

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 4 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790761

研究課題名（和文） 気道電解質分泌に対する Toll 様受容体シグナルの調節機構の解明

研究課題名（英文） A novel function of Toll-like receptors on the water-electrolytes secretions from airway submucosal glands

研究代表者

玉田 勉 (TAMADA TSUTOMU)

東北大学・病院・助教

研究者番号：80396473

研究成果の概要（和文）：生理的および病的条件下での気道分泌は、従来考えられていたものよりも精巧に調整されている。研究代表者はヒトに類似した分泌様式を持つブタ気管を用いた本研究によって、病原微生物や外来抗原の認識および排除に必要な自然免疫における中心的役割をもつことで近年注目されている Toll 様受容体 4 が、外因性の分泌増強効果を持つことを初めて明らかにした。本研究成果は今後の気道分泌研究をさらに発展させ、将来的には難治性気道炎症疾患の新規治療法の開発にも通じるものである。

研究成果の概要（英文）：Airway secretions are well controlled in both physiologic and pathologic conditions. Toll-like receptors (TLRs) recognize distinct pathogen associated molecular patterns and activate innate immune responses. In the present study, we showed that the TLR4 ligand could potentiate the secretion of electrolytes from swine tracheal gland acinar cells. This may offer a new therapeutic candidate for controlling airway secretions in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：気道粘膜下腺、パッチクランプ、Toll 様受容体、粘膜免疫、LPS、Nitric oxide

1. 研究開始当初の背景

気管支粘膜面には呼吸によって侵入してくる多くの病原微生物や有害粉塵が沈着している。気道粘膜にはこれらの外来抗原を効率的に殺菌および排除する機構が備わっている。例えば分泌型 IgA などを利用した防御機

構は抗原特異的であり、粘液線毛輸送や咳嗽反射などは非特異的な防御機構として重要である。気管支粘膜に存在する粘液や水分・電解質は、これらの防御機構を恒常的に最適な状態に維持する働きをしている。従来の報告から気管支粘膜下腺は水分・電解質分泌において特に中心的役割を果たしていること

が明らかとなっているが、その生理的な分泌調節機序および様々な疾患や病態における分泌調節異常の機序については解明されていない点が多い。TLRは病原微生物や外来抗原の認識および排除に必要な自然免疫における重要性が近年注目されている。気道では主に気道上皮細胞における炎症性サイトカイン調節機序に関する検討が多い。研究代表者らの研究対象である気道分泌も自然免疫の中心的役割を果たしているものの、TLRと気管支粘膜下腺細胞あるいは気道分泌との関連に関する検討はほとんどされていない。近年、気道上皮細胞において複数のTLRリガンドによるTLRシグナルの活性化がTGF- α の放出を促し結果としてEGFRの活性化を介して種々の炎症性サイトカインの産生を引き起こすことが報告された(Koff JL et al. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 294, L1068-L1075, 2008)。実はそれより以前に、研究代表者らは気管支粘膜下腺においてEGFRシグナルの活性化が気道分泌を濃度依存性に亢進する事実をすでに発見し報告している(Tamada, T. et al. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 22, 566-573, 2000 & Iwase, N. et al. Respir. Physiol. Neurobiol. 132, 307-319, 2002)

2. 研究の目的

本研究の主題は、気道の非特異的防御機構としての気道分泌におけるToll様受容体(TLR)シグナルの調節機序の理解である。特にTLRが気管支粘膜下腺に発現している上皮成長因子受容体(EGFR)のシグナル伝達系を介して分泌を促進することが可能かどうかを主目的としている。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的手法について

研究代表者らは限りなく生体に近い環境での分泌調節機構を明らかにするために、ネコおよびブタ気道から粘膜下腺細胞を単離する方法を1990年代に確立し、またこの単離粘膜下腺細胞に酵素処理などを加えてパッチクランプ法を適用することによって腺細胞からの生理的な水分・電解質分泌反応を微弱なイオン電流の形で捉えることに世界で初めて成功した(Sasaki, T. et al. Am. J. Physiol. 267, L152-L158, 1994、研究計画・方法の図4)。それを応用して、気管支粘膜下腺の内因性NOは生理的条件下では気道分泌を促進するものの、病的過分泌状態に対しては分泌の促進効果は認められなくなるという2相性の調節機構が存在する事実を解

明し報告した(Tamada, T. et al. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 37, 357-365, 2007、図1)。本研究の目的は単離気管支粘膜下腺からの電解質分泌に対するTLRリガンドの増強効果の確認である。実験は物理的および酵素的に単離したブタ気道粘膜下腺を用いる。従来の報告同様にガラス電極で感知される電気信号が最終的には目的のイオン電流として記録される(Tamada, T. et al. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 37, 357-365, 2007)。

