

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592583

研究課題名(和文)呼吸器線維芽細胞におけるコリントランスポーターの同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of choline transporters in respiratory tract fibroblasts

研究代表者

野中 学 (NONAKA, MANABU)

東京女子医科大学・医学部・臨床教授

研究者番号：70271351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：コリンは、全ての動物細胞において必須栄養素であり、細胞膜のリン脂質の合成やアセチルコリンの前駆体として利用されている。癌細胞において、細胞増殖との関連性が報告されている。我々は、慢性鼻副鼻腔炎に伴って形成される鼻茸中に増殖している線維芽細胞にはcholine transporter-like proteins (CTLs)が高発現し、増殖と密接に関係していることを明らかにした。またCTLsの機能を阻害することによりアポトーシスが誘導されることも証明した。新たに同定されたCTLsを介したコリン取り込み機構は、鼻茸ひいては慢性鼻副鼻腔炎治療における新規標的分子となりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Choline is essential for the synthesis of major membrane phospholipid phosphatidylcholine and neurotransmitter acetylcholine. Elevated levels of choline and up-regulated choline kinase activity have been detected in cancer cells. We found that choline transporter-proteins (CTLs) are highly expressed in nasal polyp fibroblasts and are also involved in abnormal proliferation. Identification of this new CTLs-mediated choline transporter system provides a potential new target for therapeutic intervention.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：コリントランスポーター 線維芽細胞 慢性鼻副鼻腔炎

1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞は、皮膚、粘膜など人の各臓器の間質に、支持細胞として存在している。慢性炎症に伴う線維化の過程において、線維芽細胞は、増殖し、細胞外基質(コラーゲンなど)産生を通して重要な働きをしていることはよく知られている。近年、線維芽細胞はサイトカインやケモカインを産生することが解り、上皮細胞と同様に炎症反応に深く関わっていることが解っている。たとえば、RANTES、eotaxin、MCP-4産生を通しての好酸球遊走、TARC産生によるTh2細胞の遊走、MIP-3産生やTSLP産生による樹状細胞遊走と活性化に参与していると考えられつつある。さらに、血管透過性因子であるVEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)を産生し浮腫形成にも関与している可能性がある。実際、上気道の慢性炎症である、慢性鼻副鼻腔炎に伴う鼻茸には、線維芽細胞が増殖、活性化し、サイトカイン産生を通して、好酸球やTh2細胞の浸潤、樹状細胞の浸潤及び活性化、浮腫形成に寄与すると考えられる。肺線維症においても線維芽細胞が増殖、活性化、サイトカイン産生がみられ、その病態形成において中心的役割を担っている。また肺線維症の肺組織から線維芽細胞を単離すると、高い増殖能を持った線維芽細胞のcloneが存在すると報告されている。鼻茸から単離した線維芽細胞も、健全な鼻粘膜と比較して増殖能が高いことを我々は観察している。しかしこれら呼吸器における慢性疾患において、なぜ線維芽細胞の増殖能が、単離した環境下でも、高いのか不明である。

線維芽細胞は人の部位により性質が顕著に異なっている。このことは、同じ線維芽細胞でも、炎症の起こった部位により線維芽細胞の炎症における役割が異なっていることを意味している。たとえば呼吸器において、鼻副鼻腔線維芽細胞と肺線維芽細胞を比較すると次のような違いが存在する。鼻副鼻腔線維芽細胞は、LPSをはじめとする病原微生物由来物質(toll-like receptor ligands)に toll-like receptors(TLRs)を介して刺激され、種々のサイトカインを産生し自然免疫に携わっている。一方肺線維芽細胞はLPSに対する反応性はみられない。また線維化の過程に重要な働きをするTGFβ刺激により、肺線維芽細胞は細胞の分化が誘導され、筋線維芽細胞へ変換し、α1型コラーゲンを産生する。一方、鼻副鼻腔線維芽細胞は、筋線維芽細胞への分化がおこりにくく、α1型コラーゲンを産生しにくい。このような違いから鼻副鼻腔粘膜は、外界との門戸として線維芽細胞も動員して外来からの病原菌やウイルスから防御していると考えられる。またTGFβ刺激により組織を線維化に誘導するのに重要な筋線維芽細胞に変換されないことが、炎症を何度おこしても、一生を通じて線維化病変が鼻副鼻腔にきわめて少ないことを示している可能性がある。このように線維芽細胞は、

