

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09213

研究課題名(和文)プロトン感知性受容体OGR1の慢性気道炎症、気道分泌への関与に関する研究

研究課題名(英文)The involvement of proton-sensing receptor OGR1 in chronic airway inflammation and secretion.

研究代表者

石塚 全 (ISHIZUKA, TAMOTSU)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：50302477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト気管支平滑筋細胞(BSMC)はOGR1を介して細胞外酸性を感知し、サイトカインを産生する。BSMCをpH6.3または7.4に調整した0.1%BSA含有DMEMで刺激し、IL-8 mRNA発現をRT-PCRで、IL-8をELISAで測定した。pH6.3刺激によりBSMCは十分量のIL-8を産生、遊離したが、OGR1をsiRNAによってノックダウンしたBSMCでは酸性刺激によるIL-8産生は減弱した。PKC阻害薬、MEK1/2阻害薬、I κ Bリン酸化阻害薬、デキサメサゾン(DEX)は酸性刺激によるIL-8産生を抑制した。DEXはNF- κ B p65リン酸化、DNAへの結合に影響しなかった。

研究成果の概要(英文)：Human bronchial smooth muscle cells (BSMCs) are involved in airway inflammation. Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 (OGR1) sense extracellular protons and mediate cytokine production in BSMCs. BSMCs were stimulated by pH 6.3 or pH 7.4-adjusted DMEM containing 0.1% BSA (0.1% BSA-DMEM). As a control stimulant, TNF- α (10 ng/ml) was used. IL-8 mRNA expression in BSMCs was quantified by RT-PCR. Acidic pH induced mRNA expression of IL-8 and a substantial amount of IL-8 production in BSMCs. BSMCs transfected by siRNA specific for OGR1 produced less IL-8 compared with those transfected non-targeting siRNA. PKC inhibitor, MEK 1/2 inhibitor, and the inhibitor of I κ B phosphorylation reduced acidic pH-stimulated IL-8 production in BSMCs. Dexamethasone inhibited acidic pH-stimulated IL-8 production of BSMCs in a dose-dependent manner. Dexamethasone did not affect either phosphorylation or binding to consensus DNA site of NF- κ B p65.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：プロトン OGR1 気道炎症 IL-8 気管支平滑筋細胞 グルココルチコイド

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息などの病態を考えるうえで、気道平滑筋細胞、気道上皮細胞などの気道構成細胞の果たす役割は大きい。特にヒト気管支平滑筋細胞は気管支収縮に直接関与し、気流閉塞を惹起するだけでなく、気管支平滑筋細胞の肥大、増殖による気管支平滑筋層の増加は気道過敏性亢進にも寄与する。気管支喘息患者における気道局所の pH は 5.2 まで低下すると報告されており、気管支平滑筋細胞は細胞外酸性環境にさらされている。細胞が細胞外酸性を感知するメカニズムとして知覚神経に存在し、カプサイシンに反応する TRPV 1 channel や acid-sensing ion channel が良く知られているが、近年、プロトン感知性 G タンパク質共役型受容体ファミリーの存在が報告され、これらの受容体は多種の細胞において生理的な pH の変化を、ヒスチジン残基を介して感知し、細胞内シグナル伝達を誘導することがわかってきた。私たちの研究グループではヒト支平滑筋細胞にはプロトン感知性 G タンパク質共役型受容体ファミリーのなかで、Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 (OGR1) が発現しており、OGR1 を介するプロトン刺激によって interleukin-6 (IL-6) やマトリセルラー蛋白質の一種 connective tissue growth factor (CTGF) を産生誘導することを報告してきた。また、卵白アルブミン感作によるマウスアレルギー性気管支喘息モデルにおいて、OGR1 ノックアウトマウスでは、気道への好酸球集積、気道上皮細胞の杯細胞化、BAL 液中の Th2 サイトカインの増加、気道過敏性亢進などの野生型マウスで観察される現象が改善されることを報告し、OGR1 は Th2 型気道炎症や、気道リモデリング形成に促進的に作用するものと予想している。

