

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590891

研究課題名（和文） 気道リモデリングの予防における標的細胞と分子薬理療法

研究課題名（英文） A molecular target for preventing airway remodeling

研究代表者

久米 裕昭 (Kume Hiroaki)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50303631

研究成果の概要：気管支喘息の難治化の主因である気道リモデリングにおける気道構成細胞の役割について、炎症細胞や上皮細胞と、平滑筋細胞との関連性に焦点を当て検討した。

肥満細胞、好酸球、気道上皮から産生、放出される種々の化学物質により、気道平滑筋細胞は直接に影響を受けることで気道平滑筋収縮（気流制限）、ムスカリン受容体刺激に対する反応性増強（気道過敏性の亢進）、βアドレナリン受容体の反応性の低下（β耐性化）、気道平滑筋細胞の増殖、遊走能の増強（気道リモデリング）を生じる。これらの現象のすべてに RhoA/Rho-kinase 由来の Ca^{2+} 感受性亢進は密接に関わっていた。

以上の結果から、気道平滑筋細胞における RhoA/Rho-kinase 系はこの疾患に対する病態解明、治療法の開発のためのあらたな標的分子と考えられる。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |
| 2008年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| | | | |
| | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

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、気道過敏性、β耐性化、酸化ストレス、Rho-kinase

1. 研究開始当初の背景

気道リモデリングは、気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患の重症化、難治化の主要な因子である。非可逆的な気道リモデリングの進展を防ぐことがこれらの疾患に対する治療の目標に掲げられている。肥満細胞や好酸球などの炎症細胞の活性化に由来した影響を気道平滑筋細胞が慢性的に受けることが気道リモデリングの発生機序であるにも関わらず、

その根本的な成因についてはいまだ不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

気道リモデリングを予防・治療するための標的細胞の検索、分子標的療法を確立することを目的としている。気道炎症に由来し、気流制限、気道過敏性亢進、β耐性化を経てから気道平滑筋の肥厚が生じ、気道リモデリン

グへと導かれる。気道平滑筋細胞に生じる一連の病態に関連する共通の因子を検索し、病態解明、治療法の発展の鍵を握る標的分子を探求する。

3. 研究の方法

モルモット気管平滑筋の切片を Fura-2 で負荷し、炎症細胞、上皮細胞に由来する化学物質を暴露した後のメサコリン収縮作用の変化、イソプロテレノール (β アドレナリン受容体刺激薬) の弛緩作用の変化と、それともなう細胞内 Ca^{2+} の変化と検討した。

卵白アルブミンで感作したマウスに抗原を投与し、気道抵抗を測定する。さらに一方の肺から病理組織標本を作製し、他方の肺に肺胞洗浄をおこない、炎症細胞の数、比率の測定、上清中のサイトカインの測定をおこなった。

培養ヒト気管支平滑筋細胞を用いて二次元、三次元レベルでの遊走能が炎症由来の化学物質で受ける影響と、その機序を検討した。

Rho-kinase の直接的な効果を検証するため、培養ヒト気管支平滑筋細胞を用い、GTP-RhoA (活性化 RhoA)、あるいは Rho-kinase の標的蛋白である myosin phosphatase targeting protein 1 (MYPT1) のリン酸をウエスタンブロット法で測定した。

4. 研究成果

fura-2 で負荷したモルモット気管平滑筋の切片に気道上皮細胞の傷害時に産生される ATP や、肥満細胞から放出されるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) を暴露した後、メサコリンの収縮反応は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇をとともなく著明に増強した。この現象は、Y-27632 (Rho-kinase の阻害薬) で濃度依存性に抑制された。S1P は濃度依存性に MYPT1 のリン酸化を増強した。このリン酸化反応は Y-27632 により濃度依存性に抑制された。

肥満細胞から脱顆粒するトリプターゼを暴露した後、メサコリンの収縮に対するイソプロテレノールの弛緩作用は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇をとともなく著明に減少した。この現象は、Y-27632 (Rho-kinase の阻害薬) で濃度依存性に抑制された。一方、増殖因子である PDGF を暴露した後、イソプロテレノールの弛緩効果は著明に減弱したが、この現象は電位依存性 Ca^{2+} チャンネル阻害薬であるベラパミル、ニフェジピンにより濃度依存性に抑制された。

