

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 14 日現在

機関番号：24701
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22790766
 研究課題名（和文） 難治性喘息におけるMMPの役割の解明

研究課題名（英文） Role of MMPs in refractory asthma

研究代表者

市川 朋宏 (ICHIKAWA TOMOHIRO)
 和歌山県立医科大学 医学部 助教
 研究者番号：20405450

研究成果の概要（和文）：重症の気管支喘息の気道ではリモデリングと呼ばれる気道構造の不可逆的变化が生じている。喘息の気道ではマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)が増加し気道構造の破壊と修復が繰り返されることでリモデリング形成に関与することが知られている。そこで、本研究では MMP の主要な産生細胞である肺線維芽細胞を用いて MMP の産生に関わる因子について検討した。その結果、強力な活性窒素種であるパーオキシナイトライトやウイルス感染の際に重要な toll 様受容体(TLR)3の活性化が MMP の産生を促進することを見出した。

研究成果の概要（英文）：Because it is well known that airway remodeling contributes to the refractoriness of asthma and MMPs play an important role in the formation of remodeling, we explored the factors that affect the production and activation of matrix metalloproteinase (MMPs) by lung fibroblast, one of the main producer of MMPs in the lung. We found that peroxy nitrite, one of the potent oxidants, and activation of toll like receptor (TLR)-3 are the contributors of excessive MMP production and activation by lung fibroblasts. These results suggest that reactive nitrogen species and the TLR3 pathway are related with MMP-mediated airway remodeling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

キーワード：閉塞性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

難治性喘息では気道リモデリングが生じており不可逆的な気流制限を来している。リモデリングの形成には MMP が重要な役割を果たしていることが知られている。一方、難治性喘息の気道では酸化・窒素化ストレスが充

進していることが報告されている。またウイルス感染は喘息増悪の主要な原因である。酸化・窒素化ストレスやウイルス感染がリモデリングの進行を介して喘息の難治化と関連していると考えられるが、これらが MMP の産生、あるいは MMP/TIMP のバランスに及

ぼす影響やそのメカニズムは不明であり、これを明らかにすることが難治性喘息の病態解明や新たな治療方法の確立の一助となると考えられる。

2. 研究の目的

MMP の主要な産生細胞である肺線維芽細胞において、酸化・窒素化ストレスやウイルス応答に重要な TLR3 の活性化が MMP と TIMP の産生に及ぼす影響及びそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト肺線維芽細胞を用いて、活性窒素種であるパーオキシナイトライトを投与し、ザイモグラフィー法で培養液中への MMP-2, MMP-9 の産生および活性化の程度を定量する。さらにそのシグナリングとして NF-κB と TGF-β1 に着目し、パーオキシナイトライトを線維芽細胞に投与後の核内の NF-κB の量をウエスタンブロッティング法にて、さらに培養液中の TGF-β1 の濃度を ELISA 法で定量する。

(2) ヒト肺線維芽細胞に TLR3 のリガンドである poly (I:C) を投与し、培養液中の MMP-2, MMP-9 の酵素活性をザイモグラフィー法で定量する。また細胞中の誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現をウエスタンブロッティング法にて測定する。さらに NF-κB と IRF-3 の核内移行をウエスタンブロッティング法にて検討し、NF-κB 阻害剤と IRF-3 のノックダウンにてそれぞれの経路を阻害し MMP や iNOS への影響を検討する。

4. 研究成果

(1) パーオキシナイトライトが MMP の産生と活性化に及ぼす影響についての検討。

① パーオキシナイトライトを肺線維芽細胞に投与すると濃度依存性に MMP-9 と MMP-2 の latent form 及び active form の産生を増強した(図 1)。

