

機関番号：34419

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790183

研究課題名 (和文) 肺水調節における濃度感受性ナトリウムチャネルの関与

研究課題名 (英文) Involvement of concentration-sensitive sodium channel in alveolar fluid clearance

研究代表者

萩原 央記 (HAGIWARA TERUKI)

近畿大学 理工学部 助教

研究者番号：70411577

研究成果の概要 (和文)：肺胞上皮に発現している濃度感受性ナトリウムチャネル ( $\text{Na}_c$ ) の生理的な機能は分かっていないため、マウス肺における水分調節に  $\text{Na}_c$  が関与しているか検討した。リポ多糖投与により肺に炎症を誘発させると、 $\text{Na}_c$  の発現量が著しく減少した。肺の水分含有量は炎症期に増大し、 $\text{Na}_c$  発現回復後に減少に転じた。これらの結果は炎症による肺胞上皮の  $\text{Na}_c$  発現の抑制が肺の水分含有量の増大を引き起こしていることを示唆する。

研究成果の概要 (英文)：Physiological roles of concentration-sensitive sodium channels ( $\text{Na}_c$ : c=concentration) expressed in mouse alveolar epithelial cells are not yet known. In this study, we investigated the role of  $\text{Na}_c$  in alveolar fluid clearance.  $\text{Na}_c$  expression dramatically decreased in the lung during inflammation induced by lipopolysaccharide. Lung fluid content increased during early inflammation and decreased after the recovery of  $\text{Na}_c$  expression. These results suggested that LPS-induced suppression of  $\text{Na}_c$  in alveolar epithelial cells reduced AFC and caused the increase in lung fluid content in acute lung injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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

キーワード：炎症 ナトリウムチャネル 急性肺障害 Lung fluid clearance

## 1. 研究開始当初の背景

濃度感受性ナトリウムチャネル ( $\text{Na}_c$ ) は電位感受性ナトリウムチャネルファミリーに属するが、細胞膜の電位変化ではなく、細胞外ナトリウム濃度上昇に応じて開く。 $\text{Na}_c$  は脳室周辺器官、後根神経節、肺、子宮等に発現している。脳室周辺器官では体液調節が行なわれていると考えられており、 $\text{Na}_c$  がその調節

に関与していることが報告されている。しかし、その他の部位で発現している  $\text{Na}_c$  についてはその生理的な役割は分かっていない。本研究では肺に発現している  $\text{Na}_c$  着目した。

肺の構造の最小単位は肺胞と呼ばれる 0.2～0.4 mm の袋である。肺胞壁は 0.1～0.5 mm の上皮で覆われ、その中に毛細血管を含んでいる。肺胞上皮細胞には 1 型細胞と 2 型細胞

があり、前者は薄く扁平で、この細胞を介して空気と毛細血管内の血液とのガス交換がおこなわれている。後者は界面活性剤を含み、それを肺胞内に分泌して肺胞壁同士が張り付くことを防いでいる。Na<sub>c</sub>は2型肺胞上皮細胞に発現していることが報告されている。

通常、毛細血管からは周囲の細胞に栄養分を補給するために、絶えず血漿がしみ出しており、肺胞の毛細血管では、しみ出した血漿成分の一部が肺胞内に流出する。これを吸収する機構としては、浸透圧差を利用した受動的な機構と、細胞膜タンパク質を介した能動的な機構があり、後者には様々なイオンチャネルやポンプ等のタンパク質が関与している。流出と吸収のバランスが崩れると肺胞腔に水分が貯まり、肺水腫となる。流出と吸収のバランスが崩れる原因として、炎症によって引き起こされる血管内皮の透過性の亢進による流出量の増加や吸収に関与するタンパク質の発現抑制などがある。