2. 研究の目的

気管支喘息の気道炎症は一般的には好酸球性炎症であり、ステロイドに反応良好な炎症である。しかしながら、近年、好酸球性気道炎症にはアレルギーによる獲得免疫系を介する Th2 型免疫応答によるもののほかに、IL-33 や group 2 自然免疫リンパ球の関与する自然免疫系によって惹起される好酸球性炎症も存在することが明らかになってきた。これら好酸球性気道炎症による喘息のなかで吸入ステロイド薬をベースとした標準的薬物療法では症状や増悪が十分にコントロールされない重症喘息、難治性喘息に対してはオマリスマブ (抗 IgE 抗体) やメボリズマブ (抗 IL-5 抗体)、ベンラリズマブ (抗 IL-5 レセプター- α 抗体) などの生物学的製剤の効果が期待できる。一方で、上記の重症喘息とは異なる非好酸球性気道炎症、好中球性気道炎症による重症喘息の存在が指摘されているが、その病態は不明な点が多く、一般にステ

ロイド抵抗性と考えられている。好中球を気道炎症局所に引き寄せるケモカインとして interleukin-8 (IL-8) は最も重要であると思われる。本研究ではヒト気管支平滑筋細胞に焦点を当て、ヒト気管支平滑筋細胞から細胞外酸性環境 (プロトン) によって産生、遊離される IL-8 の遺伝子転写に至る細胞内メカニズムとステロイドの IL-8 産生に対する効果について検討した。

3. 研究の方法

正常ヒト気管支平滑筋細胞 (Normal human bronchial smooth muscle cell: BSMC) は Lonza 社より購入し、5%FBS、ヒト EGF、insulin、ヒト FGF-B、gentamicin/amphotericin B を含む平滑筋基本培地で培養した。IL-8 測定用実験では BSMC は 12-well plate で、mRNA 回収実験では 6-well plate で培養した。実験に用いる BSMC は 0.1% 牛血清アルブミン (BSA) 含有 DMEM で一定時間培養後、pH 7.4 または pH 6.3 に調整した 0.1% BSA 含有 DMEM に培地を交換して刺激した。一部の実験では TNF- α (10 ng/mL) により細胞を刺激した。各種細胞内シグナル伝達因子阻害薬、デキサメサゾン は細胞刺激 30min 前に培養液中に添加した。

細胞上清中の IL-8 は ELISA 法により測定し、IL-8 mRNA、OGR1 mRNA 発現は RNA 抽出後、Taqman プローブを用いた real-time PCR 法により測定し、GAPDH mRNA によって標準化した。

OGR1 の発現を OGR1 に特異的な siRNA を transfection してノックダウンした。対照として non-targeting siRNA を transfection した細胞を用いた。

転写因子 NF- κ B p65 のリン酸化は細胞を RIPA buffer で溶解し、SDS-PAGE で展開後、Ser 536 リン酸化 NF- κ B p65 に特異的な抗体を一次抗体として Western blot 法によって検出した。

NF- κ B p65 の DNA への結合は Trans AM キット (Active Motif 社製) を用いて測定した。すなわち核蛋白質抽出後、NF- κ B コンセンサス配列 DNA (5'-GGGACTTCC-3') を固相化した 96 well plate で incubation し、結合した p65 を p65 に特異的に反応する抗体を用いて検出した。

4. 研究成果

(1) 細胞外酸性 (プロトン) 刺激による BSMC の IL-8 産生、遊離

BSMC からの IL-8 産生は pH7.4 の medium 刺激でも 24 時間後に確認されたが、pH6.3 の medium ではその約 5 倍の遊離がみられた。細胞外 pH 6.3 で刺激 24 時間後に遊離される IL-8 は TNF- α (10 ng/mL、pH 7.4) 刺激で観察される IL-8 の約 25% だった。Real-time PCR 法で半定量された IL-8 mRNA の発現は pH6.3 刺激 2 および 5 時間後において pH 7.4 刺激に比べ

で有意に増加した。

(2) 細胞外酸性 (プロトン) 刺激による BSMC の IL-8 産生への OGR1 の関与

OGR1 に特異的な siRNA で OGR1 の発現を十分にノックダウンした。Non-targeting siRNA で処理した BSMC に比べ、95%まで OGR1 mRNA 発現が抑制された。OGR1 をノックダウンした BSMC では Non-targeting siRNA で処理した BSMC に比べて、pH6.3 刺激による IL-8 産生が有意に抑制された。

