

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590075

研究課題名（和文） 気道上皮細胞修復をターゲットとした高齢者難治性喘息の治療法の探索

研究課題名（英文） Bronchial epithelial cells as the targets of the therapy for refractory asthma of elderly patients.

研究代表者

山下 直美（NAOMI YAMASHITA）

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：20239974

研究成果の概要（和文）：喘息は吸入ステロイド薬の普及により、その治療は格段の進歩を遂げた。しかし、高齢者の喘息は、炎症の持続および修復能の低下から、気道上皮細胞の障害およびその構造的変化が起き、難治性になる場合が多い。そこで、本研究では、気道上皮細胞の修復および恒常性維持の視点から、治療薬として、新規クルクミン誘導体およびコリン作動性物質の作用を解析し、その効果を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Inhaled steroid bring the great advance in the therapy of asthma. However, as for an elderly's asthma, the impairment of a respiratory-epithelium cells and its structural change break out refractory cases from a severe airway inflammation and remodeling. So, in this study, we analyzed the therapeutic potential of the novel curcumin derivative and the endogenous ligand of the alpha7 subunit of nicotinic acetylcholine receptors, and clarified its effectiveness in airway inflammation and remodeling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物薬学

キーワード：アレルギー・ぜんそく、老化、薬学、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

吸入ステロイド薬の普及により気管支喘息の治療は飛躍的進歩を遂げたが、気道上皮細胞の障害はステロイド薬により改善せず、難治化の要因となる。気道上皮細胞、樹状細胞、肺胞マクロファージ、線維芽細胞をターゲットに細胞の老化および肺構造の老化が高齢者の気道リモデリングの不可逆性を誘導し、難治化に関与する視点から制御法を開

発するユニークな研究である。Th2 サイトカイン主導の炎症と考えられていたアレルギー炎症が、近年 IL-17、IL-18 を始めとする Th1/Th2 に分類不能なサイトカインの役割も明らかにされ、さらに複雑な細胞間相互作用の上に構築されている事の重要性が再認識されてきている。抗 IgE 抗体や IL-13 関連の分子標的薬の開発も進んでいるが、気道構造の変化—いわゆる気道リモデリングの修

復は未だに解決が困難な重要課題となっている。一方では、臨床的には喘息有症率が上昇する中で、予防また寛解導入という課題がより重要なものとなってきている。

気道上皮細胞は、アレルゲンや環境汚染物質に第一に接する細胞であり、バリア機能とともに、Human thymic stromal lymphopoietin (TSLP)を始めとするサイトカインの産生を通して、炎症惹起に大きな役割を果たしていることが示され、治療のターゲットとして注目されている (Holgate, ST Allergol Int. 2008;57:1-10.)。気道上皮細胞と線維芽細胞の相互作用は気道リモデリングに関係して知られているがその制御法はまだ皆無である。さらにアレルゲン性の獲得、抗原提示の側面から、気道上皮細胞と樹状細胞との相互作用も注目されている (Lambrecht BN, et al. Immunity. 2009 ;31:412-24)。

喘息の治療法で、免疫系を修飾する方法として減感作療法が古くから行われてきた。治療薬の進んだ現在でも免疫療法は唯一疾患の natural course を修飾でき寛解を誘導できる治療法として期待されている。研究代表者は、ヒトの減感作療法の効果発現メカニズムを検討するとともに、マウスの喘息モデルを作成し、細胞間相互作用の検討を行ってきた (Yamashita N et al: Clin Exp Immunol107:332-345,1997. J Allergy Clin Immunol 2001; 107:135-42.)。その中で、もっとも有効な抗原提示細胞である樹状細胞機能を修飾する事により、効果的な免疫療法が可能な事を明らかにした (Fujita S, Yamashita N, et al J Allergy Clin Immunol 2008; 121:95-104 e7.)。

2. 研究の目的

本研究は高齢者難治性喘息の制御法を気道上皮細胞の修復・恒常性維持の観点から寛解導入を目指すことを目的として組み立てた。気道リモデリングの修復を目指し、細胞の老化および細胞間相互作用を焦点に開発する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1)気道上皮細胞のダニアレルゲン刺激によるサイトカイン産生および刺激伝達系のプロファイリング

