

## 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 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590844

研究課題名（和文）エラスターゼ誘起性杯細胞化生モデルを用いた COPD 過分泌治療法の開発

研究課題名（英文）Development of the treatment of mucus overproduction in COPD using an animal model of elastase-induced goblet cell metaplasia

研究代表者

近藤 光子（KONDO MITSUKO）

東京女子医大学・医学部・講師

研究者番号：50178430

研究成果の概要（和文）：COPD における過分泌は予後と関連する。マウス気道内にエラスターゼを反復投与して杯細胞化生を作成し、COPD 治療薬の効果を検討した。杯細胞化生と気道の炎症細胞浸潤、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞とケモカインの増加、M3 受容体発現はチオトロピウムで抑制され、*in vitro* での MUC5AC 産生亢進も抑制された。チオトロピウムは抗炎症作用と気道上皮細胞への直接作用により過分泌を抑制すると示唆された。

研究成果の概要（英文）：Airway occlusion by mucus in COPD is associated with a poor prognosis. Repeated-elastase aspiration induced marked goblet cell metaplasia in mice. The goblet cell metaplasia, increase in inflammatory cells and chemokine levels in BALF, M<sub>3</sub> receptor expression, MUC5AC production *in vitro* were inhibited by tiotropium. This result suggests that tiotropium may be useful for the treatment of mucus overproduction by anti-inflammatory action and a direct action on epithelial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
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・呼吸器内科学 1

キーワード：エラスターゼ、杯細胞化生、ムスカリン受容体、チオトロピウム、COPD、MUC5AC

## 1. 研究開始当初の背景

(1)慢性閉塞性肺疾患(COPD)はタバコ消費量の増加や人口の高齢化から、今後さらに死亡率の増加が推測されている。COPD において肺容量減少術により採取された肺組織の解析から、その生命予後を規定したものは気道内の粘液による閉塞の程度であったと報告されて

いる。すなわち、過分泌による粘液線毛クリアランスの低下は気道閉塞を引き起こし、換気不全や換気血流不均等をもたらし、死亡に結びつくと考えられる。従って、COPDにおける過分泌への対策は重要な治療上の課題となっている。

(2) COPD の病因論としてプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡は古くから有力な仮説の一つとして知られている。種々のプロテアーゼが関わっているとされるが、そのうちで最も重要なものに好中球エラスターゼがある。実際、好中球エラスターゼを気道内に単回注入する動物実験では比較的容易に肺気腫が形成される。しかし、COPD のもう一つの重要な病理所見である気管支における杯細胞化生について検討した報告は極めて少ない。我々はエーテル麻酔下にマウスにエラスターゼを点鼻してaspiration を起こさせ、これを反復投与することで、肺気腫の他に、気管支内に著明な杯細胞化生の動物実験モデルを作成することに成功した。この方法は簡便で再現性がよいことを確認している。そこで、このモデルを用いて、COPDの過分泌治療法の開発を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

好中球エラスターゼが急性の粘液分泌反応を引き起こすことは古くから知られていたが、杯細胞化生にいたるメカニズムはこれまで明らかにされていない。現在、COPD の治療は主として気管支拡張薬を中心に行われているが、長時間作働性ムスカリン受容体阻害薬のチオトロピウム は気流閉塞の改善のみならず抗炎症効果も知られてきている。しかし、チオトロピウムをはじめとする COPD 治療薬が COPD の過分泌病態や杯細胞化生に対して抑制効果があるかどうか十分な検討がなされていない。本研究では、エラスターゼ誘起性杯細胞化生マウスモデルを用いて COPD 治療薬が杯細胞化生に与える効果と作用機序を明らかにし、COPD の過分泌に対する治療法の開発をめざすことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) C57/BL6 マウスを用いてエラスターゼ反復投与による杯細胞化生モデルの作成と解析

