

## 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 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22590837

研究課題名（和文）

TRP遺伝子を標的とした呼吸器疾患治療の開発

研究課題名（英文）

Therapeutic approach for respiratory diseases targeting TRP genes

研究代表者

伊藤 理 (ITO SATORU)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60378073

研究成果の概要（和文）：培養ヒト気道平滑筋細胞において、STIM1/Orai1 活性化がストア作動型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こすことにより細胞遊走能を制御することを見出した。一方、cAMP は気道平滑筋細胞において、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルとは逆に細胞増殖ならびに細胞遊走能に対して抑制的に働くことを見出した。過剰な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が肺構成細胞に作用し細胞機能変化を生じることにより、気管支喘息や COPD の病態悪化に関与する可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that  $\text{Ca}^{2+}$  influx mediated by activation of STIM1/Orai1 regulates migration of human airway smooth muscle cells. In contrast to cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization, elevation of cAMP levels inhibits proliferation and migration of airway smooth muscle cells. Excessive elevation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations may contribute to the pathophysiology of asthma and COPD via altering cellular functions and phenotypes of pulmonary cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医学

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：TRP, STIM1, Orai1, 気道平滑筋、気管支喘息、COPD、メカニカルストレス、血管内皮

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は気道平滑筋細胞の収縮力・増殖反応を規定しており、 $\text{Ca}^{2+}$  動態

の異常が気道平滑筋機能の変化を介して喘息の病態につながっていることが推測される。様々な刺激により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度

の持続的な上昇を保つには  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを介した細胞外からの流入が必須である。しかしながら、降圧剤として臨床使用されている電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害剤は喘息治療に有効でない。その主な理由は、気道平滑筋収縮および免疫細胞の活性化が L 型チャネルとは別の  $\text{Ca}^{2+}$ 流入経路によって支配されているからである。TRP 遺伝子により制御される TRP ファミリーチャネル、STIM1 により制御される、ストア作動型  $\text{Ca}^{2+}$ 透過チャネル Orai1 がその候補  $\text{Ca}^{2+}$ 透過チャネルである。TRP や STIM1/Orai1 は G 蛋白結合型や成長因子などの受容体刺激、細胞伸展などの機械的刺激など様々な刺激による  $\text{Ca}^{2+}$ 流入経路として注目されていた。しかしながら、呼吸器系細胞においてはこれら  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル関連遺伝子がどのように細胞機能を制御しているかについての解明は十分になされていなかった。

## 2. 研究の目的

喘息における気道リモデリングの主要な病理組織像は慢性の気道炎症および気道収縮刺激に伴う気道平滑筋層の増生である。本研究では  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの制御が気道収縮・リモデリング、肺気道炎症に与える影響とその機序について明らかにし、喘息、COPD、肺炎炎症性疾患の病態解明ならびに治療法の開発に貢献することである。

## 3. 研究の方法

培養細胞（ヒト気道平滑筋細胞、ヒト肺微小血管内皮細胞）を用いた研究を行い、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの細胞機能および喘息・COPD・肺炎炎症の病態形成に果たす役割について検討した。

(1) ヒト気道平滑筋細胞に対して platelet-derived growth factor (PDGF)による持続的刺激を与えた際の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を fura-2 蛍光強度変化によって測定した。更に、細胞遊走を Boyden chamber 法で測定した。次に、TRP, STIM1, Orai1 遺伝子を siRNA 導入により抑制し、細胞機能に対する影響を検討した。

(2) 気道弛緩効果を有する cAMP の呼吸器系細胞機能に対する役割を検討した。ヒト気道平滑筋細胞においてウシ胎児血清(FBS)刺激による細胞増殖、PDGF 刺激による細胞遊走能に対する cAMP の影響を与えた。

(3) ヒト肺微小血管内皮細胞における IL-8 産生に対する cAMP の影響を検討した。細胞からの IL-8 放出については、細胞上清の IL-8 濃度を ELISA 法で測定した。

## 4. 研究成果

(1) ヒト気道平滑筋細胞には TRPC1, TRPC6, TRPV1, TRPV2, TRPV4, STIM1, STIM2, Orai1 の mRNA 発現を認めた。PDGF 刺激により、2 相性の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が引き起こされた。細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ を除去した条件では一過性の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇を認めたが、持続しなかった。このことから、PDGF 刺激は細胞内ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出と、それに引き続いて  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を誘導することが考えられ、ストア作動型  $\text{Ca}^{2+}$ 流入の関与が強く示唆された。そこで、ストア作動型  $\text{Ca}^{2+}$ 流入の責任遺伝子とされる STIM1 を siRNA 導入によって抑制し実験を行った。筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-ase 阻害剤 thapsigargin によって誘導されるストア作動型  $\text{Ca}^{2+}$ 流入に加え、PDGF により生じる持続性  $\text{Ca}^{2+}$ 流入はともに STIM1 siRNA 導入により有意に抑制された (図 1)。更に、STIM1

