

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791816

研究課題名(和文)嗅球バゾプレッシン細胞の分子生理学的特性の解明

研究課題名(英文)Physiological role of vasopressin neurons in olfactory bulb

研究代表者

大淵 豊明(OHBUCHI, Toyoaki)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：00412651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：鼻腔粘膜上皮における線毛運動の活動性の一部は、ATPを介した伝達機構により調節される。近年、pannexin-1がATP透過性を有しており、ATP放出に重要な役割を担っていることが明らかとなったが、ヒト鼻腔粘膜におけるpannexin-1発現の有無や、ATP放出機能の有無は調べられていない。

本研究では、ヒト鼻腔粘膜におけるpannexin-1とP2X7の発現を分子レベルで明らかにし、pannexin-1がATP放出に関与している可能性を示した。鼻腔粘膜に発現するpannexin-1は鼻腔粘膜線毛運動をダイナミックに調節しており、鼻副鼻腔疾患に対する治療ターゲット分子となり得る。

研究成果の概要(英文)：Pannexins are a family of transmembrane nonselective channel proteins that participate in the release of ATP into extracellular space. In the present study, we investigate the expressions of pannexin-1 and purinergic P2X7 receptor in human nasal mucosa, together with hypotonic stress-induced ATP release from this tissue.

Substantial expressions of both proteins were observed in human nasal mucosa by fluorescence immunohistochemistry. The presence of the transcripts of pannexin-1 and P2X7 was also shown by qRT-PCR. Carbenoxolone (a pannexin-1 channel blocker) significantly inhibited the ATP release from the nasal mucosa, but flufenamic acid (a connexin channel blocker) and gadolinium (a stretch-activated channel blocker) did not.

These results indicate the coexistence of Panx1 and P2X7 in, and pannexin-1-dependent ATP release from, the human nasal mucosa, suggesting the possible participation of these molecules in the physiological functions of the upper airway.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般(6902)

キーワード：鼻科生理学

1. 研究開始当初の背景

嗅球は、鼻腔粘膜上皮に存在する嗅覚受容細胞からの入力により嗅覚情報受容に関わる。近年、ラット嗅球にバゾプレッシン含有細胞が局在することが明らかとなり、嗅覚受容が脳内でのバゾプレッシン放出を介した社会行動の調節に関与する可能性が示された。しかし、嗅球バゾプレッシン細胞の生物学的性質および情報伝達機構の分子生理学的な解析は今なお不十分である。

2. 研究の目的

本研究課題は当初、嗅球より単離したバゾプレッシン細胞を遺伝子改変技術により標識した蛍光蛋白により同定し、電気生理学および分子生物学的手法を用いて嗅球バゾプレッシン細胞を取り巻く情報伝達機構の特性を明らかとすることを目的とした。実験の展開に伴い、嗅球におけるバゾプレッシンニューロンのみならず、鼻腔粘膜上皮全体におけるイオンチャネルの発現や上皮間情報伝達機構の解明も視野に入れた。特に近年注目されている pannexin-1 の鼻腔粘膜での発現の有無や生理学的特性に着目した。

3. 研究の方法

(1) ラットの鼻腔粘膜を採取し、蛍光免疫組織化学的染色法と RT-PCR 法を用いて pannexin-1 の発現の有無を調べた。

(2) ヒトの鼻腔粘膜における pannexin-1 の発現の有無と生理的役割を調べた。内視鏡下鼻内手術により両下鼻甲介骨切除術を施行された肥厚性鼻炎患者(男性 20 名、女性 1 名、10-82 歳、平均 44.2 歳)から摘出した下鼻甲介粘膜を用い、pannexin-1 と P2X7 の発現の有無を、蛍光免疫組織化学的染色法と定量的 RT-PCR 法により調べた。また、パンチアウトした下鼻甲介粘膜組織を 10 分間 Ca^{2+} free 溶液で培養し、培養液中の ATP 濃度を、luciferin-luciferase assay により *ex vivo* で測定した。