(2) TLRサブタイプの特定、局在について

TLRのサブタイプ(TLR1/2、TLR3、TLR5およびTLR6/2)の蛋白レベルでの発現の確認は電気生理学的手法と分子生物学的手法の両面からアプローチする。上記①の実験系においてTLR中和抗体で細胞を前処理することによりTLRリガンドとTLRの結合の重要性が確認されることになる。また、TLRのサブタイプそれぞれに対するモノクローナル抗体を用いて免疫染色により確認することも予定している。染色方法に関しては我々がこれまでに報告してきたものと同様、ブタ気管を凍結切片にして蛍光抗体法によって行う(Tamada, T. et al. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 22, 566-573, 2000)。

4. 研究成果

研究代表者はこれまでにヒトに類似した分泌様式を持つブタ気管を用いた研究によって、気道の生理的な水・電解質分泌に対する内因性の調節因子として最も強力なものがアセチルコリン(ACh)であることを示してきた。しかし、外来病原体に排除に対して行われる追加分泌および種々の慢性気道炎症疾患における病態増悪因子としての過分泌が単にAChの分泌過多によって生じるものではないことも、分泌腺細胞の脱感作という現象を示し証明してきた。

関与するTLRに関して、気道粘膜でしばしば感染を引き起こすものとして一般細菌およびウイルスが挙げられる。研究代表者はグラム陽性菌由来のPGN、グラム陰性菌由来のLPSおよびウイルス由来のpoly(I:C)を用いて、それぞれの認識受容体であるTLR2、TLR4およびTLR3のシグナリングが気道分泌腺にどのような影響をもたらすのかを検討した。電気生理学的検索から、生理的低濃度のAChによって惹起される電解質分泌がLPSによって濃度依存性に増強することが確認されたが、PGNやpoly(I:C)ではそのような効果は認められなかった(図1、2)。

LPSはTLR4の拮抗剤存在下では効果は発揮しないことから、LPSとTLR4の結合が重要であることが初めて確認された。我々はこ

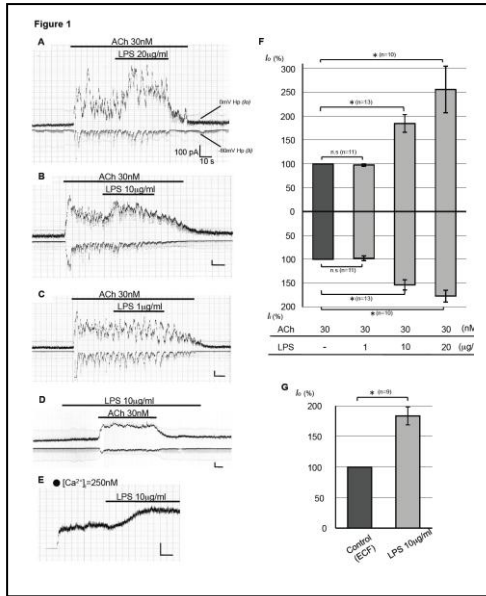


図1 LPSが濃度依存性に電流を増強する

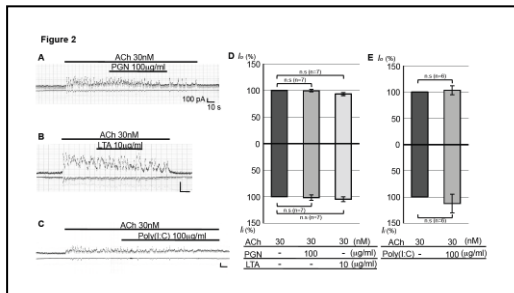


図2 PGNやpoly(I:C)は増強効果を示さず

の効果はEGFRを介している可能性を推定していたため、EGFRシグナリングで重要なTyrosine Kinaseを抑制することでこの効果が消失するかどうか検討した。しかしながら我々の予想に反してLPSによる増強効果は非特異的TK阻害剤であるGenisteinやHerbimycin Aでは抑制されなかった(図3)。

