

論文の内容の要旨

論文題目 Physiological regulation of ATP release at the apical surface of airway epithelia

和訳 気道上皮表面におけるアデノシン三リン酸放出の生理学的調節

指導教員 滝澤 始 助教授・永田 泰自 講師

東京大学大学院医学系研究科
平成 13 年 4 月入学
医学博士課程
内科学専攻

氏名 岡田 聖子

アデノシン 3 リン酸 (ATP) 及びその代謝物質アデノシンは、気道上皮表面 (細胞外) において、ATP の P2Y₂ 受容体及びアデノシンの A_{2B} 受容体を介し、イオンチャネルの透過性調節、線毛運動の促進、粘液分泌の促進を行い、異物排除を促進し宿主を保護する重要な因子として知られている。しかし、気道上皮管腔側を覆う薄い液層 (7 μ m) 内における ATP 及びアデノシンの実際の濃度、及び ATP 放出・代謝に基づく気道上皮活動の内分泌・傍分泌による調節機序に関しては、未だ不明である。細胞表面の比較的大きな体積の液層内における ATP 濃度は、細胞表面ごく近傍での濃度を正確に反映していないのではないかとの仮説が提示されてきた。

そこで当研究第 1 章では、ブドウ球菌由来プロテイン A とルシフェラーゼの融合蛋白 (SPA-luc) を部分精製し、ヒト気道上皮初代細胞表面に内因性に発現する抗原に一次抗体を介して結合させ、気道上皮管腔側を覆う薄い液層内における ATP 濃度をリアルタイムで測定した。プロテイン A は一次抗体の Fc ドメインに結合し、ルシフェラーゼはルシフェリンとマグネシウムイオンの存在下にて、ATP の濃度依存性に発光する。SPA-luc による細胞表面の ATP 濃度リアルタイム測定他に、細胞外液に溶解させたルシフェラーゼによる細胞表面管腔側液層全体の ATP 濃度リアルタイム測定、及び細胞表面管腔側液層より採取したサンプルの ATP 濃度測定を行い結果を比較した。

無刺激（休止）状態では、細胞外の ATP 濃度は管腔側に加えた液体の体積及び測定方法に関わらず、1-10 nM (P2 受容体の EC₅₀ をはるかに下回る濃度) であり、一旦 ATP 放出と分解の平衡が達成されると、細胞表面の液層内における ATP 濃度は細胞表面近傍も遠隔も一律であることが示唆された。一方、ヒト気道上皮初代細胞表面には、3 種類のエクトヌクレオチダーゼ (ATP 水解酵素) [ecto-nucleotidase pyrophosphatase phosphodiesterase (eNPP)、ecto-NTP diphosphohydrolase (eNTPDase)、アルカリンフォスファターゼ] が発現するが、それぞれの酵素の阻害剤 (順に β , γ -メチレン-ATP、エプセレン、レバミソール) を加えてこれらを阻害すると、250 fmol/min/cm² の率で ATP が細胞外に蓄積した。この蓄積率は、休止状態の細胞からの継続的な ATP 放出率を反映し、細胞表面の液層体積に依存しなかった。このような休止状態の細胞からの継続的な ATP 放出は、「非調節の」継続的な細胞からの ATP 放出を反映すると考えられている。

次に、生理的刺激に伴う ATP 放出および ATP 濃度の調節を調べた。細胞の膨張をきたす低浸透圧刺激は、ATP 放出を誘発する刺激として様々な細胞にて確立されている。ヒト気道上皮初代細胞においても、管腔側における 33%低浸透圧 (200 mOsm) は、大量の ATP 放出を刺激する。またこれは、実際に生体の気道における腺からの低浸透液の分泌の状況を模し、当研究の ATP 濃度リアルタイム測定系において用いやすく再現性に優れた刺激であるため、当研究における生理的刺激として採用した。ヒト気道上皮細胞に低浸透圧刺激を与えると、SPA-luc によって測定された細胞表面の ATP 濃度は、細胞管腔側の液層体積に関わらず約 1 μ M に達し、刺激による ATP 放出率の 1000 倍への一過性上昇を反映した。これとは対照的に、細胞外液に溶解させたルシフェラーゼによって測定された細胞表面の液層全体の ATP 濃度の最高値、及び、細胞表面の液層より採取したサンプルの ATP 濃度は、液層体積に反比例した。即ち、低浸透圧刺激に伴い、細胞表面で高く、液層内を遠ざかるに従い低い、ATP 濃度勾配が観察され、当現象には 1) 放出された ATP の大きな液層体積内への希釈、2) 放出された ATP の液層全体へ拡散する以前の段階での細胞表面での迅速な分解、3) 非混合細胞表面層効果に伴う、細胞表面 ATP のこの層外への拡散の遅延、が寄与していると考えられた。

33%の低浸透圧刺激に反応し、細胞は約 150%の体積に膨張したことから、これら気道上皮細胞は、細胞外の浸透圧変化に応じて自在に水やイオンを透過させ、細胞内の浸透圧が変化し体積が膨張する、あたかも浸透圧センサーの様な特徴を持つことが示された。この急性期の細胞膨張に引き続き、ヒト気道上皮細胞は調節的体積減少を示した。当機能は、細胞のホメオスターシスを保持する上で重要である。細胞膨張期に

