

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06180

研究課題名(和文) 気管繊毛運動と液流の解析による呼吸器疾患病態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of respiratory diseases through analyses on the beating of tracheal cilia and resulting fluid flow

研究代表者

政池 知子 (Masaike, Tomoko)

東京理科大学・創域理工学部生命生物科学科・准教授

研究者番号：60406882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：呼吸器疾患の解明は現代の重要な課題である。本研究ではアレルギー関連微粒子がマウス気管の粘液繊毛輸送に与える影響を評価した。まず、プロテアーゼであるパパインは細胞傷害を引き起こし、ATPの漏出により繊毛運動周波数を低下させ、液流の流速低下をきたす。さらに、パパインによる内部構造の破壊が起こると、ATPを補充しても繊毛運動が回復しなくなる。次に、卵白アルブミンを投与すると、アレルギー反応により粘液繊毛輸送機能が低下する。最後に、不定形の蛍光標識キチンは輸送速度が小さく気管上皮繊毛の上に堆積するが、溶液の粘性が高いと沈降速度が低下することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気管内腔と上皮内部の両側からアレルギーの原因物質が接触した場合に気管上皮に構造・機能的にどのような影響が起こるかを評価する実験系を構築することができた。この研究により微粒子の輸送速度、繊毛運動の三次元パラメーター、アレルギーの関係が明らかになる。本研究においては、直接的な細胞傷害は繊毛の脱離や運動性の低下を引き起こし、アレルギー反応も粘液繊毛輸送を低下させることが示唆された。一方、cAMP-PKAシグナル伝達経路の活性化は繊毛運動の速度と振幅を増加させるため、プロカテロールなど本シグナル伝達を活性化させる薬剤は液流形成能を向上させる効果があるのではないかと推察される。

研究成果の概要(英文)：Respiratory diseases have become major issues in modern societies. In the present research project, we evaluated the effects of microparticles on mucociliary clearance. Damages to epithelial cells by a protease papain caused leakage of ATP, which resulted in a decrease in frequency of ciliary beating. In the cases the cells are damaged further, supplementation of ATP did not cause recovery of mucociliary clearance as structures inside cells that are responsible for motility were irreversibly damaged. Next, allergy caused by ovalbumin was found to decrease frequency and asymmetry of beating, and they resulted in slow flow rate. Finally, particles of chitin tend to fall onto cilia, but sedimentation rate is attenuated by the increase in viscosity of the solution.

研究分野：生物物理学

キーワード：粘液繊毛輸送 気管繊毛 繊毛軸糸 繊毛運動 三次元 粘液流 繊毛打

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

喘息や COPD、新型コロナウイルス感染症、繊毛病由来の気道の異常など、人類は多様な呼吸器疾患に直面しており、病態の解明と治療が重要な課題となっている。これらの疾患に關与する原因物質への反応や気管の状態、粘液繊毛輸送への影響の評価は発症メカニズム解明のために重要であり、また薬剤への応答評価は治療薬開発の突破口となる可能性を内包している。そこで、本研究では微粒子が気管上皮の状態と繊毛運動に及ぼす影響および液流形成能に与える影響を定量的に評価することを目的として、研究を開始した。

2. 研究の目的

気管内腔に喘息の原因物質の微粒子を導入したときの細胞表面への堆積と繊毛運動の変化およびそれがもたらす液流形成および排出能への影響を調べ、呼吸器疾患の病態解明につなげることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、哺乳類のモデル動物としてマウスを対象とし、マウスを解剖後に気管を摘出して実験を行った。

まず縦割りの半円筒を調製して、繊毛運動により液流が形成される内腔を蛍光顕微鏡により観察した。この方法には2通りの実験方法がある。

1つ目は、トンネルを形成するように半円筒をガラス基板上に伏せて置き、倒立顕微鏡を用いて内腔の液流をビーズの移動速度として観察する方法である。この方法は、内腔が密閉空間になるため、液流が安定するため流速を安定して評価できるという優れた特徴がある。ただし、生きているマウスの腹側の半円筒状気管を上下逆向きにして観察することから、重力による微粒子の堆積を評価するには適していない。

2つ目は、繊毛が生えている気管内腔を上に向け、水浸の対物レンズをシャーレの溶液に浸して内腔に近づけ、正立顕微鏡で観察する方法である。この実験系は微粒子の堆積を観察するのに適しているため、蛍光標識したキチンの挙動を調べるために使用した。しかし、この方法では内腔がトンネル状ではなく上方が開放系になることや対物レンズが直接上皮に近接するためドリフトが起こりやすく、不安定な実験系であることがデメリットと言える。

この2つの方法では、液流測定基準として繊毛先端に結合して往復運動する蛍光ビーズに焦点が合う高さを $0\ \mu\text{m}$ と定義し、内腔に向かう高度と液流の関係を検証した。その際には、粘性の異なる液体を添加して流速に及ぼす影響の評価を行い、さらに、生体内での状態を模倣するため粘性の異なる2層の液体を上皮に重ね、液流に与える影響を調べる実験も行った。