4. 研究成果

(1) RT-PCR 法と蛍光免疫組織化学的染色法 RT-PCR 法により、ラット鼻腔粘膜に pannexin-1 が発現していることを明らかにした。

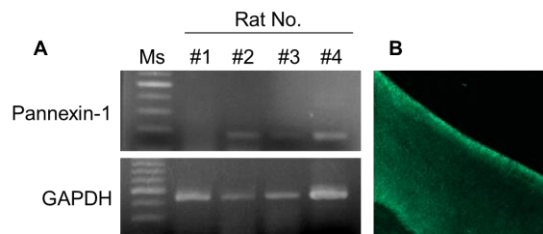


図1 ラット鼻腔粘膜における pannexin-1 の発現

(2) 蛍光免疫組織化学的染色法と定量的 RT-PCR 法により、ヒト鼻腔粘膜に pannexin-1 および P2X7 が発現していることを明らかにした。

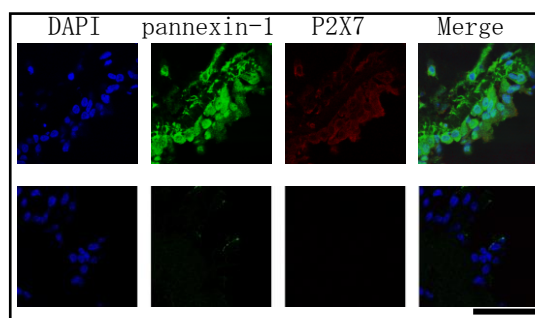


図2 免疫組織化学的染色法ヒト鼻腔粘膜における pannexin-1 と P2X7 受容体の発現

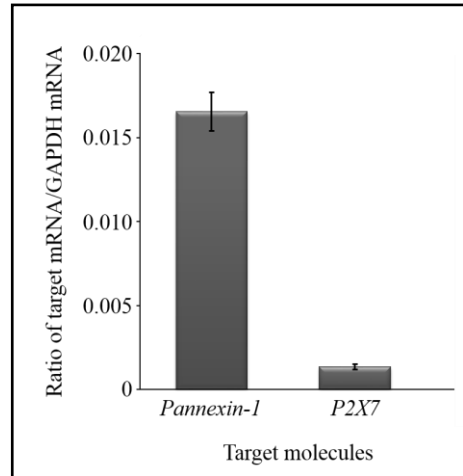


図3 定量的 RT-PCR 法による pannexin-1 mRNA の定量的検出

ex vivo での ATP 測定では、等浸透圧環境に比し低浸透圧環境で鼻腔粘膜組織からの ATP 放出は有意に増加した (76 ± 10 fM vs 233 ± 36 fM, $P=0.0304$)。この低浸透圧刺激による ATP 放出の増加は、pannexin-1 blocker である carbenoxolone (CBX) $10 \mu\text{M}$ 存在下で有意に抑制された (108 ± 19 fM vs 233 ± 36 fM, $P=0.0084$)。一方、connexin blocker である flufenamic acid (FFA) $300 \mu\text{M}$ 存在下では抑制されなかった (191 ± 40 fM vs 233

± 36 fM, $P=0.4444$)。また、stretch-activated channel blocker である gadolinium (Gd^{3+}) 100 μ M を投与しても、ATP 放出量に有意な変化は認められなかった (189 ± 53 fM vs 233 ± 36 fM, $P=0.5004$)。

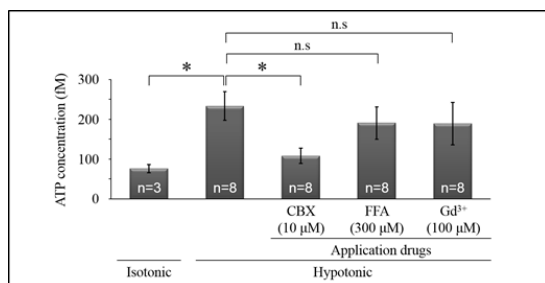


図3 ヒト鼻腔粘膜から放出される ATP の測定
低浸透圧刺激により ATP 放出量は増加し、この増加は pannexin-1 blocker である CBX 存在下で抑制される。

本研究で、ヒト鼻腔粘膜における pannexin-1 と P2X7 受容体の発現を明らかにした。鼻腔粘膜は外気と隣接し、生体防御の観点から非常に重要な免疫機能が要求される。細菌やウイルスのみならず、小物体吸入に伴う物理的的刺激、粘膜上皮の収縮や膨張に伴う機械的刺激、呼吸吸気により生じる気流刺激、加えて温度変化刺激などにも常に暴露されている。本研究は、鼻腔粘膜に発現する pannexin-1 が機械的刺激などにより活性化され、ATP の細胞外への分泌を惹起し、近傍の P2X7 受容体の活性化を介してさらに pannexin-1 の活性化を誘導する自己分泌/傍分泌の一端を担い、鼻腔全体の線毛運動をダイナミックに調節している可能性を示した。pannexin-1 は鼻副鼻腔疾患の新たな治療ターゲット分子となり得る。

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 2 件)

- 1) Ohbuchi T, Hohchi N, Ohkubo J, Hashida K, Koizumi H, Wakasugi T, Takenaga F, Suzuki H. Identification of pannexins in rat nasal mucosa. Allergy Rhinol. 2013; 4(2): e63-5.
- 2) Ohbuchi T, Takenaga F, Hohchi N, Wakasugi T, Ueta Y, Suzuki H. Possible contribution of pannexin-1 to ATP release in human upper airway

epithelia. Physiol Rep. 2014; 2(2): e00227.

[学会発表] (計 2 件)

- 1) ラット鼻中隔粘膜におけるパネキシンの発現と病態生理学的特性. 大淵豊明、武永芙美子、實地信介、若杉哲郎、鈴木秀明.
産業医科大学 医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学
第30回 産業医科大学学会総会 2012年10月20日～10月21日、北九州 (産業医科大学)
- 2) 鼻腔粘膜における pannexin-1 の発現と機能.
大淵豊明、武永芙美子、實地信介、若杉哲郎、鈴木秀明.
産業医科大学 医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学
第32回 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2014年2月6日～2月8日、徳島 (ホテルクレメント徳島)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大淵 豊明 (OHBUCHI, Toyoaki)
産業医科大学 医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部
外科学 助教
研究者番号：00412651

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

鈴木 秀明 (SUZUKI, Hideaki)
産業医科大学 医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部
外科学 教授
研究者番号：20187751

上田 陽一 (UETA, Yoichi)
産業医科大学 医学部 第一生理学 教授
研究者番号：10232745