細胞外へ放出された ATP の当機能への関与を調べたところ、調節的体積減少はアピラーゼによる細胞外 ATP の水解によって遅延し、細胞外 ATP または UTP の付加にて促進され、アデノシン A_{2B} 受容体拮抗薬 8-スルフォニルフェニルテオフィリン (8-SPT) によっては影響されなかった。即ち、低浸透圧刺激、細胞膨張に伴い細胞外へ放出された ATP は、P2Y₂ 受容体を介し (クロライドやカリウムイオンの放出の促進を介して水の放出を促進し)、細胞体積を回復するために貢献することが示唆された。但し、ATP の代謝産物のアデノシンの A_{2B} 受容体を介する細胞堆積への貢献は否定的といえた。以上より、気道上皮表面における ATP 濃度が、生理学的細胞刺激によって上昇し P2Y₂ 受容体活性化の範囲に至る証拠を初めて提示し、また、低浸透圧刺激に伴う ATP 放出が P2Y₂ 受容体を介し調節的細胞減少を促進することから、上皮管腔側への ATP 放出、細胞表面 ATP 濃度、細胞体積調節の動的な連携を提示した。極性を示す上皮細胞の表面で ATP を測定し得る当手法は、他の生理学的刺激 (液体の流れに伴うズリ応力、圧力、等) に伴う上皮細胞からの ATP 放出の研究、上皮細胞からの ATP 放出の機序の解明等、今後の研究に大変有用と考えられる。

次に、この手法を用いて、気道上皮初代細胞からの低浸透圧刺激による ATP 放出の機序に関し考察した。上皮細胞からの ATP 放出の機序に関しては、十数年の研究の歴史にも関わらず未だ不明な点が多い。ATP を含有する顆粒の、開口放出による機序と、細胞質の ATP のチャネルやトランスポーターによる伝導的放出による機序とが、2つの主要な候補と考えられている。バプタによる細胞内カルシウム剥奪は細胞外 ATP 濃度に影響せず、ATP 放出機序は、細胞内カルシウム濃度非依存性と考えられた。即ち、当培養細胞の主構成員である線毛細胞からの、細胞内カルシウム依存性開口放出以外の機序 (恐らくはチャネルやトランスポーター等) が主要な役割を果たすことが示唆された。しかし、気道上皮管腔側細胞膜に発現するクロライドチャネルであるシスティックファイブローシス膜電位調節因子 (CFTR) は、この機序に貢献しないことが、CFTR 欠損 (システィックファイブローシス) 患者からのヒト気道上皮初代細胞を用いた実験、及び CFTR の阻害剤を用いた実験にて示された。

以上に基つき当研究第 2 章では、ATP 放出を司る候補分子の一つである電位依存性陰イオンチャネル (voltage-dependent anion channel, VDAC) の ATP 放出への関与の存否の確認を試みた。VDAC はミトコンドリア外膜に発現し、ATP や ADP をはじめ様々な分子を輸送するチャネルである。細胞膜に発現する VDAC-1 のスプライズバリエント (p1-VDAC-1, Buettner et. al. PNAS 97, 2000) の報告は、このチャネルの細胞膜にお

ける ATP 輸送の可能性を示唆する他、ヒト、マウス、ラットの上皮細胞にて、電気生理学的に voltage-dependent anion channel (VDAC) に類似した ATP 通過性陰イオンチャネルの存在を示唆する報告がされている。p1-VDAC-1 を過剰発現させたマウス線維芽細胞 (NIH3T3) は、機械的刺激に応じ、対照細胞に比して有意に高い濃度の ATP を放出した。VDAC-1 ノックアウトマウスより単離、培養された気道上皮細胞は、低張液による浸透圧刺激に応じ、対照細胞の 50% の ATP を放出し、膨張後の調節的体積減少が遅延した。細胞内 ATP 濃度は VDAC-1 過剰発現細胞、ノックアウト細胞とも対照細胞と有意差が無かった。以上より、マウスの気道上皮細胞において、VDAC-1 が直接的或いは間接的に ATP 放出に関与すること、また ATP 放出の機構は他にも存在すること、が示唆された。

上皮細胞からの ATP 放出機構に関しては、未だ不明な点が多いが、主に線毛細胞からなる気道上皮初代細胞を用いた当研究の結果は、線毛細胞からの ATP 放出には細胞内カルシウム依存性開口放出以外の機序 (VDAC を含め、伝導的放出) が主要な役割を果たすことを示唆する一方で、分泌型の上皮細胞セルラインにおける研究 (Beudreault et. al. J Physiol 561, 2004) は、杯(粘液分泌)細胞からの ATP 放出は細胞内カルシウム依存性であり、主に開口放出によることを示唆した。気道上皮は、異なる ATP 放出機構を有する異なる種類の細胞から構成されると考えられる。