

氏名(本籍)	杉浦陽介(東京都)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第123号
学位授与年月日	平成22年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	イヌの呼吸器と涙器における炭酸脱水酵素の局在と遺伝子発現の検討
論文審査委員	(主査) 浅利昌男 (副査) 山本雅子 斑目広郎 村上賢

論文内容の要旨

炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase[E.C.4.2.1.1]以下CA)は、亜鉛を含む金属結合酵素で、 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ の両方向の反応を触媒する。現在までに哺乳類では12種類のアイソザイムと、3種類のCA関連蛋白が報告されている。一般的な細胞質型アイソザイムとしてはCA-I, -II, -IIIなどがあり、唯一の分泌型アイソザイムとしてはCA-VIが知られている。CAの主な機能はpH調節に不可欠な HCO_3^- を供給し体内の酸塩基平衡を維持することである。近年CA-VIは鼻腔における嗅物質や CO_2 の感知、細気管支分泌細胞における成長因子としての機能が示唆されるなど、多機能蛋白としての役割も注目されている。体内におけるCA局在は、赤血球、腎臓、骨、消化器系などにおいて多数報告されており、体組織全般においてその局在が明らかにされてきている。一方、このような蓄積されたデータの中で、生命活動に必要な呼吸ガスの交換器官である呼吸器系器官、および鼻涙管を通して気道と機能的な関連を持つことが推察される涙器付属腺におけるCAの局在に関する報告は非常に少ない。そこで本研究ではこれらの器官におけるCAアイソザイムの局在と遺伝子発現を明らかにし、それらの機能的意義を推論することを目的に、イヌの呼吸器系器官として鼻腔領域、喉頭・気管・気管支・肺の領域、涙器付属腺について3章に分けて検討した。検索対象としたアイソザイムは、これまでに呼吸器系に存在しているという報告のあるCA-I, -II、CA阻害剤であるアセタゾラミド抵抗性という特徴を持つCA-III、及び唯一の分泌型であるCA-VIとした。

全てのCAアイソザイムの検索は免疫組織化学染色法を用い、さらに分泌型のCA-VI蛋白の検索ではウェスタンブロット法を併用した。CA遺伝子発現の確認は、CA-IIとCA-VIでは定性的PCRを行い、さらにCA-VIについては定量的PCRとin situ hybridizationによる検索も行なった。また、涙器付属腺においては、免疫組織化学染色法によるCAの組織局在の観察の他、CAアイソザイム抗血清に反応が見られた第三眼瞼腺および瞼板腺の脂腺細胞の微細構造について透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

【鼻腔における CA-I, -II, -III, -VI の組織局在と遺伝子発現の検索】

免疫組織化学染色法による観察では、粘膜上皮と導管上皮では検索を行った全ての CA アイソザイム抗血清（以下 CA 抗血清）に対する反応が見られた。鼻前庭腺、嗅腺、鼻腺の各漿液腺房では一部の細胞において CA 抗血清に対する反応が見られたが、外側鼻腺の漿液腺房では全ての CA 抗血清に対する反応は見られなかった。粘液腺房や杯細胞では全ての CA 抗血清に対して反応は見られなかった。鼻粘膜嗅部では一部の嗅細胞で CA-II, -III, -VI 抗血清に対して特に強い反応があった。CA-VI 蛋白はウェスタンブロット法によりイヌの鼻腔領域に少量ながら存在することが確認された。定性的 PCR では、CA-II, -VI 双方の遺伝子発現が、検索を行った全ての部位で確認された。定量的 PCR の結果、外側鼻腺での CA-VI 遺伝子の発現量と比較して、鼻前庭部での発現量は 100 倍以上、鼻粘膜嗅部や鼻粘膜呼吸部での発現量は約 10 倍だった。In situ hybridization では、CA-VI の遺伝子発現は確認されず、この結果は下部気道や涙器付属腺においても同様であった。これは、定量的 PCR より CA-VI の遺伝子発現量が低いことが明らかとなっており、検出感度以下であったためと考えられた。

