

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21791444

研究課題名（和文） 人工呼吸中の気道上皮免疫機構におけるGABA受容体の役割

研究課題名（英文） Effects of GABAB receptors on Immune System in Airway Epithelium

研究代表者

杉山 陽子 (SUGIYAMA YOKO)

岐阜大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70444255

研究成果の概要（和文）：培養気道上皮細胞においてTNF α 刺激で産生されるIL-8が麻酔薬プロポフォールによりGABAA受容体を介して増加した。GABAB受容体作動薬はIL-8産生量を変化させなかった。TGF α 刺激における分泌型ムチンMUC5ACの産生を麻酔薬ミダゾラムが抑制したがGABAA受容体拮抗薬はその作用を抑制しなかった。

気道炎症に重要なIL-8の産生過程をGABAA受容体が修飾している可能性があり、今後新しい治療ターゲットとなりうる。

研究成果の概要（英文）：Propofol enhanced TNF α induced-IL8 production via GABAA receptors in human airway epithelial cells. GABAB receptor agonists had no effect on IL-8 production. Midazolam inhibited TGF α induced-MUC5AC production in a GABAA receptor independent manner. These results suggest that GABAA receptors may become a new therapeutic target of airway inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：麻酔・蘇生学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：気道、免疫、シグナル伝達、サイトカイン、ムチン、麻酔薬、GABA受容体

1. 研究開始当初の背景

神経伝達物質として知られる γ -aminobutyric acid (GABA)に対する受容体は現在GABAA、GABAB、GABACと三種が同定されており、主に中枢神経系に存在している。近年、GABA受容体は中枢神経以外にも末梢神経やさらには神経系以外の末梢組織にも発

現、分布していることが注目されている。近年GABAA受容体が気道上皮に発現し、受容体刺激によりゴブレット細胞の増殖や粘液産生を促進すると報告された。それに対し、本研究者はヒトおよび guinea pig の気道上皮と気管平滑筋においてGABAB受容体が存在することを発見し報告した。培養気道上皮細胞

や気管平滑筋細胞の GABAB 受容体刺激によって細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) が活性化することや、GABAB 受容体を介した抑制性 G 蛋白の活性化により細胞内サイクリック AMP 産生抑制がおこることも報告した。これらの研究結果は気道の GABAB 受容体がさまざまな細胞活動に関わっている可能性を示唆している。しかし、気道における GABA/GABAB 受容体の生物学的機能はいまだ解明されていない。

一方、我々が通常の臨床で使用している麻酔薬は、その作用機序がいまだ不明な点が多いものの、数種の麻酔薬は GABA 受容体を介して作用しているとされる。よって、麻酔薬が気道の GABA 受容体にも結合して、なんらかの生体反応を生じている可能性がある。麻酔中は気道確保として気管挿管、陽圧人工呼吸を行っており、気道の環境は生理的な状況から大きく変化している。そのような状況下で麻酔薬が気道免疫にどのような影響があるかを理解することは、臨床での麻酔中や、集中治療中の人工呼吸管理における呼吸器合併症について、新しい予防法や治療法の開発に寄与できる可能性がある。

2. 研究の目的

気道上皮細胞は、気道表面を覆い、粘液線毛クリアランスにより気道に侵入した様々な物質を排除する役割を担っている。さらに近年では、気道上皮細胞がインターロイキンなどのサイトカインや、成長因子などを産生することが判明し、気道免疫、炎症に重要な役割を果たしているとされる。本研究では培養気道上皮細胞に発現している GABA 受容体が気道上皮細胞のサイトカイン産生や粘液産生に関わり、気道免疫機構になんらかの役割を有していることを解明し、その細胞内メカニズムを解明するとともに、その作用機序が GABA 受容体を介しているとする麻酔薬が、気道免疫にどのような影響を及ぼすか検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養ヒト気道上皮細胞のモデルとして、ヒト肺粘液性類表皮癌細胞株である、NCI-H292 細胞を継代培養して用いた。NCI-H292 細胞を 10% 仔牛血清および、抗生剤含有 RPMI-1640 液体培地で培養し、コンフルエント状態になった時点で血清を除いた

培地で 24 時間インキュベーションした。その後、GABAB 受容体作動薬である baclofen、GABAA 受容体を介して作用する麻酔薬の propofol を様々な濃度で培養液に加え、その後、炎症性サイトカインの一種である腫瘍壊死因子 α (TNF α) 10ng/mL で細胞を刺激した。16 時間後、TNF α 刺激によって細胞培養液中に産生→分泌されるインターロイキン 8 (IL-8; 炎症性サイトカインの一種で好中球遊走作用を有する) の濃度を酵素免疫測定法 (ELISA 法) で測定した。さらに、各薬剤の作用が GABA 受容体を介したものを検討するため、GABA 受容体拮抗薬を前処置して IL-8 産生量の変化を測定した。