Human bronchial epithelial cell line (HBEC)をI型コラーゲンコートしたインサート付き培養プレートで培養する。Confluentになった時点で、上層の培養液を除き空気層培養に移行する。空気層培養後2週間で線毛上皮細胞に分化する。もう一群はIL-13投与し粘液分泌細胞に分化させる。この2種類の細胞について、気道上皮細胞への直接作用が明らかになったダニアレルゲン刺激(ダニアレルゲン、精製アレルゲンDerf1、Derf2)を行い、サイトカン、ケモカイン、刺激伝達

系のプロファイリングを連携研究者の高橋らの開発したアレイ解析を用いて行う。Der2は自然免疫のTLR4の刺激伝達分子MD-2を介した刺激伝達が明らかになっているが、Der1については不明である。また主要アレルゲンはあくまでIgE産生能を指標に同定されたもので、ダニアレルゲン全体に含まれる因子については複合的な作用を及ぼす可能性が高く、その点を明らかにする。

(2)気道上皮細胞修復の候補因子についてその作用の同定

申請者らが注目しているSLURP-1については、中和抗体およびsiRNAを作用させ、その上でダニアレルゲンを作用させ、気道線毛上皮細胞の機能変化を解析する。粘液分泌細胞にはその受容体 α 7nAChを強制発現させ、効果を解析する。1)で候補として挙げた因子についても蛋白発現を検討するとともに、その作用の阻害が気道線毛上皮細胞および粘液分泌細胞の機能に及ぼす効果を解析する。ヒト培養株を用い、気道上皮細胞のアレルゲン刺激による変化を明らかにし、気道修復促進因子を同定する。最終的には喘息モデル動物を用いてin vivoで修復起点促進作用の有無を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 気道上皮細胞のダニアレルゲン刺激によるサイトカイン産生および刺激伝達系のプロファイリング-線毛上皮細胞および粘液分泌細胞に分化した細胞について、粘液分泌細胞では新規コリン作動見物質であるSLURP1が大きく減少することおよびLps、polyIC、ダニアレルゲン刺激でも、新規コリン作動見物質であるSLURP1が減少することおよびSerpine1が刺激により大きく増加することが明らかになった。

(2)気道上皮細胞の分化を制御する薬剤としてのクルクミン誘導体の検討-気道上皮細胞は上皮間葉系移行(EMT)を介して、気道リモデリングに関与する事が示唆されている。この経路に介入する方法として、新規クルクミン誘導体の効果を検討し、有効性を示す知見を得た。炎症性サイトカインの抑制効果、TGF- β の刺激伝達を効率よく抑制した。さらに、ステロイドでは抑制できなかった、気道リモデリングの指標としてのSerpine1の抑制効果を明らかにした(この結果は原著論文として発表した)。

(3)SLURP-1の喘息病態への関与について-マウス喘息モデルおよび培養気道上皮細胞を用いて、SLURP-1が喘息病態では産生が低下する事を明らかにし、原著として報告した。さらにヒトリコンビナントSLURP-1を用いて、マクロファージおよび気道上皮細胞への作用の検討し、リコンビナントSLURP-1は、気道上皮細胞のサイトカイン産生を濃度依存的に抑制することを明らかにした。

SLURP siRNA を作用させると炎症性サイトカイン産生が増強し、 $\alpha 7$ nACR の siRNA を作用させると SLURP-1 の作用が解除された事から、炎症性サイトカイン抑制作用は $\alpha 7$ nACR を介している事が明らかになった。実際に SLURP-1 が抗炎症作用をヒト気道上皮細胞にオートクラインのメカニズムで発揮する事および外部から作用させる事により抗炎症作用を増強できることを明らかにできた。一方、マウス線毛上皮細胞を用いた実験で、SLURP-1 は線毛運動を促進し、恒常性維持に有効であることが示された。今後、実際に高齢者喘息で SLURP1 の分泌がどのような状態にあるか検討を進める予定である。

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 20 件)

