

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791968

研究課題名 (和文) GABA(B) 受容体を介した気管支喘息誘発機序の解明

研究課題名 (英文) Elucidation for the mechanisms of the GABA(B) receptor-mediated bronchial asthma

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

研究成果の概要 (和文)：

気管平滑筋におけるGABA_B受容体の発現は確認されていたものの、その役割については不明であった。そこで、GABA_B受容体が、G_q蛋白共役型受容体 (bradykinin受容体など) により制御を受けるホスホリパーゼC (PLC) 及びイノシトール3リン酸 (IP₃) 生成を介して、気管平滑筋を収縮させるかについて検討を行った。その結果、ヒト気管平滑筋細胞のGABA_B受容体刺激により遊離したG_{βγ}サブユニットが、PLCを介してIP₃生成及び一過性の細胞内Ca²⁺濃度上昇をもたらすことが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Although the functional expression of the GABA_B receptors coupled to the G_i protein has been reported on airway smooth muscle, the role of GABA_B receptors on airway responsiveness has been remained unclear. We investigated whether G_i-coupled GABA_B receptors cross-regulate phospholipase C (PLC), an enzyme classically regulated by G_q-coupled receptors (e.g. bradykinin receptor) in human airway smooth muscle (HASM) cells. Stimulation of GABA_B receptors on human airway smooth muscle cells rapidly mobilizes intracellular Ca²⁺ stores by IP₃ synthesis through the activation of PLC-β that was stimulated by G_{βγ} protein liberated from G_i proteins coupled to GABA_B receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：気管支喘息、GABA_B受容体、IP₃、カルシウムイオン

1. 研究開始当初の背景

γ-アミノ酪酸 (GABA) は代表的な抑制性神経伝達物質である。GABA受容体にはイオンチャネル型受容体 (GABA_A及びGABA_c受容体)

及びG蛋白共役型受容体 (GABA_B受容体) があり、このうち後者はG_i蛋白活性化を介してアデニル酸シクラーゼ活性を抑制しcAMP生成を減少させる。近年、GABA_A及びGABA_B受容体

が気管平滑筋上に存在することが明らかとなり、このうちGABA_A受容体は気管平滑筋を弛緩させることが明らかとなっているものの、GABA_B受容体が気管平滑筋においてどのような作用を及ぼすかについては不明なままであった。

GABA_B受容体と同様にG_i蛋白結合型受容体であるAdenosine A₁受容体においては、A₁受容体活性化により遊離したG_{iβγ}サブユニットの作用でホスホリパーゼC (PLC) が活性化され、イノシトール3リン酸 (IP₃) 生合成量が増加する。IP₃は筋小胞体に作用して細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)の上昇をもたらし、その結果気管平滑筋が収縮する。

一方、G_q蛋白結合型受容体 (neurokinin受容体、bradykinin受容体など)を介したIP₃生合成機構も、G_i蛋白結合型受容体活性化により遊離したG_{iβγ}サブユニットの作用でさらにIP₃生合成が促進される。よってG_i結合型受容体であるGABA_B受容体の活性化も同様の経路を介してIP₃生合成を促進し、気管平滑筋収縮をもたらすとの仮説のもとに、本研究を行った。

2. 研究の目的

気管平滑筋細胞上のGABA_B受容体を介した気管平滑筋収縮機構における細胞内シグナリング機構の解明。

3. 研究の方法

本研究には以下の手法を用いた。

(1) 気管平滑筋細胞内IP₃生合成量の測定

IP₃は細胞内Ca²⁺ストアである筋小胞体上のIP₃受容体に作用してCa²⁺を細胞内に放出させる。そこで、GABA、GABA_A受容体作動薬、GABA_B受容体作動薬投与によりIP₃合成が増加するかについて、³H-myo-inositolを負荷したヒト気管平滑筋細胞 (HASM) においてカラムクロマトグラフィーを用いて測定した。また、bradykininにより生じるIP₃合成反応が、これらの薬剤投与により増強されるかについても検討を加えた。

(2) [Ca²⁺]_iの測定

蛍光Ca²⁺インジケーター (Fluo-4AM) をヒト気管平滑筋細胞にLoadingし、GABA、GABA_A受容体作動薬、GABA_B受容体作動薬投与時の[Ca²⁺]_iの変化を蛍光プレートリーダーで測定した。また、bradykininにより生じる[Ca²⁺]_i上昇反応が、これらの薬剤投与により増強されるかについても検討を加えた。

上記の手法を用いてさらに以下の研究を行

った。

① GABA_B受容体作動薬が、細胞内IP₃生合成量、及びHASMの[Ca²⁺]_iに与える作用の検討

GABA_B受容体作動薬 (baclofen) により、HASMの細胞内IP₃生合成量や[Ca²⁺]_iが上昇するか、またこれらの作用がGABA_B受容体拮抗薬 (CGP35348, CGP55845) により遮断されるかについて検討した。また、baclofenにより促進されるbradykininにより生じる[Ca²⁺]_i上昇反応が、これらの薬剤により遮断されるかについても検討を加えた。