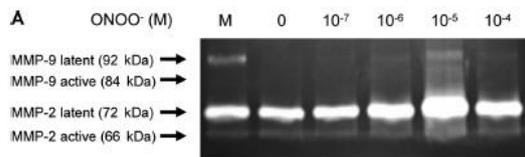


図 1 パーオキシナイトライトによる MMP-9 及び MMP-2 の分泌と活性化の促進

TIMP-1 の産生は $10^{-5}M$ までのパーオキシナイトライトの投与では有意に変化せず、 $10^{-4}M$ のパーオキシナイトライトで低下した。

② 次に、NF-κB と TGF-β1 に着目しメカニズムの検討を行った。パーオキシナイトライトは濃度依存性に線維芽細胞からの TGF-β1

の分泌を亢進した。 $10^{-5}M$ のパーオキシナイトライトを投与すると、NF-κB の核内での発現が投与後 60 分をピークに亢進した(図 2)。

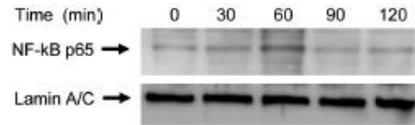


図 2 NF-κB の核内移行

プロテアソーム阻害剤である MG132 で培養細胞を前処理しておくこと、パーオキシナイトライトによる MMP-9 及び MMP-2 の分泌及び活性化の促進が有意に抑制された(図 3)。さらにパーオキシナイトライトによる TGF-β1 の分泌亢進作用も抑制した(図 4)。

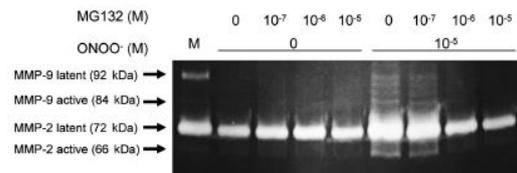


図 3 MG132 による MMP 分泌の抑制効果

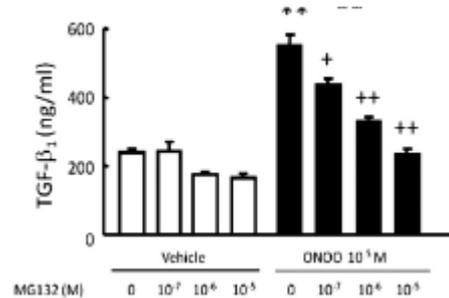


図 4 MG132 による TGF-β1 産生の抑制効果

TGF-β の中和抗体を投与するとパーオキシナイトライトによる MMP 活性促進作用が抑制された。(図 5)

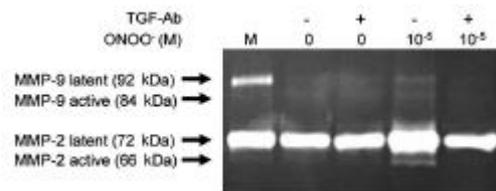


図 5 TGF-β 中和抗体による MMP 活性の抑制

③ テオフィリンは気管支拡張作用を有し、気管支喘息の治療に用いられるが、近年その抗炎症効果が注目されている。本研究ではテオフィリンの MMP 産生抑制効果を検討した。テオフィリンを投与しておくこと、パーオキシナイトライトによる MMP 活性促進作用が抑制された。(図 6)

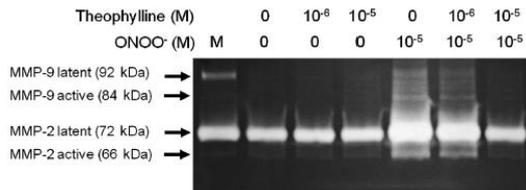


図6 テオフィリンによる MMP 活性抑制効果

さらにテオフィリンはパーオキシナイトライトによる TGF- β 1 の産生及び NF- κ B の核内移行も抑制した。またテオフィリンの抗炎症作用は HDAC2 活性を回復することで発揮されることが知られているため、パーオキシナイトライト投与後の HDAC2 活性を市販のキットで測定したところ、濃度依存性に細胞の核内での HDAC2 活性が低下したが(図 7A)、テオフィリンを投与しておくとも HDAC2 活性が回復した(図 7B)。

