

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11899

研究課題名(和文) フィトケミカルによる気管上皮安定化と気管支喘息調節機構

研究課題名(英文) Regulatory Mechanisms of Bronchial Asthma and Tracheal Epithelial Stabilization by Phytochemicals

研究代表者

脇田 亮 (Wakita, Ryo)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：60376712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：苦参の成分であるkushenolの気管支平滑筋細胞への前処理で細胞内カルシウムイオン濃度抑制が認められたが、プロスタグランジン受容体の抑制によってもその効果は変わらなかった。他の生薬由来成分を用いた研究とも併せ、kushenolに暴露させた気管上皮細胞上清を投与した気管支平滑筋細胞のホスホキナーゼA(PKA)活性化に着目したが明らかな影響は見出せなかった。PKA活性化の目安として他の蛋白に標的を変更し確認を進めているが、ホスホキナーゼCやイノシトール3リン酸を介した経路を抑制している可能性もある。そのため筋小胞体内カルシウムイオン濃度およびPLC活性を検索する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

漢方に使用される生薬はハーブとともに代替医療の有効な候補とされており、その薬理効果の解析にも注目が集まっている。その一つである苦参には上皮・粘膜抗炎症作用の報告があり、苦参を含む生薬合剤は気管支収縮を抑制することが報告されている。苦参のフィトケミカルであるkushenolの気管支平滑筋に対する直接作用は判明したが、その機序および気管上皮を介した間接作用は既知の生薬成分とは異なり未だ検索の途中にある。本研究の意義は、気管支収縮への調節機構が判明することで、従来は症状の安定化が困難だった気管支喘息への新しい選択肢となりうることにある。

研究成果の概要(英文)：Pretreatment of bronchial smooth muscle cells with kushenol, a compound of *Sophora flavescens*, resulted in inhibition of intracellular calcium ion concentrations, but suppression of prostaglandin receptors did not attenuate this effect. Considering studies using other herbal herb-derived ingredients, we focused on phosphokinase A (PKA) activation in bronchial smooth muscle cells treated with supernatant of tracheal epithelial cells that were exposed to kushenol, but we did not find any obvious effect. As a guide to PKA activation, we have changed the target to other proteins to confirm the results, but it is also possible that the pathways mediated by phosphokinase C or inositol 3-phosphate are being inhibited. We are planning to examine calcium ion concentrations in the sarcoplasmic reticulum as well as PLC activity.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：フィトケミカル 気管支平滑筋 kushenol カルシウムイオン 気管上皮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息発作は全身麻酔中に多く見られる偶発症であり、重篤な発作は時に致死的である。発症機序や誘因に関しては気管上皮の異常肥厚を伴う慢性炎症が背景にあるが、詳細や重積発作の機序に関しては様々な研究にもかかわらず不明な点も多い。

発症機序や誘因としては、アレルゲンなどの環境因子、運動、タバコ、アルコール等のストレス因子といわれる。粘膜肥厚、気道分泌亢進状態による気道の狭小化状態に加え、これら誘因により気管支平滑筋収縮の結果、気道の狭窄・閉塞が起こるとされており、その病態生理に関し様々な研究がなされているが不明な点も多い。治療としても発作時には気管支狭窄の解除を目的として気管支拡張剤とステロイド剤が、緩解時にはステロイドなどによる気道炎症のコントロールや長時間作用性の気管支拡張剤、ロイコトリエン拮抗薬の併用が使用されているが、症状を安定化させるのは困難なことも多い。

フィトケミカルとは植物中に含まれる天然化学物質で、ポリフェノール、アルカロイド、フラボノイド等の総称であり、予防医学の分野で研究が広がっている。漢方生薬の一つである苦参 (Kushen; *Sophora flavescens*) 抽出物はアトピー性皮膚炎に対し内服および外用による治療効果が認められており、アレルギー性鼻炎に対する効果があるとの報告もある。含有されるフィトケミカルである *sophoraflavanone G*, *kushenol-N* には抗炎症作用抗アレルギー作用が、*maackiain* にはヒスタミン受容体抑制作用が報告されている。申請者の所属するグループも苦参抽出物の気管支収縮抑制作用に関して報告しているが含有フィトケミカルの詳細な検討は行っていない (Yang N et al. *Phytochemistry* 2013)。

