

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462354

研究課題名(和文) 気道炎症の収束機転におけるGABAB受容体の役割

研究課題名(英文) The effects of GABAB receptors on resolution of airway inflammation

研究代表者

杉山 陽子 (Sugiyama, Yoko)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70444255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト培養気道上皮細胞株において、タバコ煙抽出液(CSE)曝露後に気道炎症の初期段階として産生される気道粘液(MUC5AC)を測定した。GABAB受容体刺激薬であるバクロフェンを前処置または後処置したがMUC5ACの産生量に影響はなかった。GABAB受容体拮抗薬を同様に投与したが有意な変化はみられなかった。CSE曝露後の気道上皮細胞株において炎症収束因子(リゾルビン)の発現を経時的に測定したが有意な変化がみられず、測定方法や測定時間の設定に問題があった可能性がある。

気道上皮細胞において喫煙で惹起される炎症の発生・収束にGABABの関与を証明することはできなかった。

研究成果の概要(英文)：Airway mucus (MUC 5 AC), which is known to play an important role as a first step of airway inflammation, was measured after cigarette smoke extract (CSE) exposure in human cultured airway epithelial cell line. Pre-treatment or post-treatment of baclofen (a GABAB receptor stimulant) or CGP35348 (one of the GABAB receptor antagonists) had no significant effect on the production of MUC5AC. Expression of the inflammatory convergence factor (resolvin D2) was measured over time in airway epithelial cell line after exposure to CSE using ELISA kit. However, there was no significant change in production of resolvin D2. There may be some technical problems in measurement settings.

These results failed to demonstrate the involvement of GABAB receptors in the development and convergence of inflammation induced by smoking in airway epithelial cells.

研究分野：麻酔科学

キーワード：気道上皮 気道炎症 喫煙 ムチン産生 炎症収束因子 術後回復

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 神経伝達物質として知られる  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) に対する受容体は現在 GABAA, B, C 受容体の三種が同定されており、主に中枢神経系に存在しているが、神経系以外の末梢組織にも発現していることが注目されている。近年 GABAA 受容体が気道上皮に発現し、粘液の産生に関与すると報告された。それに対し、本研究者はヒトおよび guinea pig の気道上皮と気管平滑筋において GABAB 受容体が存在することを発見し、さらに、GABAB 受容体刺激によって細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) が活性化することや、GABAB 受容体を介した抑制性 G 蛋白の活性化により細胞内サイクリック AMP 産生抑制がおこることも報告した。これらの研究結果は呼吸器系の GABAB 受容体がさまざまな細胞活動に関わっている可能性を示唆している。さらに本研究者は気道上皮細胞において麻酔薬 (プロポフォール) が GABAA 受容体を介して炎症性サイトカイン産生を修飾しているというデータを得、気道免疫機構に GABA 受容体がある役割を果たしている可能性を示した (日本麻酔科学会第 57 回日本学術集会 2010 にて発表)。しかし、気道上皮における GABAB 受容体の生理学的、病理学的役割についていまだ十分解明されていない。

(2) 気道炎症の収束・抗炎症に重要な役割をもつリゾルビンの受容体も同様に GPCR の一つとして知られている。近年、GCRP 同士での複合体形成や、リガンド-受容体の相互作用によって細胞機能が多様化することが知られており、気道上皮・肺胞上皮における GABAB 受容体はリゾルビン等と関連して気道炎症の収束機構に関与する可能性がある。

## 2. 研究の目的

気道上皮細胞はサイトカイン、成長因子を産生し、気道の免疫、炎症に重要な役割を果たすとされる。本研究では培養気道上皮細胞を用いて GABAB 受容体が呼吸器系の細胞機能に重要な役割を果たすこと、また、気道炎症の収束に重要な役割をもつリゾルビンに対する GABAB 受容体の相互作用を解明し、その結果をもとに敗血症、呼吸器疾患モデルのラットを作製して気道炎症修復に対する GABAB 受容体作動薬の作用を検討する。

## 3. 研究の方法

培養ヒト気道上皮細胞のモデルとして、ヒト肺粘液性類表皮癌細胞株である、NCI-H292

細胞を継代培養して用いた。NCI-H292 細胞を 10% 仔牛血清および、抗生剤含有 RPMI-1640 液体培地で培養し、80%コンフルエント状態になった時点で血清を除いた培地で 24 時間インキュベーションした。その後、タバコ煙抽出液 (CSE) を加えて培養した。CSE 刺激から 16 時間後に抗 MUC5AC モノクローナル抗体を用いて培養液中に分泌された気道粘液 (MUC5AC) を、slot blot 法で測定した。Slot blot で得られたバンドの濃さをデンシトメトリーで数値化し、定量化した。さらに、その作用が GABAB 受容体を介したものを検討するため、GABAB 受容体拮抗薬や刺激薬を前処置して MUC5AC の産生量の変化を検討した。次に CSE による刺激での気道粘液 (MUC5AC) 産生を気道炎症のポジティブコントロールとして用い、炎症惹起後のリゾルビン D2 (炎症収束因子として知られる物質) の産生・分泌の経時変化を検討しようとした。各刺激後の培養液中および細胞のリゾルビン D2 について ELISA 法を用いて定量的に測定した。

