

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09879

研究課題名(和文) 鼻粘膜上皮細胞の細胞内Ca振動による線毛運動の制御 単離ヒト鼻粘膜細胞による解析

研究課題名(英文) Regulation of the ciliary beat by intracellular Ca²⁺ oscillation in the nasal epithelial cells

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：粘液線毛輸送機能は気道粘膜の恒常性を保つために重要である。本研究ではヒト鼻粘膜上皮線毛運動の制御機構について検討した。Pannexin-1 P2X7ユニットによってもたらされた持続的な細胞内カルシウムの上昇は、calmodulin adenylate cyclase/guanylate cyclase cAMP/cGMP protein kinase A/protein kinase Gを経てT型電位依存性カルシウムチャンネルにシグナル伝達され、細胞内カルシウム振動が発生することが示唆された。気道上皮線毛運動の制御機構の解明は難治性の気道疾患に対する新たな治療法の開発に結び付くことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気道上皮の線毛運動については、単細胞生物、実験動物、培養細胞を用いた研究がこれまでに行われてきたが、ヒトの組織や単離細胞を使った研究は非常に限られている。本研究では手術で切除した鼻粘膜およびそこから単離した細胞を、採取後2～3時間のうちにex vivoの状態を観察したため、ヒトのin vivoに近い現象の研究が可能となった。線毛運動の障害は種々の上気道・下気道疾患において認められ、気道上皮線毛運動の制御機構の解明は、難治性の上・下気道疾患に対する新たな治療法の開発に結び付くものと考えられる。本研究はこうした点で優れた学術的意義と社会的意義を有していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mucociliary transport function plays an important role in the mucosal defense of the airway, and is largely depend on ciliary beating. This function is often impaired in various upper and lower airway diseases. In the present study, we investigated the regulatory mechanism of ciliary beating of the human nasal mucosa by means of ex vivo measurement of ciliary beat frequency/ATP release, immunohistochemistry, Western blot, immunoelectron microscopy, RT-PCR, and intracellular calcium imaging. Continuous increase in the intracellular calcium level induced by the Pannexin-1 P2X7 unit activates calmodulin, followed by the signaling cascade of adenylate/guanylate cyclases, cAMP/cGMP, and protein kinases A/G. The transmitted signal is then relayed to T-type voltage-gated calcium channel, which can generate intracellular calcium oscillation. A better understanding of the regulatory mechanism will be helpful in developing a new therapeutic strategy for intractable airway diseases.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：線毛運動 鼻粘膜 細胞内カルシウム 単離線毛細胞 Fluo-8 電位依存性カルシウムチャンネル TRPチャンネル オシレーション

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鼻腔粘膜を含めた気道粘膜は多列線毛上皮で被われており、その表面の律動的な線毛運動による粘液線毛輸送機能は、塵埃や病原体を排除し粘膜の恒常性を保つためにきわめて重要である。線毛運動の障害は、慢性副鼻腔炎、アレルギー性鼻炎、気管支喘息、気管支拡張症、慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症など、種々の上気道・下気道疾患において認められる[]。線毛運動の制御メカニズムについては、単細胞生物、実験動物、培養細胞などを使って研究が行われてきたが、ヒトの気道粘膜組織を使った研究はひじょうに限られている。特に線毛運動を直接制御する細胞内シグナルの発生源についてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

気道粘膜表面の律動的な線毛運動は、付着した塵埃、異物、病原体などを排除するための重要な機能である。この線毛運動を制御するメカニズムについては、これまで単細胞生物、培養細胞、実験動物などで研究されてきたが、ヒトに関する知見は非常に限られており、特に線毛運動を直接制御する周期的なシグナルの発生源についてはほとんど分かっていない。われわれは最近、pannexin-1 P2X7 ユニットが持続的に細胞内カルシウムを上昇させている可能性を報告した[]。本研究ではヒト鼻粘膜線毛上皮を使って、細胞内カルシウム上昇後のシグナル伝達経路、および細胞内カルシウムオシレーションの発生源について検討した。

