

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号: 34419

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2010 ~ 2012

課題番号: 22590846

研究課題名(和文) 気道構成細胞の表現型変化に基づいた喘息分子薬理療法

研究課題名(英文) A molecular pharmacological therapy for asthma based on phenotype changing in the structural cells in airways

研究代表者

久米裕昭 (KUME HIROAKI)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号: 50303631

研究成果の概要(和文): スフィンゴシン1リン酸 (S1P) は喘息の炎症反応によりマスト細胞から放出される。S1P を気道平滑筋に曝露すると  $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬による弛緩作用が減弱した。肺微小血管内皮細胞に S1P を曝露すると接着分子 (VCAM-1, ICAM-1) の発現が増強し、好酸球の接着率が高くなった。感作マウスに抗原刺激をすると気道周囲に好酸球の浸潤および炎症性サイトカインが増加し、ムスカリン受容体刺激による気道抵抗が増強した。これらの現象のすべては Rho-kinase 阻害薬で有意に抑制できた。ゆえに、気道構成細胞の表現型の変化から生じる喘息の病態 ( $\beta_2$  アドレナリン耐性化、好酸球性気道炎症、気道過敏性亢進など) には RhoA/Rho-kinase 系が共通に関与しており、Rho-kinase はこの疾患の治療の標的蛋白である可能性がある。

研究成果の概要(英文): Sphingosine-1-phosphate (S1P) is released from mast cells by the inflammatory reaction in asthma. The inhibitory effects of  $\beta_2$ -adrenergic receptor agonists were markedly attenuated after exposure of airway smooth muscle to S1P. The expression of adhesion molecules (VCAM-1, ICAM-1) were enhanced after exposure of human pulmonary microvascular endothelial cells to S1P. Adherence of eosinophils to the endothelial cells was also increased under this experimental condition. When an antigen was administered to sensitized mice, eosinophils and inflammatory cytokines were significantly elevated around airways. Moreover, respiratory resistance in response to methacholine was markedly augmented. All of the phenomena were suppressed by Rho-kinase inhibitors. Hence, RhoA/Rho-kinase pathways may be contributed to the pathophysiology of asthma ( $\beta_2$ -adrenergic desensitization, eosinophil inflammation, airway hyperresponsiveness etc) implicated in phenotype changes of the structural cells the airways. Rho-kinase may be target protein for asthma therapy.

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード: 気道平滑筋細胞、肺血管内皮細胞、好酸球、気道過敏性亢進、 $\beta_2$  アドレナリン受容体耐性化、Rho-kinase、sphingosine-1-phosphate、phenotype

## 1. 研究開始当初の背景

気道リモデリングは、気道上皮細胞障害、杯細胞増生、上皮下線維増生、平滑筋の増大、毛細血管増生、粘膜下腺過形成などの組織構成要素の変化を意味し、気道壁の肥厚が生じる。気道平滑筋の肥厚は気道構造の再構築に深く関与するので最も重要である。このような器質的な変化に陥ると、気道炎症の存在とは無関係に気道の収縮反応が増強し、気道過敏性の亢進を招き難治となる。喘息予防・管理のガイドラインでは、非可逆的な気道リモデリングの伸展を防止することがこの疾患に対する治療の目標に挙げられている。しかし、その発生機序の詳細は不明な点が多く、予防・治療のための臨床的な手段はいまだ確立されていない。

## 2. 研究の目的

この研究は、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の難治化の主因で、その機序が未解決である気道リモデリングを予防・治療の方法を進展させるために、根本的な病態を標的である気道の構成細胞の表現型の変化 (phenotype changes) として捉え、主要な病態に関わる phenotype changes において鍵となる蛋白を検索し、これらの疾患に対する根元的な分子標的治療を確立することを目的としている。標的細胞は、これらの疾患の病態に関与する気道構成細胞 (気道平滑筋細胞、気道上皮細胞、好酸球、肺血管内皮細胞) である。

