

## 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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21659206

研究課題名（和文）難治性喘息に対する創薬への挑戦－新規 NF- $\kappa$ B 阻害薬 (DHMEQ) の可能性－  
 研究課題名（英文）Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a novel NF- $\kappa$ B inhibitor, inhibits allergic inflammation and airway remodeling in murine models of asthma

研究代表者

西村 正治 (NISHIMURA MASAHARU)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00208224

研究成果の概要（和文）新規 NF- $\kappa$ B 阻害薬である DHMEQ は、種々の慢性炎症性疾患モデルにおける効果が報告されている。本研究では、マウス喘息モデルにおいて、DHMEQ は、好酸球性気道炎症、気道線維化を有意に抑制することが見出された。更には、*in vitro* を用いた系において、気道上皮細胞からのケモカインの抑制、Th2 細胞からのサイトカイン産生を抑制することが示された。DHMEQ は、気管支喘息における新規治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： DHMEQ significantly reduced eosinophilic airway inflammation and levels of Th2 cytokines in bronchoalveolar lavage fluid in murine asthma model. It also inhibited parameters of airway remodeling including mucus production, peribronchial fibrosis and the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin. These results indicate that DHMEQ inhibits allergic airway inflammation and airway remodeling in murine models of asthma. DHMEQ may have therapeutic potential in the treatment of asthma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	0	1,700,000
2010 年度	900,000	0	900,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	150,000	3,250,000

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：DHMEQ、NF- $\kappa$ B、気管支喘息

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は、気道における慢性の好酸球性炎症と気道構造の変化（リモデリング）、そして非特異的な物質に対する気道収縮反応、と定義される気道過敏性の亢進を招く疾患で

ある。気管支喘息の有病率は増加傾向にあることが示唆されているが、喘息患者の多くは低用量の吸入ステロイドによって安定した経過が得られる。しかしながら高用量の吸入ステロイドなどの投与下でも症状がコントロー

ルされない重症喘息と呼ばれる患者が10%程度存在するとされており、気管支喘息の新たな治療薬の開発が望まれている。

NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) は種々の炎症性サイトカインやケモカインの産生に関与している転写因子である。気管支喘息患者の気道上皮ではNF- $\kappa$ Bの発現が亢進していることが示されている。マウス喘息モデルに対してノックアウト等の手法でNF- $\kappa$ Bを抑制すると好酸球性炎症が減弱することが報告されており、気管支喘息の病態にはNF- $\kappa$ Bの亢進が関与していることが考えられるが、これまでに臨床応用されたNF- $\kappa$ B抑制薬は存在しない。

Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) は慶応大学梅澤らによって合成された新規NF- $\kappa$ B抑制薬である。DHMEQはNF- $\kappa$ Bに特異的に結合し、核内への移行やDNAへの結合を阻害することによってその働きを抑制するといった機序が報告されている。薬理作用として、関節炎モデル、同種異系間の心移植モデル、アトピー性皮膚炎モデルなどに対する抗炎症効果が既に報告されており、これまで一切の副作用発現が認められていない。DHMEQを呼吸器疾患の動物モデルに投与した報告はこれまでに存在しない。

## 2. 研究の目的

マウスを用いた気管支喘息モデルにおけるDHMEQの効果について、マウスへのDHMEQの投与、また気道上皮細胞や炎症細胞を用いた*in vitro*の実験系によって明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 実験① 〈急性期モデル〉

BALB/c マウス (6w, female) を用いた。200 $\mu$ g/mlの濃度でOVA (ovalbumin) をPBSに溶解し、これをアジュバントであるImject Alumと1:1の比で混合、総量200 $\mu$ lにしたものを抗原感作として腹腔内に注射した (day0, day7)。抗原曝露としてday21~23にOVA (1mg/ml) 経鼻投与を行い、その30分前にDHMEQを投与した (20~40mg/kg, i. p.)。day24にBAL、採血、気道過敏性測定などを行った。