② GABA_B受容体作動薬によるHASMの[Ca²⁺]_i上昇作用及びIP₃合成量増加反応におけるG_i蛋白阻害剤及びG_{βγ}サブユニット阻害剤の関与の検討

G_i蛋白阻害剤 (pertussis toxin) またはG_{βγ}サブユニット阻害剤 (gallein) を前投与した場合に、baclofenによる[Ca²⁺]_i上昇作用及びIP₃増加作用が遮断されるかを検討した。また、baclofenにより促進されるbradykininにより生じる[Ca²⁺]_i上昇反応が、pertussis toxinにより遮断されるかについても検討を加えた。

③ GABA_B受容体作動薬によるHASMの[Ca²⁺]_i上昇作用及びIP₃合成量増加反応におけるPLC阻害剤及びIP₃受容体拮抗薬の関与の検討

PLC阻害剤 (U73122) またはIP₃受容体拮抗薬 (xestospongine C) を前投与した場合に、baclofenによる[Ca²⁺]_i上昇作用及びIP₃増加作用が遮断されるかを検討した。

(3). 気管平滑筋張力の測定

GABA_B受容体作動薬投与が気管平滑筋を収縮させるか、またG_q蛋白結合型受容体作動薬 (substance P) 投与により生じる気管平滑筋収縮作用を増強させるかについて、organ bath に浸漬したモルモット気管輪の張力変化測定にて検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト気管平滑筋細胞への、GABA またはGABA_B受容体作動薬 (baclofen) 投与により、IP₃合成量が増加し (図1A)、[Ca²⁺]_iも上昇した。またこれらの反応は用量依存性 (1 μM-1 mM) であった。一方、GABA_A受容体作動薬 (muscimol, THIP) は、作用を及ぼさなかった。また、baclofenにより促進されるbradykininにより生じるIP₃合成量増加反応及び[Ca²⁺]_i上昇反応についても同様の傾向が示された (図1B)。

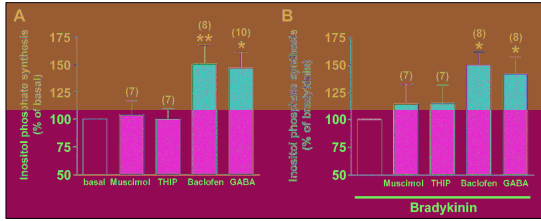


図1. ヒト気管平滑筋細胞への GABA_A 受容体作動薬 (muscimol 100 μM、THIP 100 μM)、GABA_B 受容体作動薬 (baclofen 100 μM)、GABA (100 μM) 投与により生じる IP₃ 生成作用

(2) ヒト気管平滑筋細胞への GABA_B 受容体作動薬 (baclofen; 100 μM) 投与により生じる IP₃ 合成増加反応及び [Ca²⁺]_i 上昇反応は、2 種類の GABA_B 受容体拮抗薬 (CGP35348; 1 mM、CGP55845; 10 nM) 前投与 (30 min) により遮断された (図2)。

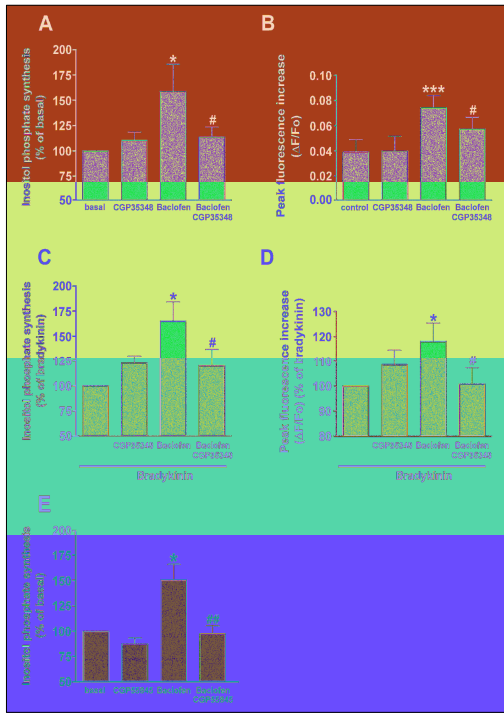


図2. GABA_B 受容体拮抗薬 (CGP35348; 1 mM、CGP55845; 10 nM) 前投与が、ヒト気管平滑筋細胞への baclofen 投与により生じる IP₃ 生成増加作用及び [Ca²⁺]_i 上昇作用に及ぼす遮断作用

