

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11976

研究課題名(和文) 気管支喘息の発症機序と発作誘因における血小板の役割について

研究課題名(英文) The role of platelets in the mechanism of pathogenesis of bronchial asthma

研究代表者

船山 ひろみ (Funayama, Hiromi)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：00359530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：気管支喘息における血小板由来成長因子(PDGF)による気管支平滑筋細胞増殖のメカニズムの解明を目指し、Neurokinin-1(NK1)受容体を高発現させたヒト気管支平滑筋由来の初代培養細胞に、G蛋白シグナリング阻害薬(Gallein)で前処理を行ったところ、PDGFによる細胞増殖が抑制され、その抑制効果は以前報告したNK1受容体作動薬のSM-SubPよりも強かった。LAM細胞を用いた検討では、その異常な細胞増殖のメカニズムの一つとしてPTENを介する細胞増殖抑制の制御異常の可能性を示す結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気管支喘息は気道過敏性の亢進、気道狭窄を特徴とする慢性閉塞性の肺疾患である。G蛋白シグナリング阻害薬(Gallein)はPI3KおよびRac1を介するシグナリングを抑制する。本研究により、G蛋白サブユニットが、NK1受容体を介するPDGFの気管支平滑筋細胞増殖に関与することが示唆された。気管支平滑筋の細胞増殖に関わる分子シグナル伝達経路は、喘息由来の気管支狭窄に対して潜在的治療標的になる可能性が考えられ、この分野の新しい治療法が確立できれば、学術的および社会的にも意義の高いものになる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of platelet-derived growth factor (PDGF)-induced airway smooth muscle cells proliferation in bronchial asthma, human airway smooth muscle cells stably transfected with the Neurokinin-1 receptor were pretreated with G protein signaling inhibitor (Gallein). PDGF-induced cell proliferation was inhibited by Gallein, and the inhibitory effect was stronger than that of SM-SubP, an NK1 receptor agonist we reported previously. In addition, our experiment of LAM cells showed that the dysregulation of PTEN-mediated inhibition of cell proliferation may be one of the mechanisms of abnormal cell proliferation in LAM cells.

研究分野：炎症免疫

キーワード：気管支喘息 気管支平滑筋 細胞増殖 血小板

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息はアレルギー反応や細菌・ウイルス感染などが発端となった気管支の炎症が慢性化することで気道過敏性の亢進、可逆性の気道狭窄を起こし、発作的な喘鳴、咳などの症状をきたす呼吸器疾患である。喘息発作時にはこれらの症状が特に激しく発現し、死（喘息死）に至ることもある。全世界に3億人以上の喘息患者がおり、年間25万人以上の方が喘息で死亡している。アレルギー、運動、タバコ、アルコール、気圧変化等のストレス刺激が引き金となり、これらに対する過敏反応として気管支平滑筋収縮、気道粘膜のむくみ、気道分泌亢進などにより気道の狭窄・閉塞が起こることが分かっているが、気管支喘息の病態生理は不明な部分が多い。

血小板活性化因子 (Platelet-Activating Factor: PAF) は、血小板凝集や脱顆粒、炎症、アナフィラキシーに関連し、気管支収縮の重要なメディエータである。PAFと喘息の研究は多いが、喘息発作時の血小板の気管支や肺での動態に関する研究はない。PAFとの関連を考えると肺に集積することが考えられるが、アレルギー喘息患者およびその発作時に末梢血小板数が増加するとの報告もある<sup>1)</sup>。また、癌細胞と血小板を co-culture すると、血小板の脱顆粒による内容物の作用の他に癌細胞と血小板が直接接触し、相互に活性化し合い、癌細胞の増殖・浸潤・血管新生に関わっているとの報告もある<sup>2)</sup>。気管支平滑筋の細胞増殖にも血小板本体の関与が強く示唆される。