3. 研究の方法

(1) 試料採取

経鼻内視鏡下手術によって、慢性肥厚性鼻炎患者から下鼻甲介を切除・採取した。これを直ちに O₂ ガスを飽和させた Hanks 緩衝液中に浸し、以下のような実験に供した。本研究で採取した試料は、もともと手術により切除する組織であり、対象者が医学的不利益を被ることはなかった。本研究計画はヘルシンキ宣言に準拠しており、学内の研究倫理委員会の承認を得た。対象者全員に対し研究の目的・方法について十分な説明を行い、書面によるインフォームドコンセントを取得した。

(2) 線毛運動速度の測定

採取した下鼻甲介から細い帯状の粘膜を切り出し、これを、緩衝液を満たした観察用チャンバーの底面に静置した。そして位相差顕微鏡(Nikon Eclipse 80i; Nikon)で線毛運動を観察し、高速度デジタルビデオカメラ(HAS U1; DITECT)で録画した。録画速度は毎秒 200 コマとし、一連の実験操作は室温(約 24)で行った。録画したビデオは HAS-U1U2 ソフトウェア(DITECT)で解析し、線毛運動速度を計測した。

(3) 蛍光免疫組織染色

採取した試料を 4% paraformaldehyde で一晩固定し、20% sucrose 液にさらに 2 晩浸した。次に試料を OCT compound(Sakura Finetek)に凍結包埋し、7 μm 厚の凍結切片を作成した。切片を 1.5% 正常ヤギ血清で処理した後、1 次抗体と一晩反応させた。洗浄後に、Alexa Fluor 488 で標識された 2 次抗体(Invitrogen)とさらに 2 時間反応させ、DAPI を含んだ封入剤(Prolong Gold antifade reagent; Invitrogen)で封入した。スライドを蛍光顕微鏡(Carl Zeiss Axioscop2 Plus; Carl Zeiss)で観察し、AxioVision software (version 4.7.2.0)を用いて蛍光強度を定量化した。励起光の光源は HBO 103 W/2 mercury vapor lamp で、Alexa Fluor 488 に対しては 475-495 nm の帯域フィルターを通し、蛍光は 515-565 nm の帯域フィルターを通した。DAPI に対しては 340-380 nm の帯域フィルターを通した励起光を用い、蛍光は 435-485 nm の帯域フィルターを通した。

(4) 免疫透過電子顕微鏡

上記と同様に処理して作成した 7 μm 厚の凍結切片を 1% 正常ウシ血清アルブミンで処理した後、1

次抗体と一晚反応させた。洗浄後に、HRP で標識された 2 次抗体 (Santa Cruz) とさらに一晚反応させた。次に 1% glutaraldehyde で 5 分間固定し、DAB で発色させた後、1% OsO₄ で 30 分間後固定した。切片を ethanol で脱水し、Epon 812 に包埋して 100 nm 厚の超薄切片を作成した。そして透過型電子顕微鏡 (JOEL JEM-1200EX; JOEL) で観察した。

(5) Western blot

採取した試料を細切してすり潰し、RIP 溶解液 (ATTO) に浸した。溶解液を超遠心して得られた上清に等量の EzApply (ATTO) を加えて 5 分間煮沸した。これを 5-15% gradient ポリアクリルアミドゲルに乗せて 20 mA で 80 分間電気泳動した。次にこのゲルをニトロセルロース膜に電気泳動転写した。転写したニトロセルロース膜を 1 次抗体と反応させた後、peroxidase で標識された 2 次抗体と反応させた。これを Luminescence solution (Wako) で化学発光させ、LumiCube CMOS デジタルカメラ (Cannon) で撮影した。

(6) Real-time RT-PCR

細切した試料を TRIzol reagent (Invitrogen) に浸し、超音波破碎した。これにクロホルムを混和し、超遠心して得られた上清から、guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform 法にて RNA を抽出した。抽出した RNA は BioRobot EZ1 (QIAGEN) で精製した。得られた RNA を、High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写し、StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて増幅した。増幅回数は 40 サイクルとした。内部標準遺伝子として *NADPH* を用いた。