酸化ストレスの指標である、過酸化水素、イソprostano (8-iso-PGF 2α) は濃度依存性に気管平滑筋の収縮を生じた。この現象には細胞内 Ca^{2+} の上昇がともなっていたが、Y-27632 はこの収縮を細胞内 Ca^{2+} 濃度を減少させることなく濃度依存性に抑制した。

感作マウスに抗原を負荷すると、気道抵抗

の上昇、メサコリンに対する反応性の亢進、気道周囲への好酸球の浸潤が認められた。Y-27632、ファスジルなどの Rho-kinase 阻害薬を前投与すると、同度依存性に気道抵抗、好酸球浸潤が抑制された。気管支肺胞洗浄液中上昇した。好酸球、IL-5 などのサイトカインは、Y-27632、ファスジルなどの Rho-kinase 阻害薬により濃度依存性に抑制された。

培養ヒト気管支平滑筋細胞の遊走能はエンドセリン 1 (ET-1) の投与で著明に上昇する。この現象は、エンドセリン受容体拮抗薬で抑制されるだけでなく、Y-27632 でも濃度依存性に抑制された。ET-1 は GTP-RhoA の割合を有意に増加した。

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 15 件)

1) Iwata S, Ito S, Iwaki M, Kondo M, Sashio T, Takeda N, Sokabe M, Hasegawa Y, Kume H. Regulation of endothelin-1-induced interleukin-6 production by Ca^{2+} influx in human airway smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 605: 15-22, 2009. 査読有り

2) Shiraki A, Kume H, Oguma T, Makino Y, Ito S, Shimokata K, Honjo H, Kamiya K. Role of Ca^{2+} mobilization and Ca^{2+} sensitization in 8-iso-PGF 2 α -induced contraction in airway smooth muscle. *Clin Exp Allergy* 39: 236-245, 2009. 査読有り

3) Kume H. RhoA/Rho-kinase as a therapeutic target in asthma. *Curr Med Chem* 15: 2876-2885, 2008. 査読有り

4) Ito S, Kume H, Shiraki A, Kondo M, Makino Y, Kamiya K, Hasegawa Y. Inhibition by the cold receptor agonists menthol and icilin of airway smooth muscle contraction. *Pulm Pharmacol Ther* 21: 812-817, 2008. 査読有り

5) Ikenouchi T, Kume H, Oguma T, Makino Y, Shiraki A, Ito Y, Shimokata K. Role of Ca^{2+} mobilization in desensitization of beta-adrenoceptors by platelet-derived growth factor in airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 591: 259-265, 2008. 査読有り

6) Kobayashi M, Kume H, Oguma T, Makino Y, Ito Y, Shimokata K. Mast cell tryptase causes homologous desensitization of beta-adrenoceptors by Ca^{2+} sensitization in tracheal smooth muscle. *Clin Exp Allergy* 38: 135-144, 2008. 査読有り

7) Ito S, Kume H, Naruse K, Kondo M, Takeda N, Iwata S, Hasegawa Y, Sokabe M. A novel Ca²⁺ influx pathway activated by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38: 407-413, 2008. 査読有り

8) 久米裕昭 ホルモテロールの薬理学的特性—長時間作用性、かつ、即効性に基づく臨床的有効性 アレルギー・免疫 15: 12-130, 2008. 査読なし

9) Oguma T, Ito S, Kondo M, Makino Y, Shimokata K, Honjo H, Kamiya K, Kume H. Roles of P2X receptors and Ca²⁺ sensitization in extracellular adenosine triphosphate-induced hyperresponsiveness in airway smooth muscle. *Clin Exp Allergy* 37: 893-900, 2007. 査読有り

10) Taki F, Kume H, Kobayashi T, Ohta H, Aratake H, Shimokata K. Effects of Rho-kinase inactivation on eosinophilia and hyper-reactivity in murine airways by allergen challenges. *Clin Exp Allergy* 37: 599-607, 2007. 査読有り

11) 久米裕昭 喘息と気道平滑筋 日胸 66: S51-60, 2007. 査読なし

12) Kume H, Takeda N, Oguma T, Ito S, Kondo M, Ito Y, Shimokata K. Sphingosine 1-phosphate causes airway hyper-reactivity by rho-mediated myosin phosphatase inactivation. *J Pharmacol Exp Ther.* 320: 766-73, 2007. 査読有り