肺胞腔のナトリウムイオンの吸収に関与するナトリウムチャネルとして上皮性ナトリウムチャネル (ENaC) が知られている。ENaCは肺胞上皮の内腔側の細胞膜に発現しており、ENaCを介して肺胞腔のナトリウムイオンが細胞内に取り込まれ、細胞内のナトリウムイオンを基底膜側に発現しているナトリウムポンプによって体内へと汲み出すというモデルが提唱されている。一方、ENaCの阻害剤を用いた研究から、肺胞腔のナトリウムイオンの吸収に ENaC 以外の未同定のナトリウムチャネルが関与していることが示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、肺胞腔のナトリウムイオンの吸収に Na<sub>c</sub> が関与しているか調べることである。Na<sub>c</sub>の肺組織内分布を明らかにするとともに、肺炎症時に水分吸収のバランスが破綻した際に、Na<sub>c</sub>の発現がどのように変化するか解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫組織化学的解析

ラット Na<sub>c</sub> のアミノ酸配列を基に Na<sub>c</sub> のペプチド抗体を作成した。作成した抗 Na<sub>c</sub> 抗体を用いて、マウス肺凍結切片を蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡により Na<sub>c</sub> の発現部位を解析した。また他のチャネルタンパク質の抗体を用いて共染色し、発現部位を比較した。

### (2) 肺炎の誘発

ICR マウスに大腸菌由来リポポリサッカライド (LPS) を肺に経気管投与し、炎症を誘発させた。肺胞洗浄液中の好中球を計測し、炎症の発症を確認した。また肺の湿乾燥重量比を算出し、水分含有量を比較した。

### (3) Na<sub>c</sub> 発現量の解析

LPS 投与したマウス肺から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR により Na<sub>c</sub> mRNA 量の変化を調べた。同時に前述の抗 Na<sub>c</sub> 抗体を用いてイムノブロットを行ない Na<sub>c</sub> タンパク質量の変化も調べた。

## 4. 研究成果

### (1) Na<sub>c</sub> の肺組織内分布

抗 Na<sub>c</sub> 抗体によりマウス肺切片を蛍光染色した (図 1)。Na<sub>c</sub> は肺胞上皮にシグナルが検出された (図 1 上段右)。抗 Na<sub>c</sub> 抗体作製時に使用した抗原ペプチドによって抗体が吸収され、Na<sub>c</sub> のシグナルが消失したことから、作製した抗体は特異的に Na<sub>c</sub> を認識していた (図 1 下段右)。肺胞上皮 I 型細胞の肺胞腔側の細胞膜に局在する水チャネルであるアクアポリン 5 (AQP5) と Na<sub>c</sub> の共染色を行なった (図 2)。Na<sub>c</sub> のシグナルと AQP5 のシグナルを重ね合わせた結果、Na<sub>c</sub> と AQP5 の局在が一致している領域は少なかった。このことから Na<sub>c</sub> は上皮細胞の基底膜側に発現していることが分かった。

