

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591150

研究課題名(和文) Toll様受容体システムによる抗原依存的な気道分泌調節機構の解明

研究課題名(英文) A study on the mechanisms of antigen-dependent potentiation in airway secretion via TLRs

研究代表者

玉田 勉 (TAMADA, TSUTOMU)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：80396473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Toll様受容体(TLR)システムによる抗原依存的な気道分泌調節機構は未解明である。本研究ではTLR2, 3, 4, 5の各サブタイプの気道分泌に対する影響、分泌細胞での発現、細胞内メカニズムを解析した。その結果、慢性気道感染の増悪に強く関与するグラム陰性菌である緑膿菌が有するLPSやFlagellinが、気管粘膜下腺細胞上に発現するTLR4やTLR5をそれぞれ刺激し、NO/cGMP/PKG系を介して分泌を増強することを明らかにした。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)：The direct relationship between Toll like receptors (TLRs) and airway serous secretion has not been well investigated. Here, we focused on whether TLR5 ligand flagellin, which is one of the components of *Pseudomonas aeruginosa*, is involved in the upregulation of airway serous secretion. We revealed a novel potentiating effect of Flagellin/TLR5 signaling in airway serous secretion that was independent of LPS/TLR4 signaling. These findings suggest that TLR5 takes part in the airway mucosal defense systems as a unique endogenous potentiator of airway serous secretions and that NO/cGMP/cGK signaling is involved in this rapid potentiation by TLR5 signaling. Thus, it is suggested that pathogens with these TLRs-ligands are able to cause hypersecretion in the airway even in cases of colonization. We believe that these findings could offer a new therapeutic candidate for controlling airway secretion in chronic inflammatory airway diseases, such as COPD and severe asthma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：気道分泌 パッチクランプ Toll様受容体 粘膜免疫 Flagellin Nitric oxide

1. 研究開始当初の背景

Toll 様受容体(Toll like receptor: TLR)は生体に備わる自然免疫機構の一部として、病原微生物や外来抗原の認識および排除に中心的役割を担うことで注目されている。一方で、気道の粘膜免疫機構において気道粘膜下腺から分泌される粘液や水分・電解質および知れによって機能が維持される粘液線毛輸送も防御機構の維持に重要であることは明白である。しかし、TLR と気道分泌の両者の直接的な生理的調節機構および種々の疾患における分泌調節機構については未だ解明されていない。

以前より研究代表者は気道分泌の生理的制御の解明という観点から疾患治療へのアプローチを進めてきた。申請者は科学研究費補助金 若手研究 B(平成 18~20 年度 課題番号 18790526)を得て、慢性気管支炎や気管支喘息など種々の炎症性気道疾患では気道粘膜で一酸化窒素(NO)産生が亢進しており生理的条件下では気道分泌を促進する作用があるものの、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二相性の複雑な調節機構が存在する事実を解明し報告している(図 1)。

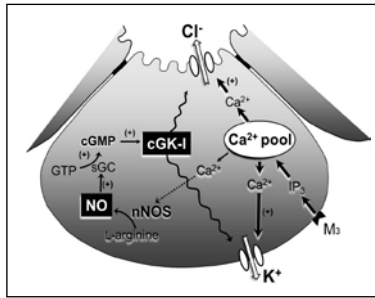


図 1 気道粘膜下腺細胞は細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$)の適切な上昇によって水・電解質分泌を行っている。研究代表者は内因性 NO が分泌活動の維持に有利に働くことを示した (AJRCMB 誌に掲載)。

気道では主に気道上皮細胞に発現している TLR が炎症性サイトカインの産生に寄与するという報告が多いが、TLR と気道粘膜下腺細胞との相互作用については研究代表者以外からの報告は認められていない。研究代表者は、TLR4 が気道分泌腺細胞表面に発現し、生理的条件下でその活性化によって $[Ca^{2+}]_i$ を著しく上昇させることなく分泌活動を増強する機序を解明した。しかし、ヒトで発現する他の TLR サブタイプにおける包括的機能解析は未だ行われていない。

