鼻粘膜繊毛運動活性と細胞内蛋白質燐酸化

福井医科大学　耳鼻咽喉科
山　田　武千代，　斎　藤　　等
国立鯖江病院　耳鼻咽喉科
森　　繁　人

はじめに

エアロゾル療法にとって，鼻粘膜繊毛運動活性は重要であり，また，その繊毛運動活性を研究する上で，活性制御機構を知ることは大切な課題である。細胞内の cAMP，イノシトール3燐酸，ジアシルグリセロールなどのセカンドメッセンジャーから連なるAキナーゼ，Cキナーゼ，Ca イオンなどが，鞭毛，繊毛運動にも関与していることが報告されている。鼻粘膜細胞においても，外界からの刺激によって，細胞応答が引き起こされるまでの細胞内情報伝達系を解析することは，繊毛運動活性の制御の意味において大切である。

今回我々は，ウィスターラット鼻中隔粘膜を酵素学的に処理し，細胞を分散させたもの（塊状形成）を実験材料として用いた。

鼻粘膜細胞の細胞内蛋白質燐酸化に変化を与える可能性のある生化学的物質を作用させ，細胞内蛋白質燐酸化の変化（今回はチロシン燐酸化）と鼻粘膜繊毛運動活性との相関を比較検討した。

研究材料および方法

実験動物としてはウィスター系ラットを用い，エーテル麻酔後，腹部大動脈を切断し失血死させ，鼻中隔粘膜を採取した。図1のように，粘膜組織は Hanks Balanced Salt Solution (HBS-S) 中にて洗浄した後，0.1% proteinase にて，37℃ で約20分間酵素的処理をした。その後メシュにて濾過後，800 rpm 遠心後の cell pellet を RPMI-1640 に浮遊させ，sample とした。バナジン酸，カルシウムイオノフォアーなどの生化学的物質を採取試料に作用させ，電気光学的に繊毛打頻度を測定し繊毛運動活性を検討し

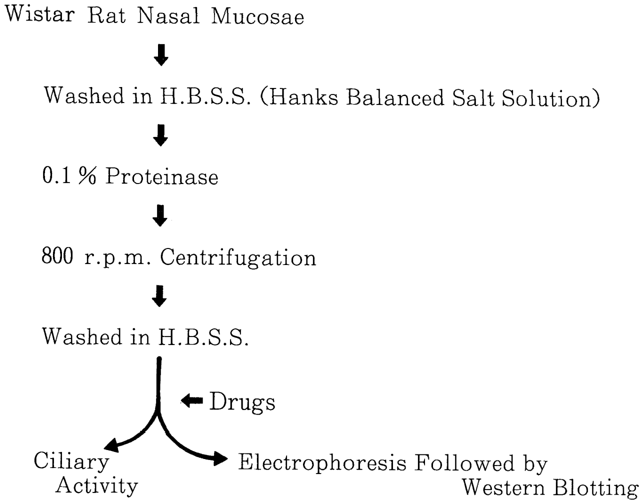

図1　Method

た。繊毛運動活性の変化が有意であるか否かはt-testを用いた。

さらに，反応させたsampleは，12.5%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した後，蛋白をポリビニリデンジフルオリド膜に転写し，抗燐酸化チロシン抗体を用いて，ウエスタンブロット法により細胞内の燐酸化チロシンを検出した。