統計処理は分散分析 (with Bonferroni test) をおこない、 $p < 0.05$  を有意とした。

## 4. 研究成果

NCI-H292 細胞の培養液中に CSE を加えて 16 時間培養維持すると濃度依存性に MUC5AC の産生・分泌の増加が確認されたものの、細胞の継代を進めるにしたいが、MUC5AC の増加現象に再現性が見られなくなり一定した結果が得られなくなってしまった。そのため、CSE の作製方法や刺激濃度・時間を調整したり、MUC5AC 検出のための slot blot 法の条件や、NCI-H292 細胞の培養条件を調整したり、異なるロットの凍結細胞や早い継代数での細胞を使用してみたりしたが、以前得られていた MUC5AC 増加量よりも変化量が少ないままであった。文献検索や学会での情報収集に努めたが原因は明らかにできなかった。よって新たに細胞を購入し、継代培養中に細胞が過剰成育して形質変化が起きないように留意して再度実験をおこなったところ、CSE 刺激 (市販たばこ 1 本分の煙を 50mL の培養液中へバブリングしたものを 100% CSE とし 10 - 20% CSE で反応を観察) でのムチン産生や炎症性サイトカイン (IL-8) の産生は有意に増加した。しかし炎症収束因子といわれるリゾルビン D2 の産生については CSE 刺激により経時的にサンプルを採取しても有意な変化はみられなかった。慢性的なタバコ暴露の現象を観察するのが目的であったため暴露時間が 1 時間から 48 時間と長く設定してお

り、長期間ではリゾルピンが不安定となり、その経時変化を捉えられなかった可能性があった。そこで炎症性サイトカインである TNF を細胞培養液へ添加してその後のリゾルピン D2 の短時間での産生について経時的に測定したがリゾルピンの測定は感度以下となり、うまくいかなかったため、次のステップである、炎症収束因子の調節に GABAB 受容体アゴニストやアンタゴニストの作用をみる段階には至らなかった。リゾルピン D2 の測定には ELISA キットを用いて測定したが、リゾルピンは脂質性のメディエーターであり、培養液中の測定を行うには刺激時間も測定系についてもその安定性が問題であった可能性がある。学会・論文検索等で情報収集したところ脂肪酸代謝物を網羅的に測定する質量分析の測定系が有用と判明したが当研究施設・共同研究施設では測定できず、研究期間内に解決することができなかった。CSE 刺激により産生増加した MAC5AC に対して、GABAB 受容体拮抗薬 (CGP35348 100 µg) および GABAB 受容体刺激薬 (パクロフェン 100 µg) の前処置で産生量に有意な変化がなく、培養気道上皮細胞において CSE による炎症反応に GABAB 受容体の関与は証明されなかった。

喫煙と炎症に関連した臨床研究として、喫煙状況と肺悪性手術後の遷延性術後痛との関連性を検討する研究を追加した。2011 年および 2013 年それぞれ 6 カ月間の肺悪性腫瘍手術 80 症例を診療録より抽出し後ろ向きに調査した。統計処理は Fisher の正確検定を用いた。抽出期間の間は術後痛に対する別の介入研究が行われていたため対象から除外している。術後 3 カ月で 16%、6 カ月で 7% の患者に創部痛が残存していた。術後鎮痛薬は主治医により処方され、2011 年には術直後より全例ロキソプロフェン 180mg/日 (10 - 59 日間) が、2013 年には全例セレコキシブ 400mg/日 (6 - 166 日間) が投与されていた。術式 (開胸/鏡視下) や麻酔法でも遷延性術後痛発生に差はなかった。コデインを追加された症例は有意に術後 1,3,6 カ月後の創部痛 (+) 症例が多く、術後 1 カ月に鎮痛薬処方がある症例では有意に 3 カ月後にも鎮痛薬処方があった。術後鎮痛薬の COX2 選択性は遷延痛発生に影響しないことが示唆され、また従来報告通り、コデインの追加処方を要するような強い痛みは遷延痛に関連する可能性があることがわかった。喫煙者 (手術前 1 年未満の禁煙) は全体で 20% いたが遷延性術後痛の発生と有意な関連性はみられなかった。今回の研究では喫煙による炎症反応増強、

創部炎症収束遅延や術後痛の遷延化助長の可能性は証明できなかったが、今後は肺手術後症例を対象とした炎症反応の推移や術後感染症・術後呼吸器合併症のイベントと喫煙状況の関連性をさらに症例数を増やして検討する予定としている。

#### 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 2 件)

吉村文貴, 山口忍, 杉山陽子, 田辺久美子, 飯田宏樹.

