

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390163
 研究課題名（和文） アルギナーゼ制御による喘息予防法及び治療薬の開発
 研究課題名（英文） Development of preventive and therapeutic method of asthma by the regulation of arginase
 研究代表者
 荻野 景規（OGINO KEIKI）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：70204104

研究成果の概要（和文）：

我々の確立したダニ抽出物点鼻喘息モデルを用いて、気管支拡張に利用される一酸化窒素(NO)が不足している原因として、肺の慢性炎症病態におけるアルギナーゼの強発現に伴うアルギニンの消費による一酸化窒素合成酵素(NOS)からのNO産生の不足を、IL-13のモノクローナル抗体、アルギナーゼ阻害剤で証明した。さらに、ヒト喘息において、血清中にアルギナーゼが上昇し、呼気中NO及び血清中アルギニンを調整していることを証明した。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated that the deletion of nitric oxide as a bronchodilator in asthma was contributed to consumption of arginine and low generation of nitric oxide from nitric oxide synthase from upregulated arginase in mite-induced mice asthma model by inoculation of anti-IL-13 monoclonal antibody and an arginase inhibitor. Moreover, it was demonstrated that in human asthma increased serum arginase levels regulated serum arginine levels and exhaled nitric oxide.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境保健、予防医学、環境生理

1. 研究開始当初の背景

(1) 気管支喘息の患者数、小児期の有病率はそれぞれ10年前の約1.5、2.0倍と増加している。

(2) 喘息の病態の特徴として、気道過敏性に加えて、炎症に伴う免疫状態のTh1からTh2への移行、IL-4、IL-5、IL-13等のサイトカインの産生、好酸球の増加、さらに、気道周囲の組織改築(**remodeling**)が指摘されている。

(3) 血管内皮細胞拡張性因子として発見された一酸化窒素(NO)は、気管支平滑筋をも拡張する因子として認知され、喘息でその不足をきたす病態として次の三つが指摘されている。

①NO合成酵素(NOS)の不均衡発現による保護的NOが不足する(Lancet 348:374, 1996; Eur J Pharm 553:240, 2006)。

②NOの最終作用物質としてのSH基との結合物であるニトロソチオールRSNOを代謝するGSNO還元酵素の過剰発現によるNO又はRSNOが不足する(Science, 308:1618, 2005)。

③気管支周囲に浸潤した活性化好酸球から産生されるIL-13がアルギナーゼの発現を増強し、NOSと共通酵素基質であるアルギニンを利用し、NOの不足を招く(J Clin Invest 11: 1862, 2003)。

(4) アルギナーゼの発現は、基質として利用されるアルギニンがプロリンやポリアミンを生成し、細胞増殖、コラーゲン繊維の増加等remodelingに関与することから、世界

的に話題になっており、喘息の世界的権威者であるRicciardolo FLは、アルギナーゼの代謝系がこれからの喘息治療薬開発の標的の一つであることを述べている。

(5) 一方、従来の実験モデルは卵白アルブミン曝露で作成されたものが多く実際の原因とはかけ離れていた。そこで、我々は、ダニ蛋白質をアトピー性皮膚炎易発症NC/Ngaマウスに点鼻することにより、ヒト喘息に非常に近い実験モデルを開発した(Life Sciences, 78:987, 2006)。

(6) 我々は、これまで好酸球の活性化に伴う活性窒素種の産生をアトピー性皮膚炎組織、培養細胞で検討してきた(Free Radic Res 36:1163, 2002; Cell Biochem Funct 22:105, 2004; Free Radic Res 39:719, 2005)。

2. 研究の目的

この実験モデル及びヒト喘息におけるアルギナーゼ発現とremodeling病態を検討し、アルギナーゼの制御と阻害剤による予防法、治療法の開発を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 喘息モデルにおけるアルギナーゼ誘導とremodeling病態の解明
NC/Ngaマウスに、5日間連続的にチリダニ抗原*Dermatophagoides farinae* (Df)を、経鼻的感作投与し、BALF及び肺組織を採取し、アルギナーゼから気管支上皮粘膜細胞過分泌、

コラーゲン産生に至る過程の代謝物や関連酵素の mRNA 及び蛋白質の発現を検討し、remodeling 病態の評価を行うために azan 染色による病理組織学的検討を行う。

(2) マクロファージ由来 Raw264.7 細胞を用いた iNOS とアルギナーゼの相互作用
ダニ蛋白質 (Df) の Raw264.7 細胞への添加により 24 時間後に誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) が誘導されることから、ダニ蛋白質添加から経時的にアルギナーゼと iNOS のクロストークを 48 時間まで PCR による mRNA 発現と Western blot により検討する。

(3) 喘息モデル肺、肺胞洗浄液、培養細胞のプロテオーム解析

(1)、(2) の実験試料を用いて、新規蛋白質をナノフロー液体クロマトグラフィー (nanoflow LC) とエレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間型タンデム質量分析装置 (ESI-Q-tof) を組み合わせた大規模高感度タンパク質解析システムで探索する。