2. 研究の目的

本研究では従来の研究代表者の成果さらに発展させて TLR2, 3, 5, 7, 9 の候補サブタイプでもそれぞれの認識抗原によって惹起される分泌調節の臨床的意義を完全解明することで、将来的には気道分泌異常が深く関与する難治性慢性気道炎症疾患に対する新

規治療戦略の確立に寄与することを可能にする。

3. 研究の方法

本研究は以下の(1)~(4)の方法を用いる。
 (1) 単離気道粘膜下腺に対して電気生理学的手法(パッチクランプ法)を適用し、生体内と同様の環境下での水分・電解質分泌をイオン電流という形で検出する(図 2)。

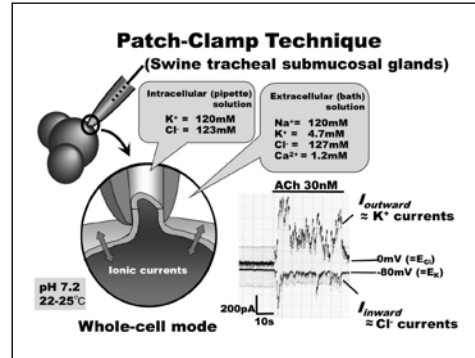


図 2 単離したブタ気道粘膜下腺細胞にパッチクランプ法を適用する。この段階まで丁寧に細胞処理することが非常に困難であり、世界中では研究代表者だけが可能な方法である。ホールセルモードによってパッチ膜以外の全ての膜電流が測定されるが、本研究では特に生体内における神経伝達物質である ACh によって惹起される生理的分泌に重要である K^+ と Cl^- の電流の解析を行う。

(2) 気道粘膜下腺細胞の分泌活動に影響を及ぼす TLR サブタイプを選択し、申請者らがすでに報告した TLR4 (申請者論文[1]) 以外の候補 TLR に対するリガンドの調節効果を確認する。種々の報告から、気道粘膜に侵入し炎症を惹起する外来微生物の菌体成分を認識するものに注目し、TLR4 以外に TLR2, TLR3, TLR5, TLR7, TLR9 を候補として選択し機能解析を行う。具体的には下表に示したそれぞれのリガンドである Peptidoglycan(PGN)、poly (I:C)、Flagellin、Imiquimod(R-837)あるいは R-848、CpG DNA を用い、単独で電流惹起するかあるいは ACh による生理的分泌活動に対する増強効果/抑制効果を有するかどうか検討する。

TLRサブタイプ	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR7	TLR9
リガンド	PGN	poly(I:C)	LPS	Flagellin	Imiquimod, R-848	多量体 CpG DNA
主な認識物質	グラム陽性菌	dsRNAウイルス	グラム陰性菌	有鞭毛細菌	ssRNAウイルス	細菌ウイルス
細胞内局在	細胞膜	細胞内ライゾソーム	細胞膜	細胞膜	細胞内ライゾソーム	細胞内ライゾソーム
下流シグナル経路	MyD88依存性 TRAP	MyD88非依存性 TRIF/TRAM	MyD88依存性/MyD88非依存性/MyD88非依存性/MyD88非依存性	MyD88依存性 IRAK	MyD88依存性 IRAK	MyD88依存性 IRAK

(3) 関与が示唆された TLR サブタイプの mRNA レベルおよび蛋白レベルでの発現をそれぞれ RT-PCR 法および免疫蛍光染色法によって確認する。

(4) 関与する細胞内調節経路を特定するため

にそれぞれの TLR 活性化によって動員される経路を種々の阻害剤および候補セカンドメッセンジャーアッセイを用いてその関与を確認する。特に研究代表者らの過去の報告から、気道分泌腺における増強系の細胞内調節経路としては、(i) $[Ca^{2+}]_i$ の増加、(ii) NO/cGMP/cGK 系などが想定され、それぞれ(i) $[Ca^{2+}]_i$ 測定蛍光プローブ Fura-2 を用いた経時的 $[Ca^{2+}]_i$ 測定、(ii) NOS 阻害剤や cGK 阻害剤のイオン電流に対する抑制効果および生細胞中 NO イメージング用蛍光プローブ DAF-2DA による NO の直接経時的測定(図 3)を中心に行う。

