

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461203

研究課題名(和文) 一酸化窒素合成酵素完全欠損マウスを用いた下気道線毛運動機序の解明

研究課題名(英文) The Role of Nitric Oxide in Tracheobronchial Ciliary Motility.

研究代表者

川波 由紀子 (Yukiko, Kawanami)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：60369072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：線毛運動における一酸化窒素(nitric oxide; NO)、NO合成酵素(NO synthase; NOS)の役割は不明な点が多い。本研究ではNOSs完全欠損マウスを用い、NO及びNOSを介した線毛運動機序の解明を行うことを目的とした。リポ多糖(LPS)腹腔内投与後の線毛運動振幅頻度(CBF)は、野生型マウスに比しNOSs完全欠損マウスではCBFは低下しており、NO donorであるisosorbide dinitrateの前投与を行うと、NOSs完全欠損マウスのCBFの低下は改善した。以上よりNO/NOSsが線毛機能において重要な保護的な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The role of nitric oxide (NO) and NO synthase (NOS) in ciliary motility is unclear. We investigated the role of NO in ciliary motility using triply NOS knockout mice in the present study. Lipopolysaccharide exposure caused more decrease of ciliary beat frequency (CBF) in triply NOS knockout mice compared with wild mice 24 hours exposure, and pre-treatment of isosorbide dinitrate (NO donor) improved the decrease of CBF. These results suggest the important protective role of NO in ciliary motility.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：一酸化窒素 NO 一酸化窒素合成酵素 線毛 原発性線毛運動不全症 PCD

1. 研究開始当初の背景

気道は気道粘液とともに細菌や粉じんを肺末梢から咽頭へ排出する粘液線毛クリアランスシステムによる防御機構を有しており、線毛は1秒間に10回程度振幅する。原発性線毛運動機能不全症 (Primary ciliary dyskinesia; PCD) は先天的に線毛機能不全を起こす疾患であり、また緑膿菌やマイコプラズマ感染、タバコなどでも線毛機能は低下することが報告されている。現在、線毛運動異常に対する有効な治療法はなく、特にPCDは難治性、進行性である。これまでの研究により線毛運動振幅数 (Ciliary beat frequency; CBF) は一酸化窒素 (nitric oxide; NO) の前駆物質である L-アルギニン投与により増加することや、PCDでは呼気 NO 低下と CBF 低下の程度が相関すること等が報告されており¹、下気道の線毛運動に NO 及び NO 合成酵素 (NO synthase; NOS) が重要な役割を果たしていると考えられ、治療への応用も期待される。

NO は NOS が担う L-アルギニンの酸化反応で生成される。NOS には誘導型 (inducible NOS; iNOS)、神経型 (neuronal NOS; nNOS)、内皮型 (endothelial NOS; eNOS) の3種類のアイソザイムが存在する。これまで NOS 研究に主に使用されてきた NOS 阻害薬は非特異的阻害剤であるため、NOS 各アイソザイムの特異的な生理機能の評価が困難であった。また、これまでに各アイソザイムのシングル KO マウスが作成されたが、残存した他の NOS が代償的に働くため、本来の NO や NOS の生体内での意義が分かりづらかった。そこで連携研究者の筒井らは、これらの3つの NOS アイソフォームのすべてをノックアウトした NOS 完全欠損マウス (トリプル n/i/eNOS-KO マウス) を 2005 年に世界に先駆けて創出し発表した²。

2. 研究の目的

NOS 完全欠損マウス、各 NOS シングルノックアウトマウスを用い、NO 及び NOS を介した線毛運動機序の解明を行う。

3. 研究の方法

対象: 8-12 週齢の雄の C57BL6J マウス (野生型) と NOSs 完全欠損マウス、各 NOS のシングルノックアウトマウス。

リポ多糖 (LPS) 曝露: 生理食塩水または LPS の腹腔内投与を行い、4 時間または 24 時間後に解剖を行った。

気管・気管支の線毛運動の定量: 特別に作成した箱型のメディウム入りプレパレート上で約 1mm 厚に切り出した気管輪の線毛運動を、顕微鏡下 (倍率 1000 倍) にデジタルハイス