(3) プロトン刺激による OGR1 を介する IL-8 産生における protein kinase C (PKC), extracellular signal-regulated kinase (ERK), NF- κ B の関与

PKC 阻害薬 bisindolylmaleimide I, MEK1/2 阻害薬 U0126, I κ B リン酸化阻害薬 BAY-11-7082 はプロトン刺激による IL-8 産生を有意に抑制したが、p38 MAP kinase 阻害薬 SB203580 は抑制しなかった。したがって、OGR1 を介する細胞内シグナル伝達経路として、PKC 活性化, MEK1/2, ERK1/2 活性化, NF- κ B の転写活性が BSMC における IL-8 産生に必須であると予想された。

(4) プロトン刺激による IL-8 産生に対するステロイドの効果

デキサメサゾン(dexamethasone: DEX)はプロトン刺激による IL-8 産生を濃度依存性に抑制した。DEX はプロトン刺激による IL-8 mRNA 発現も有意に抑制した。

DEX は TNF- α 刺激による IL-8 産生を同様に抑制したが、プロトン刺激に対する抑制率は TNF- α 刺激に対する抑制率よりも有意に大きかった。

(5) NF- κ B p65 Ser 536 リン酸化に対するステロイドの作用

プロトン刺激により、対照として用いた TNF- α 刺激と比べて弱いものの NF- κ B p65 Ser 536 のリン酸化が観察された。このリン酸化に DEX は影響しなかった。

(6)NF- κ B コンセンサス部位への p65 の結合に対するステロイドの作用

プロトン刺激 1 時間後に核タンパク質を抽出し、5'-GGGACTTTCC-3' DNA コンセンサス配列への p65 の結合を検討した。プロトン刺激, TNF- α 刺激によって p65 の DNA への結合は増加したが、DEX は p65 の DNA への結合には影響しなかった。

以上の結果より DEX は NF- κ B を介する遺伝子転写を抑制する可能性はあるが、少なくとも p65 のリン酸化や p65 の DNA への結合には影響しなかった。今後、p65 が DNA に結合した後の過程での DEX の作用を解析する必要がある。

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 18 件)

石塚 全: リポキシンとアレルギー アレルギー免疫 25: 372-381, 2018
査読無

千原一泰, 本定千知, 木村幸弘, 竹内健司, 藤枝重治, 石塚 全, 定 清直. C 型レクチンによるマスト細胞の活性化メカニズム. 臨床免疫.アレルギー科 69: 271-276, 2018
査読無

石塚 全: 気管支喘息の診断と治療 日本内科学会誌 107: 476-481, 2018
査読無

Anzai M, Morikawa M, Okuno T, Umeda Y, Demura Y, Sonoda T, Yamaguchi M, Kannno K, Shiozaki K, Ameshima S, Akai M, Ishizuka T. Efficacy and safety of nanoparticle albumin-bound paclitaxel monotherapy as second-line therapy of cytotoxic anticancer drugs in patients with non-small cell lung cancer. Medicine (Baltimore) 96: 51(e9320), 2017
査読有
doi: 10.1097/MD.0000000000009320.

Takabayashi T, Imoto Y, Sakashita M, Kato Y, Tokunaga T, Yoshida K, Narita N, Ishizuka T, Fujieda S. Nattokinase, profibrinolytic enzyme, effectively shrinks the nasal polyp tissue and decrease viscosity of mucus. Allergol Int 66: 594-602, 2017
査読有
doi: 10.1016/j.alit.2017.03.007.

Honjoh C, Chihara K, Yoshiki H, Yamauchi S, Takeuchi K, Kato Y, Hida Y, Ishizuka T, Sada K. Association of c-type lectin mincle with Fc ϵ RI β subunits leads to functional activation of RBL-2H3 cells through Syk. Sci Rep 7: 46064, 2017
査読有
doi: 10.1038/srep46064.

Kaira K, Yanagitani N, Sunaga N, Imai H, Ono A, Koga Y, Hisada T, Ishizuka T, Yamada M. Prospective exploratory study of gemcitabine and S-1 against elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. Oncology Letters 14: 1123-1128, 2017
査読有
doi: 10.3892/ol.2017.6259.