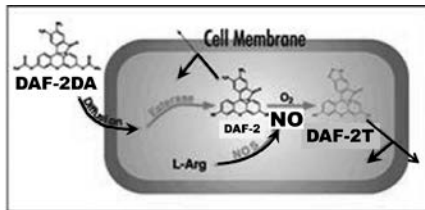


図 3 細胞内 NO イメージング

4. 研究成果

TLR4 に関しては研究代表者らによって既に生理的条件下でその活性化によって $[Ca^{2+}]_i$ を著しく上昇させることなく分泌活動を増強する機序を解明している。このため本研究では TLR2、TLR3、TLR5、TLR7、TLR9 を候補として選択し機能解析を行った。編研究ではそれぞれのリガンドである Peptidoglycan(PGN)、poly (I:C)、Flagellin、Imiquimod(R-837)あるいは R-848、CpG DNA を用いた。結果のまとめは図 4 に示した。

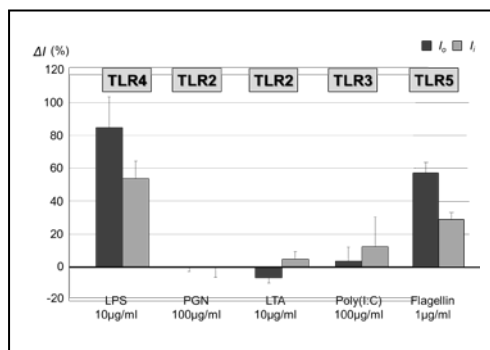


図 4 気道粘膜下漿腺細胞の Cl^- イオン電流に対する各種 TLR リガンドの効果

TLR2, 3, 4, 5 リガンドのうち、グラム陰性菌に含まれる LPS および緑膿菌に含まれる flagellin が分泌増強効果を有する。ウイルスに相当する poly (I:C) やグラム陽性菌に含まれる PGN や LTA には同様の増強効果は認めなかった。

I_o : K^+ イオン電流、 I_i : Cl^- イオン電流、 ΔI : ACh 30nM 刺激に対する ACh+TLR リガンド刺激時のイオン電流の増加率