## 3. 研究の方法

### a. 気管平滑筋の等尺性張力および細胞内 $Ca^{2+}$ の同時記録。

麻酔下でモルモットから気管を取り出し平滑筋の切片を作製し、組織をカルシウム蛍光色素である fura-2 (10  $\mu$ M の濃度で室温の条件で 4 時間) で処理した後に浴槽内に固定して等尺性張力と細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の指標である  $F_{340}/F_{380}$  の比を同時に記録した。気道炎症に関連すると考えられる刺激物質 (抗原抗体反応によりマスト細胞から放出される sphingosine-1-phosphate, S1P) を曝露した後、 $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬の弛緩作用に対する影響に  $Ca^{2+}$  動態、 $Ca^{2+}$  感受性との関連性を分析した。そして RhoA 由来の  $Ca^{2+}$  感受性の亢進が関与しているか Rho-kinase 阻害薬 (Y-27632) を用い調べた。

### b. 感作動物に対する抗原刺激による好酸球性気道炎症、気道過敏性亢進に対する抑制効果。

卵白アルブミン (OA)、および水酸化アルミゲルでマウス (BALB/c) を感作した後に OA を吸入させ (抗原刺激)、好酸球性の急性炎症の状態を誘導した。さらに、OA 感作および非感作のマウスに同様に種々の刺激を 4 週間繰り返し吸入させ、好酸球性の慢性炎症を誘導した。RhoA の効果であることを確かめるため Rho-kinase 阻害薬 (Y-27632、塩酸ファスジル)、あるいは TNF- $\alpha$  阻害薬 (サリドマイド) を前処置してから同じように実験をおこなった。

### c. 血管内皮細胞の過剰進展刺激による細胞内の変化の検証。

培養したヒト肺微細血管内皮細胞を fura-2 で処理した後に過剰伸展刺激を与え、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $F_{340}/F_{380}$ ) の変化 ( $Ca^{2+}$  動態)、種々の炎症性サイトカイン産生、および細胞骨格に対する影響について解析した。培養ヒト肺微細血管内皮細胞を Triton-X 100 で処理した後に蛍光デジタルイメージシステムによりストレスファイバーの形成を観察する。染色は、Filamentous (F) actin pools と、globular (G) actin pools を、それぞれ Fluorescein isothiocyanate-phalloidin と、Texas red DNase I とでおこなった。

### d. 気道炎症による接着分子発現に対する影響と祖に機序。

気道炎症に由来した物質である S1P より培養したヒト肺微細血管内皮細胞の表面に存在する接着分子 (ICAM-1、VCAM-1) の発現に影響を及ぼすか検索した。接着分子の発現は、RT-PCR、ウエスタンブロットを用いておこなう。RhoA に由来した機序であることを確認するため、Rhotekin pull-down 法を用いて RhoA の活性化を測定した。さらに、Rho-kinase 阻害薬 (Y-27632)、RhoA 阻害薬 (C3 exoenzyme)、および RhoA 活性化酵素の阻害薬 (GGTI-286) を用いた。さらに、三量体 G 蛋白の関連を調べるため百日咳菌毒素を用いた。実際に内皮細胞のと接着の変化を確かめるため、human eosinophilic leukemic cell line (EoL-1) を用い、接着分子の発現を変化させた条件で内皮細胞表面に流し、接着する細胞数を算出した。

## 4. 研究成果

a. Fura-2 を負荷した気管平滑筋の切片に 0.001-0.1  $\mu$ M S1P を 15 分間投与すると、濃度依存性に張力が発生し、 $F_{340}/F_{380}$  の増加がともなっていた。S1P を洗い流すと張力、 $F_{340}/F_{380}$  の値は 15 分ほどで投与前まで回復した。S1P 曝露前後で 1  $\mu$ M メサコリン (ムスカリン受容体刺激薬) による収縮に対する 0.3  $\mu$ M イソプロテレノール ( $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬) の抑制作用は著明に低下した。イソプロテレノールの抑制率は、約 75% から 2% に減少したが、 $F_{340}/F_{380}$  の値はほとんど変化しなかった。この現象はこの実験条件下の S1P の濃度の範囲内では無関係であった。10  $\mu$ M フォルスコリン ( $\beta_2$  アドレナリン受容体を介さないで直接アデニルシクラーゼを活性化する) の弛緩作用を同様に S1P を曝露する前後で調べると、S1P の曝露濃度、曝露時間に依存してフォルスコリンの弛緩効果が低下した。0.1  $\mu$ M S1P を 60 分間曝露した後