山口牧子, 梅田幸寛, 園田智明, 本定千知, 島田昭和, 森川美羽, 安斎正樹, 飴嶋慎吾, 石塚 全: ニューモシスチス肺炎予防のためのスルファメトキサゾール・トリメトプリム投与量の検討. 日呼吸会誌 6: 53-57, 2017
査読有

石塚 全: 気管支喘息患者の QOL に影響する因子 アレルギー. 免疫 24: 1146-1154, 2017
査読無

森川美羽, 石塚 全: 職業アレルギー内科 118: 1107-1113, 2016
査読無

石塚 全, 森川美羽: 専門医のためのアレルギー学講座 集団生活でのアレルギー管理 3. 職業アレルギー. アレルギー-65: 963-973, 2016
査読無

Koga Y, Satoh T, Kaira K, Koka M, Hisada T, Hirato J, Altan B, Yatomi M, Ono A, Kamide Y, Shimizu Y, Aoki-Saito H, Tsurumaki H, Shimizu K, Mogi A, Ishizuka T, Yamada M, Dobashi K. Elemental and immunohistochemical analysis of the lungs and hilar lymph node in a patient with asbestos exposure, a pilot study. *Environ Health Prev Med* 21: 492-500, 2016
査読有

Koga Y, Hisada T, Ishizuka T, Utsugi M, Ono A, Yatomi M, Kamide Y, Aoki H, Tsurumaki H, Dobashi K, Yamada M. CREB regulates TNF- α -induced GM-CSF secretion via p38 MAPK in human lung fibroblasts *Allergol International* 65: 406-413, 2016
査読有
doi: 10.1016/j.alit.2016.03.006.

Kaira K, Sunaga N, Imai H, Kamide Y, Koga Y, Ono A, Kuwako T, Masuda T, Hisada T, Ishizuka T, Yamada M. Phase I dose escalation study of amrubicin plus paclitaxel in previously treated advanced non-small cell lung cancer. *Int J Clin Oncol* 21: 240-247, 2016
査読有
doi: 10.1007/s10147-015-0883-7.

Tsurumaki H, Mogi C, Aoki-Saito H, Tobo M, Kamide Y, Yatomi M, Sato K, Dobashi K, Ishizuka T, Hisada T, Yamada M, Okajima F. Protective role of proton-sensing TDAG8 in lipopolysaccharide-induced acute lung injury *Int J Mol Sci* 16: 28931-28942, 2015

査読有
doi: 10.3390/ijms161226145.

Yatomi M, Hisada T, Ishizuka T, Koga Y, Ono A, Kamide Y, Seki K, Aoki-Saito H, Tsurumaki H, Sunaga N, Kaira K, Dobashi K, Yamada M, Okajima F. 17(R)-resolvin D1 ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Physiol Rep* 3:e12628, 2015
査読有
doi: 10.14814/phy2.12628.

Umeda Y, Demura Y, Morikawa M, Anzai M, Kadowaki M, Ameshima S, Tsuchida T, Tsujikawa T, Kiyono Y, Okazawa H, Ishizaki T, Ishizuka T. Prognostic value of dual-time-point [18F]-2-fluoro-2-deoxyglucose PET for idiopathic pulmonary fibrosis. *J Nucl Med* 56:1869-1875, 2015
査読有
doi: 10.2967/jnumed.115.163360.

Kamide Y, Ishizuka T, Tobo M, Tsurumaki H, Aoki H, Mogi C, Nakakura T, Yatomi M, Ono A, Koga Y, Sato K, Hisada T, Dobashi K, Yamada M, Okajima F. Acidic environment augments Fc ϵ RI-mediated production of IL-6 and IL-13 in mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 464:949-55, 2015
査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.077.