本研究では TLR5 リガンドである Flagellin

の気道分泌に対する影響について特に詳細に検討を加えた。

まず ACh により惹起されるイオン電流に対する Flagellin の効果を検討した(図 5)。

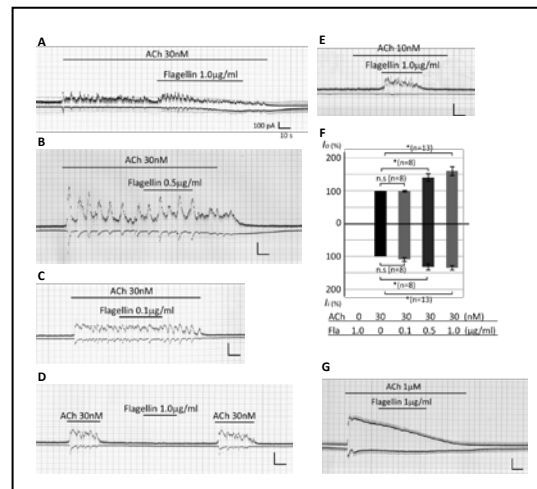


図 5 気道粘膜下腺のイオン電流に対する Flagellin の効果

Flagellin 1.0ug/ml は ACh 刺激による外向き電流 I_o ($=K^+$ 電流) を 1.6 倍、内向き電流 I_i ($=Cl^-$ 電流) を 1.4 倍と有意に増強した。Flagellin 0.5ug/ml も同様に I_o を 1.4 倍、 I_i を 1.3 倍と有意に増強した(図 5)。Flagellin 0.1ug/ml は I_o および I_i に対して有意な増強効果を示さなかった。Flagellin 1.0ug/ml 単独刺激では明らかなイオン電流を惹起しなかった。ACh 10nM という通常ではイオン電流を惹起しない極めて低濃度 ACh に Flagellin を上乗せするとイオン電流を惹起した。一方で、非生理的に極めて高い濃度 ACh (1uM 以上) で刺激すると、いわゆる脱感作という一過性の大きな反応が生じ間もなく減衰するが、このような過度の刺激下では ACh 30nM で刺激した場合と異なり、Flagellin は ACh 1uM 刺激により惹起されるイオン電流に対し増強効果は示さなかった。

以上より Flagellin は生理的な ACh 刺激下においてのみ用量依存的にイオン電流を増強することが示された。

次に、上で確認された Flagellin による分泌増強効果において TLR5 との結合が関与しているかどうか検討した。抗 TLR5 ブロッキング抗体(anti-TLR5 Ab)、非特異的免疫グロブリン G(non-specific IgG)を用いた。また、Flagellin による増強効果が TLR4 には依存していないこと、LPS の ACh によるイオン電流に対する増強効果が TLR4 との結合を介したものであり、TLR5 には依存していないことを確認するためそれぞれ特異的 TLR4 拮抗剤(LPS-RS)及び抗 TLR5 ブロッキング抗体を用いて検討した(図 6)。

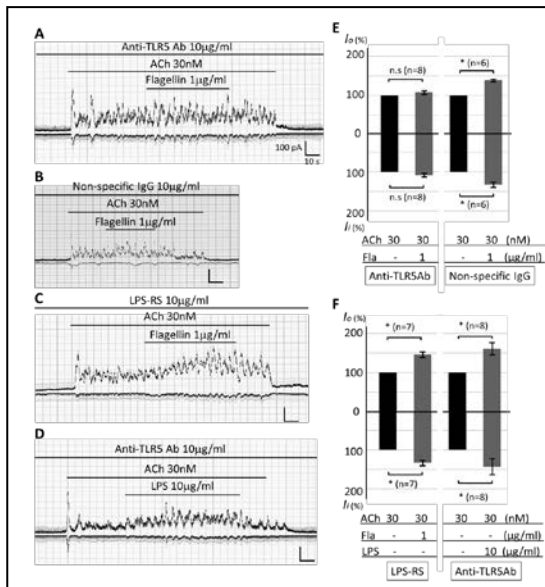


図 6 TLR5 阻害および TLR4 阻害下における Flagellin の効果

ヤギ由来抗 TLR5 ブロッキング抗体 (10 μ g/ml) で細胞を前処理すると、Flagellin の ACh によるイオン電流に対する増強効果は完全に消失した。抗体の非特異的な阻害作用を否定するためヤギ由来非特異的免疫グロブリン G で細胞を前処理しても有意な増強効果が保持されていた。特異的 TLR4 拮抗剤である LPS-RS を前投与しても、Flagellin 刺激は有意な増強効果が保持されていた。ヤギ由来抗 TLR5 ブロッキング抗体 (10 μ g/ml) で細胞を前処理しても Flagellin の有意な増強効果は保持されていた。以上より、Flagellin による増強効果が TLR4 には依存していないこと、TLR5 との結合及び活性化が必須であることが確認された。

ブタ気道粘膜下腺細胞膜上における TLR5 の発現については蛍光免疫染色法 (蛋白レベル) と RT-PCR 法 (mRNA レベル) の両方で確認された (図 7)。

