

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590839

研究課題名（和文）慢性炎症性気道疾患の難治化におけるキチナーゼ関連蛋白質の作用機序の解明

研究課題名（英文）Role of chitinase like protein in chronic inflammatory airway diseases

研究代表者

松本 久子（MATSUMOTO HISAKO）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60359809

研究成果の概要（和文）：非好酸球性気道炎症下での気道リモデリング形成の機序には不明な点が多い。気道上皮細胞、好中球・マクロファージから産生されるキチナーゼ関連蛋白質 YKL-40 は、加齢関連蛋白質としても知られるが、本検討において、気道平滑筋細胞増殖を促進し、細胞外基質の組成を変化させる可能性が示された。高齢喘息や COPD の気道病態、特にステロイド低感受性の非好酸球性気道炎症下リモデリング形成において YKL-40 の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms underlying airway remodeling accompanying with non-eosinophilic airway inflammation remain unclear. Chitinase-like protein, YKL-40 that is also known as age-related protein, is produced from various cells including airway epithelial cells, neutrophils, and macrophages. This study demonstrated that YKL-40 accelerates proliferation of cultured airway smooth muscle cells and may also alter the proportion of extracellular matrix. Thus YKL-40 may be involved in the pathogenesis of airway remodeling in elderly patients with asthma or COPD, where non-eosinophilic airway inflammation is predominant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	400,000	120,000	520,000
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：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：難治性気道疾患、キチナーゼ関連タンパク質、喘息

1. 研究開始当初の背景

吸入ステロイド（ICS）治療下の喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）の肺および血清中ではキチナーゼ関連（レクチン様）蛋白質である

YKL-40 が有意に増加し、気流閉塞や重症度と相関する。ステロイド治療下でも残る重症喘息と COPD に共通する病態メカニズムに YKL40 が関与することが示唆されるが、YKL40 の生

理的役割や疾患における作用機序には未解明な点が多い。本研究の最終目的は、YKL40の呼吸器における生理的・病態分子作用を明らかにすることで、重症喘息、COPDなどの慢性炎症性気道疾患の難治化に至るメカニズムを解明し、治療・薬剤の開発に貢献することである。

2. 研究の目的

炎症の慢性化・気道リモデリング進展において、YKL40が作用する未知の病態メカニズムを解明する。YKL40刺激による気道組織の線維化、気道平滑筋細胞の収縮・増殖の引き金になる細胞内Ca²⁺動態変化とその細胞内分子機構を解析し、ステロイド低感受性の気道リモデリング形成の解明に挑む。

3. 研究の方法

①気道平滑筋細胞に対するYKL-40の作用機序解明

1) YKL-40やその上流シグナルであるIL-13刺激下での、気道平滑筋細胞内Ca²⁺動態を解析

2) YKL40刺激下での気道平滑筋細胞の増殖能の検討

②細胞外基質蛋白に対するYKL-40の影響解明：気道平滑筋由来Proteoglycanの産生能を解析

③YKL-40の臨床情報との関連解析

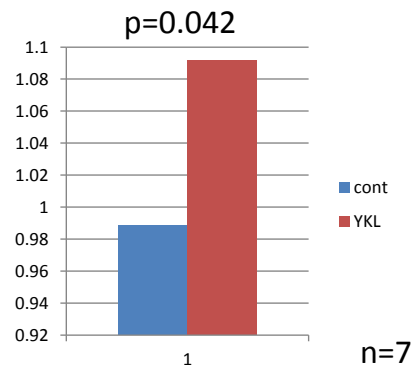
4. 研究成果

①慢性炎症性気道疾患の難治化におけるキチナーゼ関連蛋白YKL40の関与について、気道平滑筋細胞に対するYKL40の役割を中心に検討した。

1) YKL-40の上流シグナルであるIL-13の前処置下で、ロイコトリエンD4刺激により、気道平滑筋細胞内Ca²⁺ oscillationの増加を報告した(Matsumoto, Hirata et al. Cytokine, 2012)

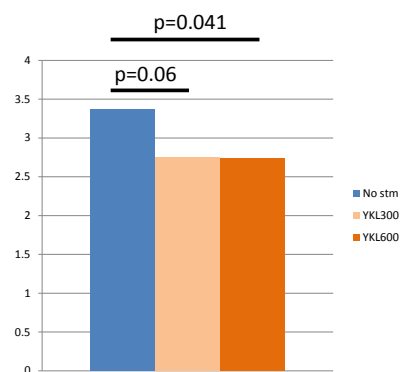
2) 次にYKL40の300 ng/ml 72時間刺激にて気道平滑筋細胞数・MTT assayによる増殖能

