

令和 2 年 7 月 4 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08545

研究課題名(和文) COPDにおけるイオン輸送体を分子標的とした気道粘液線毛輸送系活性化療法の開発

研究課題名(英文) Development of airway mucociliary transport system activation therapy targeting ion transporters in COPD

研究代表者

細木 誠之 (Hosogi, Shigekuni)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30433254

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)：慢性閉塞性肺疾患(以下COPD)患者において、閉塞性換気障害の重症化に伴い、高CO₂血症を合併する。高CO₂血症は、気道線毛細胞内pHの変化を介した気道線毛クリアランスの低下させる可能性があり、このことが頻回な気道感染の原因となっているとの仮説を立て検証した。ヒト由来初代培養細胞から気道線毛細胞を分化誘導し、高CO₂環境(CO₂10%)にて粘液線毛クリアランスの指標である線毛運動と経上皮イオン輸送(特にクロライドイオン輸送)を評価した。高CO₂環境は気道上皮細胞の細胞内pHおよびクロライド濃度を低下させ、線毛運動の低下、経上皮イオン輸送の低下をもたらすことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COPD患者の気道における高CO₂環境の環境は、細胞内pHの低下やクロライドイオンの低下をもたらすことが明らかとなった。また、それに伴う線毛細胞における線毛運動の低下と、クロライド分泌の低下による気道上皮被覆液の低下をもたらす、さらには気道被覆液のpHの低下をもたらすことを明らかとした。このことは粘液線毛クリアランスの低下を誘導し気道感染のリスクを高めていると考えられた。粘液線毛クリアランスの低下に対して重炭酸イオンの重要性も明らかとなり、今後、細胞膜上での重炭酸イオン輸送体をターゲットとした創薬開発の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), hypercapnia is associated with the aggravation of obstructive ventilatory impairment. We hypothesized that hypercapnia may decrease airway ciliary clearance through changes in airway ciliary cell pH, which is the cause of frequent airway infections. Differentiation of airway ciliated cells was induced from human-derived primary cultured cells, and ciliary movement and transepithelial ion transport (particularly chloride ion transport), which are indicators of mucociliary clearance, were evaluated in a high CO₂ environment (10% CO₂). It was clarified that the high CO₂ environment lowers the intracellular pH and chloride concentration of airway epithelial cells, resulting in a decrease in ciliary motility and a decrease in transepithelial ion transport.

研究分野：生理学

キーワード：粘液線毛クリアランス pH クロライドイオン

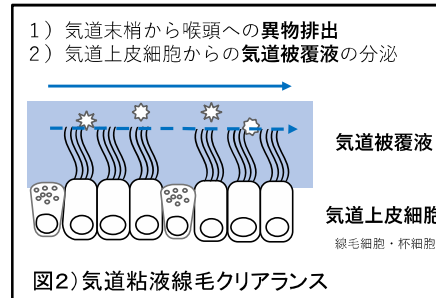
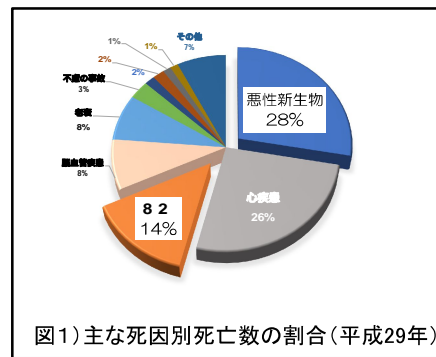
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の平成 29 年における死因別死亡数において呼吸器感染症は 14%と、悪性腫瘍、循環器疾患に次いで死亡原因の第 3 位となっている (図 1)。また肺炎死亡者において肺における基礎疾患、特に慢性閉塞性肺疾患 (以下 COPD) の関与が重要であることが近年明らかとなっている。現在これらの気道感染に対する治療法、予防法の開発は急務である。気道粘液線毛クリアランスは、気道において外部からの侵入微生物に対しての生体防御反応として非常に重要な役割を果たしている。

気道粘液線毛クリアランスは、1) 気道線毛細胞による肺末梢から喉頭への異物排出と、2) 気道上皮細胞からの気道被覆液の分泌により構成されている (図 2)。気道上皮細胞の構成細胞である線毛細胞に着目し、その機能評価として、1) 線毛運動活性を高速度カメラを用いて線毛振動周波数と振動角度を測定することにより評価し、2) 経上皮イオン輸送を、ウッシングチャンバーを用いた電気生理学的手法による評価法を確立してきた。