- 1) Kawakami, M., O. Narumoto, Y. Matsuo, K. Horiguchi, S. Horiguchi, N. Yamashita, M. Sakaguchi, M. Lipp, T. Nagase, and N. Yamashita. 2012. The role of CCR7 in allergic airway inflammation induced by house dust mite exposure. *Cellular immunology*. 275:24-32.
- 2) Narumoto, O., Y. Matsuo, M. Sakaguchi, S. Shoji, N. Yamashita, D. Schubert, K. Abe, K. Horiguchi, T. Nagase, and N. Yamashita. 2012. Suppressive effects of a pyrazole derivative of curcumin on airway inflammation and remodeling. *Experimental and molecular pathology*. 93:18-25.
- 3) Tano, T., M. Okamoto, S. Kan, K. Nakashiro, S. Shimodaira, N. Yamashita, Y. Kawakami, and H. Hamakawa. 2012. Growth inhibition and apoptosis by an active component of OK-432, a streptococcal agent, via Toll-like receptor 4 in human head and neck cancer cell lines. *Oral oncology*. 48:678-685.
- 4) Kasai A, Yamashita N, Utsunomiya-Tate N, 2010. Collagen racemization and de@position on the lung of aged rats. *Biochemistry Insight* 3:25-33.
- 5) Narumoto, O., K. Horiguchi, S. Horiguchi, Y. Moriwaki, H. Takano-Ohmuro, S. Shoji, H. Misawa, N. Yamashita, T. Nagase, K. Kawashima and N Yamashita. 2010. Down-regulation of secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (SLURP-1), an endogenous allosteric

alpha7 nicotinic acetylcholine receptor modulator, in murine and human asthmatic conditions. *Biochemical and biophysical research communications*. 398:713-718.

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 新倉雄一、中田武志、成田知也、小島香奈、橘美智子、藤澤まどか、清水彩加、山下直美
性差因子による難治性気管支喘息の制御についての解析
2012年11月30日
第62回日本アレルギー学会秋季学術大会(大阪)
- 2) 成田治、松尾由紀子、阿部和穂、阪口雅弘、長瀬隆英、山下直美
好中球浸潤を伴う喘息モデルを用いた気道炎症の制御についての解析
2012年4月22日
第52回日本呼吸器学会学術講演会(神戸)
- 3) 成田知也、新倉雄一、橘美智子、清水彩加、山下直美
喘息病態におけるヒアルロン酸と気道リモデリングとの関係
2012年3月30日
—喘息モデルマウスを用いた検討—
日本薬学会第133年会(横浜)
- 4) 中田武志、新倉雄一、小島香奈、藤澤まどか、山下直美
喘息気道炎症難治病化制御因子としての雄性因子に関する検討
2012年3月30日
日本薬学会第133年会(横浜)
- 5) 成田治、橋本祐一郎、堀口和秀、三澤日出巳、川島紘一郎、長瀬隆英、山下直美
非神経性コリン作動系の喘息病態における役割に関する検討
2011年11月10日第61回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京)
- 6) 松尾由紀子、石毛聡子、大川隆行、須甲松信、山下直美
チーム医療 喘息患者の薬局での教育指導についての認識調査
2011年5月15日
第23回日本アレルギー学会春季臨床大会(千葉)
- 7) 山下直美
コメディカルのための気管支喘息の基礎
2011年5月14日
第23回日本アレルギー学会春季臨床大会(千葉)

8) 成本治、松尾由紀子、阿部和穂、白井秀治、坂口雅弘、長瀬隆英、山下直美
喘息病態における気道上皮細胞の活性化と新規クルクミン誘導体による制御についての解析

2011年4月22日

第51回日本呼吸器学会学術講演会(東京)

[図書] (計7件)

山下 直美 疾患別薬物療法管理マニュアル
じほう 平成22年4月

[その他]

ホームページ等

<http://www.musashino-u.ac.jp/facilities/pharmacy/yakubutsu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 直美 (NAOMI YAMASHITA)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：20239974

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

高橋直之 (Naoyuki Takahashi)

東京大学 助教

研究者番号：20337447

楯 直子 (Naoko Tate)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：00201955