13) Kojima K, Kume H, Ito S, Oguma T, Shiraki A, Kondo M, Ito Y, Shimokata K. Direct effects of hydrogen peroxide on airway smooth muscle tone: roles of Ca²⁺ influx and Rho-kinase. *Eur J Pharmacol.* 556: 151-6, 2007. 査読有り

14) 久米裕昭, 伊藤 理 喘息における気道平滑筋の役割 呼吸と循環 55: 57-64, 2007. 査読なし

15) 久米裕昭 症状が安定している気管支喘息患者に潜む好酸球性気道炎症—気道炎症と肺機能との乖離 呼吸 26: 481-486, 2007. 査読有り

〔学会発表〕 (計 26 件)

1) 久米裕昭 気道平滑筋とアレルギー
第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会
2008 年 11 月 28 日、東京

2) 伊藤 理、久米裕昭、岩木 舞、岩田 晋、指

尾豊和、近藤征史、今泉和良、橋本直純、長谷川好規 ヒト肺微小血管内皮細胞における stretch-activated Ca²⁺ influx の制御
第 48 回日本呼吸器学会学術講演会 2008 年 6 月 17 日、神戸市

3) 久米裕昭、辻 清太、岩木 舞、浅野俊明、牧野 靖、指尾豊和、白木 晶、長谷川好規、下方 薫 COPD の気道炎症に対する LABA の抑制効果
第 48 回日本呼吸器学会学術講演会 2008 年 6 月 16 日、神戸市

4) 牧野 靖、久米裕昭、白木 晶、伊藤 理、長谷川好規 気道平滑筋のβアドレナリン受容体機能に対する酸化ストレスの影響
第 48 回日本呼吸器学会学術講演会 2008 年 6 月 16 日、神戸市

5) 久米裕昭 最適な喘息治療戦略—LABA の立場から
第 48 回日本呼吸器学会学術講演会 2008 年 6 月 15 日、神戸市

6) 久米裕昭、白木 晶、牧野 靖、伊藤 理、長谷川好規、下方 薫
酸化ストレスに対するβ₂刺激薬の抑制効果
第 48 回日本呼吸器学会学術講演会 2008 年 6 月 15 日、神戸市

7) Kume H. Rho/Rho-kinase in airway smooth muscle as a therapeutic target for asthma. Seminar in Center for Cardiovascular Sciences, Albany Medical College, May 22, 2008, Albany NY, U.S.A.

8) Sashio T, Kume H, Takeda N, Ito S, Kondo M, Hasegawa Y. Role of sphingosine-1-phosphate for adhesion molecules expression in human pulmonary microvascular endothelial cells. *ATS 2008 International Conference*, May 21, 2008, Toronto, Canada

9) Ito S, Kume H, Iwaki M, Sashio T, Iwata S, Kondo M, Imaizumi K, Naruse K, Sokabe M, Hasegawa Y. Mechanical stretch activates Ca²⁺ influx in human lung microvascular endothelial cells. *ATS 2008 International Conference*, May 21, 2008, Toronto, Canada

10) Kume H, Tsuji S, Sasio T, Takeda N, Ito S, Kondo M, Hasegawa Y, Shimokata K. Involvement of endothelin-1 in migration of human airway smooth muscle cells. *ATS 2008 International Conference*, May 19, 2008, Toronto, Canada

11) Makino Y, Kume H, Shiraki A, Ito S, Hasegawa Y, Honjo H, Kamiya K. Role of hydrogen peroxide in β -adrenergic receptor desensitization of tracheal smooth muscle. ATS 2008 International Conference, May 19, 2008, Toronto, Canada

12) Iwata S, Ito S, Iwaki M, Sashio T, Kondo M, Sokabe M, Hasegawa Y, Kume H. Role of intracellular Ca^{2+} for endothelin-1-induced IL-6 production in human airway smooth muscle cells. ATS 2008 International Conference, May 19, 2008, Toronto, Canada