の siRNA 導入により、PDGF による細胞遊走も有意に抑制された。同様に、ストア作動型  $\text{Ca}^{2+}$  透過チャネル Orai1 の siRNA 導入によっても PDGF による  $\text{Ca}^{2+}$  流入および細胞遊走は有意に抑制された (図 1)。一方、STIM2 の siRNA 導入は PDGF による細胞応答に影響しなかった (図 1)。以上の結果から、PDGF 刺激による気道平滑筋細胞遊走を介した気道リモデリングには、STIM1/Orai1 により制御されるストア作動型  $\text{Ca}^{2+}$  流入活性化が関与している可能性が示唆された。

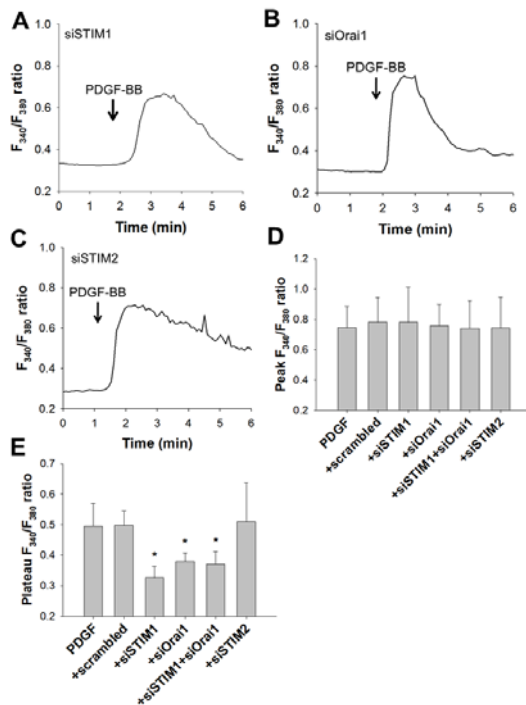


図 1. ヒト気道平滑筋細胞における PDGF 刺激による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に対する STIM1, Orai1 の関与。

(2) ヒト気道平滑筋細胞増殖ならびに遊走能に対する cAMP の影響を検討した。Forskolin, プロスタグランジン(PG)  $\text{E}_2$ ,  $\text{PGE}_2$  受容体である EP2, EP4 受容体アゴニスト、 $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬 procaterol はいずれも細胞内 cAMP を上昇させた。これらの

薬剤はいずれも FBS 刺激による細胞増殖能、PDGF 刺激による細胞遊走能を有意に抑制した (図 2)。更に、EP2, EP4 受容体を siRNA 導入により抑制することで、 $\text{PGE}_2$  の効果が減弱した。一方、 $\text{PGE}_2$  の EP3 受容体刺激は cAMP 濃度を上昇させず、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇ならびに遊走能増強を誘導した。以上のことから、cAMP は  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルと逆に気道リモデリングに対し抑制的に働くことが判明した。

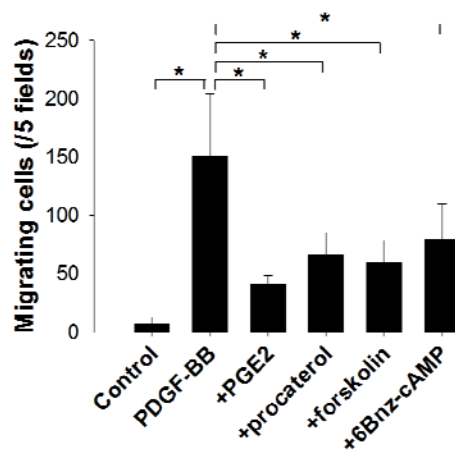


図 2. ヒト気道平滑筋細胞における PDGF 刺激による細胞遊走亢進に対する cAMP を上昇させる薬物および protein kinase A 活性化作用を有する 6Bnz-cAMP による抑制効果。

(3) ヒト肺微小血管内皮細胞における検討では、forskolin,  $\text{PGE}_2$ , EP2 受容体刺激、EP4 受容体刺激はいずれも細胞内 cAMP を上昇させ、細胞からの IL-8 産生を増強させた。cAMP 上昇は、一過性の p38 MAP-kinase 活性化を介して IL-8 産生を制御していた。以上の結果から、肺毛細血管において cAMP 濃度上昇は好中球活性化を介して炎症促進的に働くことが示唆された。このことは細菌感染などに対しては免疫促進的に働く一方で、ARDS など肺炎症性疾患においては病態悪化につながることに関与していると考え

られる。

以上の研究で得られた知見を踏まえ、今後は cAMP と Ca<sup>2+</sup>シグナル特に TRP チャネル、STIM1/Orai1 活性との関連について検討が必要である。