イヌの鼻腔内における CA アイソザイムの機能は、その緩衝能によって上部気道粘膜において産生される外因性の酸を中和し粘膜を保護し、鼻前庭部粘膜や鼻粘膜呼吸部では、このような CA の機能によって上部気道での呼気や吸気に接する粘膜上の酸塩基平衡を維持し、微小環境が保たれていると考えられた。鼻腔粘膜の各漿液腺房や導管上皮では、細胞質型 CA は細胞内の酸塩基平衡の維持やイオンの輸送を、また分泌型 CA は導管内の分泌物中の酸塩基平衡を維持していると考えられた。鼻粘膜嗅部では既に報告されているモルモット、マウスと同様、イヌにおいても一部の嗅細胞が CA 抗血清に対して特に強く反応していた。鼻粘膜嗅部での CA の存在意義は、粘液層の酸塩基平衡の維持やイオンの輸送による電解質濃度の調節を通して、CO₂ や嗅物質の感知という機能に関わることで考えられた。

【喉頭及び下部気道における CA-I, -II, -III, -VI の組織局在と遺伝子発現の検索】

免疫組織化学染色法による観察では検索を行った全ての CA 抗血清に対する反応が、喉頭をはじめとする気道粘膜上皮、漿液腺房とその導管上皮に見られた。一方で、粘液腺房や杯細胞では全ての CA 抗血清に対する反応は見られなかった。細気管支分泌細胞では、全ての CA 抗血清に対して反応が見られた。肺では、呼吸上皮細胞と大肺胞上皮細胞は、CA-I, -III 抗血清に対して反応は見られなかったが、高活性型である CA-II と分泌型である CA-VI に対しては両細胞とも一部の細胞で反応が見られた。CA-VI 蛋白はウェスタンブロット法によりイヌの喉頭及び下部気道領域に少量ながら存在することが確認された。定性的 PCR では、検索を行った全ての部位で CA-II, -VI 双方の遺伝子発現が見られた。定量的 PCR の結果、肺での CA-VI 遺伝子の発現量と比較して、喉頭から気管支での発現量は約 10 倍、主気管支での発現量はほぼ同量だった。

ヒトにおいて、気道上皮の粘液中の酸が増加することによって細菌の感染性が高くなることが報告されていることから、本研究のイヌにおいて気道上皮の CA アイソザイムの機能は、鼻腔と同様にその緩衝能によって、粘膜上の酸を中和し気道粘膜を保護している可能性が考えられた。気道粘膜上皮の

CA局在は、モルモットなどの報告では一部の上皮でのみ見られたとされているが、イヌでは一様に見られた。イヌは体温調節の際に panting を行い、大量の気体が気道を通過する際の気化熱で体温を下げる。そのためイヌの気道上皮は、大気との接触が多く、CAは気道粘膜に広く存在する可能性が考えられた。また本研究ではラットと同様、イヌにおいても細気管支分泌細胞にCAアイソザイムの局在が確認された。この局在の意義についてラットではCAの成長因子としての機能が示唆されていることから、イヌにおいても同様に成長因子としての可能性が考えられたが、本研究では成犬のみ対象としていることから、その意義については今後の検討が必要である。肺胞上皮におけるCAアイソザイムの局在は、一部の細胞でCA-IIとCA-VIが見られたのみであった。肺では、ガス交換においては赤血球に存在するCA-IIが主に働き、血漿中の H^+ と HCO_3^- から CO_2 を産生する。また肺胞上皮のCA-IIやCA-IV、CA-VIは、肺胞上皮細胞内の H^+ と HCO_3^- を CO_2 に変換すると考えられた。

【涙器付属腺におけるCA-I, -II, -III, -VIの組織局在と遺伝子発現の検索】

免疫組織化学染色法による観察では全てのCAアイソザイム抗血清に対する反応が、涙腺と第三眼瞼腺の一部の漿液腺房と導管上皮、また第三眼瞼腺と瞼板腺、睫毛腺の脂腺細胞に見られた。瞼板腺や睫毛腺の脂腺の腺房では、腺房辺縁の未分化な細胞でより強い反応がみられた。CA-VI蛋白はウェスタンブロット法によりイヌの涙器付属腺に少量ながら存在することが確認された。遺伝子発現の検討結果は、呼吸器系と同様にCA-II, -VIの定性的PCRの結果、両アイソザイムの遺伝子発現が確認された。定量的PCRの結果、上眼瞼（瞼板腺と睫毛腺を含む）でのCA-VI遺伝子の発現量と比較して、涙腺や第三眼瞼腺での発現量は10倍以上だった。

