

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500976

研究課題名(和文)閉塞性肺疾患におけるビタミンの役割

研究課題名(英文)Vitamin and chronic obstructive airway disease

研究代表者

山崎 章 (Yamasaki, Akira)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70325009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：閉塞性肺疾患患者のビタミン濃度と酸化ストレス、閉塞性障害および活動性との関連性を検討した。閉塞性障害の程度、酸化ストレスの指標および活動性の間には関連性はみられなかった。今後、抗酸化ストレス作用のあるビタミンの摂取が閉塞性肺疾患患者の呼吸機能や活動性に影響を及ぼすかどうかの前向きな検討が必要である。

また、基礎実験では平滑筋細胞を用いてビタミンEの成分であるトコトリエノールを用いて検討を行った。トコトリエノールは気管支平滑筋細胞の増殖や遊走、筋線維芽細胞様への細胞の分化も抑制した。このことから気管支喘息にみられる気道リモデリングをトコトリエノールが抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The relationships among oxidative stress marker, serum vitamin levels and physical activity index in patients with chronic airway disease were studied. The serum vitamin levels were not related to physical activity index or oxidative stress levels. Therefore, the vitamin levels might not be related to oxidative stress at short time study. The long term and prospective study is needed to investigate the effects of vitamin on patients with airway diseases. We also studied the effect of tocotrienol on human airway smooth muscle cells. Alfa, gamma and delta tocotrienol reduced airway smooth muscle cell proliferation and migration induced by PDGF-BB. This inhibitory effect is mediated by inhibition of RhoA activation. We also found that gamma tocotrienol inhibited collagen I and fibronectin expression increased by TGF-beta1. These results indicate that tocotrienol could have beneficial effects for airway remodeling in asthma by inhibiting several functions of airway smooth muscle cells.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：ビタミン トコトリエノール 気道平滑筋細胞 閉塞性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

本邦の気管支喘息の有病率は約 5-10% である。また、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の有病率も約 5% とされている。いずれの呼吸器疾患においても様々な治療薬が開発、臨床応用され、病気のコントロールも良好となってきたが、いまだに難治性の患者も存在する。難治性の要因は様々だが、気道の構造改築 (気道リモデリング) は大きな要因のひとつである。気道リモデリングでは持続する気道炎症による基底膜の肥厚、気管支平滑筋細胞の増殖、肥大、気管支腺の増加、筋線維芽細胞の増加などがみられる。これまで我々は気管支平滑筋細胞を用いた実験を行い、気管支喘息の難治化についての検討を行ってきた。気道リモデリングに見られる病変には TGF- β 1 と平滑筋細胞が重要な役割を果たしている。申請者は不死化気道平滑筋細胞を用いて TGF- β 1 が平滑筋細胞の α -sm-actin や sm-MHC といった収縮性蛋白の発現を増強させることを報告してきた。また、気道リモデリングは、軽症患者でも見られるが、重症・難治性気管支喘息患者においてはより顕著に認められる。一方重症・難治性喘息においては好中球の関与も示唆されている。好中球と気道リモデリングの関連についての検討はこれまであまりなされていなかったが、最近我々は好中球性のメディエーターの一つである LTB4 が気管支平滑筋の増殖および遊走を増強することを報告している。また、同様に好中球性のメディエーターである IL-8 も気管支平滑筋細胞の増殖および遊走を引き起こすことが報告されている。これらの炎症性メディエーターは COPD でも増加していることが報告されており、COPD の気道でも認められる気道リモデリングの病態にも同様に関与している。

また、近年大気汚染や黄砂による気管支喘息の増悪が報告されている。これら環境物質による酸化ストレスが気管支喘息の病態に関与していることが示唆されている。また、タバコが原因の 90% を占める COPD でも酸化ストレスがその病態に深く関与している。酸化ストレスに対しては抗酸化物質であるポリフェノールやカロテン、ビタミンなどの摂取が有効とされているが、これまでに気管支喘息あるいは COPD における酸化ストレスの状態と気道リモデリングの病態、またビタミン摂取との役割について検討した報告は少ない。

2. 研究の目的

(1) 気管支喘息あるいは COPD 患者における酸化ストレスの状態を呼気濃縮液の過酸化水素および血清中のヒドロペルオキシドを用いて評価する。各種ビタミン濃度は各種キットや高速液体クロマトグラフィーについて検討する。食事摂取状況について検討し、栄養状態、食生活などと各呼吸器疾患との関連性について明らかにする。

