

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590118

研究課題名(和文)新規気管支喘息治療薬開発に向けた気管支平滑筋過敏性発現メカニズムの解明

研究課題名(英文) Role of miRNAs in the development of bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in allergic asthma

研究代表者

千葉 義彦 (Chiba, Yoshihiko)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00287848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：喘息患者では、気道がわずかな刺激でも過剰に収縮して発作を引き起こす。この過剰な収縮が引き起こされるメカニズムについては不明な点が多く、したがって喘息を根治する薬物の開発には至っていない。本研究では、気道収縮をつかさどる細胞である気管支平滑筋細胞に焦点を当てて検討を行い、喘息時にはこの気管支平滑筋細胞の種々の遺伝子発現がダイナミックに変化しており、その結果過剰な収縮がもたらされる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Current study was carried out to make clear the mechanism(s) of development of airway hyperresponsiveness in asthmatics. In bronchial smooth muscles of mice with allergic asthma, an up-regulation of RhoA protein and a down-regulation of miR-140-3p were observed. In cultured human bronchial smooth muscle cells, an up-regulation of RhoA protein was observed when the function of endogenous miR-140-3p was inhibited by its antagomir. Treatment of the cells with interleukin-13 caused an up-regulation of RhoA protein and a down-regulation of miR-140-3p. These findings suggest that RhoA protein expression is negatively regulated by miR-140-3p in bronchial smooth muscle cells. The increased expression of interleukin-13 in the airways of asthmatics might, at least in part, contribute to the reduction of miR-140-3p, resulting in an up-regulation of RhoA protein and augmented smooth muscle contraction of the airways.

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：アレルギー性気管支喘息 気道過敏性 気管支平滑筋 microRNA (miRNA) miR-140 RhoA CD38 Interleukin-13 (IL-13)

1. 研究開始当初の背景

気道過敏性は、アレルギー性気管支喘息患者共通に認められ、喘息病態の増悪因子とされている。この気道過敏性発症のメカニズムを解明するには適切な動物モデルが必要であるが、研究代表者らは、感作ラットに抗原を反復吸入させることにより、著しい気道過敏性状態が獲得されていることを見いだした。この気道過敏性ラットより摘出した気管支平滑筋の各種収縮性アゴニストに対する反応性は、正常動物のものと比較して、著明かつ有意に亢進していることを明らかにした。この時、気管支平滑筋の細胞膜受容体およびアゴニストによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇については正常レベルであることも明らかにしている。一方、最近になって、血管等各種平滑筋のアゴニストによる収縮反応には Ca^{2+} 感受性の増大が確認されており、そのメカニズムが解明されつつあり、低分子量 GTP 結合蛋白質である RhoA がアゴニスト誘発 Ca^{2+} 感受性亢進機構に関与していることが示唆されてきている。この Ca^{2+} 感受性亢進機構の変化が、気道過敏性時の気管支平滑筋収縮増大に関与しているものと考え、平成 9、10 年度に交付を受けた奨励研究(A)(課題番号 09772004)および平成 12、13 年度に交付を受けた奨励研究(A)(課題番号 12770047)をもとに検討を行った結果、気道過敏性時に気管支平滑筋の RhoA タンパク質発現量が増大 (up-regulation) しており、RhoA およびその下流の Rho-kinase 系を介する収縮反応が著しく亢進していることを見出した。さらに、マウスアレルギー性気管支喘息モデルにおいても同様の現象が認められることも確認している。したがって、過敏性気管支平滑筋においてはこの RhoA/Rho-kinase 系を介する Ca^{2+} 感受性が大きく増強され、その結果、過剰な収縮反応が惹起されて呼吸困難等の喘息症状がもたらされる可能性が示唆された。これらの研究成果をもとに本研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

平成 18、19 年度に交付を受けた基盤研究(C)(課題番号 18590079)をもとに検討を行った結果、気管支喘息時に遊離される IL-13 が RhoA upregulation をもたらし、過剰な気管支平滑筋収縮、すなわち気道過敏性の発現に深く関与することが証明された。さらに、平成 20-22 年度に交付を受けた基盤研究(C)(課題番号 20590093)をもとに検討を行った結果、この IL-13 誘発 RhoA upregulation のメカニズムとして、STAT6 活性化を介する transcription 増加に加え、ある種の microRNA による post-transcriptional inhibition の減弱が深く関与している可能性を示唆してきた。本研究計画では、この microRNA に着目して、気管支平滑筋過敏性のメカニズムを明らかにすることにより、アレルギー性気管支喘息時