### 実験② 〈慢性期モデル〉

BALB/c マウス (6w, female) を用いた。500 $\mu$ g/mlの濃度でOVAをPBSに溶解し、これをImject Alumと1:1の比で混合、総量200 $\mu$ lにしたものを腹腔内に注射し抗原感作を行った (day0, day12)。抗原曝露には超音波ネブライザーを用い、マウスを密閉容器に入れた後OVA溶液 (2.5%, w/v) を30分間噴霧し吸入させた。OVAの噴霧はday21からday58まで週に3回 (連続する3日間)、計6週間行った。各OVA吸入の30分前にDHMEQを投与し (40mg/kg, i. p.)、最終噴霧翌日のday59

に気道過敏性を測定、また肺組織を採取した。

### 実験③ 〈細胞培養〉

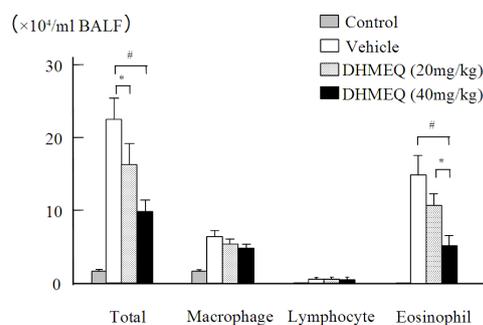
ダニ特異的IgE抗体陽性のヒト血液から分離したPBMC、あるいはOVAで感作したBALB/cマウスの脾細胞に、DHMEQの存在、非存在下で、それぞれダニ粉末あるいはOVAで刺激し、上清中のTh2サイトカイン濃度をELISAで測定した。また気道上皮細胞株 (BEAS-2B) にDHMEQの存在、非存在下でTNF- $\alpha$ もしくはIL-4で24時間刺激し、上清中のeotaxin-1濃度をELISAで測定した。

## 4. 研究成果

### 実験① 〈急性期モデル〉

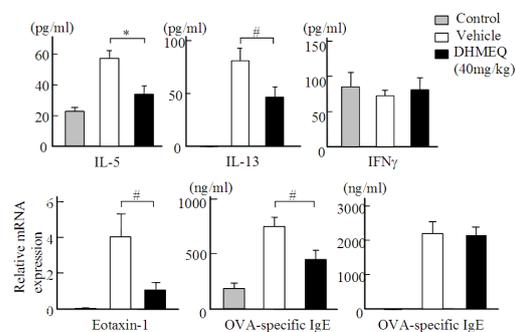
DHMEQの投与により、BALF中の好酸球数が有意に低下した (図1)。

図1



またBALF中のIL-5やIL-13といったTh2サイトカインの値、肺組織中eotaxin-1の値、血清中OVA特異的IgE抗体の値はDHMEQの投与により有意に抑制された (図2)。

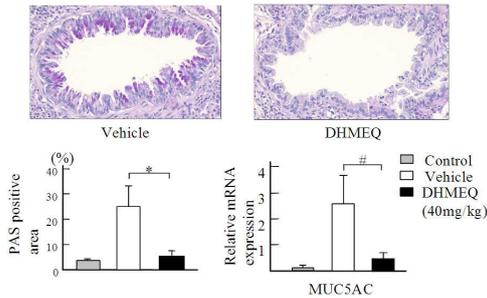
図2



次いでPAS染色を用い急性期モデルにおける

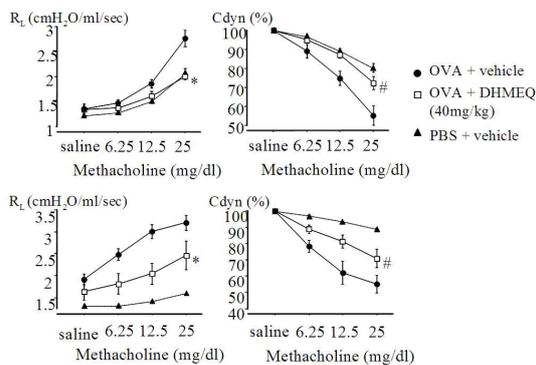
肺組織切片の評価を行ったところ、DHMEQの投与により気道粘液産生が有意に低下していることが示された。また気道粘液の主要なムチンであるMUC5ACについて肺組織RNAを用いて検討したところ、DHMEQ投与群で有意な低下が認められPAS染色所見と一致する結果であった(図3)。