涙腺、第三眼瞼腺などの涙器付属腺によって産生された涙液は、眼球表面を覆うことで、その部位の微小環境の維持にとって重要な役割を果たしている。イヌにおいて涙液全体の30%を産生と言われる第三眼瞼腺は、涙腺と同様にその存在意義は大きく、外科的に切除した場合には乾燥性角結膜炎の増加や、涙液産生量の減少及び涙液のpHの若干の上昇が報告されている。このことから涙腺や第三眼瞼腺で産生され涙液中に分泌されたCA-VIは、涙液中で HCO_3^- を産生することで、大気中の CO_2 の拡散によって生じる H^+ を中和し角膜上皮の保護を行っていると考えられ、角膜上皮における細胞質型CAアイソザイムと相補的にその緩衝能によって角膜上皮を保護していると考えられる。さらに鼻涙管を経て鼻腔内へと注ぎこむことで、鼻腔内の微小環境の維持に関与している可能性が考えられた。また、涙器付属腺の腺房や導管上皮にみられた細胞質型アイソザイムであるCA-I, -II, -IIIは、他の組織と同様に微小環境の酸塩基平衡の維持やイオンの輸送に関わっていると考えられる。また、第三眼瞼腺でCAアイソザイム抗血清に反応を示した脂腺細胞は、ブタなどに見られる深第三眼瞼腺（ハーダー腺）にある細胞と類似し、涙液の最外層の脂質層を形成する脂質を供給する細胞のひとつと思われた。この脂腺細胞を透過型電子顕微鏡により観察すると、その微細構造が同じ涙器付属腺である瞼板腺の脂腺細胞とは異なることが明らかとなった。脂腺細胞中にCAがあるとの報告は未だなく、その存在意義は不明である。しかし脂質代謝がより盛んな脂腺の腺房辺縁にある未分化な細胞が、脂質を豊富に

含み全分泌される直前の分化した細胞と比べて強く反応したことから、この酵素が細胞内の脂質代謝に何らかの役割を果たしている可能性が考えられ、CAの新たな機能を示唆していると思われた。

論文審査の結果の要旨

本研究は今まで累積的な報告がないイヌの鼻腔粘膜、およびその他の上部気道、下部気道などの一連の呼吸器粘膜あるいは解剖学的位置関係から鼻腔との繋がりが強い涙器付属腺での炭酸脱水酵素(以下CA)の細胞質型アイソザイムのCA-I, II, IIIと分泌型のCA-VIの組織内分布を明らかにすることを目的とし、その結果からそれらの細胞が持つ機能を類推することである。研究はCA-I,IIは犬の赤血球から、CA-IIIは犬の骨格筋から、そして分泌型CA-VIは犬の唾液から、それぞれ抽出し精製した抗原をもとに作製した特異抗血清を用いて免疫組織化学染色で網羅的に組織内局在を精査し、加えてウェスタンブロット法(CA-VI)でそれぞれの蛋白の存在を確認し、同時にCA遺伝子の発現を定性的PCR(CA-II/VI)・定量的PCR(CA-VI)を用いて調べ、またin situ hybridizationによって細胞質内の遺伝子の検出を試みたものである。また、研究の過程で見出されたCAアイソザイム抗血清(以下CA抗血清)に陽性の脂腺細胞の詳細な形態的特徴を明らかにするために、脂肪染色や透過型電子顕微鏡による観察も併せて行ったものである。本研究で使用された4種類のCAアイソザイムは前述したように、抗血清の精製に先立って、酵素活性などについて生化学的に同定された酵素である。本研究で検索した領域は鼻腔、喉頭・気管・気管支・肺および涙器付属腺であり、それらを3章に分けそれぞれの研究結果を報告したものである。