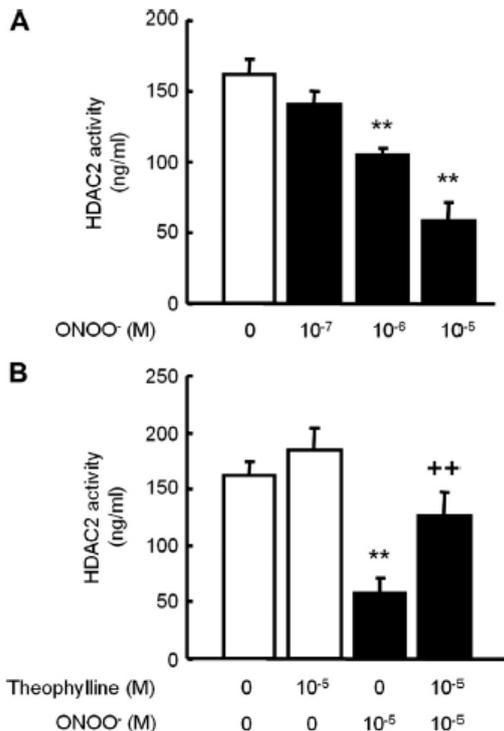


図7 テオフィリンによる HDAC2 活性の回復

以上の結果から活性窒素種が肺線維芽細胞において NF- κ B を活性化し TGF- β 1 の産生を促進することで MMP-9 及び MMP-2 の分泌及び活性化を亢進させることが示された。またテオフィリンはパーオキシナイトライトによる MMP 活性の促進効果を抑制することが示された。そのメカニズムとして NF- κ B-TGF- β 1 経路の抑制、及び HDAC2 活性の回復を介したものであることが示された。このことより活性窒素種が MMP の産生を介して気道リモデリングに関与しており、

テオフィリンの薬理作用がリモデリングの治療につながる可能性が示唆された。以上の結果は、2012年に Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 誌に発表した。(Sugiura H, Kawabata H, Ichikawa T et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 302, 2012 L764-74.)

(2) TLR3 の活性化が MMP の産生と活性化に及ぼす影響についての検討

① poly (I:C) を肺線維芽細胞に投与すると濃度依存性に MMP-2, MMP-9 の産生と活性化を亢進することがザイモグラフィ法で確認された(図 8)。

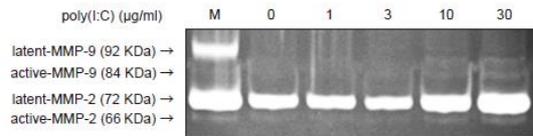


図8 poly (I:C)による MMP の産生促進

市販の MMP アレイを用いて行った検討では、poly (I:C) の投与で TIMP-1 の産生は有意な変化はなく、TIMP-2 の産生は減少した。

② poly (I:C) による MMP 産生増強のメカニズムとして iNOS の発現に着目し、poly (I:C) の投与後の iNOS の発現を検討したところ iNOS 発現が誘導され、NO の産生も亢進した(図 9)。

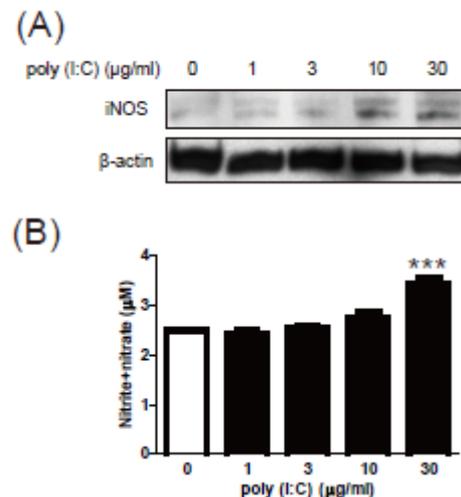


図9 poly (I:C)による iNOS 発現(A)と NO の産生(B)

TLR3 のノックダウンにより poly (I:C) による MMP の産生や iNOS 発現の誘導効果が抑制された。このことからこれらの作用が TLR3 を介したものであることが示された。さらに iNOS の阻害剤である L-NIL を投与しておくとも poly (I:C) による MMP の産生は抑制された(図 10)。

