

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861381

研究課題名(和文) 核蛋白Ki67を指標とした喘息患者における気道リモデリングの機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of the tracheal remodeling in the asthmatic patients with nuclear protein Ki67.

研究代表者

石井 浩二 (ISHII, Koji)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：40404248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを用いて慢性気管支喘息モデルを作成し、喘息発作誘発時に酸素を吸入させる群と吸入麻酔薬であるセボフルランを吸入させる群に分け実験を行った。48時間おきに喘息発作誘発と酸素あるいはセボフルラン吸入を2週間繰り返したのちに麻酔下で気管と肺を摘出した。摘出した臓器のうち気管からは気管リングを作成し、収縮力が増強されていないかを確認した。また、肺からは病理標本作製し、組織学的なリモデリングが起きているのか、また、セボフルラン吸入群では酸素吸入群に比べリモデリングが抑制されているかを確認した。

研究成果の概要(英文)：We made asthma model of rats by ovalbumin. With asthma attack, rats inhaled whether oxygen or sevoflurane. After asthma attacks every 2 days for 2 weeks, we extracted trachea and lung. We measured the strength of contraction of trachea ring. And we evaluated whether tracheal remodeling was established.

We compared the stage of tracheal remodeling of each group.

研究分野：麻酔学

キーワード：気管支喘息 気道リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息患者数は全世界で増加している。それに伴い全身麻酔を必要とする手術に占める気管支喘息患者の割合も年々増加している。全身麻酔を必要とする手術では気管挿管を行うことが多く、気管挿管に伴う気管への直接的な刺激、術後の痛みや苦痛、周術期に使用される様々な薬剤等の抗原暴露に伴うヒスタミンやアセチルコリンの放出により気管支喘息発作を起こしやすい。2010年に、ヒトに於いて48時間おきに計3回の気管支喘息発作の誘発により気管支喘息患者における気道リモデリングの進行が報告された。また、気管支喘息発作の誘発は抗原暴露によるものと気管収縮薬の吸入によるもののいずれも気道リモデリングの進行は同程度であった。以上より気道リモデリングは少ない気管支喘息発作回数でも進行し、それまで考えられていた繰り返す抗原暴露による慢性炎症のみではなく気管収縮自体が増悪因子であることが示唆された。

一方で、全身麻酔薬であるセボフルランは免疫抑制作用及び気管支拡張作用を有しており、気管支喘息重症発作患者の治療にも用いられることがある。本研究では気管支喘息発作に対する気管拡張薬としてセボフルランを用いた。

また、細胞周期関連核タンパク質であるKi67は、細胞が増殖しているG1期、S期、G2期、M期では発現し、細胞が増殖を休止しているGo期では存在しないため細胞増殖と細胞周期のマーカーとして用られる。これを利用して腫瘍組織における増殖細胞を検出するマーカーとしても用いられる。本研究では気道リモデリングが気管平滑筋・血管平滑筋・杯細胞の増殖を主な病理学的変化であることに注目しKi67を平滑筋細胞・杯細胞増殖の指標として用いた。

気管支喘息は慢性疾患であり、気管支喘息患者は非発作時より重症度に応じて吸入ステロイドを中心とした治療を必要とする、しかしながら患者は気管支喘息発作を繰り返すうちに気道リモデリングが進行し喘息発作の重症化、非発作時の活動制限を来することが知られている。この気道リモデリングを抑制することが長期の症状コントロール、ひいては気管支喘息患者の長期予後を改善すると考えられた。

## 2. 研究の目的

2009年時点における全世界の気管支喘息患者数は3億人、気管支喘息発作による死亡者数は25万人と報告されており、今後も患者数の増加が予想されている。現在でも同様である。

気管支喘息患者の気道収縮の機序とし

ては、各種伝達物質の受容体を介した細胞内カルシウム濃度の上昇が知られているが、重症患者の持続する気道収縮では慢性炎症や繰り返す収縮により気道リモデリングと呼ばれる気道平滑筋を中心とする変性を来することが知られている。本研究はラット喘息モデルを用いて気道平滑筋・杯細胞・血管平滑筋の増殖の観点から気道リモデリングの機序を明らかにし、最終的に気管支喘息患者の気道リモデリング発生予防のための発作時・非発作時患者管理の一助とすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

