

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792311

研究課題名(和文) オーフアン受容体を標的とした気道リモデリング抑制機構の解明と臨床応用

研究課題名(英文) Elucidation of orphan receptor-mediated inhibitory effects on airway remodeling

研究代表者

水田 文子(MIZUTA, FUMIKO)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：30396501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、オーファン受容体を気管支喘息治療の新たな標的とすることを目的に、オーファン受容体の気管平滑筋上での発現スクリーニング、及びオーファン受容体を介した気道リモデリング作用の解析と細胞内シグナリング機構について検討を行った。その結果、気管平滑筋におけるオーファン受容体GPR40, 41, 43, 84, 119, 120, 132の発現を同定した。またこのうち、オーファン受容体GPR40の天然リガンドである長鎖遊離脂肪酸投与により、気管平滑筋の細胞増殖作用が生じた。さらに、この作用は主にPI3 kinaseとAktを介する反応であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To establish the clinical relevance of the orphan receptors as novel therapeutic targets for treatment of asthma, we examined the expression of the orphan receptors in airway smooth muscle, the orphan receptor-mediated airway remodeling and its intracellular signaling pathways. The orphan receptor GPR40, 41, 43, 84, 119, 120 and 132 were expressed on airway smooth muscle cells. We identified that the long-chain free fatty acids, which are natural ligands for GPR40, stimulated airway smooth muscle cell proliferation. Furthermore, we revealed that PI3 kinase and Akt are involved in GPR40-mediated airway smooth muscle cell proliferation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：オーファン受容体 気管支喘息 気道リモデリング 気管平滑筋 気道上皮

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は、気管平滑筋の可逆的収縮、気道粘液分泌過多/貯留と気道リモデリングを主病態とする慢性炎症性疾患である。このうち気道リモデリングは、気道炎症に対する気道組織の修復過程において、気管壁が肥厚して不可逆的に気道内腔が狭くなる現象であり、その原因としては、気管平滑筋の増生、気管上皮層の肥厚がある。気道リモデリングの結果、気管支拡張薬に対する反応性は低下し、気管支喘息が難治化する。

現在、慢性気管支喘息の第一選択薬としては、炎症抑制の目的で吸入ステロイド薬が使用されているが、この長期連用でも気道リモデリングの過程自体は完全には抑制できない。これらの知見は、気道リモデリング阻止には、気管平滑筋増生作用、気管上皮層の肥厚作用自体を抑制させる必要があることを示唆している。しかし、既存の治療薬では難治性の気道リモデリングは阻止し得ないため、新たな気道リモデリング阻止薬の開発が模索されてきた。

近年、ゲノムプロジェクトの成果により、「オーファン受容体」と呼ばれる生理的リガンドが不明な新規受容体が、ヒトに100種類以上存在することが明らかにされた。さらにその後の精力的な研究により、50種以上のオーファン受容体に対するリガンドが既に同定された。一方、ヒト気管平滑筋細胞においては、111種類のオーファン受容体が、遺伝子発現していることがマイクロアレイ法により明らかにされている。

オーファン受容体は、主に3種のG蛋白共役型受容体群(Gs, Gi, Gq 蛋白結合型)に属すが、気道においては、Gs 蛋白共役型受容体は、MAP kinase リン酸化やPI3 kinase 活性を抑制することで気道リモデリングを抑制させるのに対し、Gi, Gq 蛋白共役型受容体はMAP kinase リン酸化やPI3 kinase 活性を促進することで気道リモデリングを亢進させる。これらの知見はオーファン受容体リガンドを利用した新たな気道リモデリング阻止薬が開発可能であることを示唆している。しかし、これらのオーファン受容体が気道に機能的に発現し、気道リモデリング

を促進/阻止させるかについては、未だ明らかにされていない。そこで本研究では、オーファン受容体を気管支喘息治療の新たな標的とすることを目的に、1)オーファン受容体の気管平滑筋上及び気管上皮上での発現スクリーニング、2)オーファン受容体を介した気道リモデリング作用の解析と細胞内シグナリング機構の解明を行った。

2. 研究の目的

(1)オーファン受容体の気管平滑筋上及び気管上皮上での発現スクリーニング

(2)オーファン受容体を介した気道リモデリング作用の解析と細胞内シグナリング機構の解明

3. 研究の方法

(1)オーファン受容体の気管平滑筋上及び気管上皮上での発現スクリーニング

オーファン受容体のうち、GPR40, GPR41, GPR43, GPR84, GPR119, GPR120, GPR132 をスクリーニング標的として選択し、これらの受容体が正常ヒト気管平滑筋細胞、モルモット由来の気管平滑筋組織上で発現しているかを、RT-PCR 法、Western blot 法、免疫組織化学染色で検索した。

(2)オーファン受容体を介した気道リモデリング作用の解析と細胞内シグナリング機構の解明

細胞増殖作用の評価

オーファン受容体GPR40が属す、Gq蛋白共役型受容体群は、気道リモデリングを促進させるとされている。そこで、オーファン受容体GPR40の天然リガンドである長鎖脂肪酸(オレイン酸、リノレン酸)、GPR40の選択的アゴニストであるGW9508を24-48時間投与した場合の、気道リモデリング作用を評価するため、CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit及びBrdU cell proliferation assay kitを用いて、GPR40を介した細胞増殖作用を測定した。