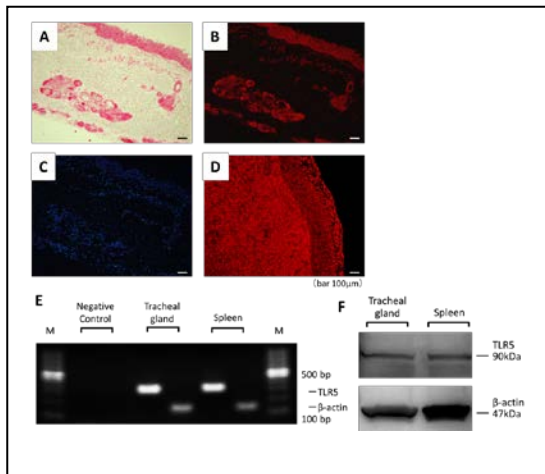


図 7 気道粘膜下腺細胞における TLR5 発現

さらに、Flagellin による分泌増強効果の細胞内機序について、過去の研究代表者らによる TLR4 に関する報告と同様に、細胞内 NO 増加が Flagellin によるイオン電流増強効果の細胞内機序にも関与するかを確認するため、2 種類の非特異的 NO 合成酵素阻害剤、L-NAME (N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) 及び L-NMMA をそれぞれ前投与することで NO 合成酵素を非特異的に阻害し Flagellin の増強効果を検討した。L-NAME (1mM) および L-NMMA (1mM) 存在下では増強効果は完全に消失した (図 8)。NO 合成酵素には上皮型、神経型及び誘導型の 3 種類のサブタイプが存在が知られている。その中で誘導型 NO 合成酵素が Flagellin によるイオン電流増強効果の細胞内機序に関与するかを検討するために、誘導型 NO 合成酵素阻害剤である L-NIL を前投与し誘導型 NO 合成酵素を特異的に阻害し Flagellin の増強効果を検討した。L-NIL (40 μ M) には増強効果を抑制する効果は認めなかった。3 種類の NO 合成酵素の中で誘導型 NO 合成酵素は Flagellin/TLR5 シグナルによるイオン電流増強効果の細胞内機序に対する関与が薄いことが確認された。NO の下流シグナルの 1 つである cGK が関与するかどうか確認するため、2 種類の cGK 阻害剤、すなわち KT-5823 及び Rp-8-Br-cGMP を前投与し cGK を特異的に阻害した条件下で Flagellin による増強効果を検討した。KT-5823 (1 μ M) および cGK 競合的阻害剤である Rp-8-Br-cGMP (5 μ M) 存在下で増強効果が完全に消失した (図 8)。以上より、Flagellin/TLR5 シグナルによる気道粘膜下腺からのイオン電流増強効果は NO/cGMP/cGK 経路の活性化を介していることが強く確認された。

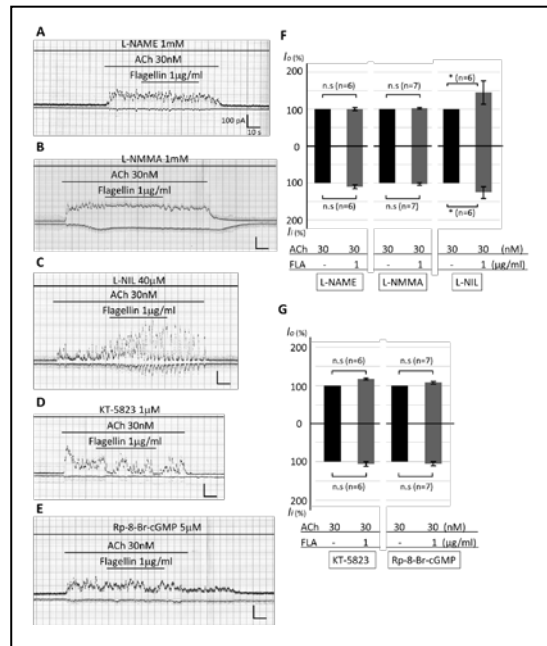


図 8 Flagellin の増強効果における細胞内 NOS および NO/cGMP/cGK の関与

さらに、Flagellin 刺激による細胞内 NO 合成が実際に行われているかどうか、NO 感受性蛍光プローブを用いて検討した。無刺激の対照群では観察前後における緑の蛍光強度に変化は見られなかったが、ACh 30nM 刺激群では蛍光強度の軽度増加が認められ、ACh+Flagellin 群では ACh 単独群と比較し更に強い蛍光強度の増加が認められた。一方で ACh+Flagellin+anti-TLR5 Ab 群では蛍光強度の増加は ACh 群とほぼ同程度となった(図 9)。これらの結果は電気生理学的実験で示された結果と同じ傾向を示し、Flagellin は TLR5 を介して即時的に細胞内 NO 合成を増加し ACh により惹起されるイオン電流を増強することが示唆された。