ピードカメラ (Ditect 社、HAS-L1、最大 1 秒間 3000 コマまで撮影可能) で撮影し、線毛の 1 秒間当たりの振幅数 (CBF) を定量した。

NOS、NO の定性および定量: 気管の免疫組織染色による NOS 発現や血液を用いて NO 代謝産物 (NOx) を測定した。

線毛の微小構造の評価: 電子顕微鏡を用いて線毛の微小構造の評価を行った。

4. 研究成果

電子顕微鏡で評価した線毛の超微細構造は、NOS 完全欠損マウスと野生型マウスでは中心微小管や dynein arm 等の数や構造異常については明らかな差は認めなかった。また、無曝露の状態では、野生型、NOS 完全欠損マウス、各 NOS シングルノックアウトマウスで CBF に差は認められなかった。

次に野生型マウスに LPS を投与したところ、投与 4 時間後の CBF は、野生型マウスと NOS 完全欠損マウスの間で差は認めなかったが、LPS 投与 24 時間後には CBF は両マウスで有意に低下した。野生型では LPS 投与群では生理食塩水投与群に比べて CBF は 79.4% に低下したが (Figure1) 野生型マウスに比し NOS 完全欠損マウスでは CBF はさらに低下した (野生型の LPS 投与群に対して 76.9% (Figure2))、NOS シングルノックアウトマウスでは野生型と差は認められなかった。

NO donor である isosorbide dinitrate の前投与を行うと、NOS 完全欠損マウスの CBF の低下は改善した (野生型の LPS 投与群に対して 93.5%) (Figure3)。また、血中 NOx 濃度や免疫組織染色による気管における NOS 発現は野生型マウスに LPS 投与することで発現亢進したが、NOS 完全欠損マウスでは発現は抑制されていた。

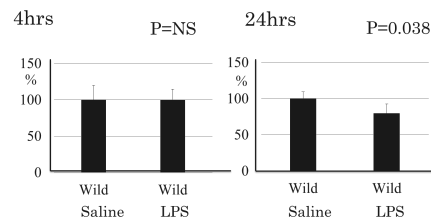


Figure1: 野生型マウスに LPS を投与したところ、24 時間後に CBF は有意に低下した。

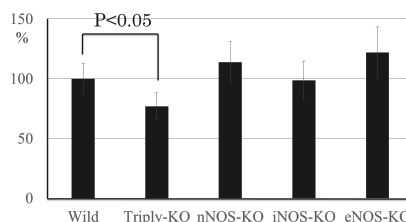


Figure2: LPS 投与 24 時間後では野生型マウス

スに比し NOS 完全欠損マウスでは CBF はさらに低下した。

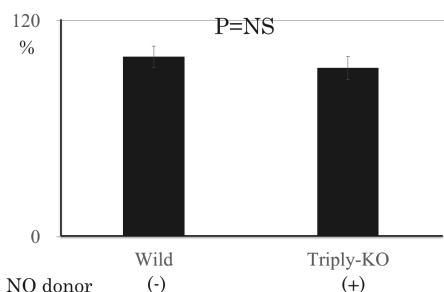


Figure3 : NO donor の前投与を行うと、NOS 完全欠損マウスの CBF の低下は改善した。

<まとめと考察>

野生型マウスと NOS 完全欠損マウス、各 NOS シングルノックアウトマウスで CBF に差は認められなかった。しかし、LPS 投与 24 時間後には、野生型マウス、NOS 完全欠損マウス両方のマウスで生理食塩水投与群と比べて CBF は有意に低下し、野生型マウスに比し NOS 完全欠損マウスでは CBF はさらに低下し、NO donor の前投与を行うと、NOS 完全欠損マウスの CBF の低下は改善した。また、血中 NOx 濃度や気管における NOS 発現は野生型マウスに LPS 投与することで発現亢進したが、NOS 完全欠損マウスでは発現は抑制されていた。

以上より NO/NOSs が線毛機能において重要な保護的な役割を果たしていることが示唆された。

Smith らは健常者の気道の線毛細胞では感染後に NO や iNOS が上昇するが、PCD 患者の線毛細胞では感染後も NO や iNOS の上昇が乏しいことを報告している³。本研究において LPS 投与で NOS 完全欠損マウスでは NOS や NOx の上昇は認められず、線毛運動の低下も認められたことより、感染時の PCD 患者の状態を検証する一つのモデルとなりうると考えられた。

<引用文献>

1. Pifferi M, Bush A, Maggi F, et al. Nasal nitric oxide and nitric oxide synthase expression in primary ciliary dyskinesia. The European respiratory journal 2011;37:572-7.
2. Morishita T, Tsutsui M, Shimokawa H, et al. Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America 2005;102:10616-21.