気管支収縮機構は主に気管支平滑筋において多くの研究がなされており解明が進んでいる。その一方で、気管上皮が気管支喘息の症状緩解に影響しているかどうかに関しては不明な点も多い。また申請者らは臨床や摘出気管支による *ex vivo* 研究で高い効果が認められる漢方薬が、培養平滑筋細胞での研究では各種指標タンパク質発現をはじめとする反応が低い場合を多く経験してきた。そこで申請者は、一部のフィトケミカルが気管上皮へ作用し、そこで産生・分泌されたメディエータが機能し、二次的に平滑筋を弛緩させるという間接的調節機構を考えた。

2. 研究の目的

気管支喘息発作の抑制機構として、フィトケミカルによる調節機構の経路解明、すなわち気管支平滑筋収縮に対する抑制、特に上述した気道クロストーク仮説による間接的調節機構を証明しこの機構解析を通して、気管支平滑筋の持続収縮機構の機序解明を目指す。気管上皮に由来するメッセンジャーを介した間接的気管支平滑筋持続収縮の調節機構解明を目指す生薬である苦参に含まれるフィトケミカルとして、*sophoraflavanone G*, *kushenol*, 等のヒスタミン受容体遺伝子産生、プロスタグランジン (PGs) 産生に与える影響について気管上皮細胞 (BEAS-2B 等 cell line および primary cell) を用いてそれぞれのケミカルメディエーター産生経路・情報伝達経路について基礎的検索を行う。また実際の治療の観点からの検討として、オーガニバスシステムを用いてマウスの摘出気管支を用いアセチルコリン刺激に対するフィトケミカルの前投与による気管支収縮力変化の検討や、気管上皮への送達法としてのネブライザーを用いた吸入やイオントフォレーシス (IOP) を用いた組織への浸透を想定した人工呼吸下マウスの呼吸機能解析装置による呼吸機能パラメータの変化に関する検討を試みる。フィトケミカル処理によるメディエータ調節に関しても検討を加え、上皮-平滑筋細胞間あるいは平滑筋細胞間の情報交換を介した筋収縮とその持続に関連した細胞内カルシウムイオン再取込および細胞内関連シグナル調節タンパク質発現を対象として、agonist/antagonist の効果を比較検討するとともに、気管支平滑筋収縮調節機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では気管支上皮および平滑筋培養細胞を用い、苦参由来フィトケミカルの気管上皮への作用、および気管支弛緩機序の解明と治療法の検索を目的とする。

(1) ヒスタミン誘発気管支平滑筋細胞収縮における *Kushenol* / *PGE2* / *Forskolin* の抑制効果

培養気管支平滑筋細胞に *Kushenol* / *PGE2* / *Forskolin* を添加し 30 分間前処理を行った後、ヒスタミン刺激を行った。刺激による細胞内カルシウム濃度変化は、カルシウムイオン選択性蛍光プローブを用い連続的に測定し、カルシウムイオン濃度の各前処理による抑制度を測定した。

(2) *PGE2* / *Kushenol* の気管支平滑筋細胞収縮抑制効果における *PGE2* 受容体拮抗薬の影響
培養気管支平滑筋細胞にプロスタグランジン受容体サブタイプである EP2 および EP4 受容体の拮抗薬および溶媒対照を加え 15 分間前処理を行った。引き続き *PGE2*, *kushenol*, 対照を添加し前処理を 30 分行った。その後上記 (1) と同様にヒスタミン刺激による細胞内カルシウム濃度変化に及ぼす影響を測定した。