次に、各薬剤の IL-8 産生能に対する修飾作用の機序を解明するため、TNF α 刺激後 1-60 分間の全細胞溶解液を作製して、その細胞内シグナル経路として代表的な p42/44 mitogen-activated protein kinase や p38 kinase の活性化 (リン酸化) を、ウェスタンブロット法を用いて測定した。

各処置による細胞の生存率への影響を検討するため、トリパンブルー染色法をおこない、200 細胞中の死細胞を計測した。

(2) コンフルエントに達した NCI-H292 細胞は 24 時間血清を除いてインキュベーションし、静脈麻酔薬であるプロポフォール、ケタミン、デクスメドミジン、ミダゾラムを様々な濃度で 20 分間前処置した。その後 Tissue growth factor α (TGF α) で刺激し、16 時間後に抗 MUC5AC モノクローナル抗体を用いて培養液中に分泌されたムチン (MUC5AC) を、slot blot 法で測定した。Slot blot で得られたバンドの濃さをデンストメトリーで数値化し、定量した。細胞内に産生された MUC5AC も測定するために、lysis buffer を用いて全細胞溶解液を作製して slot blot をおこなった。さらに、各薬剤の作用が GABA 受容体を介したものを検討するため、GABA 受容体拮抗薬を前処置して MUC5AC の産生量の変化を検討した。

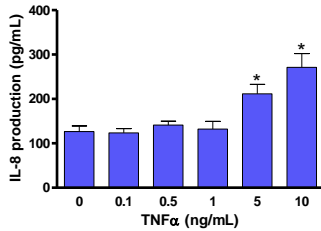
次に、各薬剤の MUC5AC 産生に対する修飾作用の機序を解明するため、TGF α 刺激後 1-60 分後の全細胞溶解液を用いて、その細胞内シグナル経路として代表的な p42/44 mitogen-activated protein kinase や p38 kinase、Akt、SAPK/JNK の活性化 (リン酸化) への影響を、ウェスタンブロット法を用いて測定した。

統計処理は分散分析 (with Bonferroni test) をおこない、 $p < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

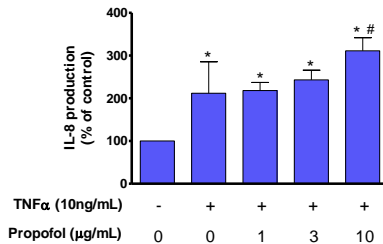
培養気道上皮細胞のNCI-H292細胞を継代培養して実験に用いた。

(1) 炎症性サイトカインであるTNF α で細胞を刺激すると16時間後の培養液中にはTNF α 濃度依存性にインターロイキン8(IL-8)の産生量が増加していた。



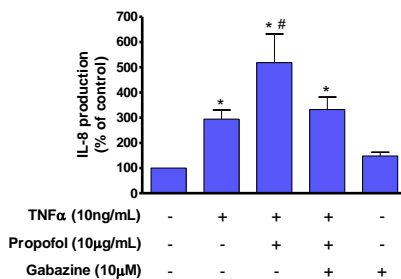
* $p < 0.05$ vs. control (n = 6) Data represent Mean \pm SD.

TNF α 刺激により引き起こされたIL-8の産生は、麻酔薬であるプロポフォール10 μ g/mLで有意に増強した。濃度依存性で増強する傾向にあった。



* $p < 0.05$ vs. control # $p < 0.05$ vs. TNF α (n = 14) Mean \pm SD

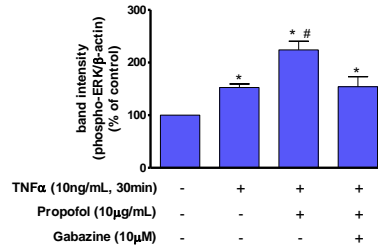
このプロポフォールの作用はGABAA受容体拮抗薬であるGabazine 10 μ Mを前処置することで抑制され、プロポフォールがGABAA受容体を介してIL-8の産生を修飾している可能性が示唆された。



* $p < 0.05$ vs. control # $p < 0.05$ vs. TNF α (n = 10) Mean \pm SD.

プロポフォールは、TNF α 刺激で誘発されるp42/44 mitogen-activated protein kinase

のリン酸化をGABAA受容体依存性に増強したことから、細胞内メカニズムのひとつとして、p42/44の関与が示唆された。



* $p < 0.05$ vs. control. # $p < 0.05$ vs. TNF α . (n = 3) Mean \pm SD.