(7) ATP 放出量の測定

採取した下鼻甲介粘膜から 4 mm の円形の粘膜片を切り出し、4 mL の Hanks 緩衝液を入れた 12 穴培養プレートに移した。一定時間において緩衝液を 100 μ L 回収し、AquaSnap Total (Hygiena) を用いて、luciferin-luciferase アッセイにより ATP 濃度を測定した。

(8) 単離線毛上皮細胞の細胞内カルシウムイメージング

下鼻甲介粘膜を Hanks 緩衝液に浸して、その表面をブラシで擦過し、上皮細胞を剥離させた。単離上皮細胞の浮遊液を、粘着剤をコーティングした薄底シャーレに移し、蛍光カルシウム指示薬 (5 μ M Fluo-8 AM) を 20 分間負荷した。シャーレの底に付着した線毛上皮細胞を倒立蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss Axioskop 2 Plus) で確認し、蛍光を観察した。励起光の光源は HBO 103 W/2 mercury vapor lamp で 475-495 nm の帯域フィルターを通し、蛍光は 515-565 nm の帯域フィルターを通した。得られた蛍光像を高速度高感度デジタルビデオカメラ (HAS-D71; DITECT) で録画し、HAS-XViewer Camera Memory (DITECT) によって蛍光強度を経時的に定量化した。録画速度は毎秒 100 コマとし、一連の実験操作は室温 (約 24 $^{\circ}$ C) で行った。

4. 研究成果

(1) 線毛運動速度の変化

ベースラインの線毛運動速度は 6.97 ± 0.22 Hz ($n=29$) であった。Acetylcholine (100 μ M) を加えると線毛運動速度は増加した。この賦活作用は、calmodulin 拮抗薬 (calmidazolium (1 μ M))、adenylate cyclase 抑制薬 (SQ22536 (100 μ M))、guanylate cyclase 抑制薬 (ODQ (10 μ M))、protein kinase A 抑制薬 (KT5720 (1 μ M))、protein kinase G 抑制薬 (KT5823 (1 μ M)) によって打ち消された。

ベースラインの線毛運動速度は、calmodulin 賦活薬 (CALP3 (100 μ M))、adenylate cyclase 賦活薬 (forskolin (10 μ M))、guanylate cyclase 賦活薬 (BAY41-2272 (10 μ M))、cAMP analogue (8-bromo-cAMP (100 μ M))、cGMP analogue (8-bromo-cGMP (100 μ M)) によって増加した。CALP3 による賦活作用は SQ22536 や ODQ によって打ち消された。一方、forskolin、BAY41-2272、8-bromo-cAMP、8-bromo-cGMP による賦活作用は calmidazolium によって阻害されなかった。

ベースラインの線毛運動速度は、T 型電位依存性カルシウムチャネルの特異的拮抗薬 (mibefradil

(1-10 μ M), NNC 55-0396 (10 μ M))によって低下した。この抑制効果は8-bromo-cAMP や8-bromo-cGMP による影響を受けなかった。

(2) 蛍光免疫組織染色

下鼻甲介の上皮層に、T型電位依存性カルシウムチャンネル α サブユニットの Cav3.1 と Cav3.3 の発現が認められた。さらに、蛍光強度の定量的解析によって、この発現が有意であることが確認された。一方、T型電位依存性カルシウムチャンネル α サブユニット Cav3.2 と R型電位依存性カルシウムチャンネル α サブユニット Cav2.3 の発現は認められなかった。

(3) 免疫透過電子顕微鏡

超微形態レベルでは、T型電位依存性カルシウムチャンネル α サブユニット Cav3.1 は線毛の表面に、Cav3.3 は線毛とその基部に発現していた。

(4) Western blot

T型電位依存性カルシウムチャンネル α サブユニット Cav3.1 と Cav3.3 のバンドが確認され、この2つのサブユニットの蛋白レベルでの発現が裏付けられた。