(4) アルギナーゼを標的とした栄養素及び阻害剤による喘息病態の予防医学的制御
アルギナーゼ阻害剤である nor-NOHA、アルギナーゼの基質である L-アルギニンの前投与、低アルギニン食 (日本クレア) 又は低マンガニン食 (日本クレア) の摂取により、Df 誘発喘息病態の気道過敏性、Th2 サイトカインの発現、NO 関連酵素群の発現、肺の組織学的検討等で、予防効果の検証を行う。

(5) ヒト喘息血清中、喀痰中のアルギナーゼ活性・量の評価

ヒト喘息患者 (小児及び成人) の血清及び喀痰のアルギナーゼ活性、アルギナーゼ量 (ELISA) を測定し、その他の血液検査データとの関連を解析する。さらに、患者情報と対照者情報をマッチングさせ臨床疫学的解析を行う。

(6) アルギナーゼ阻害剤の開発

アルギナーゼには I 型と II 型があり、I 型酵素を肝臓から抽出し、蛋白試料にアルギニン添加、マンガニンによる活性化処理をおこない尿素生成を指標として活性を測定する。この測定系を利用し、大塚製薬の薬剤スクリーニングシステムにかけ約数万の化合物の中から候補化合物を選定し、さらに細胞毒性、極性を検討しながら合成を加える。候補化合物を細胞に添加又は動物に投与しその効果を検討する。

4. 研究成果

(1) ダニ抽出蛋白の点鼻による NC/Nga マウス喘息モデルにおけるアルギナーゼ発現状況

血清中及び肺組織のアルギナーゼ活性が感作及びブースター時に、2 相性に上昇することが判明した。血清の上昇を蛋白レベルで確かめるために ELISA の直接法で調べると、活性とほぼ同じように 2 相性に上昇していた。マウスの場合、造血系から産生はないので、肺組織からの遊離であることが想像され、ヒトにおいても血清中の上昇があれば、肺組織からの遊離が考えられる。また、免疫組織学的に実験モデル肺で、世界で最初にアルギナーゼの局在を気管支周囲及び血管周囲の炎症性細胞に証明した。この血清中及び肺組織でのアルギナーゼ上昇及び強発現は、権威ある英文雑誌に多く引用されている。

(2) NC/Nga マウス喘息モデルにおける肺組織の remodeling 状態の検討

Df の感作投与、ブースター投与が終了してさらに 2 週間後に屠殺し、組織学的にコラーゲン繊維の量的評価を azan 染色で行った結果、コラーゲン線維の増強が気管支周囲、血管周囲に認められ、肺組織の改築による remodeling 状態が検証された。

(3) NC/Nga マウス喘息モデルにおける一酸化窒素(NO)の不足とアルギナーゼ発現

Df 投与喘息モデル群で PCR による iNOS mRNA の発現増強にも拘わらず NO 代謝ぶつとしての NOx の増加が認められないことより、NO の不足が考えられ、IL-13 モノクローナル抗体投与による IL-13 からアルギナーゼ発現までの過程の遮断、アルギナーゼ阻害剤投与により、気道過敏性が改善し、NOx が増加し、気管支拡張に必要な NO の不足にアルギナーゼの強発現が関与していることを証明した。

(4) アルギナーゼ阻害剤による抗炎症効果
Df 投与喘息モデルにおいて、アルギナーゼ阻害剤が気道過敏性の改善を促したことの原因として、アルギニン供給による NO 産生増強以外に、アルギナーゼ阻害剤の直接的か間接的かは不明であるが、抗炎症効果が認められた。すなわち、組織学的炎症スコア、PAS 陽性細胞数、気管洗浄液細胞数等の減少、アルギナーゼの mRNA 及び蛋白質発現、Th2 サイトカイン、エオタキシン、iNOS 等の mRNA の発現の抑制が認められた。さらに、ステロイド併用投与によって相乗効果が認められず、逆にアルギナーゼ阻害剤の作用とステロイドの作用が拮抗する所見も認められ、アルギナーゼ阻害剤の抗炎症作用は、ステロイドの抗炎症作用とは、別の機序であることが判明した。

(5) ヒト喘息における血清アルギナーゼ I 活性及び量の臨床疫学研究

約 300 名の健康人を対象とした ELISA によるアルギナーゼ I 値の生活習慣及び他の血液及び尿中パラメーターとの関連性の解析の結果、アルギナーゼ I は、白血球数、尿中イソプロスタノール、8-OHdG と関連することが判明し、さらに喘息患者では、有意に高値を示し、炎症バイオマーカーとして知られている hs-CRP や IgE と関連することが判明し、新し

い炎症バイオマーカーと可能性が示された。

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 15 件)

① Takahashi N, Ogino K, Takemoto K, Hamanishi S, Wang DH, Takigawa T, Shibamori M, Ishiyama H, Fujikura Y: Direct inhibition of arginase attenuated airway allergic reactions and inflammation in a *Dermatophagoides farinae*-induced NC/Nga mouse model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 査読有, 2010 in press.