これらの結果から、気道上皮細胞に発現しているGABA受容体がサイトカイン産生の調節を担っている可能性が示唆される。特に気道上皮におけるIL-8の産生は好中球遊走を惹起するなど気道炎症に重要な役割を持っており、GABAA受容体はその産生過程を修飾している可能性があり、今後新しい治療ターゲットとなりうる。

次にGABAB受容体の関与を検討するためにGABAB受容体作動薬であるbaclofenを用いてIL-8産生への影響を測定したが、IL-8産生量は変化しなかった。

(2) さらに、気道免疫のfirst stepとなる気道粘液(ムチン)産生においてGABA受容体が関与するか検討した。TGF α (20ng/mL、16時間)によって細胞を刺激すると濃度依存性に気道分泌型ムチンの一種であるMUC5ACの分泌が促進された。GABAA受容体に作用するといわれている麻酔薬、プロポフォールとミダゾラム、および他の麻酔薬であるデクスメデトミジン、ケタミンで前処置すると、ミダゾラムのみ濃度依存性にTGF α 刺激によるMUC5AC産生を抑制した。しかし、プロポフォールは抑制しなかった。

	TGF α (20ng/mL)	-	+	+	+	+	+
Concentration (M)	0	0	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	
Midazolam							
Dexmedetomidine	0	0	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	
Propofol	0	0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	
Ketamine	0	0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	

抗MUC5AC抗体を用いたslot blot

ミダゾラムの作用がGABAA受容体を介したのか検討するためにGABAA受容体拮抗薬gabazine、およびpicrotoxinで前処置して実験を行ったが、GABAA受容体拮抗薬はミダゾラム

ムの作用を抑制しなかった。さらにベンゾジアゼピン受容体を介しているか検討するために中枢性ベンゾジアゼピン受容体拮抗薬であるフルマゼニル、末梢性ベンゾジアゼピン受容体拮抗薬であるPK11195で前処置してMUC5ACの産生量を測定したが、どちらの拮抗薬もミダゾラムの作用をブロックせず、ベンゾジアゼピン受容体の関与も否定された。



抗MUC5AC抗体を用いたslot blot

ミダゾラムのMUC産生抑制作用の細胞内メカニズムを探るため、TGF α 刺激によるp42/44 kinase、p38 kinase、Akt、JNKの活性化におけるミダゾラムの影響を検討したが、ミダゾラムはどれも抑制しなかった。P42/44 kinaseをむしろ増強する傾向にあった。

よって、麻酔薬であるミダゾラムは、TGF α 刺激により誘発されるMUC5AC産生を抑制するが、従来ミダゾラムが作用するとされる受容体とは独立した機序で作用していることが示唆された。

GABAB受容体拮抗薬や作動薬もTGF α 刺激によるMUC5AC産生量を変化させなかった。

これらの結果から、麻酔薬ミダゾラムが気道上皮においてムチン産生を抑制することが示唆された。ムチンは気道免疫（外界刺激からの防御機構）として重要な役割をはたす一方で、喘息・COPDなど慢性炎症下では産生過剰となり気道閉塞を引き起こす原因となる。近年ではムチン産生の抑制が呼吸器疾患治療の新たなターゲットとして注目されている。麻酔薬のムチン産生に対する修飾作用の機序を解明することは、喫煙者・喘息・COPD合併患者、長期人工呼吸患者などの周術期呼吸管理においてムチン産生のコントロールをすることで呼吸器合併症などの予後改善に寄与できる可能性がある。

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0件)

[学会発表] (計4件)

- ① 杉山陽子、田辺久美子、飯田宏樹、土肥修司
気道上皮細胞のサイトカイン産生におけるプロボフェールの作用
日本麻酔科学会第57回学術集会、2010年6月3日、福岡市、日本
- ② 水田健太郎、Chang Yi、Xu Dingbang、杉山陽子、正木英二、Emala CW
気管平滑筋におけるDopamine D2受容体の発現とその機能的役割
日本麻酔科学会第57回学術集会、2010年6月3日、福岡市、日本
- ③ 杉山陽子、飯田宏樹、土肥修司
Diabetes-Induced Tactile Allodynia Involves Activation of Adenylyl Cyclase in Rat Sensory Neurons.
アメリカ麻酔学会、2009年10月17日、ニューオリンズ、米国
- ④ 水田健太郎、水田文子、杉山陽子、Emala CW
気管平滑筋のGABAB受容体はIP3合成を促進する
日本麻酔科学会第56回学術集会、2009年8月16日、神戸市、日本

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 陽子 (SUGIYAMA YOKO)
岐阜大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70444255

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：