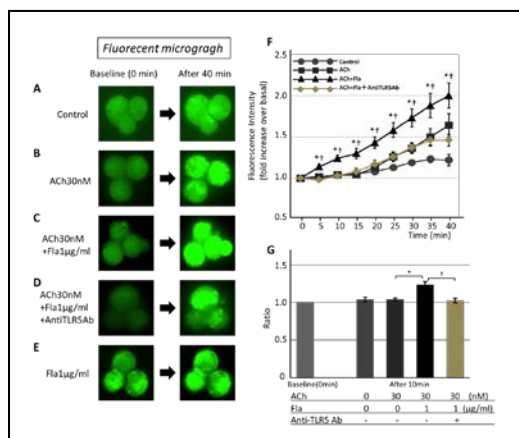


図 9 NO 感受性蛍光プローブによるブタ気道粘膜炎下腺での細胞内 NO 合成の測定

Flagellin による増強効果が細胞内カルシウム濃度($[Ca^{2+}]_i$)の上昇を伴うのか否かについて検討を加えた。図 10 に示すように、Flagellin は ACh 30nM で惹起される $[Ca^{2+}]_i$ に影響を及ぼさなかった。

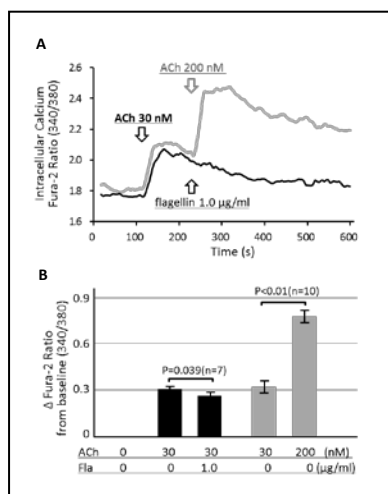


図 10 Fura-2 を用いた $[Ca^{2+}]_i$ 測定

本研究では、生理的な濃度の ACh 刺激で生じた分泌に対し Flagellin/TLR5 シグナルが LPS/TLR4 シグナルを介することなく、

NO/cGMP/cGK 経路の活性化を介して、 $[Ca^{2+}]_i$ の更なる上昇を伴わない機序で増強効果を示すことを明らかにした。慢性気道炎症疾患における緑膿菌感染に関しては LPS/TLR4 シグナル及び Flagellin/TLR5 シグナルのどちらも重要であると考えられるが、TLR4 シグナルだけでなく、TLR5 シグナルもまた気道過分泌を引き起こし、慢性気道炎症疾患の急性増悪に寄与する。本研究より明らかになった気道における追加分泌の調節機序が COPD、重症喘息のような慢性気道炎症疾患患者の過分泌を適切に調節し、感染増悪や無気肺の予防、QOL を改善する新たな治療標的として寄与するものと考えられる。

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 3 件)

① 玉田 勉、奈良正之、村上康司、村松聡士、一ノ瀬正和 解説【基礎】 TLR と気道分泌 呼吸 33(10), 971-981, 2014 一般社団法人 呼吸研究 査読無

② Murakami K., T. Tamada, M. Nara, S. Muramatsu, M. Kanehira, M. Ebina, T. Kikuchi, T. Nukiwa and M. Ichinose. Study on Secretion Regulation Mechanism by Toll-like Receptor 4 Signaling in Submucosal Glandular Cells of the Airway. Proceeding of Airway Secretion Research 19, 13-16, 2013 査読無