(2) 培養気道平滑筋細胞を用い、in vivo での検討を行い、抗酸化作用のあるビタミンが平滑筋細胞に及ぼす影響について検討する。

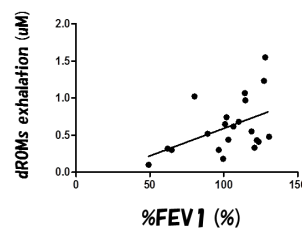
3. 研究の方法

(1) 鳥取大学医学部附属病院通院中の気管支喘息患者 19 名、COPD 患者 2 名を対象に検討を行った。酸化ストレスは Free Radical Analytical System (WismerII 社製) を用い、血清及び呼気 dROMs 値 (diacron reactive oxygen metabolites)、抗酸化力は BAP test (biological antioxidant potential) で評価をした。活動性は加速度計である Actiwatch を用いて評価した。ビタミンは簡易型自記式食事歴法質問票及び血中濃度を測定した。

(2) 不死化した気道平滑筋細胞を用いた。ビタミンについてはビタミン D とビタミン E を用いた。ビタミン D はカルシトリオールを用いた。また、ビタミン E には 8 つの isoform があるが、このうち α 、 γ および δ -tocotrienol を用いた。

4. 研究成果

(1) 閉塞性肺疾患患者 (気管支喘息患者 19 名、COPD 患者 2 名) の平均年齢は 64.4 \pm 11.2 歳、男性 10 名、女性 11 名であった。喫煙状況は current smoker 9 名、past smoker 10 名、never smoker 2 名であった。一秒率は 68.8 \pm 11.8%、予測一秒率は 103.3 \pm 22.9% であった。呼気 NO は 32.4 \pm 18.4%、ACT score は 24.3 \pm 1.0、CAT score は 10.5 \pm 0.6 であった。酸化ストレスの指標 dROM test は 337.8 \pm 47.4 U.CARR (基準値 200-300 U.CARR)、抗酸化力の指標である BAP test は 2358.2 \pm 296.8 μ M (基準値 >2000 μ M)、呼気中酸化ストレスの値 dROMs exhalation test は 0.62 \pm 0.38 μ M (基準値 34.2 \pm 0.66 μ M) であった。これらの酸化ストレスマーカーと抗酸化力についての相互関係については、抗酸化力と dROM exhalation test との間に有意な正の相関を認めた。また予測一秒率と呼気中の酸化ストレスの指標である dROM exhalation test とは有意な相関を認めた。



Spearman 順位相関
($r=0.4475$, $p=0.0419$)

しかし、一秒率と酸化ストレスのマーカーについては有意な相関はみられなかった。

次に活動性と酸化ストレスマーカーについての相関を検討したが、明らかな関連性は見られなかった。

次に呼気中の酸化ストレスマーカーと呼

気 NO との関連性について検討した。呼気 NO は呼気中の酸化ストレスマーカーと有意な相関を認めたと、呼気 NO は一秒率、予測一秒量率との間には有意な相関は見られなかった。

抗酸化作用のあるビタミン A, C, E の摂取量と各種酸化ストレスマーカーとの間には有意な相関は得られなかった。また、血清中のビタミン A, C, E と各種酸化ストレスマーカーの間にも有意な相関は得られなかった。またビタミンの濃度と actiwatch で測定した活動性あるいは呼吸機能と活動性との間にも有意な相関は得られなかった。

今回の横断的研究では、各種ビタミンが閉塞性肺疾患に与える影響についてははっきりしなかった。これは気管支喘息の症例が 19 例と多かったこと、COPD の症例が 2 例とすくなかったこと、比較的軽症例が多かったことなどが理由として考えられる。今後抗酸化作用のあるビタミンの摂取が、喘息や COPD の呼吸機能あるいは活動性の改善につながるかどうかについて今後の検討が必要である。

(2) 気管支平滑筋細胞に及ぼす影響

活性型ビタミン D は気道平滑筋細胞に及ぼす影響について

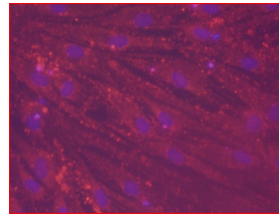
不死化した気管支平滑筋細胞を培養し、24 時間血清除去を行った後、活性型ビタミン D であるカルシトリオールで前処置を行った。1 時間の前処置後に PDGF-BB あるいは TGF- β 1 で刺激した。PDGF-BB による細胞増殖については WST-8 assay により、TGF- β 1 による Collagen I の発現については Western blotting により検討を行った。Calcitriol は 10nM, 100nM, 1 μ M の濃度依存性に PDGF-BB(10ng/ml) による細胞増殖を抑制した。また、同様に TGF- β 1 による Collagen I の発現もカルシトリオールで抑制された。したがって活性型ビタミン D は気管支平滑筋細胞の増殖および細胞外基質の産生を抑制することより気管支喘息でみられる気道リモデリングに対し有用である可能性が示唆された。

トコトリエノールの及ぼす影響について
トコトリエノールは α 、 γ 及び δ の3つの isoform を用いて検討を行った。不死化した気管支平滑筋細胞を用いて各種 isoform の作用を検討した。