さらに慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者において、閉塞性換気障害の重症化に伴い、高 CO₂ 血症が合併する。高 CO₂ 血症は、気道線毛細胞内 pH およびクロライドイオン環境の変化を介して気道線毛クリアランスの低下、気道分泌を低下させる可能性があり、このことが頻回な気道感染の原因となっているとの仮説を立てた。現在、高 CO₂ 血症の気道のイオン輸送 (Cl⁻分泌) と線毛運動に対する効果については明らかとなっていない。さらにはひと気道上皮細胞を用いた検討はなされておらず、ヒト気道上皮を用いて検討する。本研究では、気道線毛細胞における細胞内 pH およびクロライドイオン環境の制御の観点から、高 CO₂ 血症の気道線毛細胞における Cl⁻分泌、線毛運動に及ぼす影響を解明し、COPD 患者の気道感染の革新的予防法・治療法 の開発を目指している。

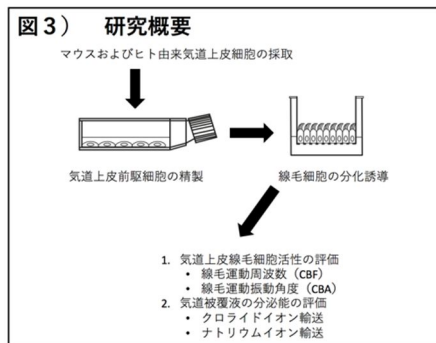


2. 研究の目的

高 CO₂ 血症は、気道線毛細胞内 pH およびクロライドイオン環境の変化を介して気道線毛クリアランスの低下、気道分泌を低下させる可能性があり、このことが頻回な気道感染の原因となっているとの仮説を立て、高 CO₂ 血症の気道のイオン輸送 (Cl⁻分泌) と線毛運動に対する効果を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) マウス気道上皮基底細胞の分離・精製と線毛上皮細胞への分化誘導
- (2) ヒト気道上皮細胞の基底細胞の分離・精製と線毛上皮細胞への分化誘導の確立を行う。
- (3) 高 CO₂ 血症による気道線毛細胞内 pH およびクロライドイオン濃度の測定を行う。
- (4) 高 CO₂ 血症による気道線毛運動活性を評価する。
- (5) 経上皮イオン輸送測定による気道イオン輸送能を評価する。

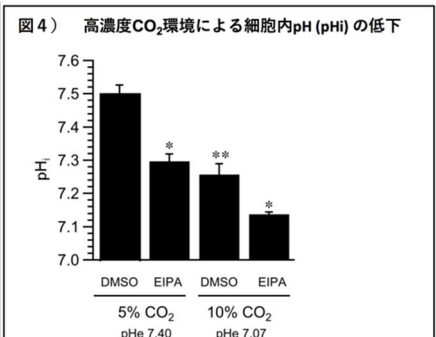


4. 研究成果

平成 29 年度よりマウス肺よりエラストラーゼ処理により気道間葉系幹細胞を分離、精製し、気道線毛細胞の分化誘導法を確立した。その条件での細胞内クロライド濃度、pH を測定し、マウス肺より単離した細胞と同様の値を示し、線毛運動においても同等の運動活性を持つことを明らかとした。これらの結果より、初代培養環境が in vivo での生育環境を十分に再現していると考えた。さらに、平成 30 年度からは京都府立医科大学、京都薬科大学での倫理委員会への申請および承認を受けて、患者検体の培養を開始し培養法を確立した。また、COPD 患者の気道環境を再現するために高 CO₂ 培養を行うためインキュベーターチャンバーを用い、高濃度 CO₂ 刺激を行なった。

(1) 細胞内 pH および細胞内クロライド濃度の検討

高濃度 CO₂ 刺激 (10%CO₂) により、細胞内 pH の低下を認めた。また pH 制御に関わるイオン輸送体として NHE3 の増加を認めたが、それ以外のイオン輸送体の優位な変化は認められなかった。細胞内 pH の維持にナトリウムプロトン交換輸送体による制御の重要性を明らかとし



