

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24年 6月20日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590294

研究課題名（和文） 慢性咳嗽時の咳感受性亢進機序における Cdk5 シグナルの関与

研究課題名（英文） Involvement of Cdk5 signaling in cough hypersensitivity during chronic cough

研究代表者

亀井 淳三 (KAMEI JUNZO)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40161236

研究成果の概要（和文）：慢性咳嗽のすべてではないものの咳感受性が亢進している病態においては TRPV1 を介する経路と介さずに直接的に C 線維を興奮させる機序が関与しており、TRPV1 を介した経路においては Cdk5 が重要な役割を果たしていることが考えられる。

研究成果の概要（英文）：The C-fiber sensitizing mechanisms have an important role in the enhancement of cough receptor sensitivity in chronic coughs. Cdk5-dependent factors are involved in these C-fiber-mediated cough sensitization.

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	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：中枢・末梢神経、慢性咳嗽、テトロドトキシン(TTX)、TTX 抵抗性 Na⁺チャネル

1. 研究開始当初の背景

慢性（遷延性）咳嗽を訴えて医療機関を受診する患者が増加し、患者・医療者側共に慢性（遷延性）咳嗽に関する関心が高まって来ているにもかかわらず、有用な鎮咳薬は少ない。また、現在臨床現場で使用されているコデインのような中枢作用性の薬剤は咳のメカニズムの中の共通経路を遮断するため効果は大きいですが、本来止めてはならない咳も止めてしまう危険性がある。したがって、中枢

性の薬剤で咳を遮断することは好ましくなく、より選択的な手段で鎮咳をもたらすべきである。日本において、鎮咳薬と称されているものは中枢性の薬剤しかない。その大きな理由としては、咳のメカニズムが明確に示されていないことが大きな理由であろう。現在までに明らかにされているメカニズムは複雑である。気道に炎症があったり、分泌物が溜まったりすると排出させようとする反射、すなわち咳が起きる。咳反射の中枢への伝達

経路は A δ という有髄線維によると考えられている。この神経の終末受容体が RARs (rapid adapting receptor) と呼ばれるものである。この受容体は粘液などの機械的な刺激により直接的な刺激や、無髄の C 線維終末から放出されるタキキニンなどにより刺激される。一方炎症時に放出される色々なメディエーターは C 線維を刺激し、C 線維は軸索反射を介して RARs を刺激する。また、粘液なども C 線維を刺激できると考えられている。これまでに、申請者は、気管支炎モデル動物および新たに作成する真菌抽出成分で感作し、咳感受性を亢進させた動物 (アトピー咳嗽モデル動物: Kamei, et al., *Pulm. Pharmacol. Therap.*, 2007 in press) を用いて、慢性咳嗽時における C 線維からのタキキニン遊離調節にシクロオキシゲナーゼ、特に COX2 の関与。さらに、アナンダミドトランスポーターより神経細胞内に取り込まれるアナンダミドによる咳嗽亢進およびその取り込み機構に対する NO の関与を明らかにしている。また、これらのタキキニン遊離調節に共通した機構として、最終的に TRPV1 受容体、いわゆるカプサイシン受容体の活性化が重要であることを明らかにしている (図 1)。しかし、TRPV1 状態の活性化以降の情報伝達に関しては不明である。近年、TRPV1 を介した疼痛制御において、その情報伝達に serine/threonine kinase のひとつである cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) が関与していることが示唆されており、気道の C 線維活性化にもその関与が考えられる。事実、申請者は Cdk5 阻害薬がカプサイシン誘発咳嗽数を用量依存的に抑制することを報告 (Kamei, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 566:181, 2007) しているが、咳感受性亢進における Cdk5 の関与について、その詳細はいまだ不明である。

したがって、咳嗽反射誘発機序における Cdk5 の関与を明らかにすることは、咳嗽反射誘発の末梢性機序を明らかにすることにつながり、慢性あるいは遷延性咳嗽に対する有用な治療薬の探索につながる糸口を見出すことが可能となる。