を検討した。増殖能は無刺激平滑筋細胞に比しYKL40刺激下で有意に亢進した(下図：MTT assay 結果)。



YKL40は好酸球よりも好中球、マクロファージで発現している(Otuska et al. Respiration 2012)ことから非好酸球性気道炎症下での気道平滑筋細胞増殖の機序を説明する結果と考えられた。しかし、ほぼ同時期にフランスのグループから同様の結果が発表され(Bara I, Am J Respir Crit Care Med 2012)、我々の系の妥当性を示すものであるが、YKL40の役割解析について、以後若干の軌道修正を要した。またYKL40刺激下で、TGF-β1、Collagen Iなど線維化に関わる因子のmRNA発現、蛋白レベルを検討したが、増加する傾向にとどまった。

②次に線維蛋白質以外の主要な細胞外基質である種々のproteoglycanについて、気道平滑筋細胞からの産生能を検討した。蛋白レベルで解析にて、YKL40の300-600 ng/ml 72時間刺激により一部のproteoglycan産生量の低下が確認された(下図)。

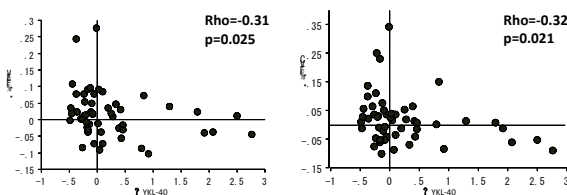


Proteoglycanの産生量は加齢により変化する。加齢関連蛋白質であるYKL40がProteoglycanの組成変化に関与することが

示唆され、高齢喘息、COPD 気道の病態解明につながる可能性がある。

③YKL40 の加齢関連蛋白質としての役割について、臨床検体での検討を追加した。治療下安定期成人喘息例において、YKL40 の血清値が末梢気流閉塞の程度と中等度に、“息苦しさ”の程度と関連することが示唆された (Nakaji et al. ATS2012)。

また末梢気道炎症を指標にした治療により、気流閉塞の指標の改善は一部の指標にとどまり、血清 YKL-40 に有意な変化はなかったが (Nakaji et al. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2013)、治療前後の 2 点間の変化率は、気流



? ACT scores also tended to associate with ?YKL-40 ($\rho = -0.26$, $p = 0.061$)
? = (post value - pre value) / pre value

閉塞の変化率と血清 YKL-40 の変化率に有意な相関が認められ、血清 YKL-40 の気道リモデリングへの関与が支持された。

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 6 件)

1. Matsumoto H, Hirata Y, Oku Y. et al. Interleukin-13 enhanced Ca^{2+} oscillations in airway smooth muscle cells. *Cytokine*, 2012;57:19-24.

2. Otsuka K, Matsumoto H, et al. Sputum YKL-40 levels and pathophysiology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration*, 2012;83:507-19.

3. Nakaji H, Petrova G, Matsumoto H, Iwata T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Nagasaki T, Kanemitsu Y, Niimi A, Misima M. Effects of 24-week add-on treatment with ciclesonide and montelukast on small airways inflammation in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2013, 110: 198-203

4. Nagasaki T, Matsumoto H, et al. Smoking attenuates the age-related decrease in IgE levels and maintains eosinophilic inflammation. *Clin Exp Allergy*, DOI: 10.1111/cea.12073

5. Tajiri T, Matsumoto H, et al. Association of eosinophilic inflammation with *FKBP51* expression in sputum cells in asthma. *PLOS one*, in press

6. Kanemitsu Y, Matsumoto H, et al. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*, in press

[学会発表] (計 2 件)

H. Nakaji, H. Matsumoto, A. Niimi, I. Ito, H. Inoue, T. Iwata, T. Oguma, T. Tajiri, T. Nagasaki, M. Mishima. Associations of asthma control status with inflammatory biomarkers: "Shortness of breath" and serum YKL-40 levels. 2012 American Thoracic Society

Matsumoto H, Nakaji H, Petrova G, Iwata T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Nagasaki T, Kanemitsu Y, Niimi A, Misima M. Effects of 24-week add-on treatment with ciclesonide and montelukast on small airways inflammation in asthma. 2013 American Thoracic Society

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本久子 (MATSUMOTO HISAKO)

研究者番号 : 60359809

(2) 研究分担者

伊藤穰 (ITO YUTAKA)

研究者番号 : 80362482

平田豊 (HIRATA YUTAKA)

研究者番号 : 10441247

越久仁敬 (OKU YOSHITAKA)

研究者番号 : 20252512