② Kambayashi Y, Binh NT, W Asakura H, Hibino Y, Hitomi Y, Nakamura H, Ogino K: Efficient assay for total antioxidant capacity in human plasma using a 96-well microplate. *J Clin Biochem Nutr*, 査読有, 44, 2009: 46-51.

③ Kambayashi Y, Ogino K, Takemoto K, Imagama T, Takigawa T, Kimura S, Hibino Y, Hitomi Y, Nakamura H. Preparation and Characterization of a Polyclonal Antibody against Brominated Protein. *J Clin Biochem Nutr*, 査読有, 44(1), 2009: 95-103.

④ Ogino K, Wang DH: Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta Med Okayama*. 査読有, 61, 2007: 181-189.

⑤ Takemoto K, Ogino K, Wang DH, Takigawa T, Kurosawa CM, Kamyabashi Y, Hibino Y, Hitomi Y, Ichimura H: Biochemical characterization of reactive nitrogen species by eosinophil peroxidase in tyrosine nitration. *Acta Med Okayama*, 査読有, 61, 2007: 17-30.

⑥Takemoto K, Ogino K, Shibamori M, Gondo T, Hitomi Y, Takigawa T, Wang DH, Takaki J, Ichimura H, Fujikura Y, Ishiyama H: Transiently, paralleled upregulation of arginase and nitric oxide synthase and the effect of both enzymes on the pathology of asthma. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 査読有, 293, 2007: L1419-26.

⑦荻野景規: NC/Ngaマウス喘息モデルの特徴. 喘息, 査読有, 22, 2007: 40-43.

⑧荻野景規: 3-ニトロチロシン. 岡山医学会雑誌, 査読有, 118, 2007: 225-234.

[学会発表] (計 14 件)

①高橋紀子、竹本圭、濱西誠司、ラニサウリアサリ、柴森雅文、汪達紘、瀧川智子、高木二郎、石山広信、荻野景規: アルギナーゼ阻害による実験的喘息の抑制、第 79 回日本衛生学会学術総会 2009 年 3 月 31 日 東京都

②赤澤裕二、荻野景規、竹本圭、汪達紘、高橋紀子、高木二郎、瀧川智子: アルギナーゼ欠損マウスにおける実験的潰瘍性大腸炎症状の評価、第 79 回日本衛生学会学術総会 2009 年 3 月 31 日 東京都

③赤澤裕二、荻野景規、竹本圭、汪達紘、瀧川智子: カタラーゼ投与による実験的潰瘍性大腸炎症の緩和、第 7 回日本予防医学会学術総会 2009 年 12 月 12-14 日、千葉市

④宗友一晃、竹本圭、吉田純子、張燃、鄒宇、瀧川智子、汪達紘、高木二郎、荻野景規: ダニ蛋白誘発喘息におけるステロイド剤の効果; NOとアルギナーゼの関係、第 7 回日本予防医学会学術総会 2009 年 12 月 12-15 日、千葉市

⑤濱西誠司、竹本圭、高橋紀子、ラニサウリアサリ、柴森雅文、汪達紘、荻野景規: アルギナーゼの特異的な阻害剤であるNor-NOHAの喘息モデルMc/Ngaマウスへの投与による

効果、第 6 回日本予防医学会学術総会 2008 年 11 月 30 日 東京都

⑥竹本圭、黒澤カルメン、濱西誠司、柴森雅文、高木二郎、瀧川智子、汪達紘、荻野景規: 喘息増悪因子としてのアルギナーゼ誘導-NC/Ngaマウス喘息モデルを用いた検討、第 8 回日本NO学会学術集会 2008 年 5 月 10 日 仙台市

⑦黒澤カルメン、柴森雅文、石山広信、竹本圭、王炳玲、濱西誠司、ラニサウリアサリ、瀧川智子、汪達紘、高木二郎、荻野景規: IL-13モノクローナル抗体によるアルギナーゼ I 阻害はNC/Ngaマウスのアレルギー喘息様反応を抑制する、第 78 回日本衛生学会 2007 年 3 月 31 日、熊本市

⑧竹村洋子、竹本圭、瀧川智子、汪達紘、荻野景規: NOの枯渇は喘息の病態に重要な影響をもたらすか? 第 7 回日本NO学会学術集会、2007 年 5 月 17-18 日、大津市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻野 景規 (OGINO KEIKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 70204104

(2) 研究分担者

汪 達紘 (OU TATSUKO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 90294404

瀧川 智子 (TAKIGAWA TOMOKO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 90403493

前川 剛志 (MAEKAWA TUYOSHI)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 60034972

泉 知則 (IZUMI TOMONORI)
山口大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 00261694

佐々木 健二 (SASAKI KENNJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：20116461
尾内 一信 (OUCHI KAZUNOBU)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：80351889

(3) 連携研究者

中村 和行 (NAKAMURA KAZUYUKI)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90107748