③ Muramatsu S., T. Tamada, M. Nara, K. Murakami, T. Kikuchi, M. Kanehira, Y. Maruyama, M. Ebina, T. Nukiwa and M. Ichinose. Flagellin/TLR5 signaling potentiates airway serous secretion from swine tracheal submucosal glands. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.; 305: L819-L830, 2013 査読有

[学会発表] (計 11 件)

① 村松聡士、玉田 勉、奈良正之、村上康司、菊地利明、一ノ瀬正和 TLR7,8 リガンドの気道粘膜炎下腺細胞への影響 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 大阪国際会議場 (大阪市) 2014 年 4 月 26 日

② Murakami, K., T. Tamada, M. Nara, S. Muramatsu, T. Kikuchi, M. M. Ebina and M. Ichinose. A switching effect of indacaterol on anion secretions from Cl⁻ to HCO₃⁻ in airway submucosal gland cells. ATS 2013 International Conference, May 19, 2013, Philadelphia, PA(USA)

- ③ 玉田 勉 シンポジウム「感染症による呼吸器疾患の急性増悪の病態と治療」慢性気道感染症における気道構成細胞の過剰反応とその制御 第53回日本呼吸器学会学術講演会 東京国際フォーラム(東京都千代田区) 2013年4月21日
- ④ 村松聡士、玉田 勉、奈良正之、村上康司、菊地利明、兼平雅彦、海老名雅仁、一ノ瀬正和 Flagellin/TLR5 シグナルの気道分泌に対する影響 第53回日本呼吸器学会総会東京国際フォーラム(東京都千代田区) 2013年4月20日
- ⑤ 村上康司、玉田 勉、奈良正之、村松聡士、菊地利明、海老名雅仁、一ノ瀬正和 気道粘膜下腺細胞からの Cl⁻および HCO₃⁻分泌調節におけるインダカテロールの関与 第53回日本呼吸器学会総会 東京国際フォーラム(東京都千代田区) 2013年4月20日
- ⑥ Murakami, K., T. Tamada, M. Nara, S. Muramatsu, T. Kikuchi, M. Kanehira and M. Ebina. TLR 4 signaling potentiates airway secretion from the swine submucosal gland via NO/cGMP/cGK pathway. European Respiratory Society Vienna 2012 Annual Congress, September 4, 2012, Vienna(Austria)
- ⑦ Muramatsu, S., T. Tamada, M. Nara, K. Murakami and M. Ebina Flagellin potentiates the Ca²⁺-dependent electrolytes secretion from airway submucosal gland in a TLR4-independent, TLR5-dependent and cGK-dependent manner. European Respiratory Society Vienna 2012 Annual Congress, September 4, 2012, Vienna(Austria)
- ⑧ Murakami, K., T. Tamada, M. Nara, S. Muramatsu, T. Kikuchi, M. Kanehira and M. Ebina. Toll-like receptor 4 signaling potentiates Ca²⁺-dependent electrolyte secretion from the airway submucosal gland by the activation of constitutive NO synthase. ATS 2012 International Conference, May 22, 2012, San Francisco, CA(USA)
- ⑨ Muramatsu, S., T. Tamada, M. Nara, K. Murakami and M. Ebina Toll-like receptor 5 potentiates Ca²⁺-dependent electrolytes secretion from airway submucosal gland ATS 2012 International Conference, May 22, 2012,

San Francisco, CA(USA)

- ⑩ 村松聡士、玉田 勉、奈良正之、村上康司、千葉茂樹、菊地利明、海老名雅仁、貫和敏博 Toll 様受容体 5 シグナルは気道粘膜の水-電解質分泌を増強する 第52回日本呼吸器学会総会 神戸国際展示場(神戸市) 2012年4月21日
- ⑪ 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52回日本呼吸器学会総会神戸国際展示場(神戸市) 2012年4月21日
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
玉田 勉 (TAMADA, TSUTOMU)
東北大学・病院・講師
研究者番号：80396473
- (2) 研究分担者
奈良 正之 (NARA, MASAYUKI)
東北大学・病院・特任教授
研究者番号：70374999