

令和元年5月14日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11203

研究課題名(和文) 中耳粘膜上皮の線毛運動の制御メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of the ciliary beat of the middle ear mucosa

研究代表者

鈴木 秀明 (Suzuki, Hideaki)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：20187751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：中耳粘膜の線毛運動はアセチルコリンやATPによって促進され、細胞外液のCaイオンを除去することにより抑制された。種々の拮抗薬や抑制薬の負荷実験により、アセチルコリンによる線毛運動促進作用はムスカリン受容体、パネキシン、およびP2Xプリン受容体を介することが示唆された。さらに線毛運動の促進・低下に応じて中耳粘膜からのATP放出も増減することが確認された。免疫組織染色法と定量的RT-PCR法により、発現しているサブタイプはM3ムスカリン受容体、パネキシン-1、P2X7プリン受容体であることが分かった。しかしWestern blot法とパッチクランプ法ではこれらの存在を確認することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により線毛運動の制御経路にパネキシン-1とP2X7プリン受容体が関与することが示唆された。P2X7プリン受容体はATPが結合するとCaイオンを通すチャンネルであり、またパネキシンは細胞外へATPを放出する通路として近年着目されている。形質膜上でこの2つが互いに非常に近い距離に存在していれば、Caイオン流入とATP放出を周期的に反復する振動子として働き、線毛運動を引き起こしている可能性がある。中耳炎において障害される中耳粘膜の線毛運動の制御機構を解明することは、難治性中耳炎の病態を理解する上で重要であり、有効な治療法を開発する糸口となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ciliary movement of the middle ear mucosa was promoted by acetylcholine and ATP, and inhibited by the depletion of extracellular Ca ion. Loading test of various antagonists and inhibitors suggested that the promotion of the ciliary movement by acetylcholine is mediated by muscarinic receptor, pannexin channel and P2X purinergic receptor. Promotion and inhibition of the ciliary movement coincided with the change of ATP release from the middle ear mucosa. Fluorescence immunohistochemistry and quantitative RT-PCR showed that the subtypes of the above 3 components are M3 muscarinic receptor, pannexin-1 channel and P2X7 purinergic receptor. However, we could not confirm the expressions of these molecules by Western blot and patch clamp techniques. The pannexin-1-P2X7 unit may serve as an oscillator that generates periodic increase in intracellular Ca ion and thereby induce rhythmic ciliary beat.

研究分野：上気道粘膜の病態生理

キーワード：中耳粘膜 線毛運動 制御機構 ムスカリン受容体 ATP Pannexin カルシウム P2Xプリン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

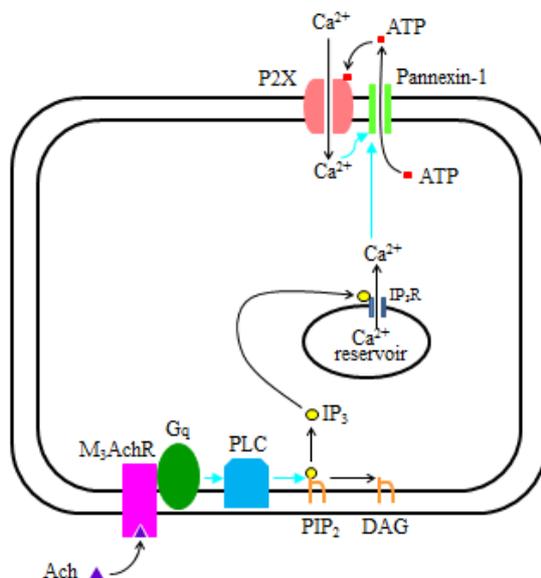
中耳粘膜は気道上皮と同様に線毛上皮を持ち、律動的な線毛運動による粘液線毛輸送機能は正常な中耳腔が維持されるためにきわめて重要である。気道上皮の線毛運動を制御する因子として ATP、acetylcholine、Caイオンが知られているが、この3つがどのように関連しているかについては明らかではない。さらにこれまでの研究対象は主に動物モデルか培養細胞であり、特にヒト中耳粘膜の線毛運動の制御メカニズムについてはほとんど研究されていない。本研究では手術時に採取した中耳粘膜を ex vivo の実験を中心として解析し、ヒトの in vivo にきわめて近い状態での直接的なデータに基づいて線毛運動の制御メカニズムを解明することを目的とする。この研究から得られる知見は難治性中耳炎の病態を理解する上で重要であり、新しい治療法の開発に結び付くことが期待される。