欧米では 20 年以上前より慢性咳嗽の原因疾患と治療に関する臨床研究が進んでいる。しかし、本邦ではやっと 10 年前頃から一部の臨床研究医が欧米の成績と照らし合

わせながら、研究を展開してきたのが現状である。特に、基礎的な研究は申請者のグループ以外、国内外とも皆無に近い。したがって、本研究は、慢性咳嗽の発症機序を明らかにする基礎的研究のさきがけになると考える。

2. 研究の目的

咳嗽反射誘発における C 線維を介したタキキニン遊離調節に対する Cdk5 の関与ならびに、慢性咳嗽時における Cdk5 活性の変化を検討することを最終目標として、以下の検討を行った。

1) ovalbumin による感作およびチャレンジにより作成した気管支炎モデル動物における咳感受性亢進機序における C 線維の関与に関する検討。

2) ovalbumin による感作およびチャレンジにより作成した気管支炎モデル動物における咳感受性亢進機序における C 線維の活性亢進における Na⁺ チャネルならびにその α サブユニットの関与に関する検討。

3. 研究の方法

4 週齢雄性 ICR マウスに ovalbumin (4 mg/kg) を 1 週間間隔で 2 回、腹腔内投与し、その翌週から鼻腔内に 10mg/50ml の用量で連日 6 日間処置する。最終感作 24 時間後にネブライザーで霧状にしたカプサイシンを吸入させ下記に示した方法により動物用咳嗽反射測定装置を用い咳嗽発現数の変化から感受性を評価する。咳嗽反射はプレスチモグラフ法に従い測定する。すなわち、直径 4 cm、長さ 10.5cm の円筒形のプラスチック製プレスチモグラフを用いる。プレスチモグラフはマウスの胴体を入れるシリンダーの部分と頭部より被せるキャップ部分よりできている。シリンダー上部には、呼吸流量計と接続できるように排気口を開け、カプサイシン吸入に伴う胸部の動きをシリンダー内の容積変化として呼吸流量計を介して測定する。咳嗽が誘発されると、マウスの胸部が激しく動くので、シリンダー内に一時的に大きな容積変化が起こるため、呼吸流量計を介して正常呼吸と区別して測定を行う。この回数を測定して咳嗽の回数とする。また薬物適用前後の咳嗽数より薬物適用前の咳嗽数に対する抑制率

を算出して評価する。

4. 研究成果

1) マウスアレノレギー性気道炎モデルを用いてカプサイシン誘発咳嗽数を非気道炎モデルマウス（対照マウス）と比較したところ、その咳嗽数は有意に増加しており、アレルギー性気道炎モデルにおいて咳嗽亢進が引き起こされていることを確認できた。アレルギー性気道炎モデルにおけるカプサイシン誘発咳嗽数の増加はC線維の脱感作により、消失した。また、本モデルマウスの肺胞洗浄液中の一酸化窒素 (NO) 濃度は、対照マウスに比べ有意に増加していた。しかし、肺胞洗浄液中のsubstance P 量に対しては有意な変化が認められなかった。一方、アレルギー性気道炎モデルマウスにおいて認められたカプサイシン誘発咳嗽数の増加と肺胞洗浄液中のNO濃度の増加はCysteinyl-leukotriene (Cys-LTs) 受容体拮抗薬であるmontelukastにより、対照マウスで認められたレベルにまで抑制された。これらのことより、アレルギー性気道炎時に認められる、咳嗽反射亢進にはCys-LTs受容体を介したNO産生亢進が一部関与していることが明らかとなった。また、アレノレギー性気道炎時に認められる咳嗽反射亢進にC線維が関与していることは明らかであるにも関わらず、肺胞洗浄液中のsubstance P 量の遊離量に変化が認められなかったことより、本モデルにおける咳嗽反射亢進にはsubstance P 以外のタキキニン類が関与している可能性が考えられる。

