et al, Curcumin and Genistein Additively Potentiate G551D-CFTR, Journal of Cystic Fibrosis, 査読有、10巻、2011、243-252

Matsuzaki Y, Hokuto I, Ikeda K, Surfactant protein A in gastric fluid at birth as a useful marker of differentiation diagnosis between respiratory distress syndrome and transient tachypnea of the newborn., 査読有、53巻、2011、788-789

[学会発表](計2件)

相馬 義郎、松崎 陽平 et al, CFTRチャネルのATP依存性ゲーティング機構と活性増強薬の作用機序、肺サーファクタント分子病態研究会、2011年6月25日、札幌医科大学 記念ホール(北海道)

松崎 陽平, et al, 正期産児・早産児における胃液中肺サーファクタント蛋白A濃度の検討、第55回日本未熟児新生児学会・学術集会、2010年11月6日、神戸国際会議場(兵庫)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

[その他]  
ホームページ等  
特にありません

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松崎 陽平 (MATSUZAKI YOHEI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：60327583