2. 研究の目的

中耳腔の良好な含気が維持されるためには、中耳粘膜表面の線毛運動による粘液線毛輸送機能は大きな役割を果たしている。中耳炎や副鼻腔炎の病態ではこの線毛輸送機能が障害されていることが知られている。気道上皮の線毛運動を制御する因子として ATP、acetylcholine、Caイオンが知られている。細胞外液中の ATP は気道粘膜上皮細胞表面のプリン受容体を介して線毛運動を亢進させ、このとき細胞内Caイオン濃度の上昇が起こる。Acetylcholineも muscarine 受容体を介して線毛運動を促進させる。しかし ATP、acetylcholine、Caイオンが線毛運動の制御経路で互いにどのように作用しているかは明らかではない。

細胞外への ATP 放出の経路として、近年、pannexin channel が注目されている。最近われわれは、鼻粘膜上皮細胞において pannexin channel と P2X プリン受容体が共存していること、および acetylcholine が細胞内Caイオンの上昇を介して pannexin channel を活性化させ ATP 放出を引き起こすことを発見した(付図)。以上のようなエビデンスに加えて P2X プリン受容体が Caイオン channel であることを考え合わせると、pannexin / ATP / P2X プリン受容体 / Caイオン系は気道粘膜局所において paracrine 機構を構成し、律動的な線毛運動を制御している可能性が示唆される。中耳粘膜も基本的に上気道と同様の構造をなしており、その線毛運動に関しても同様の制御機構が働いている可能性が高いと考えられる。本研究計画では手術時に採取した中耳粘膜を用い、ex vivo の状態での実験に基づいて線毛運動の制御機構を解明することを目的とした。

付図 鼻粘膜上皮細胞におけるアセチルコリン刺激によるATP放出の制御機構



Ach; acetylcholine

M₃AchR; M₃ acetylcholine receptor

PLC; phospholipase C

PIP₂; phosphatidylinositol bisphosphate

DAG; diacylglycerol

IP₃; inositol triphosphate

IP₃R; inositol triphosphate receptor

P2X; purinergic P2X receptor

3. 研究方法

(1) 線毛運動速度の測定

手術時に採取した中耳粘膜を細い帯状にトリミングして培養液（酸素飽和したHank's balanced salt solution (HBSS)）を満たした観察用チャンバー中に置き、位相差顕微鏡下に線毛運動を観察した。観察される像を高速ビデオカメラ（DITECT 社製、HAS-L2）で録画し、線毛運動のビート数を付属のソフトウェアHAS-U1U2で解析した。さらにacetylcholine, ATP, muscarine 受容体拮抗薬、pannexin channel 拮抗薬、P2X プリン受容体拮抗薬、Caイオンキレート剤等を負荷し、線毛運動のビート数の変化を観察した。実験は室温で行い、録画速度は毎秒200コマとした。

(2) ATP 放出量のex vivo 測定

採取した中耳粘膜を直径2 mmの円形にトリミングし、HBSS中に浸して一定時間（5～30 分）incubate し、ATP 放出量を測定した。ATP の定量はluciferin-luciferase 法によるassay キット（Hygiena 社製）を用いて行った。さらにacetylcholine, muscarine 受容体拮抗薬、pannexin channel 拮抗薬、P2X プリン受容体拮抗薬、Caイオンキレート剤等を負荷し、ATP 放出量の変化を測定した。

(3) 蛍光免疫組織染色

採取した中耳粘膜をparaformaldehyde で固定し、中耳粘膜におけるmuscarine 受容体（subtype 1-5）、pannexin channel（subtype 1-3）、P2X プリン受容体（subtype 1-7）の発現・局在を蛍光免疫組織染色法で調べた。

(4) 定量的RT-PCR

採取した中耳粘膜をTRIzol 溶液（Invitrogen 社）に浸し、acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform 法によりRNA を抽出した。抽出したRNA を定量的RT-PCR で分析し、muscarine 受容体（subtype 1-5）、pannexin channel（subtype 1-3）、P2X プリン受容体（subtype 1-7）の発現を調べた。内部標準遺伝子としてGAPDH を用いた。

(5) Western blot

採取した中耳粘膜を細切してRIPA lysis buffer（ATTO 社）に浸し、蛋白を抽出した。抽出物中のmuscarine 受容体（subtype 1-5）、pannexin channel（subtype 1-3）、P2X プリン受容体（subtype 1-7）の発現をWestern blot 法で調べた。

(6) パッチクランプ法

中耳粘膜を培養液中に浸して機械的に攪拌し、剥脱してきた線毛上皮細胞を用いて、線毛上皮細胞の細胞膜上に存在すると考えられるpannexin やP2X プリン受容体などのchannel の電気生理学的特性を明らかにするため、パッチクランプ法による解析を行った。パッチクランプ増幅器は現有施設として保有している機器を使用した。