は、1  $\mu\text{M}$  メサコリン収縮に対するフォルスコリンの抑制率は約 80%から 40%に減少した。0.1  $\mu\text{M}$  S1P に 0.001-1  $\mu\text{M}$  Y-27632 を存在させると、S1P 曝露後のフォルスコリンの弛緩作用の低下は、濃度依存性に回復し、正常範囲内に戻った。さらに、0.001-1  $\mu\text{g/ml}$  百日咳菌毒素で 6 時間曝露して洗い流した後に同様に実験をおこなうと、S1P 曝露後のフォルスコリンの弛緩作用の低下は濃度依存性に改善した。

b. 感作されたマウスに抗原チャレンジをおこなった後、肺泡洗浄液を採取すると、総細胞数、好酸球数の著明な上昇が起こった。さらに、IL-4、IL-5、IL-13、TNF- $\alpha$  の濃度の著明な上昇が認められた。サリドマイド (30 – 300 mg/kg) を前投与すると、好酸球数、IL-5、TNF- $\alpha$  の有意な減少が生じたが、総細胞数、IL-13 の低下は起こらなかった。肺切片のよる組織学的な検討では、抗原チャレンジにより、気道周囲への好酸球の浸潤の増加および杯細胞の過形成が生じた。サリドマイドで前処置すると好酸球の浸潤、杯細胞過形成は有意に抑制された。メサコリンによる呼吸抵抗は抗原チャレンジにより著明に上昇した (気道過敏性の亢進) が、サリドマイドで前処置すると有意に改善した。

c. 培養したヒト肺微小血管内皮細胞をヒトフィブロネクチンで覆われたシリコンチャンバーに置いた。そして単軸方向に 10 – 30% の強度で 3 秒間の過剰伸展刺激を与えた。3  $\mu\text{M}$  Fura-2 が 25 分間 37°C の条件で負荷された。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $F_{340}/F_{380}$ ) は過剰伸展刺激の強度に依存して上昇した。すなわち、30% の過剰伸展では、 $F_{340}/F_{380}$  は 0.4 から 0.8 に増加した。この現象 ( $F_{340}/F_{380}$  の増加) は、 $\text{Ca}^{2+}$  フリー溶液、stretch-activated cation channel の阻害作用を有する  $\text{Gd}^{3+}$ 、transient receptor potential vanilloid の阻害作用を有する ruthenium red を存在させると起こらなくなった。さらに、cytochalasin D (actin polymerization の阻害薬) は過剰伸展による  $F_{340}/F_{380}$  の上昇を抑制した。蛍光イメージでは、1  $\mu\text{M}$  S1P は F-actin を増加させたが、cytochalasin D は F-actin を増加させなかった。S1P は過剰伸展刺激後の  $F_{340}/F_{380}$  を有意に上昇させた。

d. 培養した肺微小血管内皮細胞に 0.1 – 10  $\mu\text{M}$  S1P を投与すると、濃度依存性に VCAM-1、ICAM-1 の発現が増加した。この現象は RT-PCR、ウェスタンブロットともに認められた。これらの接着分子の発現は S1P 曝露後にしだいに増加し 4 -8 時間後に最大に達した。これは抗原曝露後、遅発性喘息反応が生じる時間に相当する。Rhotekin pull-down 法に従って RhoA の活性化を調べると、1  $\mu\text{M}$  S1P により活性化した RhoA (GTP-RhoA) は約 3 倍に増加した。0.1 – 10  $\mu\text{M}$  Y-27632、10 – 30 ng/ml C3 exoenzyme、GGTI-286 の存在下で S1P を曝露すると、濃度依存性に接着分子の発現が抑制された。10 – 300 ng/ml 百日咳菌毒で 4 時間

前処置してから S1P を曝露すると、濃度依存性に接着分子の発現が低下した。上記に示した実験条件下でヒト肺微小血管内皮細胞表面に接着分子を誘導させて、EoL-1 細胞をその表面に流して、接着した EoL-1 細胞を算出すると、S1P の曝露で接着した細胞数は増加し、Y-27632、百日咳菌毒素などの前処置によりコントロールレベルまで改善した。

#### 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)

[雑誌論文] (計 9 件)