(3) ヒト気管平滑筋細胞への GABA_B 受容体作動薬 (baclofen; 100 μM) 投与により生じる細胞内 [Ca²⁺]_i 上昇作用及び IP₃ 合成量増加反応は、G_i 蛋白阻害剤 (pertussis toxin; 100 ng/ml) の前投与 (4 hrs) により有意に抑制された (図3)。

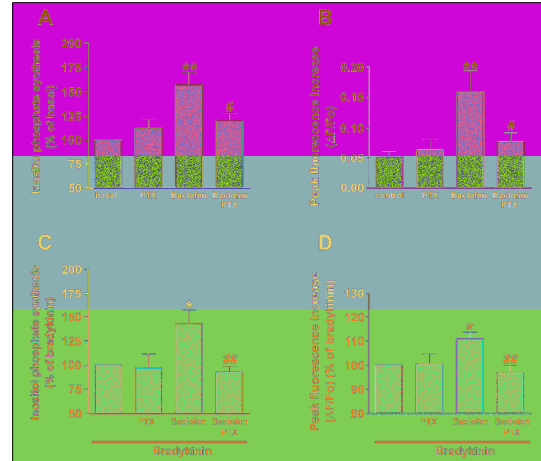


図3. pertussis toxin 前投与が、baclofen 投与により生じる IP₃ 生成増加作用及び [Ca²⁺]_i 上昇作用に及ぼす遮断作用

(4) ヒト気管平滑筋細胞への GABA 受容体作動薬 (baclofen) 投与により生じる IP₃ 合成増加反応は、G_{βγ} サブユニット阻害剤 (gallein; 100 μM) 前投与 (30 min) により有意に抑制された (図4A)。

(5) ヒト気管平滑筋細胞への GABA_B 受容体作動薬 (baclofen; 100 μM) 投与により生じる IP₃ 合成増加反応及び [Ca²⁺]_i 上昇反応は、PLC 阻害剤 (U73122; 5 μM) 前投与 (10 min) により遮断された (図4B & C)。

(6) ヒト気管平滑筋細胞への GABA_B 受容体作動薬 (baclofen) 投与により生じる細胞内 Ca²⁺ 濃度増加反応は、IP₃ 受容体遮断薬 (xestospongine C; 20 μM) 前投与 (30 min) により有意に抑制された (図4D)。

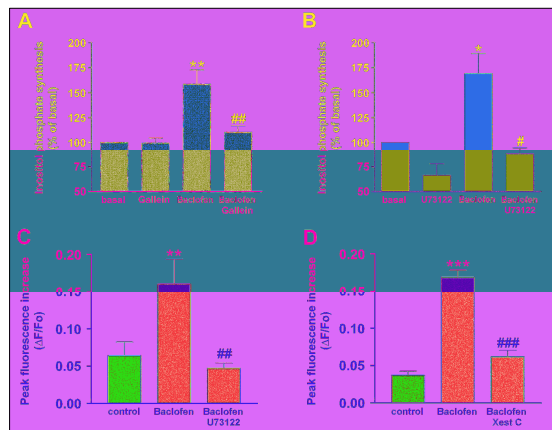


図4. Gallein (100 μM)、U73122 (5 μM)、xestospongine C (20 μM) 前投与が、baclofen 投与により生じる IP₃ 生成増加作用及び [Ca²⁺]_i 上昇作用に及ぼす遮断作用

(7) Substance P投与に生じる、モルモット気管輪収縮作用は、GABA_B受容体作動薬 (baclofen; 100 μM)により増強された。

以上の結果は、(1) 気管平滑筋上の GABA_B受容体刺激により遊離した G_{iβγ}サブユニットが PLC を活性化し、IP₃生合成量を増加させること、(2) 生成された IP₃が筋小胞体上の IP₃受容体に作用して細胞内[Ca²⁺]_iの上昇をもたらす結果、気管平滑筋が収縮すること、さらに(3) G_q蛋白結合型受容体を介した IP₃生合成機構も、G_i蛋白結合型受容体活性化により遊離した G_{iβγ}サブユニットの作用で、さらに IP₃生合成が促進させることを示唆するものである。

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4件)

① 水田 健太郎、水田 文子、杉山 陽子、Charles W. Emala
気管平滑筋の GABA(B)受容体は IP₃合成を促進する(優秀演題)
第56回日本麻酔科学会
平成21年8月16日 神戸市

② 水田 健太郎、水田 文子、正木 英二
気管上皮における GABA_B受容体の発現とその機能的役割
第37回日本歯科麻酔学会学術集会
平成21年10月10日 名古屋市

③ 水田 健太郎、水田 文子、正木 英二
気管平滑筋の GABA_B受容体は IP₃合成を促進する
第37回日本歯科麻酔学会学術集会
平成21年10月10日 名古屋市

④ 水田 健太郎、水田 文子、正木 英二
気管平滑筋における dopamine D₂受容体の発現とアデニル酸シクラーゼ活性の調節. 第38回日本歯科麻酔学会
平成22年10月8日 横須賀市

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