

## 審査結果の要旨

氏名 岡田 聖子

気道上皮細胞におけるイオンチャネル透過性調節、線毛運動や粘液分泌の促進といった機能は異物を排除して宿主を保護するために重要であるが、こうした機能には気道上皮管腔側を覆う薄液層内のアデノシン3リン酸 (ATP) 及びその代謝物質アデノシンが深く関わっていると考えられている。しかし、薄液層ゆえにその中の ATP およびアデノシンの実濃度を知ることは非常に困難であり、ATP の放出、代謝とその内分泌・棒分泌による気道上皮細胞活動調節との関係についても解析が十分進んでいないのが現状である。本研究は、気道上皮細胞上の薄液層内の ATP 濃度を知るために独自のモニター系を構築し、従来法との比較からその有用性を証明すると共に、その系を用いて以下の結果を得ている。

1. 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) をヒト気道上皮初代細胞表面に存在する抗原とその一次抗体を介して結合させ、ルシフェリン・ルシフェラーゼによる発光反応が ATP 依存的である性質を利用して細胞表面上の ATP 濃度を発光強度を指標にモニターする系を構築した。
2. 休止状態細胞の場合、一旦 ATP 放出と分解の平衡が達成されると細胞外 ATP 濃度は一律に 1-10 nM であることが明らかとなった。また、ATP 水解酵素阻害剤を添加すると細胞外での ATP 蓄積が認められ、継続的な ATP の放出と分解を示唆した。
3. ヒト気道上皮初代細胞を 33%低浸透刺激で膨張させると ATP 放出が促進することを確認し、その際の細胞表面 ATP 濃度は局所的に約  $1\mu\text{M}$  にも達すること、即ち、低浸透刺激によって ATP 放出率は一過的に休止状態の約 1000 倍にまで上昇することを上記の SPA-luc 系にて明らかにした。なお、従来法による ATP 濃度測定結果との比較から、放出された ATP は速やかに拡散、分散されることが分かった。
4. 33%低浸透刺激でヒト気道上皮初代細胞は約 150%の体積にまで急速に膨張後、速やかに調節的体積減少した。この調節的体積減少はアピラーゼによる ATP 水解で遅延、ATP または UTP 添加で促進されたことから放出 ATP がこの体積回復減少にかかわることが示唆され、さらに、アデノシン  $A_{2B}$  受容体拮抗薬はこの現象に影響を及ぼさなかったことからこの回復機構には ATP 受容体である  $P2Y_2$  受容体の関与が示唆された。
5. 低浸透刺激時のヒト気道上皮初代細胞からの ATP 放出機構についても検討した。ATP 含有顆粒の開口放出と、チャネル或いはトランスポーターによる伝導的放出の 2 つの機構を候補として想定したが、バプタ添加による細胞内カルシウムイオンのキレートが細胞外 ATP 放出に影響を及ぼさなかったことから、前者の機構が主軸を占めることは否定的と考えられた。
6. システィックファイブローシス膜電位調節因子 (CFTR) 欠損患者の気道上皮初代細胞

を用いた実験、及び CFTR 阻害剤を用いた実験結果より、気道上皮管腔側細胞膜に発現する当該クロライドチャンネルは ATP 放出に関与しないことが明らかとなった。

7. 以上に基づき、ATP の伝導的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ンネル(voltage-dependent anion channel, VDAC) の ATP 放出への関与の存否の確認を試みた。細胞膜発現型 VDAC-1 (pl-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。

8. 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他の研究は、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。

以上、本論文はヒト気道上皮初代細胞が定常状態において継続的かつ非調節的な ATP 放出を行っていることを明らかにし、さらに、この放出機能は低浸透刺激によって局所的に約 1000 倍も促進されて P2Y<sub>2</sub> 受容体活性化範囲にまで到達し、この受容体を介する刺激が膨張した細胞体積を回復させる現象に関わる事を示唆した。また、低浸透刺激時の ATP 放出機構は CFTR を除く何らかのチャンネル或いはトランスポーターによるものと結論付けた。さらに、候補分子の一つである VDAC-1 が、実際に ATP 放出に関与することをマウスの気道上皮において示した。これらの知見は今後の気道上皮細胞機能解析、特に ATP 放出の機序や役割を解析する上で、非常に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。