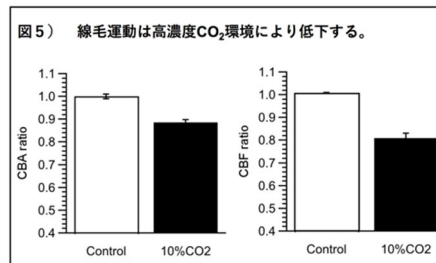
た(図4)。また、細胞内クロライド濃度測定により、高濃度CO₂環境によって細胞内クロライド濃度の低下が認められた(図6)。

(2) 気道被覆液のpH評価

高濃度CO₂環境により気道被覆液のpHの低下を認めた。

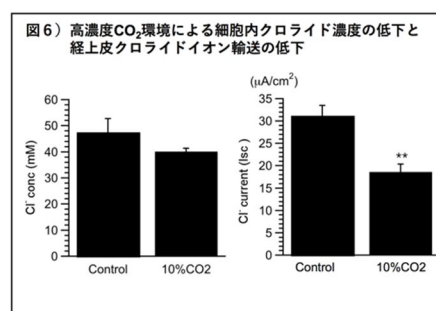
(3) 線毛運動機能の検討

次に線毛運動評価のため、線毛運動における振動周波数(CBF)と線毛運動振動角度(CBA)の評価を行なった。CBFおよびCBAの低下(図5)を認めた。さらに細胞内cAMP濃度の低下も認められた。CBF、CBAの低下にはpHのみならずcAMPの低下も関与していることが示唆された。



(4) 経上皮イオン輸送の検討

経上皮短絡電流の測定においてクロライドイオン輸送の低下(図6)を認めた。クロライドイオン輸送の低下には、クロライドイオンチャネルのコンダクタンスに優位な変化は認められなかったことより、NKCC活性の低下やそれに伴う細胞内クロライド濃度の低下が示唆された。



これらの結果より、COPD患者の気道における高濃度CO₂環境は細胞内pHの低下と気道被覆液のpHの低下、細胞内クロライド濃度の低下をもたらすことが明らかとなった。さらにはcAMPの低下を伴い、線毛細胞における線毛運動活性(CBF、CBA)の低下と、クロライド分泌の低下による気道上皮被覆液の低下をもたらすことが明らかとなった。このことは粘液線毛クリアランスの低下を誘導し気道感染のリスクを高めていると考えられた。

今回、高濃度CO₂環境による細胞内および細胞外のpHの低下が引き起こされることで、粘液線毛クリアランスの低下が引き起こされる機序を明らかとした。またpHの低下にはNHE機能低下の関与が示唆された。今後、気道感染リスクとなる機序を標的に、これらの機能低下を改善する活性化化合物のスクリーニングを含めた臨床応用への研究の発展を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kogiso H, Ikeuchi Y, Sumiya M, Hosogi S, Tanaka S, Shimamoto C, Inui T, Marunaka Y, Nakahari T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Seihai-to (TJ-90)-induced activation of airway ciliary beatings of mice: Ca ²⁺ modulation of cAMP-Stimulated Ciliary Beatings via PDE1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 658-670
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19030658	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kogiso H, Hosogi S, Ikeuchi Y, Tanaka S, Shimamoto C, Matsumura H, Nakano T, Sano KI, Inui T, Marunaka Y, Nakahari T.	4. 巻 469
2. 論文標題 A low [Ca ²⁺] _i -induced enhancement of cAMP-activated ciliary beating by PDE1A inhibition in mouse airway cilia.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pflugers Arch - Eur J Physiol	6. 最初と最後の頁 1215-1227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00424-017-1988-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shigekuni Hosogi, Leonardo Puppulin, Hideo Tanaka, Eishi Ashihara
2. 発表標題 Epithelial ion secretion of human bronchial ciliary epithelium
3. 学会等名 The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細木誠之 田宮暢代 瀬古友理恵 千原佑介 今林達哉 芦原英司 高山浩一
2. 発表標題 ヒト初代培養気道線毛細胞の線毛運動とイオン輸送解析
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hosogi S, Nakahari T, Marunaka Y.
2. 発表標題 Ambroxol-Stimulated Increases in CBA and CBF in Airway Ciliary Cells of Mice
3. 学会等名 Dynein 2017 international workshop (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hosogi S, Nakahari T, Marunaka Y
2. 発表標題 Ambroxol-Stimulated Increases in CBA and CBF Via pHi Increase and [Cl ⁻]i Decrease in Airway Ciliary Cells of Mice
3. 学会等名 American thoracic society 2017 international conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中張 隆司 (Nakahari Takashi) (20189020)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授 (24303)	