結果および考察

図2は，バナジン酸濃度と繊毛運動活性の経時的変化を示したものである。バナジン酸が低濃度で作用しやすいように，同時に，過酸化水素を100 μM加えている。

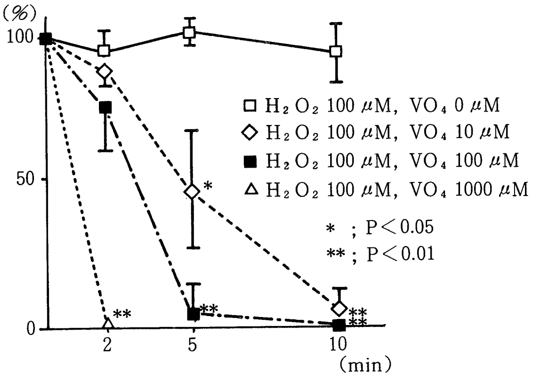

図2 H_2O_2・VO_4による鼻粘膜繊毛運動活性への影響

0分の繊毛運動を100%とすると，バナジン酸10 μMでは，2分で88.7±4.3%（平均値±標準偏差），5分で46.1±14.1%，10分で5.4±9.4%，バナジン酸100 μMでは，2分で75.4±10.3%，5分で4.3±7.5%，10分で0%，バナジン酸1mMでは，2分で0%であった。過酸化水素100 μM単独投与の繊毛運動活性と比較すると，バナジン酸10 μMと100 μMでは5分より，バナジン酸1mMでは2分より，繊毛運動は有意に減少した。

一方，この時の鼻粘膜細胞内のチロシン燐酸化はバナジン酸10 μMでは10分より，100 μMでは5分より，バナジン酸1 mMでは2分より，検出可能であった。これらの結果より，バナジン酸が，鼻粘膜細胞においても細胞内のチロシン燐酸化を亢進させていることが明らかにされるとともに，バナジン酸を鼻粘膜に作用させた場合，細胞内のチロシン燐酸化が亢進するとともに鼻粘膜運動活性が減少しているという事実を得た。

しかしながら，鼻粘膜運動活性の減少は，バナジン酸の細胞毒性である可能性があるため，バナジン酸100 μMを鼻粘膜に10分間作用させ，洗浄後の経時的変化を観察した（図3, 4）。

図3は，0分の繊毛運動を100%とした時の繊毛運動活性を示している。洗浄前（刺激後10分）は，0%であった繊毛運動活性が，1時間で7.3%±12.7%，2時間で40.8±23.8%，5時間で57.5±9.4%と長い時間を要するが復活しており，バナジン酸の細胞毒性は否定できた。

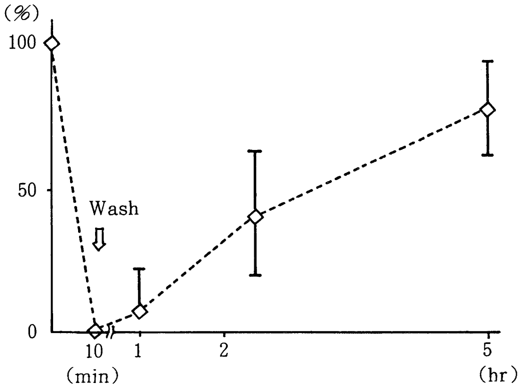

図3 H_2O_2・VO_4による鼻粘膜繊毛運動活性への影響（H_2O_2 100 μM, VO_4 100 μM）

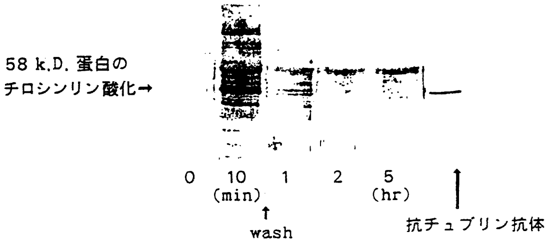

図4 H_2O_2・VO_4による鼻粘膜細胞内蛋白のチロシン燐酸化
（H_2O_2 100 μM, VO_4 100 μM）

図4は，図3のそれぞれの時点での細胞内チロシン燐酸化を示した。繊毛運動活性が0％の刺激後10分では細胞内チロシン燐酸化が亢進しているが，洗浄後1時間，2時間，5時間と徐々に燐酸化が消失しており，細胞内のチロシン燐酸化が減少するとともに鼻粘膜運動活性が増加しているという現象が存在した。

