

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5月15日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591364

研究課題名（和文） ω 3 脂肪酸代謝物の小児喘息に対する能動的消炎機構の解明

研究課題名（英文）possible inhibitory action of omega-3 unsaturated fatty acid on development of childhood asthma

研究代表者 浜崎 雄平（HAMASAKI YUHEI）

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：10172967

研究成果の概要（和文）：小児喘息は気道の慢性炎症であることが知られている。気道の炎症・消炎の機構を解明するために脂肪酸代謝産物を含む種々の内因的・外因的活性物の気道上皮に対する作用を検討した。①leukotrieneB4 (LTB4)は気道上皮の ICAM-1 発現を誘導し、ウイルス感染時に炎症・消炎に関与していることが示唆された。②ウイルス感染のモデルである PolyIC 刺激により気道上皮にセマフォリン (sema3A) 分子の発現が誘導されることを明らかにした。また sema3A は好中球に作用してその食能を増強することを見いだした。③IL-13 はマウスの気道上皮を増殖させることを air-liquid interface assay 法を用いて確認した。この作用は epidermal growth factor receptor (EGFR) のリガンドのひとつである epigen の発現を誘導することによって生ずることを解明した。

研究成果の概要（英文）：Childhood asthma has been known to be a chronic airway inflammation which is characterized by infiltration of inflammatory cells including lymphocytes, mast cells, eosinophils and PMNs. We investigated action of various bioactive substances including unsaturated fatty acid-metabolites and cytokines in human and murine cultured airway epithelial cells. (1)Leukotrienes (LTB4), a substance of unsaturated fatty acid induced ICAM-1 expression on cultured human airway epithelial cells, indicating important roles in the process of virus-induced inflammation of airway. (2)Poly IC induced sema3A in cultured human airway epithelial cells. Sema3A increased phagocytotic function of human PMNs. (3)IL-13 was confirmed to stimulate proliferation of cultured murine tracheal epithelial cells by using air-liquid interface assay. This proliferative action is associated with new induction of epigen, which is a substance of epidermal growth factor receptor (EGFR) ligand family.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：気道上皮，気道炎症，脂肪酸代謝物，小児気管支喘息，アラキドン酸代謝物

1. 研究開始当初の背景：

生体がホメオスターシスを維持するための能動的な消炎反応として resolution が注目されている (Serhan CN, Nature Immunol 2008). resolution を制御する因子として，従来はアラキドン酸代謝産物の Prostaglandin (PG) E₂, Lipoxin A₄ (LXA₄) 等が知られていたが，近年，fish oil 等に多く含まれている eicosapentaenoic acid (EPA) や docosahexaenoic acid (DHA) に由来する Resolvin D シリーズ， Resolvin E シリーズ， Proteitin 等が種々の炎症性疾患において抗炎症性，消炎性活性物質として重要な役割をはたしていることが報告されている．また，気道炎症発症および消炎のプロセスには好中球，好酸球，リンパ球などの炎症細胞と気道上皮細胞や線維芽細胞などの気道構成細胞とが関与することが知られている．特に気道上皮細胞はバリア機能のみならず，脂肪酸代謝物やケモカイン，サイトカインのような外因性，内因性の活性物質に受容体を介して反応し，それ自身も種々の活性物質を合成分泌し，気道炎症の抑制，消炎等に重要な役割を果たしていることが考えられている．その機能について報告がなされてはいるものの，いまだ完全に解明されているわけではない．

2. 研究の目的：脂肪酸の代謝物を含む種々の内因性・外因性活性物質に対する気道上皮の反応を調べることにより炎症・消炎症における気道上皮の役割を明らかにし，慢性の気道炎症である小児気管支喘息の病態を解明する

3. 研究の方法

(1) LTB₄ の気道上皮に対する作用と役割

細胞培養：ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B (LHC-9 medium) と正常ヒト気道上皮細胞 NHBE (BEBM) は 37 °C、5 % CO₂ 存在下で培養し，実験にもちいた． mRNA は通常の方法で抽出し定量的、半定量的 RT-PCR 法で測定した． 蛋白定性：RIPA buffer を用いて蛋白を抽出し Western blot 法を用いて測定した．

免疫染色：細胞をコラーゲンコートしたスライドガラスに撒き一次/二次抗体を用いて発色させて検討した． フローサイトメトリーは通常の方法で行った．

(2) polyIC 刺激によるヒト気道上皮の反応：

肺胞洗浄液より回収したヒト気道上皮細胞と培養細胞 (BEAS-2B)， 健常ヒトボランティアのへパリン加末梢血より分離し，顕微鏡下に 95% 以上であることを確認した多核白血球 (PMN) を用いて実験を行った． medium は