### (2) 肺炎症時の Na<sub>c</sub> 発現量の変化

マウス肺に LPS を投与することにより、肺

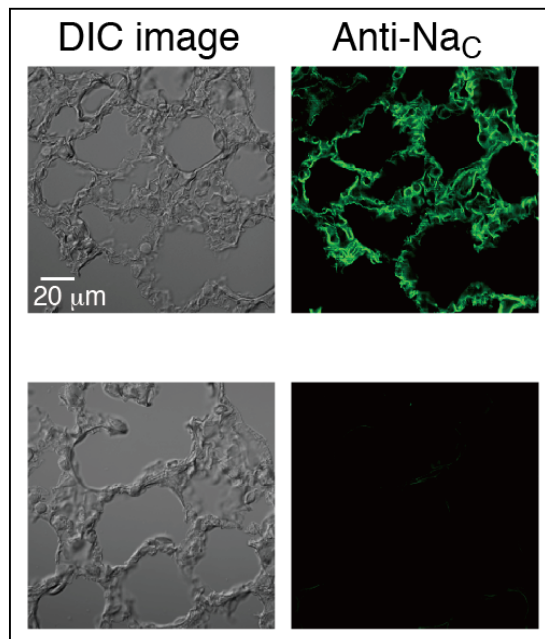


図 1 Na<sub>c</sub> の肺組織内分布

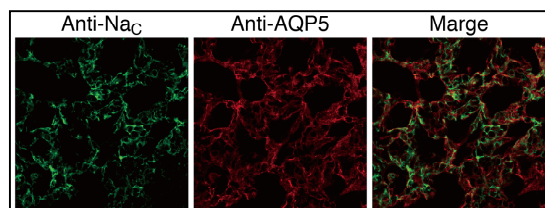


図 2 Na<sub>c</sub> と AQP5 との共染色

胞洗浄液中に肺胞腔に滲出した好中球が多数計測されたことから、肺に炎症が誘発されたことが分かる (図3)。好中球滲出のピークは、LPS投与後2~3日目であり、その後減少していった。この期間の肺におけるNa<sub>C</sub> mRNA発現量を測定したのが図4である。Na<sub>C</sub> mRNA発現量はLPS投与後2日目までに激減し、4日目以降回復し始め、6日目に投与前の発現レベルまで回復した。対照群では有為な変化は見られなかった。Na<sub>C</sub> mRNAの発現量は好中球の肺胞腔への滲出が多かったLPS投与後2~3日目に非常に少なくなっていたことから、炎症の発症によりNa<sub>C</sub> mRNAの発現が抑制されたと考えられる。発現抑制の仕組みとしては、上皮細胞が障害され発現が抑制されたことや炎症細胞から放出されたサイトカインの効果等が考えられる。

Na<sub>C</sub>タンパク質量の変化についても、抗Na<sub>C</sub>抗体を用いた免疫ブロットによりLPS投与後14日目まで調べた (図5)。図5の下段は全タンパク質の染色を示しており、各レーン同等の量のタンパク質が使われている。図5上段が抗Na<sub>C</sub>抗体で染色したもので、各レーンのバンドがNa<sub>C</sub>タンパク質量を示している。LPS投与後のNa<sub>C</sub>タンパク質量は2~6日目に発現量が少なくなり、8日目に6日目に投

与前の発現レベルまで回復した。対照群ではほとんど変化は見られなかった。LPS投与による肺におけるNa<sub>C</sub>タンパク質量の変化はNa<sub>C</sub> mRNAと同じく減少したが、回復の時期がNa<sub>C</sub> mRNA量が6日目にはほぼ回復したのに対して、Na<sub>C</sub>タンパク質量は遅れて8日目に回復した。このことからNa<sub>C</sub>発現が転写レベルだけではなく翻訳レベルでも抑制されていることが示唆された。また肺組織を抗Na<sub>C</sub>抗体により蛍光染色した (図6)。LPS投与したマウス肺組織においてNa<sub>C</sub>のシグナルが減少した (図6下段中央)。このことから、炎症時に肺胞上皮細胞のNa<sub>C</sub>タンパク質量が減少していることが分かった。