- 1) Makino Y, Kume H, Oguma T, Sugishita M, Shiraki A, Hasegawa Y, Honjo H, Kamiya K. Role of sphingosine-1-phosphate in  $\beta$ -adrenoceptor desensitization via  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization in airway smooth muscle. *Allergol Int* 61: 311-22, 2012. 査読有
- 2) Sashio T, Kume H, Takeda N, Asano T, Tsuji S, Kondo M, Hasegawa Y, Shimokata K. Possible Involvement of Sphingosine-1-Phosphate/ $\text{G}_i$ /RhoA pathways in adherence of eosinophils to pulmonary endothelium. *Allergol Int* 61: 283-93, 2012. 査読有
- 3) Kotani H, Kishi R, Mouri A, Sashio T, Shindo J, Shiraki A, Hiramatsu T, Iwata S, Taniguchi H, Nishiyama O, Iwata M, Suzuki R, Gonda H, Niwa T, Kondo M, Hasegawa Y, Kume H, Noda Y. Influence of leukotriene pathway polymorphisms on clinical responses to montelukast in Japanese patients with asthma. *J Clin Pharm Ther* 37: 112-6, 2012. 査読有
- 4) Asano T, Kume H, Taki F, Ito S, Hasegawa Y. Thalidomide attenuates airway hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biol Pharm Bull* 33: 1028-32, 2010. 査読有
- 5) Ito S, Suki B, Kume H, Numaguchi Y, Ishii M, Iwaki M, Kondo M, Naruse K, Hasegawa Y, Sokabe M. Actin cytoskeleton regulates stretch-activated  $\text{Ca}^{2+}$  influx in human

- pulmonary microvascular endothelial cells.  
Am J Respir Cell Mol Biol 43: 26-34, 2010.  
査読有
- 6) 久米裕昭、東田有智  
COPD 治療における  $\beta_2$  刺激薬の特性  
吸入療法 3: 30-40, 2011.  
査読無
- 7) 久米裕昭、忌部 周、塚本啓造、沖本奈美、深井有美、山藤啓史、牧野 靖、西山 理、岩永賢司、東本有司、中島宏和、東田有智  
インダカテロール(新規超長時間作用性  $\beta_2$  刺激薬)の薬理学的特性とそれに基づく臨床的有用性  
アレルギー・免疫 18: 1858-1868, 2011.  
査読有
- 8) 久米裕昭、辻 清太、塚本啓造、忌部 周、山藤啓史、綿谷奈々瀬、宮嶋宏之、西川裕作、中島宏和、東田有智  
慢性閉塞性肺疾患に潜伏する好酸球性気道炎症に対する制御と吸入ステロイド薬/長時間作用性  $\beta_2$  刺激薬配合剤の有用性—あらたな臨床病型の可能性  
アレルギー・免疫 17: 2056-2065, 2010.  
査読有
- 9) 久米裕昭、白木 晶、綿谷奈々瀬、西川裕作、川内映理、佐藤隆司、東本有司、宮良高維、中島宏和、東田有智  
慢性閉塞性肺疾患の肺機能改善における短時間作用性  $\beta_2$  刺激薬の有効性—固有活性に基づいた効果の検討  
アレルギー・免疫 17: 1230-1238, 2010.  
査読有
- [学会発表] (計 16 件)
- 1) Kume H, Imbe S, Iwanaga T, Tohda Y.  
Synergistic effects of glycopyrronium bromide and indacaterol on muscarinic agonist-induced contraction in airway smooth muscle.  
ERS Annual Congress-Vienna 2012, Austria, September 05, 2012.  
(Poster Discussion)
- 2) Kume H, Imbe S, Nishiyama O, Sano H, Yamagata T, Iwanaga T, Higashimoto Y, Nakajima H, Tohda Y.  
Inhibitory effects of Indacaterol on muscarinic activation- and oxidative stress-induced contraction in airway smooth muscle.  
ATS 2012 International Conference, San Francisco, California, U.S.A., May 20, 2012.  
(Poster Discussion Session)
- 3) Kume H, Sugishita M, Maino Y, Tohda Y.  
A novel classification and rational use of  $\beta_2$ -adrenergic agonists based on their intrinsic efficacy.  
ATS 2011 International Conference, Denver, Colorado, U.S.A., May 16, 2011.
- 4) 久米裕昭、東田有智  
気道炎症からみた喘息と COPD の接点  
喘息と COPD の接点  
第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会  
2012 年 11 月 30 日、大阪市  
(シンポジウム)
- 5) 久米裕昭、東田有智  
あらたな喘息分子薬理療法の可能性—標的分子としての RhoA/Rho-kinase 系第 32 回六甲カンファレンス  
2012 年 7 月 29 日、京都市
- 6) 久米裕昭、東田有智  
Future Risk の予防に求められる LABA の必要性和その特性  
Next stage of asthma treatment  
第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会  
2012 年 5 月 13 日、大阪市  
(ランチプログラム)
- 7) 久米裕昭、東田有智  
好酸球性気道炎症に基づく吸入ステロイド薬の有効性  
COPD と喘息: 治療の接点  
第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会  
2012 年 5 月 13 日、大阪市  
(シンポジウム)
- 8) 久米裕昭、忌部 周、塚本敬造、深井有美、牧野 靖、佐藤隆司、西山 理、佐野博幸、岩永賢司、東田有智  
Indacaterol (超長時間作用性  $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬)の特徴とそれに基づく臨床的有用性  
第 52 回日本呼吸器学会学術講演会、  
2012 年 4 月 22 日、神戸市
- 9) 久米裕昭、沖本奈美、深井有美、忌部 周、宮嶋宏之、西山 理、岩永賢司、東本有司、に鹿島宏和、東田有智  
慢性閉塞性肺疾患の新たな表現型—好酸球性気道炎症と気道過敏性からみた病型分類  
第 52 回日本呼吸器学会学術講演会、  
2012 年 4 月 21 日、神戸市
- 10) 久米裕昭、塚本敬造、忌部 周、牧野 靖、岩永賢司、中島宏和、東田有智  
Indacaterol (超長時間作用性  $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬)の薬理学的特性について  
第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会