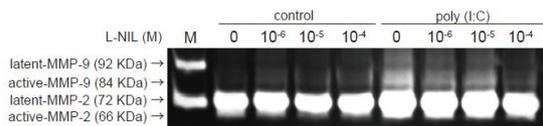


図 10 iNOS 阻害剤による MMP 産生抑制効果

③poly (I:C)が有する上述の作用のメカニズムを検討するため NF- κ B と IRF-3 に着目し検討を行った。poly (I:C)の投与により NF- κ B およびリン酸化型 IRF-3 の核内移行が促進することがウエスタンブロッティング法で確認された。NF- κ B 阻害剤である caffeic acid phenethyl ester(CAPE)を投与しておくくと poly (I:C)による MMP(図 11A)、および iNOS の産生は抑制された。また IRF-3 をノックダウンしておくくと poly (I:C)による MMP 産生(図 11B)と iNOS 発現の誘導が抑制された。

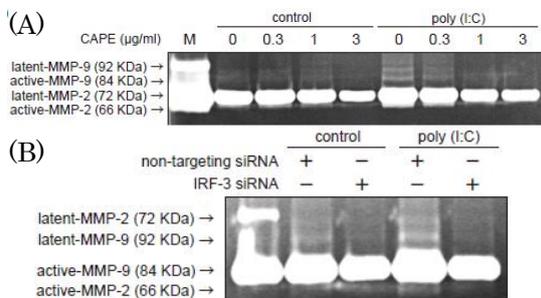


図 11 CAPE(A)と IRF-3 ノックダウン(B)による MMP 産生の抑制

以上より TLR3 の活性化が iNOS の発現とそれに引き続き内因性の NO の産生を介して MMP の産生を亢進させることが示された。さらに NF- κ B と IRF-3 の両方の経路が関与することが示された。現在は引き続き、MMP-2 と MMP-9 以外にも MMP-1 についても検討を行っており、さらに IFN- β の関与についても検討中である。本研究の結果の一部は第 53 回日本呼吸器学会学術講演会にて 2013 年に発表した。

(3)その他の研究

今回の研究では喘息における MMP 産生に影響を与える因子を検討したが、その他の研究として、我々は慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者の気道でコレステロール水酸化酵素である cholesterol-25-hydroxylase(CH-25H) 及びコレステロール水酸化物である 25-hydroxycholesterol (25-HC)が増加しており、好中球性気道炎症と関連していることを報告した(Sugiura H, Koarai A, Ichikawa T et al. *Respirology*. 17, 2012)。この結果を踏まえ 25-HC が肺線維芽細胞に及ぼす生物活性を検討したところ、25-HC は肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化、及び MMP-9 と

MMP-2 の産生を NF- κ B-TGF- β 1 の経路を介して促進することを見出し、肺リモデリングの形成に関与することを示した。この結果より、活性窒素種や TLR3 の活性化以外にも、25-HC が COPD や気管支喘息をはじめとした炎症性気道疾患の病理学的変化に関与していることが示され、25-HC 気道疾患における新たなメディエーターとなり得ることが示唆される。この研究結果は *Exp Cell Res* 誌に 2013 年に発表した(Ichikawa T et al. *Exp Cell Res*. 319, 2013)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Ichikawa T, Sugiura H, Koarai A, Kikuchi T, Hiramatsu M, Kawabata H, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M. 25-hydroxycholesterol promotes fibroblast-mediated tissue remodeling through NF- κ B dependent pathway. *Exp Cell Res*. 査読有,319, 2013, 1176-86

2. Koarai A, Yanagisawa S, Sugiura H, Ichikawa T, Kikuchi T, Furukawa K, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M. 25-Hydroxycholesterol enhances cytokine release and Toll-like receptor 3 response in airway epithelial cells. *Respir Res*. 査読有, 13, 2012.

3. Koarai A, Yanagisawa S, Sugiura H, Ichikawa T, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M. Cigarette smoke augments the expression and responses of toll-like receptor 3 in human macrophages. *Respirology*. 査読有, 17, 2012, 1018-25.