[学会発表](計7件)

門脇麻衣子, 本定千知, 梅田幸寛, 森川美羽, 安斎正樹, 山田秀典, 齋藤 悠, 久田剛志, 岡島史和, 石塚 全: 細胞外 pH の低下によるヒト気管支平滑筋細胞からの IL-8 産生亢進の転写調節機序とステロイドの抑制効果. 第 66 回日本アレルギー学会学術大会 2017.6.17 東京

門脇麻衣子, 三ツ井美穂, 島田昭和, 本定千知, 梅田幸寛, 森川美羽, 安斎正樹, 飴嶋慎吾, 山田秀典, 齋藤 悠, 久田剛志, 岡島史和, 石塚 全: 細胞外 pH 低下によるヒト気管支平滑筋細胞の IL-8 産生に対するステロイドの効果. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 2017.4.22 東京

門脇麻衣子, 山田秀典, 齋藤 (青木) 悠, 森川美羽, 梅田幸寛, 酒井啓行, 飴嶋慎吾, 久田剛志, 岡島史和, 石塚 全: ヒト気管支平滑筋細胞のプロトン感知性受容体 OGR1 を介する IL-8 産生に対するステ

ロイド薬の作用.第 65 回日本アレルギー学会学術大会 2016.6.18 東京

門脇麻衣子,島田昭和,園田智明,本定千知,酒井啓行,梅田幸寛,森川美羽,安斎正樹,飴嶋慎吾,山田秀典,青木 悠,久田剛志,岡島史和,石塚 全:プロトン刺激によるヒト気管支平滑筋細胞の IL-8 産生に対するステロイドの抑制効果. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会 2016.4.9 京都市

石塚 全,安斎正樹,森川美羽,園田智明,梅田幸寛,飴嶋慎吾,浅野文祐:気管支サーモプラスティ治療前後における喘息症状,呼吸機能評価. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会 2016.4.8 京都市

門脇麻衣子,山田秀典,森川美羽,梅田幸寛,安斎正樹,飴嶋慎吾,上出庸介,青木 悠,久田剛志,岡島史和,石塚 全:細胞外 pH 低下によるヒト気管支平滑筋細胞からの IL-8,アンフィレギュリン産生に関する検討. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会 2015.5.26 東京

門脇麻衣子,園田智明,山口牧子,本定千知,酒井啓行,梅田幸寛,森川美羽,安斎正樹,飴嶋慎吾,石崎武志,山田秀典,青木 悠,久田剛志,岡島史和,石塚 全:プロトン刺激によりヒト気管支平滑筋細胞から誘導される因子の検討. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会 2015.4.18 東京

〔図書〕(計 8 件)

森川美羽,石塚 全:費用負担および他治療との医療経済的比較.気管支サーモプラスティパーフェクトガイド(石井芳樹編)p.93-99 日本医事新報社 2018
総ページ数 117

森川美羽,石塚 全:症状をゼロに一気管支ぜんそく,肺の生活習慣病 COPD.福井大学病院の得意な治療がわかる本(福井大学医学部附属病院 編著)p.30-31 バリユーメディカル 2017
総ページ数 160

石塚 全:肺がんの分子標的薬治療と免疫療法.福井大学病院の得意な治療がわかる本(福井大学医学部附属病院 編著)p.33 バリユーメディカル 2017
総ページ数 160

石塚 全:喘息と妊娠.呼吸器疾患診断治療アプローチ 気管支喘息(三嶋理晃,井上博雅 編)p.344-349 中山書店 2017
総ページ数 369

石塚 全:特発性好酸球増多症候群(IHES)別冊日本臨牀 免疫症候群(第 2 版)(□)―その他の免疫疾患を含めて― p.180-184 日本臨牀社 2016
総ページ数 859

石塚 全(ガイドライン作成委員の 1 人として分担):外科手術と喘息 喘息予防.管理ガイドライン 2015 (一般社団法人日本アレルギー学会 喘息ガイドライン専門部会 監修)p.265-268 協和企画 2015
総ページ数 317

石塚 全(ガイドライン作成委員の 1 人として分担):職業性喘息 喘息予防.管理ガイドライン 2015 (一般社団法人日本アレルギー学会 喘息ガイドライン専門部会 監修)p.261-264 協和企画 2015
総ページ数 317

石塚 全:咳.痰.内科処方実践マニュアル 使い分けとさじ加減 改訂第 2 版(日本臨床内科医会 編)p.513-517 日本医学出版 2015
総ページ数 574

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石塚 全 (IHIZUKA, Tamotsu)
福井大学.学術研究院医学系部門.教授
研究者番号:50302477

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岡島史和 (OKAJIMA, Fumikazu)
青森大学.薬学部.教授
研究者番号:30142748

(4) 研究協力者

なし