

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18782

研究課題名(和文) 咽喉頭気管粘膜疾患と細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role and mechanism of extracellular signal-regulated kinase in upper airway stenosis

研究代表者

木村 朱里(Kimura, Akari)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：40623137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：気管・咽喉頭の創傷治癒過程におけるExtracellular signal-regulated kinase 細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)のメカニズムの解明を目的とし本研究を行った。マウスでの気管狭窄モデルを作成した。気管切開後に気管前壁を焼灼し1週間後に観察し、気管狭窄を認めた。焼灼5分後の気管ではリン酸化ERKの増加を認め、以降は減少していた。そこで、ERK上流に位置するMEKに対する阻害剤を用いて狭窄率の変化を調べたところ、阻害剤を5日間投与した1週間後の気管狭窄率群は、無治療の焼灼気管と比較して有意に低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気管癒着狭窄マウスモデルを作成した。ERK上流のMEK阻害剤を投与することによって気管狭窄・癒着予防効果の検討を行うことができた。ERK1/2は気管狭窄に対する新規治療法の標的となる可能性がある。今後はERK1/2それぞれのノックアウトモデルを用いた研究も可能となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Tracheal stenosis is a refractory and recurrent disease induced by excessive cell proliferation within the restricted tracheal space. We investigated the role of extracellular signal-regulated kinase (ERK), which mediates a broad range of intracellular signal transduction processes in tracheal stenosis and the therapeutic effect of the MEK inhibitor which is the upstream kinase of ERK. We histologically analyzed cauterized tracheas to evaluate stenosis using a tracheal stenosis mouse model.

The cauterized trachea increased the rate of stenosis compared with the control trachea. The phosphorylation rate of ERK was significantly increased at 5 min after the cauterization. The daily treatment group had suppressed stenosis compared with the non-inhibitor treatment group. P-ERK activation after cauterization could play an important role in the tracheal wound healing process. Consecutive inhibition of ERK phosphorylation is a potentially useful therapeutic strategy for tracheal stenosis

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：気管狭窄 細胞外シグナル調節キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

気管狭窄、瘢痕声帯、口腔咽頭食道粘膜狭窄では、長期気管挿管や外傷・炎症・熱傷などにより気管粘膜や声帯粘膜が損傷を受け、また経口切除や ESD 後の術後瘢痕狭窄などにより口腔咽頭食道粘膜が障害され、過剰な創傷治癒反応によって限られたスペースに余剰な肉芽形成、瘢痕化、繊維化を生じる。実臨床においてこれらの病態は難治性であり、気管狭窄では長期間の気管切開、複数回の外科的治療が必要となり、瘢痕声帯では高度の嚔声が生じる。口腔咽頭食道粘膜の障害では狭窄により嚔下障害を生じ摂食障害や誤嚥性肺炎の危険を伴う。いずれの場合も外科手術を施行しても再発が多く複数回の手術を必要とし患者の QOL を著しく損なう。

近年、細胞増殖に必須の Extracellular signal-regulated kinase 細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 経路が創傷治癒に関与することが示唆されている。ERK は mitogen-activated protein kinase 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) の一種であり、遺伝子発現の調整、分裂、代謝、生存、アポトーシス、分化に関与するとされている細胞内シグナルである。ERK は細胞外からの刺激に反応して、スレオニンとチロシン残基の 2 か所のリン酸化を受けることで活性化される。マウス皮膚での熱傷における ERK2 の関与の解明や、中枢神経の ERK2 が神経障害性疼痛においてアロディニアの発症に関与している可能性や炎症性疼痛の神経可塑性への関与、ERK の記憶との関連などが研究されている。ERK の粘膜創傷治癒や瘢痕形成における役割は現時点では明らかではないものの、皮膚上皮細胞熱傷後の創傷治癒に重要な役割を担っていることが示唆されていることから、気道・粘膜上皮においても同様の役割を担っている可能性が高い。傷害を受けた気道粘膜上皮においては、ERK 経路の過剰な活性化が起きている可能性があり、粘膜における病的な創傷治癒に ERK がどのように関与するかを解明すれば、狭窄を予防もしくは治療するための新たな治療戦略の開発につながる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

耳鼻咽喉科領域である気管・咽喉頭での創傷治癒過程における ERK のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 気管狭窄モデルの作成

気管切開後に気管孔上方の気管前壁を焼灼し 1 週間後に第 1-2 気管を摘出した。この焼灼群において横断面の組織学的評価を行い、狭窄率を無処置群、気管切開のみの群と比較した。