またこの実験系で $0\ \mu\text{m}$ の基準面を決めるために用いた繊毛先端のビーズを三次元位置検出顕微鏡によっても観察を行い、繊毛運動を球面近似して三次元パラメータを測定した。

以上、液流と繊毛運動を計測するこの実験は、アレルギーを誘導した場合や、気管上皮に細胞傷害が発生した場合、刺激を与えたとき、また、薬剤を添加した場合の効果を見積もるのに活用した。また、切り出した気管組織については、固定化を行って簡易型の電子顕微鏡による撮影を行い、繊毛密度の計測を試みる実験にも使用した。

次に、マイルドなプロテアーゼであるディスパーゼを用いて気管上皮細胞層を剥離し、微分干渉顕微鏡を用いて繊毛運動を観察する実験を行った。この方法では、運動周波数の計測、繊毛密度の評価が可能となった。さらに、ストレプトリジン O を用いて上皮細胞の細胞膜に細孔を形成し、外液の影響を調べる実験系を立ち上げた。これらの手法により、外液の ATP や ADP の濃度に呼応して繊毛運動が変化するセミンタクト細胞の挙動を見ることができるようになった。また、喘息の原因物質となるパピインで処理した場合に上皮繊毛がどのように変化するかを調べることが可能となった。

最後に、摘出した気管から繊毛を単離し、Triton-X で脱膜した単離軸系を対象とした実験も行った。この実験系では、蛍光ビーズを軸系の先端に結合し、周囲の影響を受けない単一繊毛の三次元運動を高空間分解能・高時間分解能で計測することが可能である。また、軸系が溶液に直接曝されているため、溶液組成が運動に与える効果を明確に評価することができるのが特徴である。本研究では、これまでに評価を行ってきた基本的なヌクレオチド組成の効果だけでなく、繊毛細胞内のシグナル伝達による運動の変化を見積もることに挑戦した。具体的には、cAMP-PKA シグナル伝達経路を *ex vivo* で再現し、繊毛運動に与える影響を評価した。

以上、当初予定した気管上皮への微粒子の堆積とその影響の評価にとどまらず、粘液繊毛輸送機能を多角的に評価する実験系を構築することができた。

4. 研究成果

(1) アレルギー関連微粒子が気管上皮細胞に与える影響

アレルギー反応を引き起こす微粒子や、そのアジュバントが粘液繊毛輸送に及ぼす影響には大きく2種類があると結論付けられる。

一つ目は、繊毛細胞の細胞傷害である。プロテアーゼの一種であるパピンを気管上皮細胞層に作用させると上皮が損傷を受け、繊毛運動周波数が低下することがわかった。その原因は、細胞内のATPの漏出である。外液にATPを補充すると繊毛運動が回復する場合が多いというのがその証拠である。しかし、処理するパピンの濃度を高め、影響が大きくなる条件にすると繊毛運動は外液ATPでは回復しなくなる。このことは、プロテアーゼによる細胞傷害が単なる膜の損傷ではなく、細胞内部の軸糸構造を破壊するなど、より深刻な事態を引き起こすというメカニズムが考えられる。また、この条件では細胞からの繊毛脱離や、運動を示さない繊毛の増加もみとめられた。これらの結果は、ストレプトリジン0を用いて膜に細孔を形成しセミンタクト化した場合素直にATPやADPへの応答がみとめられるのとは異なり、細胞の内部構造が損傷を受けていると考えられる。

二つ目は、アレルギー反応による繊毛運動の低下である。東京理科大学・生命医科学研究所の協力のもと、細胞傷害を与えない卵白アルブミンによるアレルギー反応を誘導したマウスの気管上皮観察を行った。その結果、免疫反応がみとめられる条件において、繊毛運動と液流が極端に低下することがわかった。このことは、気管内腔からアクセスしたプロテアーゼによる直接的な細胞傷害だけでなく、アレルギー反応が原因となり気管組織内部からの影響で粘液繊毛輸送が低下することを示唆している。

(2) 微粒子排出の実態

次に、気管からの異物排出能に焦点をあてる。モデル微粒子として使用した直径1 μm の蛍光ポリスチレンビーズと蛍光標識キチンを比較すると、不定形の蛍光標識キチンの方が気管上皮に堆積しやすいが、溶液の粘性が高いと沈降速度が低下することが示唆された。ただし、粘性が高い場合には輸送速度も低下するため、沈降と速度のトレードオフであることがわかる。蛍光標識キチンは移動速度が変動するが、これは不定形な形状に起因すると考えられる。