4. Matsunaga K, Yanagisawa S, Hirano T, Ichikawa T, Koarai A, Akamatsu K, Sugiura H, Minakata Y, Matsunaga K, Kawayama T, Ichinose M. Associated demographics of persistent exhaled nitric oxide elevation in treated asthmatics. *Clin Exp Allergy*. 査読有, 42, 2012, 775-81.

5. Kanda M, Minakata Y, Matsunaga K, Sugiura H, Hirano T, Koarai A, Akamatsu K, Ichikawa T, Ichinose M. Validation of the triaxial accelerometer for the evaluation of physical activity in Japanese patients with COPD. *Intern Med*. 査読有, 51, 2012, 369-75.

6. Sugiura H, Koarai A, Ichikawa T, Minakata Y, Matsunaga K, Hirano T, Akamatsu K, Yanagisawa S, Furusawa M, Uno Y, Yamasaki M, Satomi Y, Ichinose M. Increased 25-hydroxycholesterol concentrations in the lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 査読有, 17, 2012 533-40.

7. Sugiura H, Kawabata H, Ichikawa T, Koarai A, Yanagisawa S, Kikuchi T, Minakata Y, Matsunaga K, Nakanishi M, Hirano T, Akamatsu K, Furukawa K, Ichinose M. Inhibitory effects of theophylline on the peroxynitrite-augmented release of matrix metalloproteinases by lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 査読有, 302, 2012 L764-74.

8. Kikuchi T, Sugiura H, Koarai A, Ichikawa T, Minakata Y, Matsunaga K, Nakanishi M, Hirano T, Akamatsu K, Yanagisawa S, Furukawa K, Kawabata H, Ichinose M. Increase of 27-hydroxycholesterol in the airways of patients with COPD: possible role of 27-hydroxycholesterol in tissue fibrosis. *Chest*. 査読有, 142, 2012, 329-37.

9. Furukawa K, Sugiura H, Matsunaga K, Ichikawa T, Koarai A, Hirano T, Yanagisawa S, Minakata Y, Akamatsu K, Kanda M, Nishigai M, Ichinose M. Increase of nitrosative stress in patients with eosinophilic pneumonia. *Respir Res*. 査読有, 17, 2011

10. Minakata Y, Ueda H, Akamatsu K, Kanda M, Yanagisawa S, Ichikawa T, Koarai A, Hirano T, Sugiura H, Matsunaga K, Ichinose M. High COPD prevalence in patients with liver disease. *Intern Med*. 査読有, 49, 2010, 2687-91.

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. 市川朋宏: Toll 様受容体 3 の活性化は誘導型 NO 合成酵素の発現を介して肺線維芽細胞からの matrix metalloproteinase の産生を亢進する. 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会, 2013 年 4 月 21 日, 東京

2. 市川朋宏: COPD 肺における 25-hydroxycholesterol の産生と生物学的作

用についての検討. 第 9 回呼吸器バイオマーカー研究会, 2013 年 3 月 2 日, 東京

3. 市川朋宏: 25-hydroxycholesterol は肺線維芽細胞に作用して気道リモデリングを促進する. 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会, 2011 年 4 月 22, 23 日, 東京 (震災のため一般演題は誌面での発表のみ)

〔図書〕 (計 3 件)

1. 市川朋宏, 一ノ瀬正和: COPD 大規模臨床研究の全容. 医薬ジャーナル社, 医薬ジャーナル, p1709-p1715, 2012

2. 市川朋宏, 一ノ瀬正和: [COPD の治療・管理 update] 安定期の管理 薬物療法 気管支拡張薬 抗コリン薬・テオフィリン薬. 克誠堂出版, 日本胸部臨床, pS39-pS49, 2011

3. 市川朋宏, 杉浦久敏: [喘息と COPD をめぐって 類似点と相違点] 疫学. 医薬ジャーナル社, アレルギー・免疫, p1974-p1984, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川 朋宏 (ICHIKAWA TOMOHIRO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20405450