(5) Real-time RT-PCR

Cav3.1 と Cav3.3 に対応する *CACNA1G* と *CACNA1I* を増幅したところ、増幅曲線の指数関数的な立ち上がりが確認され、この2つの物質の存在が転写レベルで裏付けられた。

(6) ATP 放出量

下鼻甲介粘膜からの ATP 放出量は、mibefradil や NNC 55-0396 を加えても変化しなかった。

(7) 単離線毛上皮細胞の細胞内カルシウム

単離線毛上皮細胞の細胞内カルシウム濃度は、mibefradil や NNC 55-0396 を加えることにより経時的に低下した。

(8) 考察

われわれは最近の研究で、acetylcholine の刺激が pannexin-1 P2X7 ユニートを活性化してカルシウムイオンの持続的な細胞内流入を引き起こし、繊毛運動を亢進させることを報告した[]。今回の研究により、細胞内カルシウムの上昇に続いて calmodulin の活性化 adenylylate cyclase/guanylate cyclase の活性化 cAMP/cGMP の上昇 protein kinase A/protein kinase G の活性化という制御経路が存在することが示された。さらにこの経路の下流には T型電位依存性カルシウムチャンネルが関与することも示された。電位依存性カルシウムチャンネルは膜電位の脱分極に反応して開くチャンネル膜蛋白であり、哺乳類では筋組織、中枢神経、内分泌組織に存在しており、シグナル伝導、筋収縮、シナプスの可塑性、ホルモン分泌、化学遊走、ホルモン分泌、シグナル伝達などにおいて重要な役割を果たしている[]。このチャンネルはまた、緑藻、ゾウリムシ、精子の鞭毛/繊毛にも発現していることが報告されている[,]。Fujiu ら[]は、緑藻 Chlamydomonas に発現している電位依存性カルシウムチャンネルのアミノ酸配列がヒト電位依存性カルシウムチャンネルの T型 Cav3.1、および R型 Cav2.3 と高い相同性を示すことを見出した。電位依存性カルシウムチャンネルの中でも T型チャンネルは、L型など他の型と比べて浅い脱分極に反応して活性化し、活性化/不活性化が速く非活性化が遅いという電気生理学的特性を有する[]。この特性のため、ベースラインの膜電位が一定のレベル(-60 mV 程度)まで上昇すると T型電位依存性カルシウムチャンネルは自律的に開閉を繰り返すようになり、カルシウムイオンの細胞内流入が反復して起こる[]。小脳のプルキンエ細胞、視床/視床下部ニューロン、洞房結節のペースメーカー細胞には T型電位依存性カルシウムチャンネルが発現しており、このチャンネルが細胞内カルシウム振動の発信器であることが明らかになっている[,]。

今回の研究でわれわれは、ヒト鼻粘膜上皮の線毛に T型電位依存性カルシウムチャンネルの Cav3.1 と Cav3.3 が発現していることを、蛋白レベル、転写レベル、および超微形態レベルで示した。さらに T型

電位依存性カルシウムチャネルの特異的拮抗薬が線毛運動を抑制し、線毛上皮細胞の細胞内カルシウムレベルを低下させることも示した。そして ATP 放出量の測定や cAMP/cGMP アナログを負荷した実験から、このチャネルの反応は ATP、cAMP/cGMP の作用点よりも下流にあることが示された。

以上より、T 型電位依存性カルシウムチャネルによって線毛上皮細胞内に発生したカルシウム振動が線毛運動を直接制御するシグナルである可能性が示唆される。

細胞内カルシウムレベルの変化がどのようにして線毛運動を制御するかについては今後の課題である。線毛の骨格をなす微小管どうしを架橋する outer arm dynein は ATPase 活性を有しており、ATP を分解するときに生じるエネルギーで構造変化を起こし、隣接する微小管どうしをスライドさせてたわませる。Outer arm dynein にはカルシウム結合ドメインがあり、これによって自身の ATPase 活性が制御されていることが報告されている [,]。T 型電位依存性カルシウムチャネルと outer arm dynein の相互作用についてはさらなる研究が待たれる。

<引用文献>

Ikedo K, Oshima T, Furukawa M, Katori Y, Shimomura A, Takasaka T, Maruoka S. Restoration of the mucociliary clearance of the maxillary sinus after endoscopic sinus surgery. *J Allergy Clin Immunol* 99: 48-52, 1997.