3. Smith CM, Fadaee-Shohada MJ, Sawhney R, et al. Ciliated cultures from patients with primary ciliary dyskinesia do not produce nitric oxide or inducible nitric oxide synthase during early infection. Chest 2013;144:1671-6.

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)

Takashi Kido, Masato Tsutsui, Yukiko Kawanami, Hiroshi Ishimoto, Takaaki Ogoshi, Yumiko Toyohira, Nobuyuki Yanagihara, Kazuhiro Yatera and Hiroshi Mukae. The Role of Nitric Oxide in Tracheobronchial Ciliary Motility. Proceeding of airway selection research. 査読無, Vol 17, 2016, pp. 21-22.

城戸貴志、石本裕土、生越貴明、川波由紀子、小田桂土、西田千夏、山崎啓、矢寺和博、迎 寛. DPB 様画像所見でマクロライドに異なる反応を示した原発性線毛運動不全症の2例. Therapic research. 査読無, Vol 37, 2016, pp. 567-568.

* 作成中もう 1 件あり

〔学会発表〕(計 12 件)

先成このみ、城戸 貴志、矢寺 和博 他：全身性エリテマトーデスを合併した原発性線毛運動不全症の一例. 第 78 回日本呼吸器学会、日本結核病学会、九州支部春季学術講演会. 2017/3/11. 福岡国際医療福祉学院 (福岡県・福岡市).

城戸 貴志、川波 由紀子、矢寺 和博 他：線毛運動における NO/NOSs の役割の検討. 第 46 回日本心臓血管作動物質学会. 2017/2/10. 琉球大学 (沖縄県・西原町).

城戸 貴志、先成 このみ、矢寺 和博 他：SLE を合併し原発性線毛運動不全症の特徴も有する気管支拡張症の一例. 第 43 回難治性気道疾患研究会. 2017/2/4. 東京国際フォーラム (東京都・千代田区). T Ogoshi, T Kido, Y Kawanami, Yatera

K,et al. The Role of Nitric Oxide in Tracheobronchial Ciliary Motility. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 2016/5/21. Sendai International Center (Miyagi, Sendai).

城戸 貴志、川波 由紀子、矢寺 和博
他：DPB 様画像所見でマクロライドに異なる反応を示した原発性線毛運動不全症の 2 例. 第 42 回難治性気道疾患研究会. 2016/1/30. 東京国際フォーラム(東京都・千代田区).

城戸 貴志、川波 由紀子、矢寺 和博
他：線毛運動における一酸化窒素の役割の検討. 第 33 回産業医科大学学会総会. 2015/10/3. 産業医科大学(福岡県・北九州市).

城戸 貴志、川波 由紀子、矢寺 和博
他：線毛運動における NO/NOSs の役割の検討. 2015/7/11. 第 34 回気道分泌研究会. 札幌プリンスホテル(北海道・札幌).

城戸 貴志、川波 由紀子、矢寺 和博
他：線毛運動における一酸化窒素の役割の検討. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会. 2015/4/19. 東京国際フォーラム(東京都・千代田区).

T Kido, Y Kawanami, K Yatera, et al. The role of nitric oxide in tracheobronchial ciliary motility. 19th congress of Asian Pacific Society of Respiriology. 2014/11/16. Bali, Indonesia.

6. 研究組織

(1)研究代表者

川波 由紀子 (KAWANAMI, Yukiko)
産業医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号：60369072

(2)研究分担者

城戸 貴志 (KIDO, Takashi)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号：30389465

(3)連携研究者

矢寺 和博 (Yatera, Kazuhiro)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：40341515