A. 感作ラットの作成 B. 気管支平滑筋の厚さ、血管平滑筋の厚さ、盃細胞数の計測 C. Ki67発現量の測定 D. 気管支喘息発作時のセボフルラン吸入モデルラットを作成し、前出の2群間と気管支平滑筋の厚さ、血管平滑筋の厚さ、盃細胞数、Ki67発現量を比較検討。 E. セボフルランの適切な吸入濃度の検討。上記を検討するために以下のような手法により実験を進めることとした。A.を用いて、まずはB.を行う。喘息発作により気道リモデリングの進行が起こることを証明する。証明できればC.を行い、気管平滑筋、血管平滑筋の肥厚は細胞増殖によるものなのか、筋線維肥厚によるものなのかを検討する。以上までの実験で有効性が期待できればD.により気道リモデリング抑制効果を検討することとした。E.の実験は臨床に則した形となるために行うこととした。

具体的には以下のような計画を立てた。

### A. 感作ラットの作成雄性

1. Wister ラット (以下ラット、実験開始時体重 200-250g) を使用 Ovalbumin 10 $\mu$ g、水酸化アルミニウム 10mg を腹腔内投与したのち 2 週間安定した環境で飼育し、感作させる。
2. 初回感作より 2 週間後から、さらに 3 週間の間 2.5% Ovalbumin を 0.3mg 鼻腔内に隔日で投与する。
3. コントロール群では上記 1. 2. の操作をすべて生理食塩水で同様に行う。

平成 25 年度

### B. 気管支平滑筋厚さ、血管平滑筋厚さ、杯細胞数の計測

A. で作成したラットの腹腔内に 50mg/kg のペントバルビタールを投与し麻酔した後、断頭し、気管、肺を取り出す。摘出気管は以下に示す方法

により Ovalbumin の感作が完成しているかどうかの判定に用いる。Ovalbumin の感作が完成しているかどうかの判定は以前より我々のグループが使用している Isometric tension ( 摘出気管から 3mm のリングを作成して、95% 酸素、5% 二酸化炭素で通気した Krebs-Henseleit 溶液 ( K-H 溶液 ) の中で、0.5g の静止張力を与え、安定状態を得た後、収縮実験を行う。 ) により確認が可能である。すなわち、K-H 溶液へ 50 $\mu$ g/ml となるように Ovalbumin を投与すると、感作が完成していれば気管収縮が得られる。我々のグループはこの方法でフェンタニル、プロポフォール等で気管収縮抑制の結果を過去に報告している。摘出肺は 10%ホルマリン液に 1 週間つけた後 Hematoxylin and eosin stain ( HE 染色 )、Periodic acid-Schiff stain ( PAS 染色 ) により病理標本作製し、上記項目を顕微鏡を用いて測定し、コントロール群と喘息モデル群との間に統計学的有意差を検討する。

#### C. Ki67 発現量の測定

B. で 2 群間に統計学的有意差を認めた場合、免疫染色により Ki67 を染色する。B. と同様に 2 群間で Ki67 の発現量を比較する。

#### D. 喘息発作時のセボフルラン吸入モデルラットの作成し、前出の 2 群間と気管平滑筋厚さ、血管平滑筋厚さ、杯細胞数、Ki67 発現量を比較検討する。

A. で作成したコントロール群、喘息モデル群に加え、初回感作より 2 週間後から 3 週間の間、隔日で 2.5% ovalbumin を 0.3ml 鼻腔内に投与した後にセボフルラン 2% を 1 時間投与する。本群をセボフルラン吸入群とする。コントロール群、喘息モデル群と同様に HE 染色、PAS 染色、免疫染色の病理標本作製し B. C. と同様の計測を行い、3 群間の統計学的有意差を検討する。

平成 26 年度

#### E. セボフルランの適切な吸入濃度の検討

E. でセボフルラン吸入群作成のために用いた 2% というセボフルランの吸入濃度は実際の臨床で用いる濃度 : 1MAC ( 最小肺胞内濃度 : minimum alveolar concentration ) を

参考として決定した。以前の研究により本試験で使用するラットの 1MAC は 2% 前後と報告されている。

#### 4. 研究成果

上記の方法で気管支喘息発作誘発を繰り返すことにより気道リモデリングが生じることが病理学的検討により確認された。

次に気管支喘息発作時に酸素あるいはセボフルランを吸入することにより気道リモデリングが抑制されるか否かの確認を行った。実験を行うにつれて気道リモデリングの抑制が確認できた個体とそうでない個体が見られ、発作誘発及び酸素、あるいはセボフルラン吸入の方法を検討し、実験制度の向上を図っているところである。

#### 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

○ 出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○ 取得状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[ その他 ]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石井 浩二 ( ISHII, Koji )

長崎大学・病院 ( 医学系 ) ・助教

研究者番号：40404248