(3) 気管支平滑筋細胞収縮調節機構における筋小胞体由来のカルシウムイオン調節作用
培養気管支平滑筋細胞に *saponin* を添加し 60 分間前処理を行った後、細胞外カルシウムの影響

を避けるためカルシウムイオンを含有しない溶媒に交換、xestospongin C で前処理を行った後ヒスタミンまたは adenophostin A を投与した。投与による細胞内カルシウム濃度を、カルシウムイオン選択性蛍光プローブを用い連続的に測定し、カルシウムイオン濃度の各前処理による抑制度を測定した。

(4) 気管支上皮細胞由来成分による気管支平滑筋細胞収縮の抑制効果

培養気管支上皮細胞を Kushenol / Kushenol 添加後 Ach 刺激 / 溶媒のみ、の条件で 60 分間前処理を行った。処理後の細胞培養の上清を回収し、気管支平滑筋細胞に添加した。陰性対照として無処理群、陽性対照として PGE2 添加群を設定した。各々 30 分処理後、細胞よりタンパク質を回収し、Western blot 法を用いて phospho-CREB 量を測定した。

(5) イオントフォーシスを用いた経皮的な薬剤浸透とその薬理効果の検討

薬剤送達方法としてイオントフォーシスを用いた組織への浸透を確認した。ゾレドロン酸を電極に浸漬し、マウス耳珠に電極を装着、直流通電装置で 30 分通電した。また同薬剤を皮下投与した群も設定した。3 日後の組織 (耳珠) サイトカイン濃度を ELSA 法で測定し比較した。

4. 研究成果

(1) ヒスタミン誘発気管支平滑筋細胞収縮における Kushenol / PGE2 / Forskolin の抑制効果 (図 1)

kushenol-N 処理により細胞内カルシウムイオン濃度の上昇抑制は PGE2, Forskolin と同程度であり、PKA 経路を介している可能性が想起された。

(2) PGE2 / Kushenol の気管支平滑筋細胞収縮抑制効果における PGE2 受容体拮抗薬の影響 (図 2)

Kushenol の作用が EP 受容体を介したものであるかどうかを確認するため、プロスタグランジン受容体拮抗薬による前処理をおこなった。PGE2 による細胞内カルシウムイオン濃度上昇抑制作用は低下したが、kushenol-N によるカルシウムイオン濃度抑制効果には変化がみられなかったことから、kushenol による作用は細胞内での cAMP の産生と PKA を活性化する伝達経路に作用していると考えられた。CREB や HSP-20 のリン酸化を指標として PKA の活性化を証明する。PDE-4 の抑制による cAMP 増加機序が他の生薬成分で判明していることから (Townsend, et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2013)、PDE-4 に対する抑制作用を Rolipram を対照として検索中である。

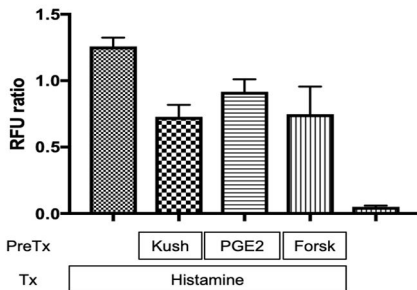


図1) kushenol による筋収縮抑制効果

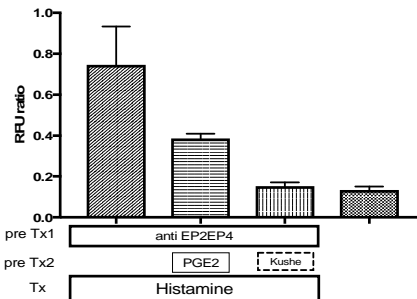


図2) PGs 受容体抑制による緊縮効果の影響

(3) 気管支平滑筋細胞収縮調節機構における筋小胞体由来のカルシウムイオン調節作用 (図 3)