さて，カルシウムイオンは，種々の細胞において，細胞増殖，分泌，形態の変化など，様々な細胞機能に影響を与えていることが知られており，鞭毛，繊毛細胞においても例外ではない。次に，細胞質のカルシウム濃度を増加しうるカルシウムイオノフォアー（A23187）を鼻粘膜に作用させ，上記と同様に検討した。

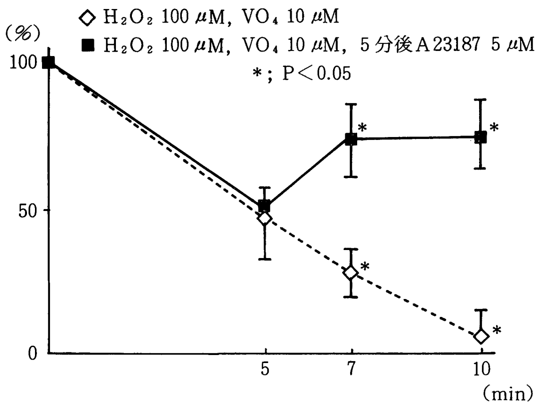

図5　Ca ionophoreによる鼻粘膜繊毛運動活性への影響

図5は，バナジン酸10 μMで5分間反応させ繊毛運動活性が減少しはじめた時点で，A23187を5 μM加えた時の鼻粘膜繊毛運動活性を観察したものである。A23187を加えた場合，7分で73.7±14.9%，10分で73.3±12.4%と繊毛運動活性はやや増加したのに対し，バナジン酸10 μM投与のままでは，7分で28.5±7.3%，10分で5.4±9.4%と減少した。両者の間には，7分，10分とも有意差が認められた。

また，それぞれ10分の時点での鼻粘膜細胞内チロシン燐酸化にも違いが検出された。特に，図4で示した細胞内チロシン燐酸化の中で，最も燐酸化の亢進が明瞭な58kDの蛋白において違いが認められ，バナジン酸10 μM投与のままの鼻粘膜細胞内チロシン燐酸化と比較すると，A23187を加えた場合，燐酸化は減少していた。

さらに，最も燐酸化の亢進が明瞭な58kDの蛋白が何であるかを検討したのが，図4の右端のlaneである。鼻粘膜細胞を電気泳動した後，抗チュブリン抗体によるウエスタンブロット法で，鼻粘膜チュブリンを検出したものである。蛋白の同定は難しいが，燐酸化亢進が明瞭な蛋白の分子量が，鼻粘膜チュブリンのそれと同じであった。鼻粘膜細胞の繊毛は，チュブリンを多く含んでいることを考え合わせると，非常に興味深い。

今回，我々は，鼻粘膜細胞の細胞内蛋白質燐酸化と繊毛運動活性に変化を与える可能性のある生化学的物質として，バナジン酸を使用したが，ATPase阻害作用もあり，チロシン燐酸化と繊毛運動を直接証明することは難しい。しかしながら，燐酸化が亢進すると繊毛運動活性が減少し，逆に燐酸化が減退すると繊毛運動活性は増加するという現象から，鼻粘膜細胞内のチロシン燐酸化が繊毛運動活性に深く関与している可能性があることが示唆された。

おわりに

鼻粘膜繊毛活性制御機構が解明され，繊毛運動活性を調節できれば，エアロゾル療法に大きく貢献する可能性があり，細胞レベルで何が起こっているかを解析することは重要である。

討　論

質問；久松（山梨医科大学）

100 μMの H_2O_2 を用いているが，暴露後，更に長時間，繊毛活性を追跡したことがあるか。

応答；山田（福井医大）

H_2O_2 単独投与の場合は，長時間観察はしていません。

他の実験系（他の細胞）でも，対照群として H_2O_2 を入れた報告があり，これを参考としました。