#### 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 10 件)

1. Billington CK, Ojo OO, Penn RB, Ito S. cAMP regulation of airway smooth muscle function. *Pul Pharmacol Ther* 26:112-120, 2013. 査読有
2. Aso H, Ito S, Mori A, Suganuma N, Morioka M, Takahara N, Kondo M, Hasegawa Y. Differential regulation of airway smooth muscle cell migration by prostanoid EP receptor subtypes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 48:322-329, 2013. 査読有
3. 伊藤理. 細胞ストレスと呼吸器. 呼吸 32:192-202, 2013. 査読無
4. 伊藤理. 解説「基礎」呼吸器とメカニカルストレス. 呼吸 31:997-1004, 2012. 査読無
5. 伊藤理、長谷川好規. 細胞力覚：メカノセンシングが生命機能を生み出す：呼吸器のメカノバイオロジジー. 細胞工学 31:1014-1029, 2012. 査読無
6. Suganuma N, Ito S, Aso H, Kondo M, Sato M, Sokabe M, Hasegawa Y. STIM1 regulates platelet-derived growth factor-induced migration and Ca<sup>2+</sup> influx in human airway smooth muscle cells. *PLoS One* 7:e45056, 2012. 査読有
7. Aso H, Ito S, Mori A, Morioka M, Suganuma N, Kondo M, Imaizumi K, Hasegawa Y. Prostaglandin E<sub>2</sub> enhances IL-8 production via EP4 receptor in pulmonary microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302:L266-L273, 2012. 査読有
8. Ito S, Ko SBH, Morioka M, Kondo M, Imaizumi K, Hasegawa Y. Three cases of bronchial asthma preceding IgG4-related autoimmune pancreatitis. *Allergology Int* 61:171-174, 2012. 査読有
9. Morioka M, Parameswaran H, Naruse K, Kondo M, Sokabe M, Hasegawa Y, Suki B, Ito S. Microtubule dynamics regulate cyclic stretch-induced cell alignment in human airway smooth muscle cells. *PLoS One* 6:e26384, 2011. 査読有
10. Mori A, Ito S, Morioka M, Aso H, Kondo M, Sokabe M, Hasegawa Y. Effects of specific prostanoid EP receptor agonists on cell proliferation and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations in human airway smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 659:72-78, 2011. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. 伊藤理. シンポジウム 8：気道平滑筋の収縮性変化が及ぼす病態とその機序. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 大阪 国際会議場 2012 年 11 月 30 日.
2. 伊藤理、麻生裕紀、菅沼伸一、高原紀博、森明美、近藤征史、長谷川好規. cAMP によるヒト気道平滑筋遊走能の制御機構. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 大阪 国際会議場 2012 年 11 月 29 日.
3. 伊藤理. 細胞ストレスと呼吸器. 第 40 回箱根呼吸器討論会 大津 ロイヤルオークホテル 2012 年 6 月 9 日.
4. 伊藤理、長谷川好規. オーガナイズドセッション：呼吸器とメカノバイオロジジー. 第 51 回日本生体医工学会大会 福岡 国際

会議場 2012 年 5 月 10 日.

5. Ito S, Suganuma N, Aso H, Kondo M, Sato M, Hasegawa Y. STIM1 regulates Ca<sup>2+</sup> influx and migration induced by platelet-derived growth factor in human airway smooth muscle cells. *ATS 2012 International Conference*, San Francisco, CA, USA, May 21, 2012.
6. Ito S, Suganuma N, Hasegawa Y. Symposium: Role of STIM-1 in regulation of airway smooth muscle functions. *International Symposium on Mechanobiology*, Shanghai, China, Nov. 5, 2011.
7. Ito S, Parameswaran H, Morioka M, Naruse K, Kondo M, Sokabe M, Suki B, Hasegawa Y. Essential role for microtubule dynamics in cyclic stretch-induced cell alignment in human airway smooth muscle cells. *ATS 2011 International Conference*, Denver, CO, USA, May 16, 2011.
8. Ito S, Mori A, Hasegawa Y. Regulation of cell proliferation and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations by prostanoid EP receptor subtypes in human airway smooth muscle cells. *7th Young Investigators' Meeting on Smooth Muscle*, Winnipeg, Canada, May 12, 2011.
9. 伊藤理, 長谷川好規. オーガナイズドセッション:呼吸器とメカニカルストレス. 第 50 回日本生体医工学会大会 東京 東京電気大学神田キャンパス 2011 年 4 月 29 日.

[図書] (計 2 件)

1. Ito S, Hasegawa Y. (2012) Mechanical stretch and cytokine synthesis in pulmonary endothelial cells. In: Kamkin A, Kiseleva I (Eds) "Mechanosensitivity in cells and tissues" No 5. Mechanical stretch and

cytokines. *Springer*, New York, NY, pp165-187.

2. Ito S, Suganuma N, Hasegawa Y. (2012) Role of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in airway smooth muscle cell functions and in pulmonary medicine. In: "Recent Advances in Mechanobiology". *Shanghai Scientific and Technological Literature Publishing House*, Shanghai, China, pp171-174.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med-nagoya-respmed.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 理 (ITO SATORU)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 60378073

(2) 研究分担者

長谷川 好規 (HASEGAWA YOSHINORI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 20270986

佐藤 光夫 (SATO MITSUO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号 : 70467281

(3) 連携研究者

曾我部 正博 (SOKABE MASAHIRO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 10093428

