

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 田宮 暢代

### 論文題目

Procaterol-stimulated increases in ciliary bend amplitude and ciliary beat frequency in mouse bronchioles.

### 論文内容の要旨

気道の粘液線毛クリアランスは、吸入異物、細胞破砕物、細菌等を気道表面の粘液層で捉え、線毛運動により体外へ排泄する、いわば異物除去のためのベルトコンベアーシステムである。すなわち、気道表面粘液層はコンベアーベルト、線毛運動はこのシステムを駆動するモーターに相当する。線毛運動の障害は粘液線毛クリアランスを低下させ、副鼻腔炎、気管支拡張症等の原因となる。生体防御の観点からは、肺胞直前の細気管支線毛運動の重要性は明らかであるが、ほとんど研究が中枢気道、鼻粘膜でなされアクセスの難しさから細気管支の研究はほとんどなされてこなかった。細気管支では 8-25Hz と高い線毛運動周波数 (Ciliary Beat Frequency, CBF)が維持され、本研究では、肺から単離した線毛細胞を高速度カメラ (500Hz) を接続した顕微鏡下に直接線毛運動を観察することで、CBF と CBA(Ciliary Bend Amplitude [線毛運動振動角])を同時に測定し、細気管支線毛運動 (CBA と CBF) に対する  $\beta_2$  刺激薬 (プロカテロール) の効果について検討した。

雌性マウス(C57BL/6J)をペントバルビタールナトリウム麻酔下(60-70mg/kg, ip)に開胸し肺動脈より  $Ca^{2+}$ -free 溶液で灌流、脱血した後、肺を取り出した。取り出した肺の気道腔内をエラストーゼで処理 (37° C, 40 分) することにより、細気管支線毛細胞を単離した。単離した細胞を顕微鏡システムにセットし、線毛運動を観察した。高速度カメラ (500Hz) を用い記録した単離細気管支線毛細胞の 2 秒間の画像を画像解析ソフトウェア (Dipp-Motion 2D, DITECT, 東京) で解析 (線毛上に引いたラインの輝度の経時変化)、視覚化することで、CBF を測定した。また、得られた画像から、線毛運動の 2 枚の画像 (有効打と回復打) を選び、有効打に回復打をスーパーインポーズすることにより、線毛運動の振動角 (CBA)を測定した。また、CBA,CBF の増加の線毛輸送に対する効果を検討するために、肺切片を用いて、細気管支におけるマイクロビーズ輸送も観察、測定した。

単離線毛細胞の CBF は  $11.5 \pm 0.2$  Hz (300 細胞) で、4 - 25 Hz の範囲で正規分布していた。プロカテロール刺激は CBF と CBA を濃度依存性に増加させた。高濃度プロカテロール (10nM) で細気管支線毛細胞を刺激すると、典型的な反応例では、最初に CBA を 80° から 160° に増加させ、続いて CBF を 11.5 Hz から 27 Hz に増加させた。刺激直前の値に対するプロカテロール (10nM)による CBA 増加率と CBF 増加率は、ともに 200%であった。このように、高濃度プロカテロール刺激は、最初に CBA 増加を、続いて CBF 増加を引き起こした。一方、低濃度の 10pM プロカテロールでは、CBA のみが 30%増加し、CBF

は変化しなかった。プロカテロールの濃度依存性を調べた結果は、CBA 濃度依存性曲線が CBF 曲線より低濃度側へシフトしていた。他の  $\beta_2$  刺激薬であるサルブタモール、ターベタリンにおいても、CBA 曲線は低濃度側へシフトしていた。ただし、構造の違いから、濃度依存性曲線の EC50 は、プロカテロール < サルブタモール < ターベタリンとなった。このプロカテロールの反応は、フォルスコリン (cAMP 合成酵素刺激薬) により再現され、 $\beta_2$  受容体の阻害薬 (10 $\mu$ M ICI-118,558)、PKA 阻害薬 (PKI amide) により消失することから、 $\beta_2$  受容体を介した cAMP 増加によるプロテインキナーゼ A (PKA) の活性化によるものと考えられた。

肺切片標本中の末梢気管支表面における、線毛運動によるマイクロビーズ輸送を顕微鏡下に観察した。直径 1 $\mu$ m のマイクロビーズを灌流チャンバーに加えると末梢気道表面に到達したマイクロビーズは線毛運動が駆動している気道表面の流束に従い輸送された。1nM プロカテロール刺激により、同一気道表面での 300 ミリ秒にビーズが移動した距離 (d<sub>0</sub>) は、マイクロビーズの移動距離 (d<sub>stim</sub>) の約 1.7 倍となった。プロカテロールに対する移動距離比率 (d<sub>stim</sub>/d<sub>0</sub>) とプロカテロール濃度の関係は、10pM プロカテロール (CBA のみ増加) は、マイクロビーズ輸送速度を増加させていた。また、10nM プロカテロールでは、マイクロビーズ輸送速度はさらに増加していた。この結果は、CBF だけでなく CBA も、線毛輸送速度を増加させる重要な因子であることを示している。

今回の結果は、プロカテロール刺激時には、CBA と CBF が異なる調節を受けていることを示している。線毛運動は分子モーターである二つのダイニン (内腕ダイニン、外腕ダイニン) により駆動されている。Chlamydomonas の変異株の研究から二つのダイニンは機能的に異なり、内腕ダイニンは線毛運動の波形 (CBA を含む) を、外腕ダイニンは、線毛運動の周波数を調節していることが明らかにされている。今回の結果は、プロカテロール刺激時に、内腕ダイニン (CBA 調節)、外腕ダイニン (CBF 調節) を調節している微小領域における cAMP 濃度が異なる可能性を示唆している。

今回の結果は、線毛運動の周波数増加だけでなく、線毛運動の波形変化、特に振動角増加が線毛輸送速度上昇のための重要な因子であることを示している。線毛運動の波形異常を持つ内腕ダイニンの欠損の患者は、CBF は保たれているが、CBA は小さく、内蔵逆位を含む Kartagener 症候群の症状を持っていた。さらに、Tetrahymena の内腕ダイニンの変異株、マウスの精子の内腕ダイニンの変異では、線毛運動の CBF は保たれているが、CBA は小さくなっており、いずれの例においても泳ぐスピードは低下していた。これらの結果は、線毛運動の CBF だけでなく、CBA も線毛運動機能の評価に重要であることを示している。