

平成21年 5月29日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590055

研究課題名（和文） 気管支喘息治療におけるパラドックス解明のための基礎研究

研究課題名（英文） Basic research for finding the mechanism of paradox appeared in Controlling asthma

研究代表者

齊藤 真也 (SAITO SHIN-YA)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：80271849

研究成果の概要：

我々は膜透過性 cAMP 誘導体および PDE1 阻害薬を使った実験から、cAMP は気管拡張反応を担う重要なセカンドメッセンジャーであるにも関わらず、収縮にも寄与しうることを明らかにした。このことは実は喘息治療薬のパラドックスとして知られている問題の根本には矛盾がないことを示している。今後はどのような条件／細胞内環境が cAMP 機能の切り替えを担っているのかを明らかにすることで、治療薬のより安全な使用方法が確立され得るものと期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬理学、細胞内情報伝達、天然生理活性物質、喘息、平滑筋

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は慢性の炎症を伴う気道の狭窄であり、 β 受容体刺激薬やメチルキサンチン誘導体などの気管支拡張薬がよく用いられている。しかしながら喘息治療には弛緩薬であるはずの β 受容体刺激による気道収縮ならびに NSAIDs 誘発性喘息（いわゆるアスピリン喘息）という、治療薬によって症状が増悪する二つの大きなパラドックスが存在しており、治療の安全性を大きく脅かしてい

る。しかしその発症メカニズムが全く明らかではないため、合理的な治療法が未だ確立していない。

喘息は古くから知られている疾病であり、その治療法も確立していると考えられている。しかしながら、気道の狭窄にかかわる気道平滑筋の収縮メカニズムは未だ十分に解明されているとは言いがたい。というのも β 受容体刺激薬にしてもメチルキサンチン誘導体にしてもその狙いは気道平滑筋に細胞において cAMP 量を増加させることにある。

それは平滑筋において cAMP 量の増加が細胞内 Ca 濃度の低下を伴い、収縮張力を減弱させるためである。しかし一方で平滑筋において張力の増加は伴わないものの、細胞内 Ca 濃度を上昇させる現象があることも報告されてきている。

近年心筋のように細胞内で低分子セカンドメッセンジャーである cAMP の濃度が局在しているという概念が確立しつつある。つまり産生系であるアデニル酸シクラーゼおよび分解系であるホスホジエステラーゼ (PDE) がそれぞれ細胞内で局在することで cAMP 濃度が細胞内でも一様にならないという概念である。平滑筋においてもカベオラやラフトといった膜蛋白質を局在させる細胞膜装置によってアデニル酸シクラーゼや K チャネルが集積することが報告されており、cAMP が局在する可能性は十分高いと考えられる。

2. 研究の目的

以上のことを踏まえると、cAMP の局在こそがパラドックス解明のための鍵であることが予測される。しかし現在平滑筋細胞クラスの大きさの細胞において cAMP の局在を検討した研究は皆無である。そこで本研究では cAMP の局在性を検討すると共に、cAMP の多面的な働きを理解するために、薬理的・生化学的・分子生物学的・細胞生物学的手法を用いて、cAMP 量を調節する細胞内情報伝達機構を理解すると同時に収縮にかかわる分子実体の解明、そして *in vivo* におけるそれらの機構の役割を解明していくことを目的とした。

3. 研究の方法

実験には主として摘出ラット大動脈平滑筋標本およびモルモット気管平滑筋標本を用いた。

脂肪および結合組織を取り除いた平滑筋標本は約 2 mm 幅に切り、さらに大動脈ではリングの一端を、気管では平滑筋の付着部より約 1.5 mm の部分の軟骨を切断し、平滑筋の短冊状標本を得た。標本は Krebs-Henseleit 緩衝液を満たしたマグナス装置内に懸垂し、標本の一端をホルダーに固定し、多端をトランスデューサーに接続することで、等尺性に収縮張力を測定した。

10 mN を負荷し、静止張力が安定した後、60 mM KCl 緩衝液に対する収縮反応性が一定になってから、実験を開始した。

PDE (0.05 mg/ml) の活性は 10 U/ml カルモデュリン存在下、Ca-EGTA 緩衝系にて遊

離 Ca 濃度を 1 μ M もしくは 10 nM 未満に固定した条件で検討した。2 mM cAMP もしくは cGMP を添加後、室温にて 25 分間インキュベートした。生成された AMP もしくは GMP は共存する 50 U/ μ l 5'-ヌクレオチダーゼにて直ちに加水分解され、このとき産生された無機リン酸量をマラカイトグリーン法にて定量した。

4. 研究成果

気道平滑筋収縮調節を行っているオータコイドとして内因性のプロスタグランジンが知られている。プロスタグランジン類は DP、EP、TP 各受容体を介して収縮を制御している。DP および EP₂、EP₄ 受容体は G_s 蛋白質を介した気道拡張作用を有している。一方トロンボキサン A₂ は TP 受容体を介して収縮作用を示すが、炎症時のケミカルメディエーターは主としてこのトロンボキサンとロイコトリエンによって気道狭窄を引き起こしている。