の気道過敏性発症機序の解明に迫るとともに、microRNA をターゲットとした新規気管支喘息治療薬開発の可能性を探る。

3. 研究の方法

気道過敏性モデルマウスの作製: BALB/c 系マウスに ovalbumin(OA)を抗原とし、感作および追加感作を施し、さらに霧状にした OA を反復的に吸入チャレンジさせることにより気管支喘息症状を惹起させた。コントロール群として、感作を施した後 OA の代わりに saline を吸入させた動物を使用した。

マウス摘出左主気管支平滑筋収縮反応性の測定:

マウスより左主気管支を摘出し、95% O_2 -5% CO_2 を通気した Krebs-Henseleit 液の入った organ-bath 内に懸垂し、等尺性張力を測定した。Acetylcholine (ACh: 10^{-7} - 10^{-3} M) を累積投与することにより、その濃度収縮反応を観察した。

培養ヒト気管支平滑筋細胞 (hBSMCs) の培養および薬物処置:

hBSMCs (3×10^4 cells/well) を 6-well plates に播種し、5% ウシ胎児血清含有 SmBM 培地中にて 80% コンフルエントまで培養した。その後、無血清培地に交換して 24 時間インキュベートした後、IL-13 (100 ng/mL) を処置した。各種 microRNA あるいはその inhibitors の処置は、Lipofectamine2000™ を用いてマニュアルにしたがい行った。

マウス主気管支平滑筋組織および hBSMCs における各種タンパク質レベルおよび mRNA 発現レベル、microRNA 発現レベルの測定:

マウス主気管支平滑筋は最終抗原チャレンジ終了 24 時間後に摘出し、hBSMCs は IL-13 (100 ng/mL) 処置 1、3、6、12 および 24 時間後に回収し、常法にしたがい total protein samples あるいは microRNA を含む total RNA samples を調製した。各種タンパク質発現レベルの測定は western blot 法を用いて、各種 mRNA 発現レベルあるいは microRNA 発現レベルは real-time RT-PCR 法を用いて行った。

抗原誘発気道過敏性マウスにおける microRNA 発現変動の網羅的解析:

上記の microRNA を含む total RNA sample について Exiqon 社の miRCURY™ LNA miRNA Array を用いてコントロール群との比較検討を行うことにより、発現変動する microRNA の網羅的解析を行った。

4. 研究成果

抗原誘発気道過敏性マウスの気管支平滑筋組織において発現変動する microRNAs の同定:

Exiqon 社の miRCURY™ LNA miRNA Array を用いて網羅的解析を行ったところ、抗原誘発気道過敏性マウスの気管支平滑筋

組織において miR-140-3p、miR-140-5p および miR-133a-3p 発現の有意な減少が認められ、miR-1971 などの 11 種類の microRNAs の有意な増加が認められた(表 1)。

miRNA (mm-)	Accession	Mature sequence	Human expression	AHR/Cont
miR-140-3p	MMAT0000152	5'-UACCCAGGGUAGAACCACCGG-3'	Yes	0.448
miR-140-5p	MMAT0000151	5'-CAGUGGUUUUACCUAUGGUAAG-3'	Yes	0.449
miR-133a-3p	MMAT0000145	5'-UUUGGUCCUUCACACGUG-3'	Yes	0.465
miR-1971	MMAT0000946	5'-GUAAAGGUCGGUCUGAGA-3'	No	2.004
miR-142-3p	MMAT0000155	5'-UGUAGUGUUUCCUACUUAUGGA-3'	Yes	2.101
miR-669e-5p	MMAT0003479	5'-AUAGUUGUGUGGUAUGUGUGU-3'	No	2.123
miR-1897-5p	MMAT0007864	5'-CUUUGGAGGAGGAAAGAGGGGG-3'	No	2.257
miR-300-5p	MMAT0004578	5'-UUAAGAGAGGUAUACCUUUGU-3'	Yes	2.262
miR-1196-5p	MMAT0005857	5'-AAAUACUCCUGCCUCGCU-3'	No	2.488
miR-302a-3p	MMAT0000380	5'-UAAUGUCUCCUUGUUGUGA-3'	Yes	2.525
miR-133b-3p	MMAT0000769	5'-UUGGUCUCCUUCACACGUA-3'	Yes	3.134
miR-1947-3p	MMAT0017343	5'-GCUCAGGUCUCCUCCUCC-3'	No	6.173
miR-3100-3p	MMAT0014920	5'-CUGUGACACCCGUCUCCAG-3'	No	6.410
miR-3474	MMAT0015646	5'-CCUUGGAGGAGGUGGAUUC-3'	No	12.195

表 1.