C57/B6 マウスをchamber にいれ生食またはチオトロピウム を超音波ネブライザーで吸入させた。ついで好中球エラスターゼをPBS に溶解し、エーテル麻酔下にC57/B6 マウスに点鼻し、下気道へaspirationさせた。これをDay 1, 4, 7 の3 回行った。Day 8, 11, 14, 20 にマウスを気管支肺胞洗浄し、また光顕標本を作成した。染色はHE染色とPAS/Alcian blue 染色を用いた。気管支肺胞洗浄液(BALF)中の総細胞数を算定し、またMay-Grünwald-Giemsa 染色標本により細胞分画を算定した。さらにBALF上清中のサイトカインやロイコトリエンB4をELISAキットで測定した。杯細胞化生についてはPAS/Alcian blue 染色標本を作成し、Nagai<sup>1)</sup>らの方法により200 mm 以上の気管支の気道上皮にしめる杯細胞の割合でスコア化し、その総和の平均値で評価した。またM3受容体抗体を用いて免疫染色を行った。次にすでに確立した杯細胞化生に対する受容体阻害薬の治療的効果についても検討した。すなわち、C57/B6 マウスにエラスターゼをDay 1, 4, 7 の点鼻投与で杯細胞化生を作成し、その後、チオトロピウムを吸入させた群と生食吸入群に分割し、さらに連続してエラスターゼをDay 10, 13, 16 に点鼻してDay 20 に上記と同様の解析を行った。

(2) 培養上皮細胞を用いた粘液産生に対するin vitro の検討

粘液産生能のあるヒトのmucoepidermoid carcinomaのcell lineであるNCI-H292細胞を用いてM3受容体が存在するか、抗ヒトM3受容体抗体を用いて免疫染色を行った。この受容体の機能発現を可視的に確認するため、カルバコールを用いて、Kondo<sup>2)</sup>の報告に基づき

Fura-2法で細胞内Ca濃度を測定し、受容体阻害薬の抑制効果も検討した。次にエラスターゼまたはカルバコールで刺激後、細胞を洗浄し培養、24時間後に細胞を剥離回収し、cell lysateを作成後、MUC5ACの濃度をTakeyama<sup>3)</sup>の報告に基づきELISA法で測定した。また、これらの反応がムスカリン受容体阻害薬などにより抑制されるかを検討し、エラスターゼによる粘液産生におけるムスカリン受容体との関わりの有無を検討した。

さらにCOPDの治療薬として期待されているフォスフォジエステラーゼ4 (PDE4) 阻害薬のエラスターゼ刺激による粘液産生への影響についても検討した。PDE4阻害薬としては現在臨床使用が可能なイブジラストを用いた。

NCI-H292細胞をイブジラスト存在下にエラスターゼで刺激し、その細胞溶解液中のMUC5AC濃度をELISAで測定した。そのシグナル伝達機構の解明のため細胞内cAMPの濃度もEIAで測定した。

#### 方法の文献

- 1) Nagai A. et al. Am Rev Respir Dis 1990;142:172-176.
- 2) Kondo M. et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2002;27:536-541.
- 3) Takeyama K., et al. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:3081-3086.

#### 4. 研究成果

##### (1) エラスターゼ誘起性杯細胞モデルにおける検討

エラスターゼ気道内投与は気管支上皮に杯細胞化生と気道周囲の炎症細胞浸潤をもたらした。この反応はチオトロピウムで著明に抑制された(図1)。また気管支肺胞洗浄液中の好中球、好酸球細胞数の増加もチオトロピウムで抑制された。また気管支肺胞洗浄液中のKC、ロイコトリエンB4の増加はチオトロピウム投

与により有意に抑制された。さらに気道上皮細胞、炎症細胞にM3受容体の発現が認められたが、チオトロピウムの投与により発現が低下した。エラスターゼ誘起性杯細胞化生が確立した後にチオトロピウムを投与しても、杯細胞化生の抑制効果が認められた。