4. 研究成果

(1) Baselineの線毛運動速度は6~10 Hzで、Caイオン(-)の溶液中では抑制された。線毛運動はATPやacetylcholineによって再現性良く促進され、線毛運動速度は統計学的に有意に増加した。これに対し、Acetylcholineによる線毛運動促進作用はmuscarine受容体拮抗薬であるatropineによって有意に抑制された。一方、pannexin-1拮抗薬であるcarbenoxoloneとprebenecid、およびP2X受容体拮抗薬であるPPADSについては線毛運動が抑制される傾向が認められたものの、データのばらつきが比較的大きく、統計学的有意差には至らなかった。

(2) 直径2 mmの円形にpunch outした中耳粘膜をHBSSを満たしたチャンバー内に留置した。そして各種薬剤で10分間刺激し、ATPの放出量を測定した。ATPは無刺激の状態でも少量放出された。このATP放出はacetylcholineによって促進され、Caイオン(-)の溶液中では抑制された。この促進効果はmuscarine受容体拮抗薬であるatropineによって有意に抑制された。一方、pannexin-1拮抗薬であるcarbenoxoloneとprebenecid、およびP2X受容体拮抗薬であるPPADSについてはATP放出が抑制される傾向が認められたが、データのばらつきが大きく有意差には至らなかった。

(3) 採取した中耳粘膜をparaformaldehydeで固定し、M1 muscarine受容体、M3 muscarine受容体、pannexin-1、P2X7プリン受容体の発現、局在を蛍光免疫組織染色法で調べた。P2Xプリン受容体については7つのサブタイプのうち、P2X7がpannexin-1と共発現していることが近年報告されており、P2X7を選んだ。M1 muscarine受容体とM3 muscarine受容体は主に上皮細胞に発現しており、M3 muscarine受容体はM1 muscarine受容体に比べて強く発現していた。またpannexin-1とP2X7プリン受容体についても上皮細胞の頂面に弱い発現が認められた。

(4) 採取した中耳粘膜からacid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform法によりRNAを抽出し、M1 muscarine受容体、M3 muscarine受容体、pannexin-1、P2X7プリン受容体について定量的RT-PCRを行った。その結果、いずれのmRNAも発現していることが確認された。

(5) 蛍光免疫組織染色法と定量的RT-PCR法により中耳粘膜における存在が確認されたM1 muscarine受容体、M3 muscarine受容体、pannexin-1、P2X7プリン受容体について、Western blot法により蛋白質レベルでの発現をみた。M1 muscarine受容体とM3 muscarine受容体についてはその発現が確認できたが、pannexin-1とP2X7プリン受容体は存在が確認できなかった。その理由としてはpannexin-1とP2X7プリン受容体の絶対量が非常に少ないためではないかと考えられた。

(6) 培養液に浸した中耳粘膜から機械的に線毛上皮細胞を剥脱・遊離させ、whole cellパッチクランプを行った。しかし遊離した細胞の中にはviableなものが少なく、またviableな細胞は線毛運動のために振動しており、再現性のある実験データが得られなかった。さらに底面をコーティングやゼラチンコーティングしたディッシュを用い、線毛細胞をディッシュ底面に付

着・固定させて同様の実験を行ったが、やはり再現性のあるデータは得られなかった。

(7) 以上より acetylcholine による中耳粘膜の線毛運動の制御は主に M3 muscarine 受容体、一部 M1 muscarine 受容体を介することが示された。さらにその制御経路には細胞外 Ca イオンが必須であり、ATP 放出を伴うことも示された。M3 muscarine 受容体も M1 muscarine 受容体も Gq 蛋白と共役していることが分かっているが、Gq 蛋白により phospholipase C が活性化され inositol-3 リン酸と diacylglycerol が生成する段階までは、細胞外 Ca イオンも ATP も関与しない。今回の研究では、この後の経路で pannexin-1 と P2X7 プリン受容体が関与することが示唆された。Pannexin channel は細胞外へ ATP を放出する通路として近年着目されている。また P2X プリン受容体は ATP が結合すると陽イオン、特に Ca イオンを通す ligand-gated イオンチャンネルである。この 2 つのチャンネルが線毛運動の制御経路に含まれるとすれば、ATP と細胞外 Ca イオンの関連が理解できる。さらに形質膜上の pannexin-1 と P2X7 プリン受容体が互いに近接して存在していれば、Ca イオン流入と ATP 放出を周期的に反復する oscillator として働いている可能性が示唆される。これによりもたらされる周期的な脱分極が線毛運動を起こす振動子として働いているのかも知れない。

難治性中耳炎では中耳粘膜の線毛運動が障害されていると考えられる。その制御メカニズムを解明することは中耳炎の病態を理解する上で重要であり、難治性中耳炎の新しい治療戦略を開く突破口になるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:大淵 豊明

ローマ字氏名：Toyoaki Ohbuchi

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 00412651

研究分担者氏名：小泉 弘樹

ローマ字氏名：Hiroki Koizumi

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 70461572

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。