2) TypeII pyrethroid 系殺虫剤であるフェンバレレートはそのNa⁺チャンネルオープナーとして作用しその活性を示す事が知られている。フェンバレレートをマウスに吸入させることで濃度依存的に咳嗽数を増加させることを見出した。フェンバレレートにより誘発される咳嗽はテトロドトキシン (TTX) の投与により有意に減少したが、その抑制程度は非常に小さいものであった。一方、TTX 抵抗性Na⁺チャンネル阻害作用を持つことが最近見出された去痰薬のアムプロキソールおよび TTX を同時に投与することで、フェンバレレートにより誘発される咳嗽反射は完全に消失した。

これらのことからフェンバレレートはTTX 抵抗性Na⁺チャンネルの活性化により咳嗽反射を誘発することが明らかとなった。一方、Cdk5の活性化によりC線維の活性化が充進することを明らかにしているovalbumin感作により作成した気道炎症モデルマウスにおいて、フェンバレレート誘発咳嗽数が、非感作マウスに比べ有意に増加することも明らかとなった。これらのことから、慢性あるいは遷延性咳嗽時における咳嗽感受性亢進にTTX 抵抗性Na⁺チャンネルの活性化を介した、C線維の活性化亢進が関与していることが示唆された。

TTX 感受性 Na⁺チャンネルの α サブユニット Nav1.7 に対して選択性の高い Na⁺チャンネルオープナーである veratridine をマウスに吸入することにより濃度依存的に咳嗽数が増加し、その咳嗽は Nav1.7 の選択的阻害薬である ProTXII により抑制された。また、veratridine 誘発咳嗽は TRPV1 の選択的阻害薬である capsazepine により抑制された。さらに、C線維を脱感作させたマウスにおいて veratridine 吸入による咳嗽数の増加は認められなかった。これらの結果より、TTX 感受性 Na⁺チャンネルの α サブユニット Nav1.7 は TRPV1 を間接的に活性化することで C線維の活性を亢進し、咳嗽反射に関与する受容体の感受性増強に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。これまでの研究成果を総合すると慢性咳嗽のすべてではないものの咳嗽感受性が亢進している病態においては TRPV1 を介する経路と介さずに直接的に C線維を興奮させる機序が関与しており、TRPV1 を介した経路においては Cdk5 が重要な役割を果たしていることが考えられる。

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2件)

①Ohkura N, Fujimura M, Hara J, Ohsawa M, Kamei J, and Nakao S: Bronchoconstriction-triggered cough in conscious guinea pigs. *Experimental Lung Research*, 35: 296-306, 2009.

②Kamei J, Nakanishi Y, Ishikawa Y, Hayashi SS, Asato M and Ohsawa M: Possible involvement of tetrodotoxin-resistant sodium channels in cough. *European Journal*

of Pharmacology, 652: 117-120, 2011.

〔学会発表〕(計5件)

① 亀井淳三：慢性咳嗽の病態は基礎的にどこまで解明されるか 第11回日本咳嗽研究会 2009年11月14日、名古屋

② 中西友樹、朝戸めぐみ、亀井淳三：GERD様モデルマウスにおけるC線維を介した咳嗽亢進 第12回日本咳嗽研究会 2010年11月13日、福岡

③ 中西友樹、石川蓉子、林隼輔、藤平智子、朝戸めぐみ、池田弘子、亀井淳三：咳嗽反射におけるテトロドトキシン抵抗性ナトリウムチャネルの関与 第84回日本薬理学会年会、2011年3月22日 横浜

④ 中西友樹、藤平智子、朝戸めぐみ、池田弘子、亀井淳三：咳嗽反射におけるナトリウムチャネル Nav1.7 α サブユニットの関与 第85回日本薬理学会年会 2012年3月16日 京都

⑤ Kamei J: Role of nitric oxide in the enhancement of C-fiber-mediated cough sensitivity -In cases of allergic airway inflammation and gastroesophageal reflux disease (GERD)- China-Japan-UK Joint Summit on Cough 2012年4月20日 上海 中華人民共和国

〔その他〕

ホームページ等

<http://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsu/chiryou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井淳三 (KAMEI JUNZO)
星薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：40161236

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：