これらの問題点を背景に、我々は平滑筋における TP 受容体の細胞内情報伝達の解明に着手した。これまで TP 受容体刺激による平滑筋収縮は、受容体関連チャンネルを介した Ca 流入と、Ca 感受性の亢進によって引き起こされ、電位依存性 Ca チャンネルの関与は低いとされていた。しかし我々は比較的低濃度のアゴニストによる刺激の場合、従来考えられてきた以上に細胞の脱分極に収縮が依存していること、その脱分極にはカチオンチャンネルが関与していることを明らかにした。さらに奇妙なことではあるが、アラキドン酸代謝物であるトロンボキサンが TP 受容体を刺激すると、その下流でホスホリパーゼ A₂ の活性化を引き起こしていることを見出した。しかしながらその関与はシクロオキシゲナーゼ阻害薬やリポキシゲナーゼ阻害薬では拮抗されないことから、プロスタグランジン類あるいはロイコトリエン類がオートクライン的に作用しているのではなく、アラキドン酸それ自身あるいは共生成物であるリゾリン脂質が情報伝達を媒介している可能性も示唆されている。

一方我々は以前より自然界から様々な生理活性物質を見出してきている。そこで既存の薬理的ツールでは上述の解析に限界があるため、新たな阻害薬の探索とその応用も行った。喘息は慢性炎症を伴っているが、そこに介在する肥満細胞の役割は重要である。肥満細胞の培養モデル株である RBL-2H3 細胞を用い、様々な生薬から炎症抑制成分を見出した。天然アルカロイドであるステイロピンもこのようなアッセイ系で見出された化合物であるが、生化学的な検討により、われ

われはこの化合物が PDE のサブタイプのうち、1 型特異的な阻害薬であることを見出した。(図 1)

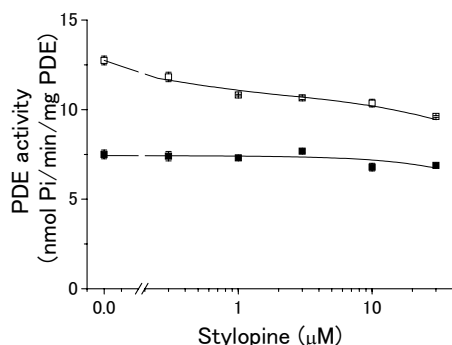


図 1. 天然アルカロイド、スティロピンによる cAMP を基質とした PDE 活性の抑制効果

Ca 存在下および非存在下でのウシ心臓由来 PDE 活性を測定した。活性は cAMP 添加後、一定時間における AMP 産生量をヌクレオチダーゼによる無機リン酸の放出量で間接的に定量した。スティロピンは濃度依存性に Ca-カルモデュリン感受性の PDE1 画分のみを抑制した。

興味深いことに、スティロピンは血管平滑筋収縮を抑制するのに対して、モルモット気管平滑筋において収縮を惹起することを見出した。しかもこの収縮はアデニル酸シクラーゼ阻害薬 SQ 22536 によって抑制されており、気管平滑筋では細胞内の cAMP 量が増加することにより、収縮が引き起こされることが示唆された。さらにインドメタシンでも抑制されたことから内因性のプロスタグランジン特に PGE₂ の存在が必須であることも示された。しかしながら、β 受容体刺激により細胞内 cAMP 量を増加させることで、気管平滑筋が弛緩することは従来よりよく知られている。このことにより、細胞内の cAMP 量増加が弛緩のみならず、収縮にも寄与できることが示された。同様の二面性作用は他の阻害薬においても観察された。すなわちフォロスコリンが一貫して静止張力を濃度依存性に抑制したのに対して、膜透過性 cAMP 誘導体であるジブチリル cAMP は低濃度でのみ収縮を惹起したのである (図 2)。この結果から同一の組織においても、cAMP の濃度あるいはバランスによってこのセカンドメッセンジャーが収縮性にも弛緩性にも働き得ることが示された。現在この収縮のメカニズムを検討中である。

以上のことから、cAMP は気管拡張反応を担う重要なセカンドメッセンジャーであるにも関わらず、収縮にも寄与しうることを明ら

かにした。このことは実はパラドックスの根本には矛盾がないことを示している。今後はどのような条件/細胞内環境が cAMP 機能の切り替えを担っているのかを明らかにすることで、治療薬のより安全な使用方法が確立され得るものと期待される。