## 2. 研究の目的

喘息は気道過敏性の亢進、気道狭窄を特徴とする慢性閉塞性の肺疾患である。Gタンパク質結合受容体はAktのリン酸化を含むシグナル伝達を介して気管支平滑筋 (Airway Smooth Muscle: ASM) の細胞増殖を促進する事が報告されている<sup>3)</sup>。また Neurokinin-1 (NK1) は気道収縮を引き起こすことが知られている。当初NK1受容体の活性化は病的なASM増殖を促進すると考えていた。しかし、我々は、予想に反してNK1受容体作動薬のSM-SubPは、NK1を高発現させたASM細胞を用いた実験で、血小板由来成長因子 (Platelet Derived Growth Factors: PDGF) による細胞増殖を阻害したことを報告した。本研究ではNK1受容体を高発現したASM細胞におけるPDGFによる細胞増殖のメカニズムの解明をめざして、G蛋白 $\beta\gamma$ シグナリング阻害薬 (Gallein) を用いた実験を行った。

リンパ脈管筋腫症 (Lymphangiomyomatosis: LAM) は、異常な平滑筋様細胞 (LAM細胞) が肺、体軸リンパ節 (肺門・縦隔、後腹膜腔、骨盤腔など)、腎臓で増殖して病変を形成し、病変内にリンパ管新生を伴う疾患である。通常、生殖可能年齢の女性に発症し、労作時息切れ、気胸、咳、痰、血痰、喘息様の喘鳴などの契機に診断される。臨床的には進行性肺嚢胞化、反復性の肺気腫、胸水貯留が認められ、多くの症例では進行性に呼吸不全となる。結節性硬化症に合併する場合にはTSC1、TSC2という遺伝子が、孤発性でもTSC2遺伝子の異常が検出されると報告されている。気管支喘息による気道の狭窄・閉塞の原因解明を目指して、LAM細胞における異常な平滑筋様細胞の増殖のメカニズムについて、血小板との関連を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) G蛋白 $\beta\gamma$ シグナリング阻害薬 (Gallein) の効果

まず、ヒト気管支平滑筋初代培養細胞にレンチウイルスを用いたNK1受容体の遺伝子導入を行った。細胞増殖の評価についてはBrdUの取り込み: Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) (Roche)を用いた。遺伝子導入を行いNK1受容体を高発現させたヒト気管支平滑筋由来の初代培養細胞にPDGF、Gallein、およびSM-Subを作用させ、細胞増殖の指標であるBrdUの取り込みを検討した。

### (2) LAM細胞におけるPDGFによる細胞増殖とNK1受容体作動薬の効果

LAM細胞とヒト気管支平滑筋初代細胞にPDGFを用いた細胞増殖試験およびNK1受容体作動薬の効果を検討した。細胞増殖の評価についてはBrdUの取り込みを指標とした。

### (3) LAM細胞におけるNK1受容体

LAM細胞にNK1受容体が存在するか確認するため、NK1受容体作動薬のSM-SubPを用いた細胞内カルシウムアッセイを実施した。細胞内カルシウムイオン測定試薬として、Fura-2 AM (Calbiochem) を用いた。

### (4) LAM細胞の異常な細胞増殖のメカニズムの解明

LAM細胞の異常な細胞増殖のメカニズムを明らかにするため、腫瘍抑制因子として同定され、細胞増殖抑制に深く関与するPTENをターゲットとして、PTENフォスファターゼ活性を測定し、ヒト気管支平滑筋細胞株と比較した。

## 4. 研究成果

### (1) G蛋白 $\beta\gamma$ シグナリング阻害薬 (Gallein) の効果 (図1)

遺伝子導入を行い NK1 受容体を高発現させたヒト気管支平滑筋由来の初代培養細胞に PDGF (10ng/ml) を作用させると, Gallein (10 uM) の前投与により PDGF による細胞増殖が抑制され, その抑制効果は以前報告した NK1 受容体作動薬の SM-SubP (10 uM) よりも強かった. Gallein は PI3K および Rac1 を介するシグナリングを抑制する. G 蛋白  $\beta\gamma$  サブユニットが, NK1 受容体を介する PDGF の細胞増殖に関与することが考えられる. 気管支平滑筋の細胞増殖に関わる分子シグナル伝達経路は, 喘息由来の気管支狭窄に対して潜在的治療標的になる可能性が考えられた.