同じ呼吸器内においても、それぞれの特異性がある。コリンは、全ての動物細胞にとって重要な必須栄養素であり、細胞膜の構成成分であるリン脂質の合成に利用されている。コリンを利用するためには細胞内に取り込む必要がある。コリンの細胞内への輸送は、コリントランスポーターを介することが知られている。現在、コリントランスポーターとして、高親和性のコリントランスポーターである high-affinity choline transporter 1 (CHT1)と中間的な親和性を有する choline transporter-like proteins (CTLs)、および organic cation transporters (OCTs)の3つのグループが知られている。最近、癌細胞においてコリントランスポーターの機能、及び発現増強と細胞増殖との関連性が注目され、癌治療の標的分子になると考えられている。またヒト皮膚ケラチノサイトに CTL1 の subtype である CTL1a が機能的に発現していることが報告されている。さらにヒト CTL1 の subtype である CTL1c は、ヒト CD 抗原である CDw92 抗原と同一分子であり、樹状細胞の IL-10 (サイトカインの1つ)産生調節や発現をコントロールする自己調節グループとして、免疫細胞機能における役割も報告されている。しかし呼吸器における線維芽細胞におけるコリントランスポーターの発現や、その機能解析の検討は未だ行われていない。本研究では、高い増殖能を有する鼻茸(慢性鼻副鼻腔炎に伴い形成されるもの)中線維芽細胞や肺線維症由来線維芽細胞におけるコリン取り込み機構を明らかにし、コリン輸送に関するコリントランスポーターの分子実体の解明と細胞増殖、ひいてはサイトカイン産生との関連性について検討することを目的とする。このように線維芽細胞におけるコリントランスポーターの機能解析を行い、さらに特異的に発現するコリントランスポーターの機能を阻害することができれば、慢性鼻副鼻腔炎や肺線維症においてみられる線維芽細胞の異常増殖、サイトカイン産生を抑制することに繋がり、慢性鼻副鼻腔炎や肺線維症の治療戦略になると考えられる。

2. 研究の目的

慢性鼻副鼻腔炎には線維芽細胞が増殖している。線維芽細胞増殖はそれらの病態形成において、増殖やサイトカイン産生を通し主役をなすが、増殖の機序は不明である。それら線維芽細胞は、例えば癌細胞のように、細胞自身の増殖能が増強しているとされている。コリンは細胞にとって必須栄養素であり、細胞膜のリン脂質の合成に利用される。最近、コリン代謝と細胞増殖の関連が指摘されている。新規コリントランスポーターである choline transporter-like protein が癌細胞のコリン輸送を担っており、その輸送機能を抑制すると細胞増殖抑制やアポトーシスをおこす。本研究は、慢性鼻副鼻腔炎に伴い形成

される線維芽細胞のコリントランスポーターの発現を検討し、特異的に発現するコリントランスポーターを標的として線維芽細胞増殖を制御することで、新たな慢性鼻副鼻腔炎治療戦略を開発することを目的とする。

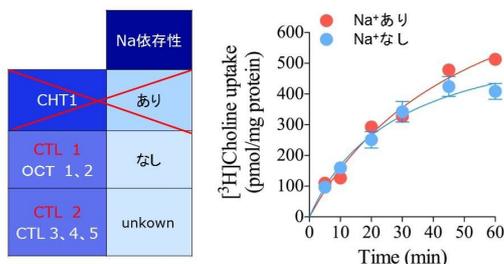
3. 研究の方法

培養鼻茸線維芽細胞における CTL ファミリー (CTL1-5)、CHT1、OCT1-3 の mRNA を real time-PCR 法で、およびタンパク質発現を Western blotting 法で検討する。鼻茸線維芽細胞に高発現ないしは特異的に発現しているコリントランスポーターにおける、 $[^3\text{H}]$ コリン取り込み機構の特徴を明らかにする。検討項目として、Na⁺依存性、Kinetics、薬物感受性、細胞内外の pH 依存性などを $[^3\text{H}]$ コリン輸送活性測定にて検討し、コリントランスポーターを介するコリン取り込み機構の生化学的特徴を明らかにする。培養鼻茸線維芽細胞の培養上清にコリン添加有無の状態、細胞の増殖の変化、アポトーシス誘導の有無を検討する。