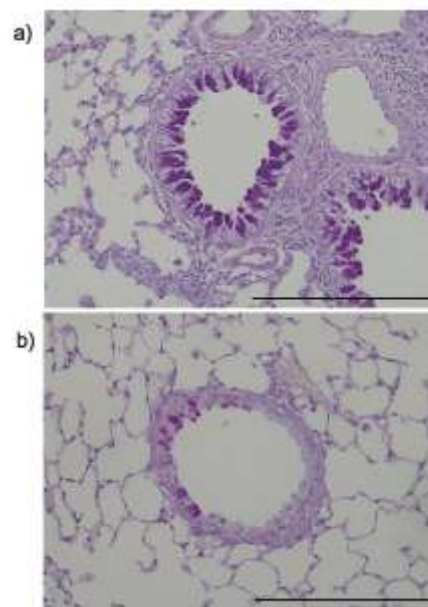


図1 エラスターゼ誘起性杯細胞化生に対するチオトロピウムの抑制効果

a) エラスターゼ投与群、b) チオトロピウム+エラスターゼ投与群 PAS/AB染色、Scale=200 μm.

##### (2) 培養上皮細胞を用いたin vitroでの検討

###### ①ムスカリン受容体阻害薬の検討

粘液産生能を有するNCI-H292細胞にM3受容体が発現していることを免疫染色で確認した。次いで、コリン作働薬であるカルバコールで刺激したところ、MUC5ACの産生は増加した。この反応はチオトロピウムにより有意に抑制された。また、Fura-2法を用いて、本細胞の細胞内カルシウム動態への影響を検討した。その結果、カルバコールは細胞内カルシウム上昇を惹起し、ムスカリン受容体阻害薬はこの反応を有意に抑制した。以上のことから、

NCI-H292細胞のM3受容体の活性化は細胞内カルシウムを上昇させ、粘液産生を引き起こすことが示唆された。次に、NCI-H292細胞にエラスターゼ刺激を行ったところ、有意にMUC5AC産生が亢進した。この反応はチオトロピウムやイプラトロピウムの前処置により、用量依存性に抑制された。以上のことから、エラスターゼ刺激はNCI-H292細胞のM3ムスカリン受容体の活性化を通して粘液産生をもたらし、ムスカリン受容体阻害薬は粘液産生を抑制することが示唆された（図2）。

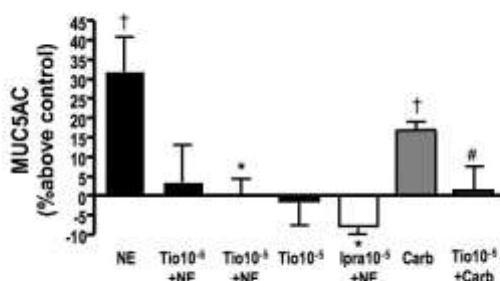


図2 NCI-H292細胞におけるMUC5AC蛋白の産生に対する薬剤の効果

NE;好中球エラスターゼ, Tio;チオトロピウム, Ipra; イプラトロピウム, Carb; カルバコール.

チオトロピウム、イプラトロピウムはエラスターゼ刺激によるMUC5AC産生を抑制する。またチオトロピウムはカルバコール刺激によるMUC5AC産生を抑制する。

## ②PDE4阻害薬の検討

PDE4阻害薬であるイブジラストもエラスターゼ刺激によるMUC5AC産生亢進を有意に抑制した。またイブジラストはエラスターゼ刺激後の細胞内cAMP濃度を有意に増加させた。同様に細胞外から投与した8-Br-cAMPもエラスタ

ーゼ刺激後のMUC5AC産生亢進を有意に抑制した。以上のことから、イブジラストは細胞内cAMPの増加を介してエラスターゼ刺激後の粘液産生を抑制することが示された。

## (3) 本研究の評価と今後の展望

以上の結果から、COPD治療薬であるムスカリン受容体阻害薬、PDE4阻害薬は抗炎症作用と気道上皮細胞への直接作用により過分泌を抑制する可能性が示された。本研究の主たる成果はEur Respir J（発表論文⑥）に掲載され、COPD治療における過分泌に対してのチオトロピウムの作用機序を解明したことから海外からも注目されている（Karaklulakis G., Mediators Inflamm 2012, Yohannes AM., Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2013）。さらに、COPDや気管支喘息の過分泌病態においてカルシウム活性化クロロイオンチャネルが関わっていることも報告されていることから、その阻害薬であるniflumic acidの過分泌治療への可能性についても研究を進展させた。その結果、動物実験モデルを用いてniflumic acidが気道杯細胞からの分泌反応を抑制することを見出した（発表論文①）。以上の成果は既存の治療薬のみならず、過分泌に対する新規治療法への道を開くものであり、今後さらなるメカニズム解明のための研究を展開する予定である。