2011年11月10日、東京

- 11) 久米裕昭、岩永賢司、東田有智  
喘息と末梢気道閉塞  
呼吸機能検査の未来への第一歩：末梢気道閉塞を問い直す  
第51回日本呼吸器学会学術講演会、  
2011年4月23日、東京  
(シンポジウム)
- 12) 久米裕昭、東田有智  
吸入ステロイド薬に対する反応  
高齢者喘息とCOPDの類似点・相違点  
第60回日本アレルギー学会秋季学実大会  
2010年11月27日、東京  
(ワークショップ)
- 13) 久米裕昭、東田有智  
高齢者喘息  
喘息を取り巻く最近の話題  
第60回日本アレルギー学会秋季学実大会  
2010年11月26日、東京  
(イブニングシンポジウム)
- 14) 久米裕昭、東田有智  
高齢者喘息の問題点～患者に適した治療を求めて～  
第50回日本呼吸器学会学術講演会  
2010年4月25日、京都市  
(ランチチョンセミナー)
- 15) 久米裕昭、東田有智  
COPD治療の向上に求められる $\beta_2$ 刺激薬の薬理学的特性  
COPDの治療戦略—アシストユースの有用性—  
第50回日本呼吸器学会学術講演会  
2010年4月24日、京都市  
(イブニングシンポジウム)
- 16) 久米裕昭、辻 清太、牧野 靖、西山 理、東田有智  
気管支喘息の病態におけるエンドセリン-1の役割—あらたな炎症マーカーとしての可能性—  
第50回日本呼吸器学会学術講演会  
2010年4月23日、京都市

〔図書〕(計3件)

- 1) 久米裕昭、東田有智  
喘息治療薬  
カラー版内科学、門脇 孝、永井良三編  
西村書店、東京、P. 222-227, 2012.
- 2) 久米裕昭、東田有智  
気管支拡張薬、

総合アレルギー学、福田 健編  
南山堂、東京、P. 331-339, 2011.

- 3) 久米裕昭、牧野 靖、東田有智  
 $\beta_2$ 刺激薬  
アレルギー疾患イラストレイテッド  
永倉俊和、福田 寛、足立 満編  
メディカルレビュー社、東京、P226-233,  
2010.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

久米裕昭 (KUME HIROAKI)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：50303631

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：