4. 研究成果

コリントランスポーターの mRNA の発現を real time-PCR で、ウエスタンブロット解析でタンパク質発現を確認した。その結果 CTL1 と CTL2 の mRNA の高発現と蛋白質の発現が明らかになった。コリンの取り込みは、Na⁺非依存性であり CHT1 は関与せず、CTL1 か CTL2 により行われていると考えられた。

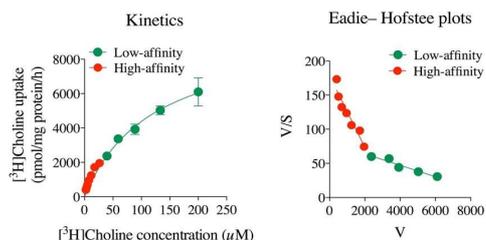
コリン取り込みにおけるNa依存性



CHT1は関与していない、Na非依存性

Kinetic 解析では、低親和性と高親和性の2種類の飽和曲線が示され、Eadie-Hofstee plots に変換すると2種類の取り込み機構が存在することが明らかになり、その Km 値から、高親和性は CTL1 で、低親和性は CTL2 と考えられた。

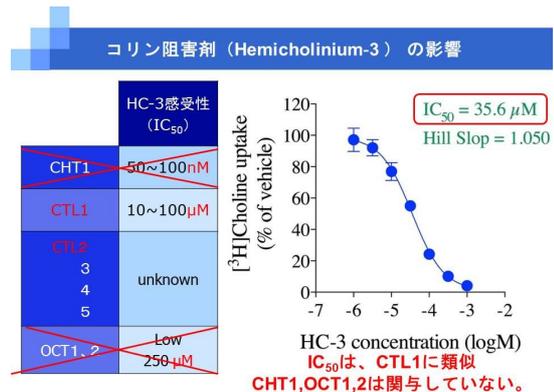
コリン取り込みのkinetic解析



高親和性→CTL1
低親和性→CTL2

	High	Low
Km(μM)	20.7	121.7

コリン阻害剤である Hemicholinium-3 のコリン取り込みへの影響をみると、その取り込み阻害に要する Hemicholinium-3 の量 (IC₅₀ は 35.6 μM) で、これまでの報告での CTL1 を介する阻害量に一致していた。



また、コリン取り込みにおける細胞外 pH の影響をみると、pH が産生からアルカリ性になるに従い、コリン取り込みが上昇し、コリンの取り込みは水素イオンとの交換輸送により行われていることが分かった。更に、培養鼻茸線維芽細胞の培養上清中にコリン添加すると細胞の増殖が亢進し、添加しないと抑制されること、添加しないと線維芽細胞のアポトーシスが誘導されることを発見した。すなわち鼻茸線維芽細胞の増殖機序の一部は CTL1 および CTL2 のコリントランスポーターを介したコリンの取り込みにより行われていることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

一瀬和美、野中 学、稲津正人、瀬尾友佳子、吉原俊雄．鼻茸線維芽細胞におけるコリントランスポーターの同定とその機能解析．第116回日本耳鼻咽喉科学会総会．2015年5月21日～23日．東京国際フォーラム(東京都千代田区)

稲津正人、小西花恵、鈴木理紗、小野寺翔、富田隆義、山中 力、野中 学．鼻茸由来線維芽細胞におけるコリントランスポーターの機能解析．第87回日本薬理学会年会．2014年3月19日～21日．仙台国際センター(宮城県仙台市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

野中 学 (NONAKA MANABU)
東京女子医科大学・医学部・臨床教授
研究者番号：70271351

(2)研究分担者

稲津正人 (INAZU MASATO)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00297269