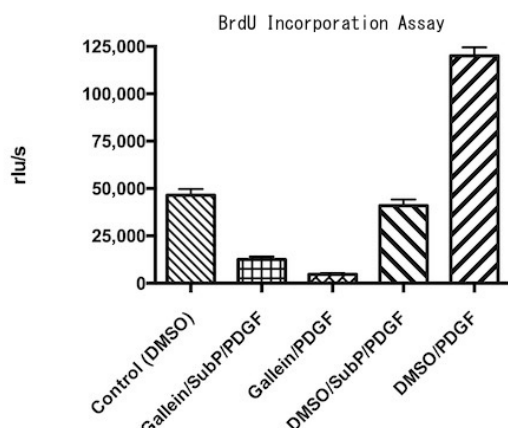


図1. NK1受容体を高発現させたヒト気管支平滑筋細胞の細胞増殖におけるGalleinの効果

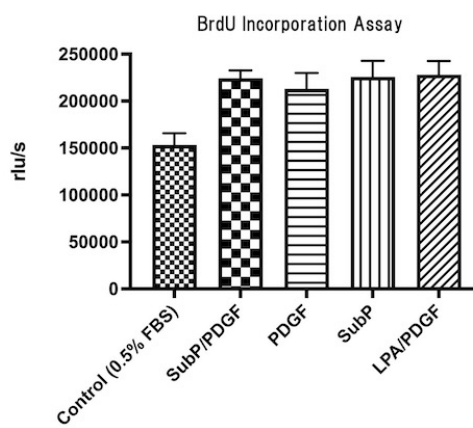


図2. LAM細胞におけるPDGFによる細胞増殖とNK1受容体作動薬の効果

(2) LAM 細胞における PDGF による細胞増殖と NK1 受容体作動薬の効果 (図2)

LAM 細胞の増殖スピードが異常に速く, ヒト気管支平滑筋初代細胞との比較が困難であった. LAM 細胞は, PDGF (10ng/ml) および Lysophosphatidic acid (LPA) (10 uM) で細胞増加を認めたが, NK1 受容体作動薬の SM-SubP (10 uM) を併用しても以前報告したような細胞の増殖抑制は認められなかった.

(3) LAM 細胞における NK1 受容体 (図3)

LAM 細胞に PDGF を用いた細胞増殖試験を行った際に, NK1 受容体作動薬の SM-SubP を併用しても以前報告したような細胞の増殖抑制は認められなかったため, LAM 細胞に NK1 受容体が存在するかどうか, SM-SubP を用いて細胞内カルシウムアッセイを実施した. Positive control として Bradykinin (10 uM) を使用した. SM-SubP (10 uM) においても, Bradykinin より少ないが産生増強を認めたため NK1 受容体は存在するが, それを上回る細胞増殖のメカニズムが示唆された.

(4) LAM 細胞の異常な細胞増殖のメカニズムの解明 (図4)

LAM 細胞の異常な細胞増殖のメカニズムを明らかにするため, PTEN フォスファターゼ活性を測定したところ, ヒト気管支平滑筋細胞株に比べ, LAM 細胞は低い PTEN フォスファターゼ活性を認め, PTEN を介する細胞増殖抑制の制御異常の可能性を示す結果を得た.