トリガーポイント注射における局所麻酔製剤の注入時痛の検討 - ジブカイン配合薬 (ネオビタカイン注®) とメピバカイン注射薬 (カルボカイン注®) の比較 -

ペインクリニック. 2016 ; 37 : 957-959.

査読 有

Mikito K, Yoshitani K, Sugiyama Y, Iida H, Ohnishi Y.

A Retrospective examination of the efficacy of paravertebral block for patients requiring intraoperative high-dose unfractionated heparin administration during thoracoabdominal aortic aneurysm repair.

J Cardiothorac Vasc Anesth 29: 2015; 973-941 査読 有

[学会発表](計 10 件)

Sugiyama Y, Amaya F, Kojima K, et al Prevalence of persistent postoperative pain after thoracotomy and total knee arthroplasty.

International Association for the study of pain 2016 年 9 月 27 日 Yokohama

杉山陽子, 吉村文貴, 山口忍, 田辺久美子, 操奈美, 木村緑, 長瀬清, 飯田宏樹 胸腔鏡手術後持続する急性痛にエコーガイド下前鋸筋膜面ブロックが奏功した 1 症例 日本ペインクリニック学会第 50 回大会 2016 年 7 月 8 日 横浜市

杉山陽子, 山口忍, 吉村文貴, 飯田宏樹 神経婚パルス高周波法と手術療法で疼痛コントロールし得た転移性頸椎腫瘍の 1 例

第 21 回日本緩和医療学会学術大会 2016 年  
6 月 18 日 京都市

杉山陽子、吉村文貴、山口忍、田辺久美子、飯田宏樹

当院における肺悪性腫瘍手術後遷延痛の後ろ向き検討と鎮痛薬使用の現状

日本麻酔科学会第 63 回学術集会 2016 年 5 月 26 日 福岡市

杉山陽子、飯田宏樹

痛みの機序から考える鎮痛補助薬

日本臨床麻酔学会第 35 回大会 2015 年 10 月 23 日 横浜市

南公人、杉山陽子、飯田宏樹

ステントグラフト内挿術後の急性腎障害が生存率と維持透析導入率に及ぼす影響の検討

日本心臓血管麻酔学会第 20 回学術大会 2015 年 10 月 10 日 福岡市

Yamaguchi S, Yoshimura N, Tamaki K, Iida Y, Sugiyama Y, Takenaka M, Tanabe K, Iida H

Efficacy of the ultrasound-guided pulsed-radiofrequency of suprascapular nerve for intractable shoulder pain - Case series -

European Society of Anaesthesiology (Berlin) May 31, 2015

Minami K, Sugiyama Y, Iida H

The risk factors for arterial line inaccuracy during general anesthesia: a retrospective observational cohort study 2015 Annual Meeting of the International Anesthesia Research Society (Honolulu) March 23, 2015

Yoshimura N, Iida H, Yamaguchi S, Sugiyama Y, Takenaka M.

Administration of pregabalin for the treatment of post-thoracotomy pain: a randomized study.

American Society of Anesthesiologists 2014 annual meeting, New Orleans, USA 2014 年 10 月 12 日

吉村文貴、堤久美子、山口忍、杉山陽子、竹中元康、飯田宏樹

Pittsburgh Sleep Index を用いた帯状疱疹

関連痛患者における睡眠障害の評価  
日本麻酔科学会第 61 回学術集会 2014 年 5 月 17 日  
横浜市

〔図書〕(計 3 件)

杉山陽子、飯田宏樹:川真田樹人編:NSAIDs,その他の鎮痛薬使用の考え方.  
167-171. 中山書店(東京), 2015

杉山陽子、飯田宏樹:井関雅子編.  
胸郭出口症候群患者の麻酔科的治療,臨床に役立つ神経障害性痛の理解.  
195-196, 文光堂(東京), 2015

杉山陽子、飯田宏樹:川真田樹人編  
脊髄くも膜下硬膜外併用麻酔と脊髄くも膜下鎮痛単独,麻酔科医のための周術期疼痛管理  
225-233, 中山書店(東京), 2014

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

杉山 陽子 (SUGIYAMA, Yoko)  
岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 70444255

### (2)研究分担者

飯田 宏樹 (IIDA, Hiroki)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 30159561

田辺 久美子 (TANABE, Kumiko)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 30402209

### (3)連携研究者

( )

研究者番号:

### (4)研究協力者

( )