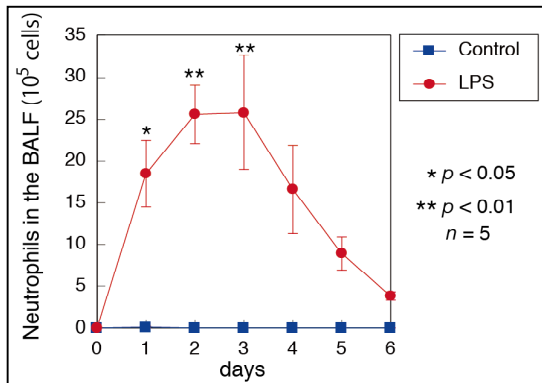


図3 LPS投与後の肺胞洗浄液の好中球数

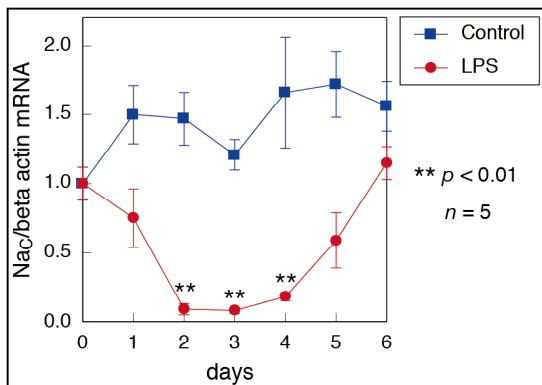


図4 LPS投与後の肺におけるNa<sub>C</sub>mRNA量変化

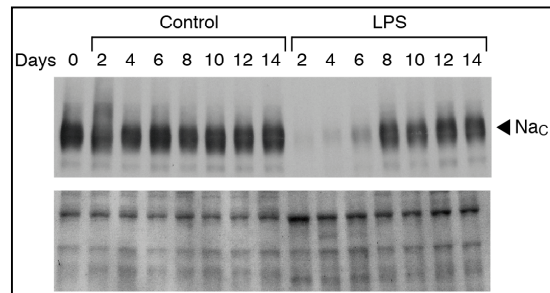


図5 LPS投与後の肺におけるNa<sub>C</sub>タンパク質量変化

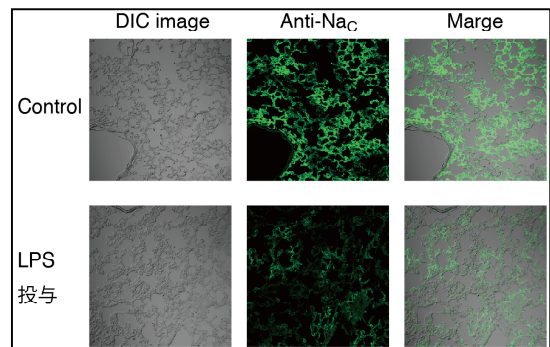


図6 LPS投与後の肺におけるNa<sub>C</sub>免疫染色

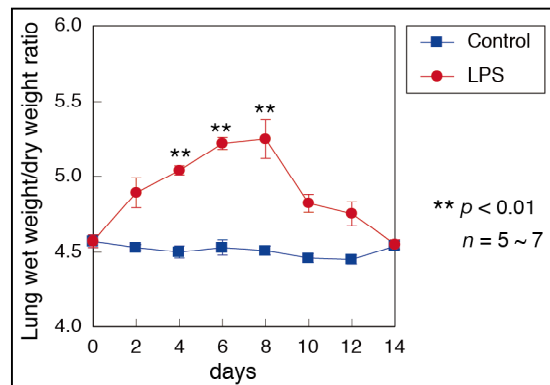


図7 LPS投与後の肺湿乾燥重量比

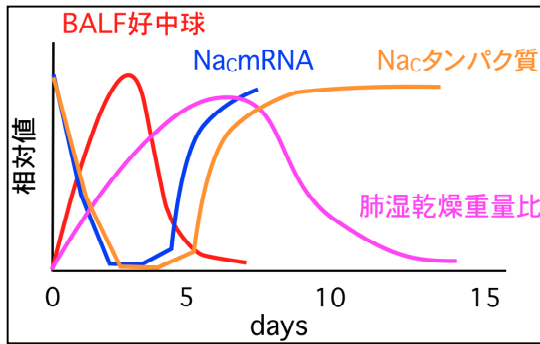


図8 LPS投与後の測定データ間の比較

### (3) 肺炎症時の肺の水分含有量変化

肺炎症時には肺胞毛細血管内皮の膜透過性が亢進するため、肺胞腔や肺間質に体液成分が流出し易くなり、肺組織が水分を異常に含む状態になる。本研究のLPS投与において、肺組織の水分含有量がどのように変化しているか調べるために、肺湿乾燥重量比を経時的に測定した(図7)。LPS投与後から8日目にかけて肺湿乾燥重量比は有意に増加し、その後減少して14日目に投与前のレベルに戻った。

本研究の結果をまとめたものが図8である。炎症が起きたときNa<sub>c</sub>発現が減少し、肺の水分含有量が増加した。そしてNa<sub>c</sub>タンパク質量が回復すると、水分含有量が減少し始めた。これらの結果からNa<sub>c</sub>が肺の水分吸収に関与していることが示唆された。

## 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)

[学会発表] (計2件)

- ① 萩原 央記、吉田 繁 Suppression of concentration-sensitive sodium channel during acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. 第33回日本分子学会年会、第83回日本生化学会合同大会 神戸 12月8日 2010年
- ② Teruki Hagiwara, Shigeru Yoshida. EXPRESSION REGULATION OF CONCENTRATION-SENSITIVE SODIUM CHANNEL IN MOUSE LUNG. 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, Athens, Greece, June 29, 2008

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 央記 (Hagiwara Teruki)

近畿大学 理工学部 助教

研究者番号: 70411577