【鼻腔領域におけるCA-I, -II, -III, -VIの組織局在と遺伝子発現の検索】

鼻腔領域として、鼻前庭部粘膜、鼻粘膜嗅部、鼻粘膜呼吸部、外側鼻腺を検索している。免疫組織化学染色法による組織内分布を観察した結果では、粘膜上皮と腺とその導管上皮では検索を行った全てのCA抗血清に対する反応が見られ、外側鼻腺を除く鼻前庭腺、嗅腺、鼻腺の各漿液腺房では一部の細胞においてCA抗血清に対する反応が見られ、特に鼻粘膜嗅部では一部の嗅細胞でCA-II, -III, -VI抗血清に対して特に強い反応があったとしている。一方、粘液腺房や杯細胞では全てのCA抗血清に対して反応は見られなかったことも確認しており、この結果はあとに続く下部気道、涙器付属腺でも同様であったとしている。CA-VI蛋白はウェスタンブロット法によりイヌの鼻腔領域に少量ながら存在することが確認された。CAの遺伝子発現の検討では、定性的PCRでは、CA-II, -VI双方の遺伝子発現を検索を行った全ての部位で確認され、定量的PCRではそれぞれの部位でのCA-VI遺伝子の発現量を確認している。In situ hybridizationではCA-VIの遺伝子局在は観察されず、これは下部気道、涙器付属腺においても同様であった。このことは定量的PCRでの検索の結果から見てCA-VIの遺伝子発現は非常に低く、すべてが本法の検出感度以下であった結果だと考えた。著者は、今まで報告されてきたCAの組織内分布とその機能に関する文献に照らして、①イヌの鼻腔粘膜上皮とそれに付属するほとんどの漿液性腺房上皮および導管上皮にCAの局在と遺伝子発現が確認された ②とくに鼻粘膜嗅部の感覚

系嗅細胞にCAの局在と遺伝子発現が認められたと結論している。著者はこの領域におけるCAアイソザイムの機能は、その緩衝能によって上部気道粘膜において産生される外因性の酸を中和し粘膜を保護するものと考え、鼻前庭部粘膜や鼻粘膜呼吸部では、このようなCAの機能によって上部気道での呼気や吸気に接する粘膜上の酸塩基平衡の維持が行なわれ、微小環境が保たれていると推論している。また、今回初めて示された鼻粘膜嗅部でのCAの存在の意義は、この部分で粘液層における酸塩基平衡の維持やイオンの輸送による電解質濃度の調節を介して、CO₂や嗅気物質の感知という機能に関わるのではないかと、他の動物で示されている機能的意義をもとに推論している。

【喉頭及び下部気道におけるCA-I, -II, -III, -VIの組織局在と遺伝子発現の検索】

喉頭及び下部気道・肺領域として、喉頭蓋、気管頸部・頸胸部・胸部・分岐部、主気管支、肺を検索している。免疫組織化学染色法による組織内分布を観察した結果では、今回検索を行った全てのCA抗血清に対する反応が、喉頭をはじめとする気道粘膜上皮、漿液腺房とその導管上皮に見られたとしている。肺領域では、細気管支分泌細胞（クララ細胞）で全てのCA抗血清に対して反応が見られ、さらに肺胞では呼吸上皮細胞と大肺胞上皮細胞でCA-IIとCA-VIの存在が示された。この領域でのウェスタンブロット法によりCA-VI蛋白は、同時に少量ながら存在することを確認している。CAの遺伝子発現の検討では、定性的PCRでは、CA-II, -VI双方の遺伝子発現を検索を行った全ての部位で確認され、定量的PCRでそれぞれの部位でのCA-VI遺伝子の発現量を確認している。これらの結果は①イヌの喉頭あるいは下部気道の粘膜上皮とそれに付随する漿液腺房上皮および導管上皮にCAの局在と遺伝子発現を確認した ②肺においてはとくに細気管支分泌細胞（クララ細胞）と肺胞上皮細胞でのCAの局在と遺伝子発現を認めたというものであった。このことを踏まえて著者は、今まで蓄積されてきた炭酸脱水酵素の本態研究あるいはこの領域における今まで報告されてきたCAの組織内分布とその機能に関する研究報告に照らして、この領域におけるCAアイソザイムの機能について、ヒトにおいて気道上皮の粘液中の酸が増加することで細菌の感染性が高くなることが示されていることから、気道上皮においては鼻腔と同様にその緩衝能によって、粘膜上の過剰な酸を中和し気道粘膜を保護していると推論している。また気道粘膜上皮のCA局在は、イヌでは一様に見られたがモルモットなどの報告では一部の上皮でのみ見られたとされている。イヌでは体温調節の際に行うpantingのメカニズムに適応した独特な分布ではないかと推論している。また細気管支分泌細胞におけるCAアイソザイムの局在の意義についても、成長因子としての機能に関する報告のあるラットでの研究内容を紹介し、今回のイヌでの意義も同様なものである可能性を論じている。肺胞上皮におけるCAアイソザイムの局在については高活性型CA-IIと分泌型CA-VIの2種類の存在が明らかになったが、これらのCAアイソザイムは、元来ある赤血球中のCA-IIを補う酵素として存在しているのではないかと推論している。