Asai K, Haruna S, Otori N, Yanagi K, Fukami M, Moriyama H. Saccharin test of maxillary sinus mucociliary function after endoscopic sinus surgery. *Laryngoscope* 110: 117-122, 2000.

Sun SS, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Kao CH. Evaluation of nasal mucociliary clearance function in allergic rhinitis patients with technetium 99m-labeled macroaggregated albumin rhinoscintigraphy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 111: 77-79, 2002.

Sears PR, Bustamante-Marin XM, Gong H, Markovetz MR, Superfine R, Hill DB, Ostrowski LE. Induction of ciliary orientation by matrix patterning and characterization of mucociliary transport. *Biophys J* 120: 1387-1395, 2021.

Do BH, Ohbuchi T, Wakasugi T, Koizumi H, Yokoyama M, Hohchi N, Suzuki H. Acetylcholine-induced ciliary beat of the human nasal mucosa is regulated by the pannexin-1 channel and purinergic P2X receptor. *Am J Rhinol Allergy* 32: 217-227, 2018.

Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol Rev* 83: 117-161, 2003.

Fujiu K, Nakayama Y, Yanagisawa A, Sokabe M, Yoshimura K. *Chlamydomonas* CAV2 encodes a voltage-dependent calcium channel required for the flagellar waveform conversion. *Curr Biol* 19: 133-139, 2009.

Lodh S, Yano J, Valentine MS, Van Houten JL. Voltage-gated calcium channels of *Paramecium* cilia. *J Exp Biol* 219: 3028-3038, 2016.

Rossier MF. T-type calcium channel: a privileged gate for calcium entry and control of adrenal steroidogenesis. *Front Endocrinol* 7: 43, 2016.

Iftinca MC. Neuronal T-type calcium channels: What's new? *J Med Life* 4: 126-138, 2011.

Kutomi O, Hori M, Ishida M, Tominaga T, Kamachi H, Koll F, Cohen J, Yamada N, Noguchi M. Outer dynein arm light chain 1 is essential for controlling the ciliary response to cyclic AMP in *Paramecium tetraurelia*. *Eukaryot Cell* 11: 645-653, 2012.

Inaba K. Calcium sensors of ciliary outer arm dynein: functions and phylogenetic considerations for eukaryotic evolution. *Cilia* 4: 6, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nguyen TN, Do BH, Kitamura T, Ohkubo J-I, Wakasugi T, Ohbuchi T, Suzuki H	4. 巻 277
2. 論文標題 Expression of Cl- channels/transporters in nasal polyps	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Archives of Oto-Rhino-Laryngology	6. 最初と最後の頁 2263-2270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00405-020-0598-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nguyen TN, Suzuki H, Baba R, Yoshida Y, Ohkubo J-I, Wakasugi T, Kitamura T	4. 巻 183
2. 論文標題 Expression of T-type voltage-gated calcium channel in the cilia of human nasal epithelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Archives of Allergy and Immunology	6. 最初と最後の頁 579-590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000521765	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 -
1. 著者名 Nguyen TN, Suzuki H, Yoshida Y, Ohkubo J-I, Wakasugi T, Kitamura T	4. 巻 49
2. 論文標題 Decreased CFTR/PPARgamma and increased transglutaminase 2 in nasal polyps	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 964-972
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anl.2021.10.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nguyen TN, Koga Y, Wakasugi T, Kitamura T, Suzuki H	4. 巻 50
2. 論文標題 TRPA1/M8 agonists upregulate ciliary beating through the pannexin-1 channel in the human nasal mucosa	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 2085-2093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-022-08201-7	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	大淵 豊明 (Ohbuchi Toyoaki) (00412651)	産業医科大学・医学部・講師 (37116)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------