γ -トコトリエノールは TGF- β 1 による気道平滑筋細胞の α -smooth muscle actin の発現をその濃度依存性に抑制した。また、fibronectin および collagen I の発現も濃度依存性に抑制した。TGF- β 1 は Smad2/Smad 3 をリン酸化したが、 γ -トコトリエノールはこの Smad 2/Smad3 のリン酸化は抑制しなかった。しかしながら、TGF- β 1 による RhoA の活性化は γ -トコトリエノールによって抑制された。また、 γ -トコトリエノールは TGF- β 1 に

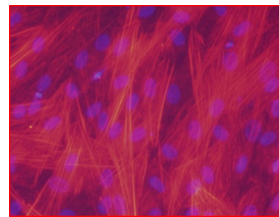
よる Id1 の発現を抑制した。したがって、 γ -トコトリエノールは RhoA および Id1 の発現を抑制することによって、筋線維芽細胞様の分化を抑制することが分かった。

(a) 無刺激

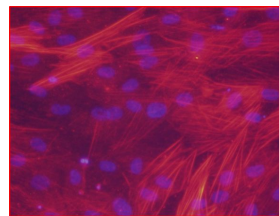


Alexa 568: α SMA

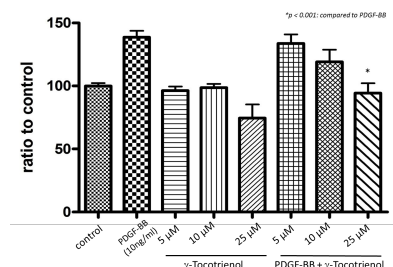
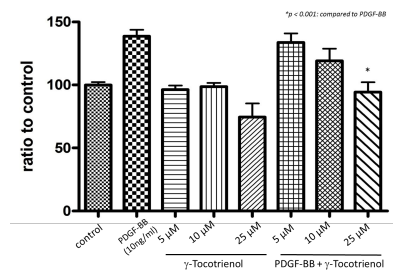
(b) TGF- β 1 (2ng/ml, 48hour)

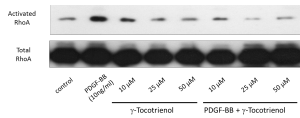


(c) TGF- β 1(2ng/ml)+ γ -トコトリエノール (50 μ M)



また、 γ -トコトリエノールは PDGF-BB による細胞増殖および遊走を濃度依存性に抑制した。PDGF-BB は p42/p44 MAPK や Akt1 をリン酸化したが、 γ -トコトリエノールはこれらの p42/p44 MAPK あるいは Akt1 は抑制しなかった。一方、PDGF-BB は RhoA を活性化したが、この活性化を γ -トコトリエノールは有意に抑制した。





また同様の検討を α および δ -トコトリエノールを用いて検討した。 α および δ -トコトリエノールは、 γ -トコトリエノールと同様にPDGF-BBによる気管支平滑筋細胞の増殖および遊走を抑制した。これには、p42/p44 MAPKおよびAkt1のリン酸化は関与していなかったが、PDGF-BBによるRhoAの活性化が関与していた。また、 γ -トコトリエノールと同様に、 α および δ -トコトリエノールはTGF- β 1による α -smooth actinの発現増強を抑制した。これにもRhoAの活性化が関与していた。

したがって α 、 γ および δ -トコトリエノールは、気管支平滑筋細胞の増殖および遊走を抑制し、また筋線維芽細胞への分化誘導を抑制する。これは気管支喘息でみられる気道リモデリング対し有用である可能性が示唆された。

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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tomoya Harada, Akira Yamasaki, Hiroki Chikumi, Kiyoshi Hashimoto, Ryota Okazaki, Miki Takata, Takehito Fukushima, Masanari Watanabe, Jun Kurai, Andrew J. Halayko, Eiji Shimizu. γ -Tocotrienol reduces human airway smooth muscle proliferation and migration, *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 査読有 32(2015), 45-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pupt.2015.04.003>

〔学会発表〕(計 5 件)

山崎 章、福嶋健人他、および γ -tocotrienol が気道平滑筋細胞に及ぼす影響について、日本アレルギー学会、2015年5月26日、東京、新高輪グランドプリンスホテル

山崎 章、原田智也他、閉塞性肺疾患患者での酸化ストレス、ビタミンと活動性に関する検討、日本呼吸器学会、2015年4月17日、東京、東京国際フォーラム

山崎 章、原田智也他、Tocotrienol inhibits TGF- β 1-induced human airway smooth muscle differentiation、ヨーロッパ呼吸器学会、2013年9月7日、バルセロナ、スペイン FIRA バルセロナコンベンションセンター

原田智也、山崎 章他、The effect of

γ -tocotrienol on human airway smooth muscle cell proliferation and migration、ヨーロッパ呼吸器学会、2013年9月7日、バルセロナ、スペイン FIRA バルセロナコンベンションセンター

原田智也、山崎 章他、トコトリエノールの気管支平滑筋細胞に及ぼす影響について、日本アレルギー学会、2012年11月29日、大阪、大阪国際会議場

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 章 (YAMSAKI, Akira)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：70325009