【涙器付属腺におけるCA-I, -II, -III, -VIの組織局在と遺伝子発現の検索】

涙器付属腺で産生される涙液は鼻涙管を通して鼻腔内に流れ、鼻腔内環境にも何らかの影響を与え

ていると考えられる。そこで筆者は涙器付属腺の涙腺、第三眼瞼腺、瞼板腺、睫毛腺におけるCAアイソザイムの組織内分布を検討している。免疫組織化学染色法による組織内分布を観察した結果、全てのCA抗血清に対する反応が、涙腺と第三眼瞼腺の一部の漿液腺房と導管上皮、また第三眼瞼腺と瞼板腺、睫毛腺の脂腺細胞に見られ、瞼板腺や睫毛腺の脂腺の腺房では、腺房辺縁の未分化な脂腺細胞でより強い反応がみられことを明らかにした。またCA-VI蛋白はウェスタンブロット法によりイヌの涙器付属腺に少量ながら存在することも確認した。CAの遺伝子発現の検討では、呼吸器系と同様にCA-II, -VIの定性的PCRおよび定量的PCRの結果、両アイソザイムの遺伝子発現とその量が確認された。これらの結果を踏まえて著者は①イヌの涙器付属腺の腺房上皮および導管上皮にCAの局在と遺伝子発現があった ②第三眼瞼腺、瞼板腺、睫毛腺の各腺房内の脂腺細胞にCAの局在と遺伝子発現があったと述べ、とくに脂質合成細胞にCAの局在が確認されたのは今回の研究で初めてであることを明らかにした。著者はこの領域におけるCAアイソザイムの機能について、さまざまな研究報告に照らしながら次のように述べている。イヌの涙腺、第三眼瞼腺などの涙器付属腺によって産生された涙液は、眼球表面を覆うことで、その部位の微小環境の維持にとって重要な役割を果たしている。とくに涙液全体量の30%を産生すると言われる第三眼瞼腺は、イヌにおいては涙腺と同様にその存在意義は大きく、外科的に切除した場合には乾燥性角結膜炎の増加や、涙液産生量の減少及び涙液のpHの若干の上昇が報告されていることを紹介し、このことから涙腺や第三眼瞼腺で産生され涙液中に分泌されたCA-VIは、角膜上皮における細胞質型CAアイソザイムと相補的にその緩衝能によって外因性の酸を中和し、角膜上皮の保護を行っていると考えられ、さらに鼻涙管を経て鼻腔内へと注ぎこむことで、鼻腔内の微小環境の維持に関与していると推論している。また第三眼瞼腺の脂腺細胞は涙液層の脂質層を形成する脂質を供給する細胞のひとつと思われ、著者は、この脂腺細胞の透過型電子顕微鏡による観察から、その細胞の微細構造が、同じ涙器付属腺である瞼板腺の脂腺細胞とは異なることを明らかとした。この脂腺細胞以外にもイヌの体内に分布する脂腺細胞にCAが存在するとの報告は未だ見られず、その存在意義は不明である。しかし脂質代謝がより盛んな脂腺の腺房辺縁にある未分化な細胞では、脂質を豊富に含み全分泌される直前の分化した細胞と比べて強い反応がみられたことから、この酵素が細胞内の脂質代謝に何らかの役割を果たしている可能性が考えられることを推論している。

本研究では、イヌの呼吸器系器官および涙器付属腺での炭酸脱水酵素アイソザイムの組織内分布の詳細を明らかにし、気道粘膜上皮および付属腺はもとより、とくに鼻粘膜嗅部嗅細胞、肺胞・細気管支分泌細胞（クララ細胞）、涙器付属腺内に見られる脂腺細胞にCA酵素が局在している事実を明らかにし、これらの細胞での酵素の存在意義について説明したものである。したがって本研究は、獣医学上基礎的なデータの蓄積によく貢献し、獣医学上意義ある業績として博士（獣医学）の学位を授与するのに相応しいものと判定した。