図3



またメサコリン吸入に対する気道過敏性の評価を行ったところ、DHMEQの投与により肺抵抗、肺コンプライアンスともに改善が認められ、DHMEQは気道過敏性を有意に抑制した(図4)。

図4



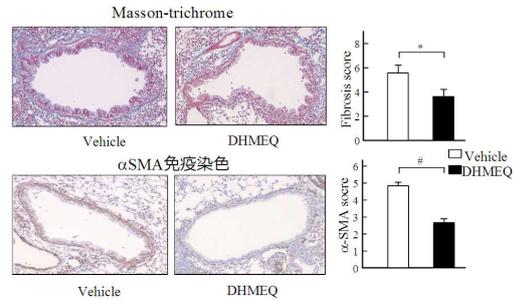
#### 実験② 〈慢性期モデル〉

気道周囲の線維化と平滑筋増生の状態について、慢性期モデルの肺組織切片を用いて検討した。気道周囲線維化の評価としてMasson trichrome染色、平滑筋増生の評価として $\alpha$ -SMAの免疫染色を行った(図5)。基底膜周囲径で補正しスコア化して客観的に評価したところこれらの所見はDHMEQの投与により有意に抑制されており、NF- $\kappa$ B経路

の抑制により気道リモデリングの進展が抑制されることが示唆された(図5)。

また急性期モデルと同様、メサコリン吸入に対する気道過敏性(図4)も有意に抑制された。

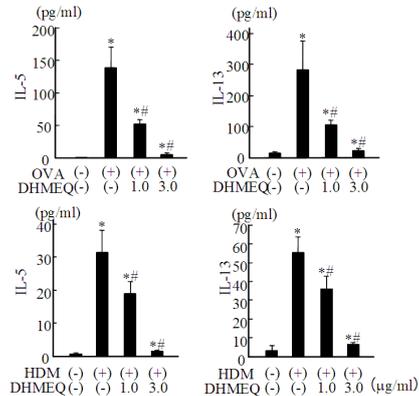
図5



#### 実験③ 〈細胞培養〉

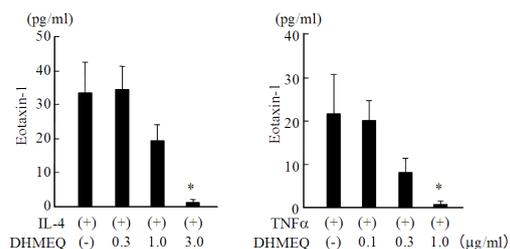
ヒトPBMCないし小鼠脾細胞を、それぞれダニ抗原、OVAで刺激し産生されるIL-5、IL-13といったTh2サイトカインはDHMEQの投与により有意に低下し、喘息モデルマウスのBALFで認められた結果と同様であった(図6)。

図6



また気道上皮細胞としてBEAS-2Bを用い、IL-4やTNF- $\alpha$ で刺激して産生されるeotaxin-1の値もDHMEQの投与により有意な低下が認められた(図7)

図 7



今野 哲 (KONNO SATOSHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：20399835

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

## 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)

Shimizu K et al.

Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a novel NF-kappaB inhibitor, inhibits allergic inflammation and airway remodeling in murine models of asthma. Clin Exp Allergy (in press). 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1 Shimizu K. A selective NF-κB inhibitor, DHMEQ, inhibits allergic inflammation and airway remodeling in a murine model of asthma. American Thoracic Society annual meeting May 17 2011 Denver.

2 清水 健一 アレルギー性気道炎症モデルにおける DHMEQ の効果 日本呼吸器学会 学術講演会 2011 年 4 月 22 日, 東京フォーラム, 東京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西村 正治 (NISHIMURA MASAHARU)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：00208224

### (2) 研究分担者

藤堂 省 (TODO SATORU)  
北海道大学・大学院医学研究科・特任教授  
研究者番号：60136463

南須原 康行 (NASUHARA YASUYUKI)  
北海道大学・北海道大学病院・准教授  
研究者番号：30322811