RPMI1640+10%FBS+ABAM を使用した．

肺胞洗浄液中細胞染色：ヒト肺胞洗浄液を cytospin を用いてスライドに固定し，免疫染色を行った． 1st: anti sema3A (H130) rabbit IgG /normal rabbit IgG ; 2nd: anti rabbit HRP goat IgG-Alexa488 をもちいた． mRNA 発現：半定量的 PCR 法を用いた．

Apoptosis Assay：PMN を培養し，1 時間後 Annexin V 法を用いて flow Cytometry で測定した． Transmigration Assay：Transwell® (pore: 5 μm) を用い，90 分培養後遊走した PMN を顕微鏡的に count した． Phagocytosis Assay：前処置後 PMN を Latex Beads-Rabbit IgG-FITC (Phagocytosis assay kit) と 45-60 分間反応させ，洗浄後 flow cytometry で測定した． Phagocytosis Signal Assay：前処置の前に PI3K 阻害薬 (LY294002/50 μM 30 分) を PMN に加え，phagocytosis assay を行った．

(3) IL-13 刺激による気道上皮の反応：

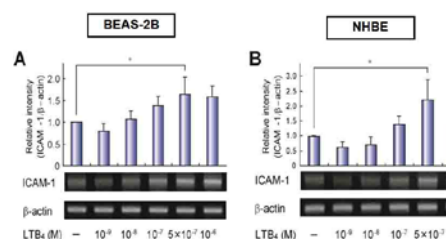
MPAE (マウスの気道上皮細胞) を air-liquid interface assay 法を用いて培養した．

細胞増殖：³H-thymidine incorporation assay, および細胞を HE 染色と免疫染色法を用いて鏡見することにより判定した．

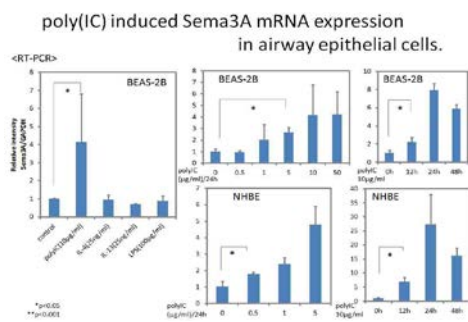
4. 研究成果

(1) LTB₄ の気道上皮に対する作用と役割：

LTB₄ は BLT1 および BLT2 と命名された 2 種の受容体で情報伝達が行われる． 気道上皮には BLT2 の発現が認められない一方で， BLT1 発現は恒常的に発現が認められることが判明した． 蛋白発現も免疫組織染色法と Western blotting 法で確認することが出来た． NHBE 細胞でも同様の結果であった． 極めて強い受容体発現が認められるにもかかわらず，気道上皮細胞における LTB₄ の作用は明確ではない． 我々は気道上皮に対する LTB₄ の種々の作用について検討した． その結果， LTB₄ は RS ウイルスの感染経路である ICAM-1 の発現を増強することが判明した． 以前より INF-γ が ICAM-1 の発現を増強することが知られているが LTB₄ はこの作用を相加的に強めることが明らかとなった． BLT1 の拮抗薬はこの増強作用を阻害することが確認出来た．

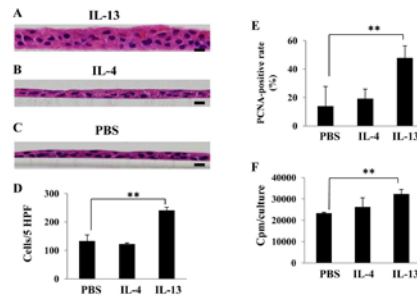


(2) polyIC 刺激によるヒト気道上皮の反応: 気道上皮細胞の cell line である Sema3A の mRNA は気道上皮細胞 (BEAS-2B と NHBE) で恒常的に発現していること, 気道上皮細胞の Sema3A は, 二本鎖 RNA である polyIC 刺激によって濃度依存的に 24 時間をピークにその発現が増強することが判明した. また, 細胞培養上清中に Sema3A 分子の分泌が増加することも確認できた. 分泌された Sema3A が感染性炎症に関連して好中球に対して何らかの効果を与えているのではないかと仮説の下に好中球の apoptosis, 遊走能, 貪食能に対する効果を検討した. その結果, apoptosis と遊走能に対しては効果を認めなかったが, 貪食能を増強することが判明した. LTB4 も貪食能を増強するが, LTB4 の作用を更に増強することが判明した. 好中球は IgG でオプソニン化されている異物を貪食し, そのシグナルは Fc γ レセプターを介していると推測される. Fc γ レセプターを介する好中球の貪食は PI3K を介してアクチンの再重合をおこし細胞骨格の形態変化を起こすことによると報告されている. PI3K inhibitor である LY294002 を作用させて貪食能を測定したところ抑制が認められた. すなわちこの作用は PI3K を介した細胞骨格の形態変化による可能性が示唆された.