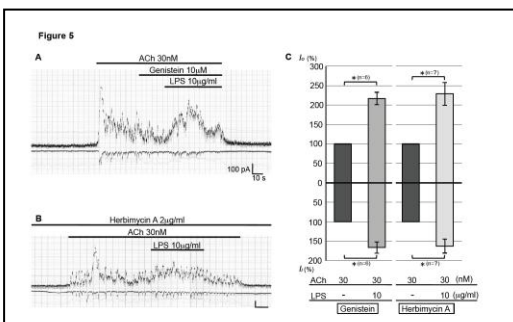


図3 TK阻害剤はLPSの効果に影響せず

我々の過去の報告から、気道粘膜下腺細胞はTK以外にも細胞内NO/cGKの系で分泌増強が得られることが証明されているためその細胞内メカニズムとしてNO/cGMP/PKG

の経路の関与を検討した。電気生理学的検討によって、2種類の細胞内NO合成酵素阻害剤(L-NAME, L-NMMA)の前投与によってそれぞれLPSによる分泌増強効果が消失した。また細胞内PKG阻害剤であるKT-5823およびRp-8Br-cGMPの投与によってもそれぞれLPSによる分泌増強効果が消失した(図4)。このことから気道粘膜下腺細胞のTLR4刺激による分泌増強にはNO/cGMP/PKG系が強く関わっていることが明らかとなった。

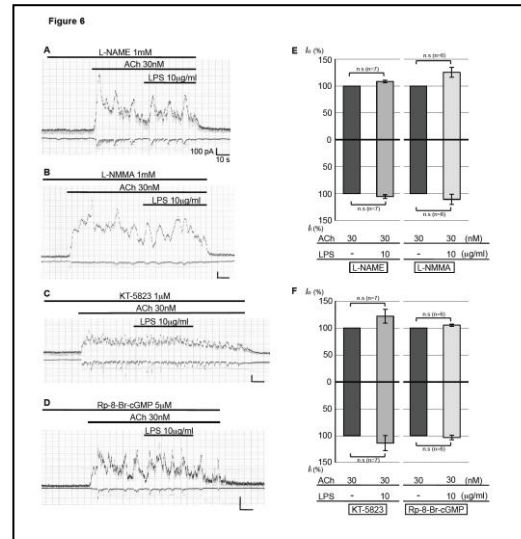


図4 NO/cGMP/PKG系の関与が示された

LPSは長時間作用すると様々な細胞においてiNOSの発現を誘導することがわかっているため、iNOSの関与を確認するために特異的iNOS阻害剤である1400WおよびL-NILの影響を検討した。今回の実験系においてはLPSの作用時間はわずか数分間であるためiNOSの関与は少ないものと推測していたが、やはり1400WもL-NILもどちらもLPSによる分泌増強効果に影響はしなかった。

さらに気道粘膜下腺におけるTLRサブタイプの発現も検討した。上記電気生理学的検索で検討したTLR2、TLR3およびTLR4に対してPT-PCRを行った。明らかな発現が認められたのはTLR4であり、TLR2は軽度発現のみで、TLR3は明らかな発現は認められなかった(図5)。

最後にLPSが実際に細胞内NOの合成を促進するかどうか、細胞内NO特異的蛍光色素であるDAF2-DAを用いた検討を行いLPSには即時的なNO合成促進作用があることまたその効果はTLR4との結合阻害剤の存在下では認められなくなることを明らかにした(図6)。これは気道粘膜下腺においてTLR4シグナルがLPSによって活性化された場合、従来知られていたものとは別の即時的な経路(本研究によってNO/cGMP/PKG系