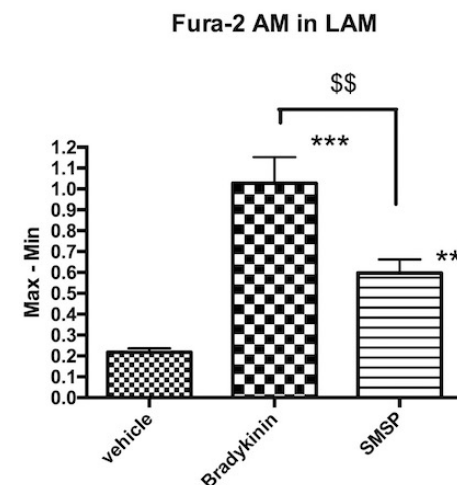


図3. LAM細胞におけるNK1受容体

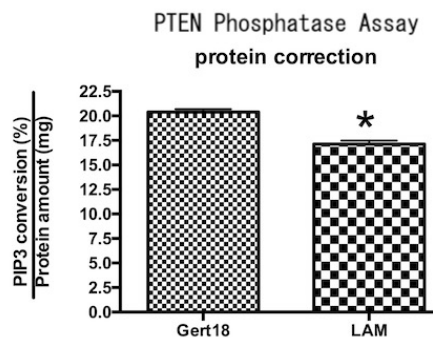


図4. LAM細胞におけるPTEN活性

#### <引用文献>

- 1) Kemono-Chetnik I *et al.* Thrombocytopoiesis in allergic asthma. *Pol Arch Med Wewn.* 2007;117:9-13.
- 2) Suzuki K *et al.* The influence of platelets on the promotion of invasion by tumor cells and inhibition by antiplatelet agents. *Pancreas.* 2004;29:132-40.
- 3) Damera G *et al.* An rgs4-mediated phenotypic switch of bronchial smooth muscle cells promotes fixed airway obstruction in asthma. *PLoS one* 2012;7:e28504.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suzuki H, Bando K, Tada H, Kiyama T, Oizumi T, Funayama H, Sugawara S, Takahashi T, Endo Y.	4. 巻 42(2)
2. 論文標題 Augmentation of Lipopolysaccharide-Induced Production of IL-1 and IL-1 in Mice Given Intravenous Zoledronate (a Nitrogen-Containing Bisphosphonate) and Its Prevention by Clodronate (a Non-nitrogen-containing Bisphosphonate).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 396-403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Funayama H, Tashima I, Okada S, Ogawa T, Yagi H, Tada H, Wakita R, Asada Y, Endo Y.	4. 巻 42(6)
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 Biol Pharm Bull.	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Endo Yasuo, Funayama Hiromi, Yamaguchi Kouji, Monma Yuko, Yu Zhiqian, Deng Xue, Oizumi Takefumi, Shikama Yosuke, Tanaka Yukinori, Okada Satoshi, Kim Siyoung, Kiyama Tomomi, Bando Kanan, Shima Kazuhiro, Suzuki Hikari, Takahashi Tetsu	4. 巻 140
2. 論文標題 Basic Studies on the Mechanism, Prevention, and Treatment of Osteonecrosis of the Jaw Induced by Bisphosphonates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 63~79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.19-00125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Danielsson Jennifer, Vink Joy, Hyuga Shunsuke, Fu Xiao Wen, Funayama Hiromi, Wapner Ronald, Blanks Andrew M., Gallos George	4. 巻 25
2. 論文標題 Anoctamin Channels in Human Myometrium: A Novel Target for Tocolysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reproductive Sciences	6. 最初と最後の頁 1589~1600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1933719118757683	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 該当する

1. 著者名 Suzuki Hikari, Bando Kanan, Tada Hiroyuki, Kiyama Tomomi, Oizumi Takefumi, Funayama Hiromi, Sugawara Shunji, Takahashi Tetsu, Endo Yasuo	4. 巻 42
2. 論文標題 Augmentation of Lipopolysaccharide-Induced Production of IL-1 and IL-1 in Mice Given Intravenous Zoledronate (a Nitrogen-Containing Bisphosphonate) and Its Prevention by Clodronate (a Non-nitrogen-containing Bisphosphonate)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 164 ~ 172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 加藤 靖隆、船山 ひろみ、古屋 吉勝、長岡 悠、黒田 翠、平山 展大、朝田 芳信	4. 巻 55
2. 論文標題 大学病院小児歯科来院患児の保護者に実施した再生医療に対する意識調査	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 小児歯科学雑誌	6. 最初と最後の頁 390 ~ 396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11411/jspd.55.3_390	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 鈴木飛佳理, 坂東加南, 多田浩之, 木山朋美, 大泉丈史, 船山ひろみ, 菅原俊二, 高橋 哲, 遠藤康男
2. 発表標題 Zoledronate(bisphosphonate)静脈投与マウスでのLPSによるIL-1産生増強とclodronate(bisphosphonate)による抑制
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiromi Funayama, Takaaki Munemasa, Ryo Wakita, Haruhisa Fukayama, Yasuo Endo, Yoshinobu Asada
2. 発表標題 Iontophoretic administration of bisphosphonates: a trial for establishing a method to prevent their side effects and to retain their potent anti-bone resorptive effects
3. 学会等名 11th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 船山ひろみ, 朝田芳信.
2. 発表標題 Neurokinin receptorを介する気管支喘息の発生機序の解明.
3. 学会等名 第55回小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 船山ひろみ, 田村光平, 高澤みどり, 山崎嘉久, 朝田芳信.
2. 発表標題 乳幼児歯科健診および相談事業の市町村における現状と課題.
3. 学会等名 第76回日本公衆衛生学会総会
4. 発表年 2017年

〔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	脇田 亮  (Wakita Ryo)  (60376712)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授   (12602)	

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
---------	---------