## 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9件）

- ① Kondo M., Nakata J., Arai N., Izumo T., Tagaya E., Takeyama K., Tamaoki J., Nagai A. Niflumic acid inhibits goblet cell degranulation in a guinea pig asthma model. Allergol Int. 61:133-142, 2012. doi:10.2332/allergolint.11-0A-03

07. (査読有)

- ② 近藤光子 玉置淳 医学と医療の最前線 気道分泌の管理と治療 日本内科学会誌 Dec 10;101(12):3525-32, 2012. (査読無)
- ③ 近藤光子 玉置淳 喘息治療の薬理遺伝学 最新医学 67(6):84(1286)-89(1291), 2012. (査読無)
- ④ 近藤光子 慢性気道炎症とマクロライド療法 日本胸部臨床 71(1)29-37, 2012 (査読無)
- ⑤ 近藤光子 痰を伴う咳 診断と治療 99(12): 2037-2049, 2011. (査読無)
- ⑥ Arai N., Kondo M., Izumo T., Tamaoki J., Nagai A. Inhibition of neutrophil elastase-induced goblet cell metaplasia by tiotropium in mice. Eur Respir J. 35:1164-1171, 2010. doi:10.1183/09031936.00040709. (査読有)
- ⑦ Izumo T., Kondo M., Arai N., Nagai A. Role of leukotriene B4 receptor antagonist in pulmonary fibrosis. Annals of Respiratory Medicine 1(2): 1-5, 2010. (査読有)
- ⑧ Tamaoki J., Yokohori N., Tagaya E., Kirishi S., Miyamoto Y., Ochiai K., Kondo M., Nagai A. Comparable effect of a leukotriene receptor antagonist and long-acting beta<sub>2</sub>-adrenergic agonist in cough variant asthma. Allergy Asthma Proc. Sep-Oct; 31(5): 78-84, 2010. doi: 10.2500/aap.2010.31.3366. (査読有)
- ⑨ 近藤光子 ウイルス感染と気道炎症の増悪② COPDはなぜ悪化するのか The Lung perspectives p. 30(358)-33(361) 18巻4号 2010. (査読無)

[学会発表] (計5件)

- ① 近藤光子 玉置淳 厚生労働科学研究費

補助金難治性疾患克服研究事業 呼吸不全に関する調査研究班 平成 24 年度第 2 回総会 COPD 随伴症状としての慢性咳嗽および気道過分泌の病態に関する研究 2012. 12. 21, 東京

- ② Kondo M., Nakata J., Nagara N., Takeyama K., Tagaya E., Tamaoki J., Nagai A. Niflumic acid inhibits antigen- and histamine-induced goblet cell degranulation in a guinea pig asthma model. American Thoracic Society International Conference. 2012. 5. 24. San Francisco, USA.
- ③ 近藤光子 洲崎春海 気腔から肺胞までの粘膜病態 one airway one disease 第 51 回日本呼吸器学会総会. 2011. 4. 22, 東京
- ④ 近藤光子 中田潤子 新井尚希 多賀谷悦子 玉置淳 永井厚志 モルモット喘息モデルにおけるヒスタミン誘起性気道分泌反応に対する Niflumic acid の抑制効果 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2011. 11. 12, 東京
- ⑤ Kondo M., Nagaoka M., Nakata J., Izumo T., Arai N., Tamaoki J., Nagai A.. The frequency of gastroesophageal reflux disease and the therapeutic effect of rabeprazole in patients with asthma European Respiratory Society Annual Congress. 2010. 9. 21, Barcelona, Spain.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 光子 (KONDO MITSUKO)  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50178430