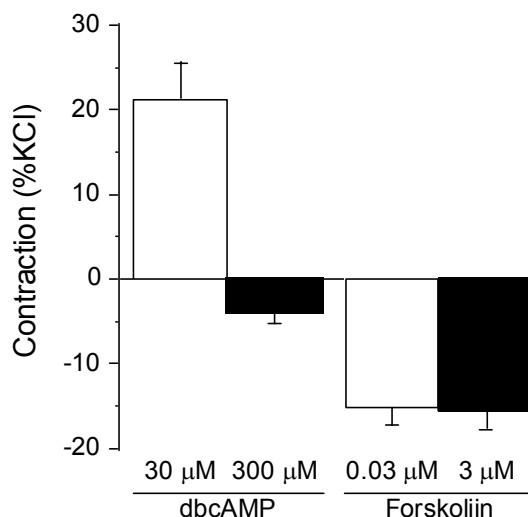


図 2. モルモット気管平滑筋標本の静止張力に対するジブチリル cAMP およびフォロスコリンの作用

37°C 下で張力が安定した後、収縮刺激を行わずに表示された濃度のジブチリル cAMP もしくはフォロスコリンを投与し、その張力変化を観測した。張力変化は高濃度 KCl によって惹起されたそれを 100%とした相対変化で表記した。

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 9 件)

1. Wakabayashi M., Sakurai E., Yanai K., Umemura K., Yoshida M., Ohizumi Y., Yamakuni T. Shishihakuhito, a traditional Chinese medicine for atopic dermatitis, inhibits IgE-mediated histamine release from rat RBL-2H3 basophilic leukocyte cells. *J. Trad. Med.* **26**, 44-49, 2009.
2. Matsuzaki K., Miyazaki K., Sakai S., Yawo H., Nakata N., Moriguchi S., Fukunaga K., Yokosuka A., Sashida Y., Mimaki Y., Yamakuni T., Ohizumi Y. Nobiletin, a citrus flavonoid with neurotrophic action, augments protein kinase A-mediated phosphorylation of the AMPA receptor

- subunit, GluR1, and the postsynaptic receptor response to glutamate in murine hippocampus. *Eur J Pharmacol.* **578**, 194-200 (2008).
3. Obara Y., Okano Y., Ono S., Yamauchi A., Hoshino T., Kurose H., Nakahata N. $\beta\gamma$ subunits of Gi/o suppress epidermal growth factor-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 5, whereas they enhance phosphorylation of extracellular-signal regulated kinase 1/2. *Cell. Signal.* **20**, 1275-1283 (2008)
 4. Nakajima A., Yamakuni T., Matsuzaki K., Nakata N., Onozuka H., Yokosuka A., Sashida Y., Yoshihiro Mimaki Y., Ohizumi Y. Nobiletin, a citrus flavonoid, reverses learning impairment associated with NMDA receptor antagonism by activation of ERK signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **321**, 784-790 (2007).
 5. Yoshida M., Sato Y., Shimura T., Ohkubo S., Honma S., Tanaka T., Kurimoto T., Nakahata N. Distinct effects of Z-335, a new thromboxane A₂ receptor antagonist, on rabbit platelets and aortic smooth muscles. *Pharmacology* **79**, 50-56 (2007)
 6. Sasaki M., Sukegawa J., Miyosawa K., Yanagisawa T., Ohkubo S., Nakahata N. Low expression of cell-surface thromboxane A₂ receptor b-isoform through the negative regulation of its membrane traffic by proteasomes. *Prostagland. Other Lipid Mediat.* **83**, 237-249 (2007)
 7. Iwashita M., Oka N., Ohkubo S., Saito M., Nakahata N. Piperlongmine, a constituent of Piper longum L., inhibits rabbit platelet aggregation as a thromboxane A₂ receptor antagonist *Eur. J. Pharmacol.* **570**, 38-42 (2007)
 8. Sugama J., Yu J.-Z., Rasenick M.M., Nakahata N. Mastoparan inhibits β -adrenoceptor-Gs signaling by changing the localization of Gas in lipid rafts. *Cell. Signal.* **19**, 2247-2254 (2007)
 9. Matsuoka R., Ohkubo S., Yoshida M. Nakahata N. Alteration of adenylyl cyclase type 6 expression in human astrocytoma cells after exposure to simulated microgravity. *J. Health Sci.* **53**, 534-542 (2007)

[学会発表] (計 2 件)

1. Suzuki K., Nishijima A., Saito S., Ishikawa T. Contribution of phospholipase A₂ to U46619-induced vascular contraction in rat

aorta. 第 82 回日本薬理学会年会 (横浜), *J. Pharmacol. Sci.* **109(Supl. 1)**, 198P, 2009 年 3 月 17 日

2. Nishijima A., Saito S., Ishikawa T. The role of phospholipase A₂ product in U46619-induced contraction mediated by voltage dependent Ca²⁺ channel in the presence of indomethacin. 第 81 回日本薬理学会年会 (横浜), *J. Pharmacol. Sci.* **106(supl. 1)**, 168P, 2008 年 3 月 17 日

[図書] (計 1 件)

1. Saito S. Toxins affecting actin filaments and microtubules. *In Marine Toxins as Research Tools.* (Fusetani N. and Kem W. eds.) 187-219, Springer-Verlag (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織 (1) 研究代表者

齊藤 真也 (SAITO SHIN-YA)
静岡県立大学・薬学部・准教授
研究者番号：80271849

(2) 研究分担者

中畑 則道 (NAKAHATA NORIMICHI)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：60045804
山国 徹 (YAMAKUNI TOHRU)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：30333793