13) 久米裕昭, 辻 清太, 岩木 舞, 中島治典, 浅野俊明, 白木 晶, 指尾豊和, 下方 薫 好酸球性気道炎症に対する吸入ステロイド薬と長時間作用性 β_2 刺激薬との併用療法の有用性 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007 年 11 月 3 日、横浜市

14) 辻 清太, 久米裕昭, 武田直也, 伊藤 理, 近藤征史, 今泉和良, 長谷川好規, 下方 薫 エンドセリンが及ぼす気管支平滑筋細胞の遊走能への影響 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007 年 11 月 2 日、横浜市

15) 白木 晶, 久米裕昭, 伊藤 理, 辻 清太, 長谷川好規 Losartan はインプロスタンによる気道収縮を抑制する 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007 年 11 月 2 日、横浜市

16) 伊藤 理, 久米裕昭, 白木 晶, 近藤征史, 岩田 晋, 長谷川好規, 下方 薫 L-メンソールによる細胞内 Ca^{2+} 流入抑制を介した気道平滑筋弛緩効果 第 19 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2007 年 6 月 9 日、横浜市

17) Kume H, Shiraki A, Ikenouchi T, Makino Y, Ito S, Kondo M, Shimokata K. The effects of β_2 -agonists intrinsic efficacy on oxidative stress-induced contraction in airway smooth muscle. ATS 2007 International Conference, May 21, 2007, San Francisco, U.S.A.

18) Shiraki A, Kume H, Ito S, Kondo M, Honjo H, Kamiya K, Shimokata K. Intracellular mechanisms of isoprostane-induced contraction in tracheal smooth muscle. ATS 2007 International Conference, May 21, 2007, San Francisco, U.S.A.

19) Ikenouchi T, Kume H, Oguma T, Shiraki A, Ito S, Kondo M, Shimokata K. The role of voltage-dependent Ca^{2+} channels on β -adrenergic desensitization by platelet-derived growth factor in tracheal smooth muscle. ATS 2007 International Conference, May 21, 2007, San Francisco, U.S.A.

20) 岩田 晋, 伊藤 理, 武田直也, 指尾豊和, 岩木 舞, 近藤征史, 長谷川好規, 下方 薫, 久米裕昭 Endothelin-1 刺激による培養ヒト気道平滑筋細胞の IL-6 産生能に対する影響 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会 2007 年 5 月 12 日、東京

21) 岩田 晋, 伊藤 理, 武田直也, 指尾豊和, 岩木 舞, 近藤征史, 長谷川好規, 下方 薫, 久米裕昭 ヒト気道平滑筋細胞のメカノバイオロジ: ストレッチによる MAP-kinase 系活性化 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会 2007 年 5 月 12 日、東京

22) 白木 晶, 久米裕昭, 伊藤 理, 牧野 靖, 近藤征史, 下方 薫 イソプロスタン (8-iso-PGF 2α)による気道平滑筋収縮における Ca^{2+} 動態と Ca^{2+} 感受性の関与 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会 2007 年 5 月 12 日、東京

23) 伊藤 理, 久米裕昭, 近藤征史, 池ノ内 紀祐, 白木 晶, 岩田 晋, 長谷川好規, 下方 薫 Menthol は寒冷受容体を介して気道平滑筋を弛緩させる 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会 2007 年 5 月 12 日、東京

24) 牧野 靖, 久米裕昭, 白木 晶, 池ノ内 紀祐, 武田直也, 伊藤 理, 近藤征史, 今泉和良, 長谷川好規, 下方 薫 気道平滑筋の β アドレナリン受容体機能に対するアンギオテンシン II の影響 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会 2007 年 5 月 12 日、東京

25) Ito S, Kume H, Naruse K, Iwata S, Takeda N, Kondo M, Hasegawa Y, Shikata K. Mechanobiology of airway smooth muscle cells: Effects of mechanical stretch. 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会 2007 年 5 月 10 日、東京

26) 久米裕昭 モニタリングからみた誘発喀痰検査と肺機能 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会 2007 年 5 月 10 日、東京

〔図書〕（計 1 件）

1) 久米裕昭 β_2 刺激薬 気管支拡張薬の吸入療法 “21 世紀の吸入療法” 薬物吸入療法研究会編 仙台気道研究所 仙台市 178－190 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久米 裕昭 (Kume Hiroaki)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50303631