蛍光ビーズの輸送計測では、繊毛先端からの高さに応じて輸送速度が低下するが、繊毛運動による溶液の攪拌の影響が少なくなるため、高度が上昇するに従い、液流が一様になり定常流となった。繊毛先端が位置する高さでの液流は振動を伴う非一様流であったが、この流れはホコリやキチン、プロテアーゼなど呼吸器疾患の原因となる微粒子の吸着を防ぎ、高い高度での定常流まで押しあげる効果もあるのではないかと考えられる。人工的に高粘度と低粘度メチルセルロース溶液を気管上皮にのせて液流観察を行った実験では、境界付近と考えられる高さで逆方向の流れがみとめられるケースもあった。これも、繊毛が運動する高さの液流が乱れており、沈降してくる微粒子の吸着を防ぐ効果があるものと考えられる。

このように、観察された液流や微粒子の挙動はおそらく流体力学的にはもっともな性質を示していただけであると捉えることもできるが、実際に哺乳類の気管が発生させる溶液流が異物排出にとって理にかなった性質を示すことを実証できた意義は大きいと考えている。

(3) アレルギー原因物質や活性化薬による繊毛運動の変化

本研究では繊毛運動の周波数だけでなく、運動のパラメーターを詳細に解析した。大きな発見としては、周波数が高いことは、液流形成の向上効果をもたらすとは限らないということである。周波数が高ければ少なくともある程度の液流が期待できるというのは定性的に真実ではあるとも考えられるが、液流の流速自体が大きくなる決定打であるとは限らない。

液流の流速が最大になるのは、周波数と振幅がともに大きく、運動の非対称性が確保されている場合である。これまで行ってきた往復運動の非対称性が減弱したモデルマウスの実験からも同様の傾向が示唆されていたが、本研究によりそれがより明確になったと考えている。

液流低下がもたらされた例として、アレルギー反応を起こしたマウスの気管の繊毛運動の非対称性が低下したケースが挙げられる。液流形成能が向上したケースでは、運動の振幅が大きくなり、それに伴って有効打と回復打の速度がともに増加し、周波数が安定していた場合が多い。cAMP-PKA シグナル伝達や喘息薬プロカテロールによる繊毛運動の活性化がみとめられたが、これらの運動パラメーターがそのパターンにあてはまる。このように、一口に繊毛運動の活性化、低下と言っても、その各パラメーターを調査することがいかに重要であるかがわかる。

(4) 展望

本研究では、アレルギー原因微粒子が気管上皮繊毛の運動、ひいては液流に与える影響を定量化することに成功した。今後はこのアッセイを病態や薬剤効果の定量化に応用していくことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋秀, 上林悠人, 田中信清, 中江進, 池上浩司, 政池知子
2. 発表標題 パパインの鼻腔内投与がマウス気管上皮に与える影響
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第81回学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 上林悠人, 中江進, 田中信清, 池上浩司, 政池知子
2. 発表標題 パパインによるマウス気管上皮組織の損傷と粘液纖毛輸送への影響
3. 学会等名 東京分子モーターショー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石井大暉, 田中信清, 池上浩司, 政池知子
2. 発表標題 単一マウス気管纖毛軸系のin vitro三次元運動に対するcAMP-PKA シグナル伝達の効果
3. 学会等名 東京分子モーターショー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 師井佑, 池上浩司, 田中信清, 政池知子
2. 発表標題 粘液と纖毛周囲液の二層構造を疑似的に再現したマウス気管上皮による異物排出機能の解析
3. 学会等名 第13回纖毛研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋秀, 田中信清, 中江進, 池上浩司, 政池知子
2. 発表標題 パバインを体内に投与したマウスの気管上皮構造と粘液纖毛輸送機能
3. 学会等名 第13回纖毛研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市川達也, 世利謙太郎, 田中信清, 池上浩司, 政池知子
2. 発表標題 セミインタクト化マウス気管上皮細胞の3次元纖毛運動解析
3. 学会等名 第61回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山谷文洋, 田中信清, 政池知子
2. 発表標題 Ex vivoで再現するマウス気管上皮の粘液纖毛クリアランス
3. 学会等名 東京分子モーターショー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 世利謙太郎, 田中信清, 池上浩司, 政池知子
2. 発表標題 セミインタクト化マウス気管上皮細胞の纖毛運動
3. 学会等名 第12回纖毛研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉村将, 田中信清, 池上浩司, 政池知子
2. 発表標題 マウス気管繊毛軸系の3次元運動に対する非加水分解性ATPアナログとcGMPの効果
3. 学会等名 第11回繊毛研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究は広島大学との共同研究として開始され、途中から東京理科大学・生命医学研究所との共同研究としても発展した。2024年日本顕微鏡学会・第81回学術講演会においては、本研究の研究成果により、学生が優秀ポスター賞を受賞した。

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	池上 浩司 (Ikegami Koji) (20399687)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	
研究分担者	中江 進 (Nakae Susumu) (60450409)	広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授 (15401)	

	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
研究協力者	田中 信清 (Tanaka Nobukiyo)		

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
---------	---------