(2) 気管内の ERK の局在の確認

無処置、焼灼 5 分後における気管内リン酸化 ERK の局在を免疫組織学的に評価した。

(3) 気管焼灼後の気管内の ERK のリン酸化の経時的変化の確認

無処置、焼灼 5 分後、30 分後、90 分後の気管を摘出し、ウェスタンブロット解析にて気管内 ERK1/2 リン酸化を定量評価した。

(4) Control 気管における、MEK 阻害剤による ERK リン酸化抑制の確認

無処置気管において ERK 上流に位置する MEK 阻害剤 ((α -[amino[(4-aminophenyl)thio]methylene]-2-(trifluoromethyl) benzene acetonitrile (SL-327)) (50mg/kg) を腹腔内投与し、30, 60, 90, 120 分後にそれぞれ気管を摘出し、Western blot を行い、ERK1/2, p-ERK1/2 を定量した。

(5) 焼灼気管の MEK 阻害剤による ERK リン酸化抑制の確認

MEK 阻害剤を焼灼 30 分前に投与した群と非投与群において、焼灼 5 分、30 分、90 分後の気管を摘出し、気管内 ERK1/2 リン酸化を定量評価した。

(6) MEK 阻害剤投与群と非投与群における、焼灼 1 週間後の気管狭窄率の比較

MEK 阻害剤を単回投与した焼灼群、連日 (5 日間) 投与した焼灼群における 1 週間後の気管狭窄率を無治療焼灼群と比較した。

4. 研究成果

- (1) 焼灼群は、HE 染色にて粘膜下組織の肥厚により著明な狭窄を認め、粘膜下組織の膠原組織の増加、コラーゲンの沈着、血管新生を認めた。気管狭窄率は、焼灼群では無処置群と比較して有意に上昇を認めた。各群の狭窄率中央値は無処置群：10.7%、気管切開のみ群：13.5%、焼灼群：48.2%であった。焼灼群は無処置群と比較して有意に増加していた。
- (2) 免疫組織学的評価において、無処置群、焼灼 5 分後群の両群において ERK1/2 リン酸化は気管上皮基底細胞に認めた。

- (3) 焼灼 5 分後に ERK1/2 リン酸化が増加し、以降は減少した。
- (4) Control 気管におけるリン酸化 ERK1/2 は、MEK 阻害剤投与後 30 分から 120 分の間、著明に低下した。このことより、MEK 阻害剤投与後 120 分までは ERK リン酸化の抑制効果があると考えられた。
- (5) 免疫組織学的評価にて MEK 阻害剤投与群で p-ERK1/2 の低下を認めた。MEK 阻害剤投与群では非投与群と比較し焼灼 5, 30, 90 分後に p-ERK1/2 の低下を認めた。
- (6) 各群の狭窄率中央値は、無治療群：51.8%、単回治療群：43.0%、連日治療群：34.0%であった。単回治療群と無治療群では有意差を認めなかったが、連日治療群は無治療群と比較して有意に低下した

本研究の結果より、今後 MEK 阻害剤を用いた気道狭窄への応用として、臨床的にはレーザー手術前後などの治療などが可能と考えるが、火災のような事故の場合は、傷害が生じる前に患者に MEK 阻害剤を投与することは現実的ではない。今後の研究では、有効な MEK 阻害剤の投与のタイミングを検討する必要がある。また全身的な投与により、湿疹、下痢、末梢の浮腫などの副作用が生じることも報告されている。障害部位への噴霧による投与など Drug Delivery System による安全な投与の確立が望ましい。またステロイド剤やマイトマイシン C など現在治療で用いられている薬剤との併用療法も検討される。今回は ERK1/2 の活性化を共に抑制する MEK 阻害剤を用いた実験を行ったが、将来的にはノックアウトマウスを用いて創傷治癒過程における ERK1/2 のそれぞれの役割も解明したいと考える。

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 1件）

1. 著者名 Kimura Akari, Araki Koji, Satoh Yasushi, Mogi Sachiyo, Fujitani Kazuko, Kurioka Takaomi, Endo Shogo, Shiotani Akihiro, Yamashita Taku	4. 巻 16
2. 論文標題 Inhibition of extracellular signal-regulated kinase pathway suppresses tracheal stenosis in a novel mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0256127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0256127	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 木村朱里
2. 発表標題 Extracellular signal-regulated kinase経路阻害による気管狭窄マウスモデルの狭窄予防効果.
3. 学会等名 第72回日本気管食道科学会総会・学術講演会ワークショップ [気管食道領域の基礎研究]
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村朱里
2. 発表標題 Inhibition of Extracellular signal-regulated kinase pathway suppresses tracheal stenosis.
3. 学会等名 13th Congress of the European Laryngological Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村朱里
2. 発表標題 Extracellular signal-regulated kinase経路阻害による気管狭窄マウスモデルの狭窄予防効果.
3. 学会等名 第38回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村朱里
2. 発表標題 Extracellular signal-regulated kinase経路阻害による気管狭窄マウスモデルの狭窄予防効果
3. 学会等名 第121回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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