苦参抽出物の EP 受容体を介する作用として cAMP の作用点として、PKA を介する経路の他に筋小胞体からのカルシウムイオン放出調節に着目している。IP3 受容体阻害作用のある xestospongin C (XesC) での前処理の有無と、Bradykinin による PKC の活性化を介した細胞内カルシウムイオン調節と、adenophostin A (ADA) による筋小胞体の IP3 受容体を介した調節をそれぞれ比較した。XesC と ADA の作用を向上させるために処置前に saponin で透過処理をおこなった。XesC の前処理により Bradykinin 刺激によって細胞内カルシウム濃度上昇は抑制された。その一方 IP3 受容体刺激作用のある ADA 投与では増強した。Saponin 処理により細胞膜だけでなく小胞体膜の透過性が変化した結果、貯蔵されているカルシウムイオンの放出機構に影響がでた可能性や使用している蛍光プローブの問題が考えられ、検証中である (Brown, et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2016)。対応法が判明次第 Kushenol や sophoraflavanone G の前処理による変化を検討する。

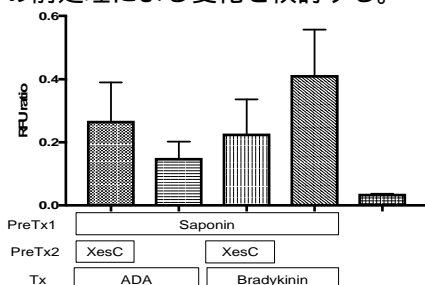


図3) XesC 処理による ADA/BK 刺激への影響

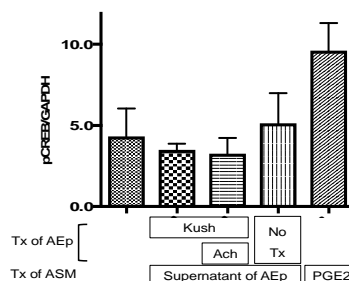


図4) AEp 上清による ASM 収縮への影響

(4) 気管支上皮細胞由来成分による気管支平滑筋細胞収縮の抑制効果 (図 4)

気管上皮細胞 (AEp) に Kushenol 前処理あるいは Kushenol 前処理後にアセチルコリン刺激を行な

った後の上清による平滑筋(ASM)収縮への影響を PKA を介した経路に着目し、pCREB を指標に検討した。気管上皮細胞上清の添加による pCREB の発現量は、PGE2 添加による発現と比べ低下したが、気管上皮の処理による差はみられなかった。その一方、上皮細胞へのアセチルコリン添加の有無による変化はみられなかったが、kushenol 添加の細胞上清は非添加の上清より、有意差は見られないものの、pCREB 発現量が少ない傾向がみられた。これは kushenol の平滑筋細胞への直接作用の結果と矛盾するため、PKA を介する経路の活性化の別の指標として、HSP-20 を用いて再度検討する。また本研究では培養上皮細胞を使用しているが、先行研究ではマウス気管を摘出し気管支平滑筋収縮の抑制効果を観察しており、上皮細胞が繊毛など細胞の極性を有した状態を有する状態での検討を要する。

(5) イオントフォーシスを用いた経皮的な薬剤浸透とその薬理効果の検討

イオントフォーシスを用いた組織でも、皮下投与した組織と同様に IL-1・IL-18・TNF- α の上昇が見られ、薬剤の経皮送達および薬理作用発現が認められた。しかしその量は皮下投与と比較し少なく、試料採取が投与3日後と間隔が空いている。そのため薬液の送達速度および組織濃度の更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Funayama Hiromi, Tashima Itaru, Okada Satoru, Ogawa Takuya, Yagi Hideki, Tada Hiroyuki, Wakita Ryo, Asada Yoshinobu, Endo Yasuo	4. 巻 42
2. 論文標題 Effects of Zoledronate on Local and Systemic Production of IL-1 , IL-18, and TNF- in Mice and Augmentation by Lipopolysaccharide	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 929 ~ 936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b18-00923	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	船山 ひろみ (Funayama Hiromi) (00359530)	鶴見大学・歯学部・講師 (32710)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------