細胞内シグナリング機構の解明

MAP kinase及びAktリン酸化の測定

オーファン受容体GPR40が属すGq蛋白共役型受容体は、MAP kinaseリン酸化やPI3 kinaseリン酸化により気道リモデリングを促進させる。そこで、ヒト気管平滑筋細胞にオーファン受容体GPR40作動薬を長時間投与した場合のMAP kinaseのリン酸化及びPI3 kinase活性の促進を、Western blot法にて測定した。MAP kinaseは、p42/44 MAPK (ERK)とp38 MAPKを測定対象とした。またPI3 kinase活性の促進はAktリン酸化を指標とした。

4. 研究成果

(1) オーファン受容体の気管平滑筋上及び気管上皮上での発現スクリーニング

GPR40, 41, 43, 84, 119, 120, 132受容体の、ヒト気管平滑筋細胞/組織、ヒト気管上皮細胞/組織でのmRNAレベルでの発現を確認した。さらにwestern blot法及び免疫組織化学染色により、モルモット及びヒトの気管平滑筋及び上皮でのGPR40受容体、GPR120受容体の蛋白レベルでの発現を確認した。

(2) オーファン受容体を介した気道リモデリング阻止作用の解析と細胞内シグナリング機構の解明

細胞増殖作用の解析

オーファン受容体GPR40が属す、Gq蛋白共役型受容体群は、気道リモデリングを促進させるとされている。そこで、オーファン受容体GPR40の天然リガンドである長鎖脂肪酸(オレイン酸、リノレン酸)、GPR40及びGPR120の選択的アゴニストであるGW9508を24時間投与した場合の、気道リモデリング作用について、CyQUANT Cell Proliferation Assay Kitを用いて、細胞増殖作用を評価した。その結果、2%ウシ胎児血清投与により生じるヒト気管平滑筋細胞の増殖作用は、オレイン酸、リノレン酸、GW9508の投与により、薬20%程度増大した。またBrdU cell proliferation assayにて同様の実験を行ったところ、ヒト気管平滑筋細胞の増殖作用は、オレイン酸、リノレン酸、GW9508の48時間投与により、有意に増大した。また、これらの反応は、PI3K

inhibitor (LY294002)、MEK inhibitor (U0126)により有意に抑制された。

細胞内シグナリング機構の解明

ヒト気管平滑筋細胞に、オーファン受容体作動薬を長時間投与した場合のMAP kinaseリン酸化を、Western blot法にて測定した。その結果、GPR40受容体(Gq蛋白共役型)の天然リガンドであるオレイン酸、ならびにリノレン酸によるERK, Akt, p38のリン酸化が生じた。またこれらの反応のピークは、オレイン酸投与の5-10分後に生じた。さらにPI3 kinaseの下流にあるAkt、及びMEKの下流にあるERKは、ともにp70s6kのリン酸化をもたらすとされる。さらにp70s6kのリン酸化はS6のリン酸化を介して、気道リモデリングをもたらすとされている。そこで、ヒト気管平滑筋細胞に、オレイン酸、リノレン酸、GW9508を投与した場合のp70s6k及びS6のリン酸化を、Western blot法にて測定した。その結果、オレイン酸、リノレン酸、GW9508投与によりp70s6k及びS6のリン酸化が生じた。またこれらの反応のピークは、Aktリン酸化やERKリン酸化よりやや遅れて生じた。

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2件)

Mizuta K, Zhang Y, Xu D, Mizuta F, D' Ovidio F, Masaki E, Emala CW. The dopamine D1 receptor is expressed and facilitates relaxation in airway smooth muscle. *Respir. Res.*, 14, 89, 2013. 査読有

DOI: 10.1186/1465-9921-14-89

Mizuta K, Mizuta F, Xu D, Masaki E, Panettieri RA Jr, Emala CW. Gi-coupled -aminobutyric acid-B receptors cross-regulate phospholipase C and calcium in airway smooth muscle *Am. J.*

Respir. Cell Mol. Biol., 45, 1232-1238,
2011. 査読有
DOI: 10.1165/rcmb.2011-00880C

[学会発表](計5件)

水田 健太郎、水田 文子、正木 英二
遊離脂肪酸受容体 FFAR1 を介した気管平
滑筋収縮促進作用
第41回 日本歯科麻酔学会学術集会
2013年10月4日 横浜市

水田 健太郎、水田 文子、堀之内 節、佐
藤 港、正木 英二、Charles W. Emala
気管平滑筋における遊離脂肪酸受容体
FFAR1の発現とその役割
第60回日本麻酔科学会学術集会
2013年5月23日 札幌市

Goto A, Mizuta K, Danielsson J, Mizuta
F, Masaki E, Emala CW.
The dopamine D₁ receptor is expressed
and stimulates cyclic AMP production in
airway epithelium.
American Society of Anesthesiologists
annual meeting 2012
2012年10月14日 ワシントンDC
(アメリカ)

Mizuta K, Zhang Y, Xu D, Mizuta F,
Masaki E, Emala CW.
Dopamine D₁ receptor-mediated airway
smoothmuscle relaxation is mediated via
a cyclic AMP pathway.
Euroanaesthesia 2012
2012年6月10日 パリ市(フランス)

水田 健太郎、水田 文子、正木 英二
気管平滑筋におけるドーパミン D1 受容体
の発現と気管平滑筋弛緩作用
第39回 日本歯科麻酔学会学術集会
2011年10月8日 神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水田文子 (MIZUTA FUMIKO)
東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常
勤講師
研究者番号：30396501