であることが示されている) によって追加分泌を惹起し得ることを意味する。

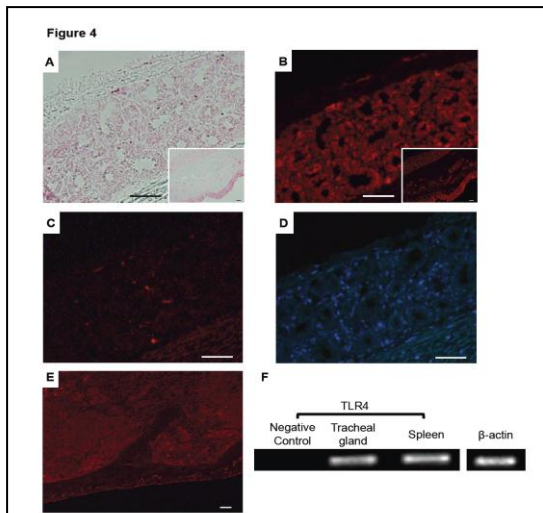


図5 蛍光染色と PCR での TLR4 の発現

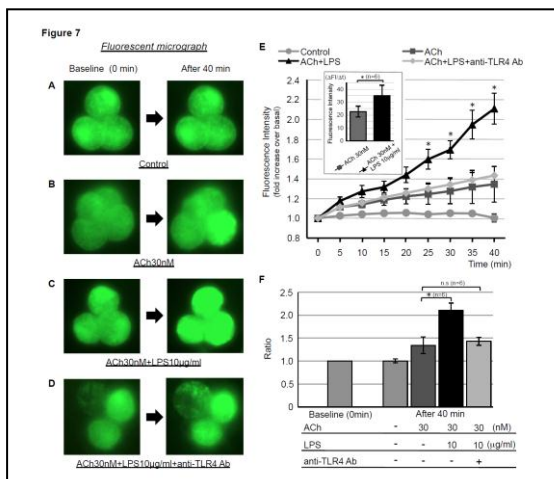


図6 LPS による細胞内 NO 合成

本研究によって、未知の外的調節因子の一つとして TLRs が機能し得ることを明らかにした。グラム陰性菌の関与する気道感染の際に、気道粘膜下腺に発現する TLR4 は即時的に気道分泌を増強し粘液線毛運動を亢進することで病原体排除に関与する可能性がある。ウイルス感染時にはこの機序は成立しないと考えると、臨床的に気道分泌が多くなるとい現象が説明できるかもしれない。生体に備わっている TLR サブタイプはそれぞれ種々の菌体成分を認識して、従来知られている自然免疫だけでなく気道粘膜の初期防御機構の賦活化という合目的な反応にも寄与していると考えられる。今回の研究成果は気道分泌を調整する初めての外因性調節因子を特定した報告であるとともに今後の気道分泌研究を進展させ、最終的には難治性気道炎症疾患の新規治療法の開発にも通じるという点で新展開を予感させるもので

あると信じている。

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 1 件)

1. Murakami K., T. Tamada, M. Nara, S. Muramatsu, T. Kikuchi, M. Kanehira, Y. Maruyama, M. Ebina and T. Nukiwa. Toll like receptor 4 potentiates Ca²⁺ dependent electrolyte secretion from swine tracheal glands Am J Respir Cell Mol Biol 45, 1101-1110, 2011、査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. Murakami, K., T. Tamada, M. Nara, S. Muramatsu, T. Kikuchi, M. Kanehira, M. Ebina and T. Nukiwa. Toll-like receptor 4 signaling as a potentiator in the airway submucosal gland secretion. ATS 2011 International Conference, May 15, 2011, Denver, CO USA
2. Muramatsu, S., T. Tamada, M. Nara, K. Murakami, M. Ebina and T. Nukiwa. The effects of clinically-used phosphodiesterase inhibitors on Ca²⁺-dependent electrolytes secretion from airway submucosal gland. ATS 2011 International Conference, May 15, 2011, Denver, CO USA
3. 村上康司, 玉田 勉, 奈良正之, 村松聡士, 菊地利明, 兼平雅彦, 海老名雅仁, 貫和敏博 気道粘膜下腺細胞における Toll 様受容体 4 シグナリングによる分泌調節機序の検討 第 51 回日本呼吸器学会総会 (東京) 2011 年 4 月 24 日
4. 村松聡士, 玉田 勉, 奈良正之, 村上康司, 海老名雅仁, 貫和敏博 気道粘膜下腺細胞からの電解質分泌に対する PDE 阻害効果の影響 第 51 回日本呼吸器学会総会 (東京) 2011 年 4 月 24 日
5. 奈良正之, 長岡深雪, 玉田 勉, 田村弦, 本郷道夫. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) によるブタ気道平滑筋の収縮機構. 第 52 回日本平滑筋学会総会 (シンポジウム: 炎症と平滑筋) (仙台) 2010 年 6 月 30 日

6. Murakami, K., T. Tamada, M. Nara, S. Muramatsu, T. Kikuchi, M. Kanehira, M. Ebina and T. Nukiwa. TLR4 signaling as a potentiator in the airway submucosal gland secretion. European Respiratory Society Annual Congress, September 20, 2010, Barcelona, Spain
7. Murakami, K., T. Tamada, M. Nara, T. Kikuchi, M. Ebina and T. Nukiwa. Toll-like receptor signaling as a potentiator in the airway submucosal gland secretion. ATS 2010 International Conference, May 15, 2010, New Orleans, LA USA
8. 村上康司、玉田 勉、奈良正之、菊地利明、海老名雅仁、貫和敏博. 気道粘膜下腺細胞における Toll 様受容体シグナリングによる分泌調節機序の検討 第50回日本呼吸器学会総会（京都）2010年4月23日

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉田 勉 (TAMADA TSUTOMU)

東北大学・病院・助教

研究者番号：80396473

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者