(3) IL-13 刺激による気道上皮の反応:

Th2 サイトカインである IL-13 を加えて培養することにより, マウスの気道上皮細胞はコントロールに比べて強い増殖反応を呈することが明らかとなった. IL-13 による気道上皮の増殖反応は EGFR の阻害薬である AG1478 により完全に抑制された. ところが, IL-13 は EGFR のリガンドではないので, IL-13 による増殖反応は直接作用ではなく, 何らかの EGFR のリガンドを介した反応であることが推測された. 我々は EGFR のリガンドのひとつである epigen が IL-13 により強く誘導されることを見だし, IL-13 による気道上皮の増殖反応が epigen に由来するものであることを明らかにした.



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

① Taniguchi K, Yamamoto S, Aoki S, Toda S, Izuhara K, Hamasaki Y. Epigen is induced during the interleukin-13-stimulated cell proliferation in murine primary airway epithelial cells, *Experimental Lung Research* 査読有 37: 2011, 461-470

② 浜崎雄平, 山本修一. 脂質メディエーター, 喘息 査読無 24:2011, 12-17

③ 濱崎雄平. 炎症・アレルギーと脂質代謝物, 査読有 24: 2010, 1-7

④ 浜崎雄平, 松尾宗明. COX-2 と Vasoactive intestinal peptide (VIP), 査読無 6: 2010, 31-34

⑤ 浜崎雄平. アラキドン酸・脂肪酸研究がもたらす喘息治療の展望; 生体の治癒機能を向上させる食事や環境を見いだすために. *Info Allergy* 査読無 52: 2010, 2-3

⑥ 浜崎雄平, 山本修一. 抗炎症 (anti-inflammation)・消炎性 (pro-resolution) 機構におけるオメガ-6 およびオメガ-3 多価不飽和脂肪酸由来活性脂質の役割とその意義, 査読有 *日本小児アレルギー学会雑誌* 23: 2009, 613-622

⑦ K. Ishii, M. Zaitzu, N. Yonemitsu, Y. Kan, Y. Hamasaki and M. Matsuo. 5-lipoxygenase pathway promotes cell proliferation in human glioma cell lines, 査読有 *Clinical Neuropathology* 28: 2009, 445-452

[学会発表] (計 9 件)

① 稲田由紀子, 人見会美子, 谷口一登, 山本修一, 濱崎雄平. 好中球性気道炎症における Semaphorin 3A の関与, 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2011 11/10-12, 東京

② Hamasaki Y, Zaitzu M, Yamamoto S.

Bronchial asthma long-term management; Roles of LTRA in the long term management of bronchial asthma in children, 16th Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiratory and Immunology, 2011 10/28-30, Fukuoka

③Ohtaguro E, Yamamoto S, Inada Y, Muro E, Hitomi E, Taniguchi K, Hamasaki Y. Leukotriene B4 enhanced intercellular adhesion molecule-1 in airway epithelial cells, 16th Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiratory and Immunology, 2011 10/28-30, Fukuoka

④浜崎雄平, 小児気管支喘息治療・管理ガイドライン：今後の方向性と展望, 第 60 回日本小児アレルギー学会, 2010. 11. 25-27 東京

⑤稲田由紀子、大田黒一舞、人見会美子、在津正文、室英理子、山本修一、浜崎雄平. 気道炎症におけるSemaphorin 3Aの関与, 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2010. 11. 25-27 東京

⑥浜崎雄平. 炎症・アレルギーと脂質代謝物, 第 46 回日本小児アレルギー学会(特別講演), 2009 12/5-6, 福岡市

⑦浜崎雄平. 小児気管支喘息と呼吸器感染, 第 91 回日本小児科学会島根地方会(特別講演), 2009 6/28, 出雲市

⑧浜崎雄平. 小児の気管支喘息・最近の知見, 第 20 回日本小児小児科医会総会(教育セミナー) 2009 6/13-14, 東京

⑨Y. Hamasaki. Roles of leukotriene(LTs) and leukotriene receptor antagonist(LTRA) in childhood asthma, The spring meeting of the Korean Academy of Asthma, allergy and clinical immunology. 2009 5/9-10, Souel

研究組織

(1)研究代表者

浜崎 雄平(HAMASAKI YUHEI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：10172967