これらの発現変動の認められた microRNAs のうち、miR-140-3p および miR-140-5p に着目し、以下の検討を行った。

アレルギー性気管支喘息時の気管支平滑筋 RhoA up-regulation における miR-140-3p の役割: まず上記マイクロアレイの結果について real-time RT-PCR 法を用いて確認したところ、図 1 に示すように喘息マウスの気管支平滑筋組織において miR-140-3p 発現レベルの有意な低下が認められた。

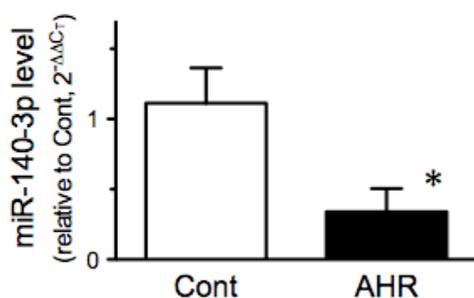


図 1.

バイオインフォマティク解析の結果、この miR-140-3p の標的遺伝子の一つとしてマウスおよびヒトにおいて RhoA が予測された(図 2)。

喘息マウスの気管支平滑筋組織における RhoA 発現について検討を行ったところ、我々のこれまでの報告同様 RhoA タンパク質発現レベルの著明かつ有意な増加が認められた(図 3A)、RhoA mRNA 発現レベルはコントロールレベルであった(図 3B)。したがって、喘息時の気管支平滑筋における RhoA up-regulation には、その翻訳レベルでの変化が関与している可能性が示唆された。

次に hBSMCs を用いて検討を行った。hBSMCs に miR-140-3p inhibitor を transfect したところ、RhoA タンパク質発現の有意な増加が認められた(図 4)。さらに、hBSMCs に IL-13 を処置することにより、抗原誘発 AHR マウスの気管支平滑筋組織で認められたような RhoA up-regulation が惹起された(図 5)。一方、miR-140-3p mimic を transfect した hBSMCs において、この IL-13 誘発 RhoA

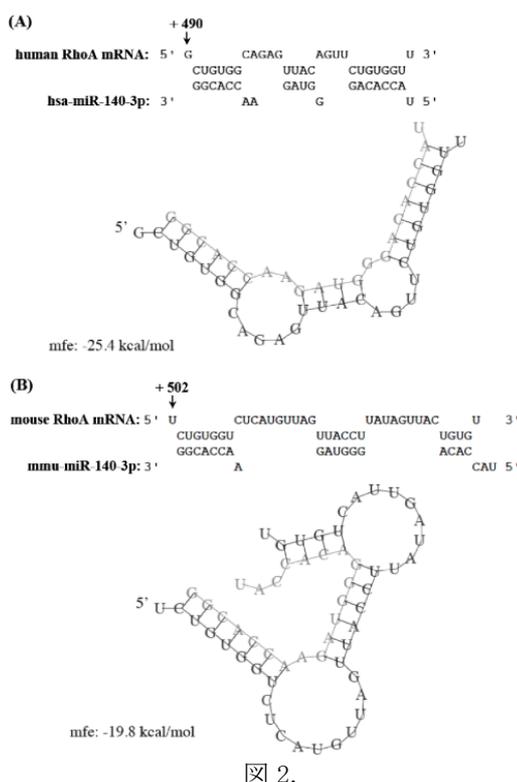


図 2.

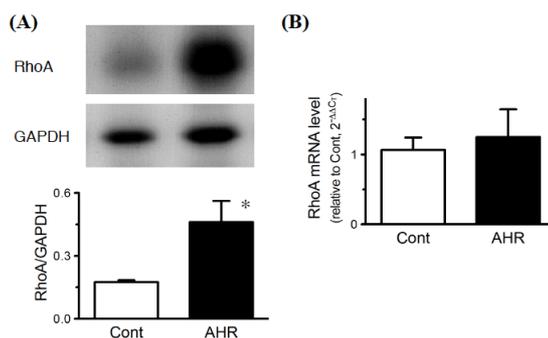


図 3.

up-regulation が有意に抑制された(図 5)。さらに、IL-13 処置した hBSMCs において、miR-140-3p 発現が有意に低下していた(図 6A)。したがって、喘息時に気道局所で増加する IL-13 が miR-140-3p の down-regulation を引き起こし、その結果 RhoA translation が亢進して AHR が惹起される可能性が示唆された。一方、IL-13 処置した hBSMCs において、わずかではあるものの有意な RhoA mRNA 発現の増加も認められ(図 6B)、これも喘息時の RhoA タンパク質 up-regulation に一部関与している可能性が示唆された。

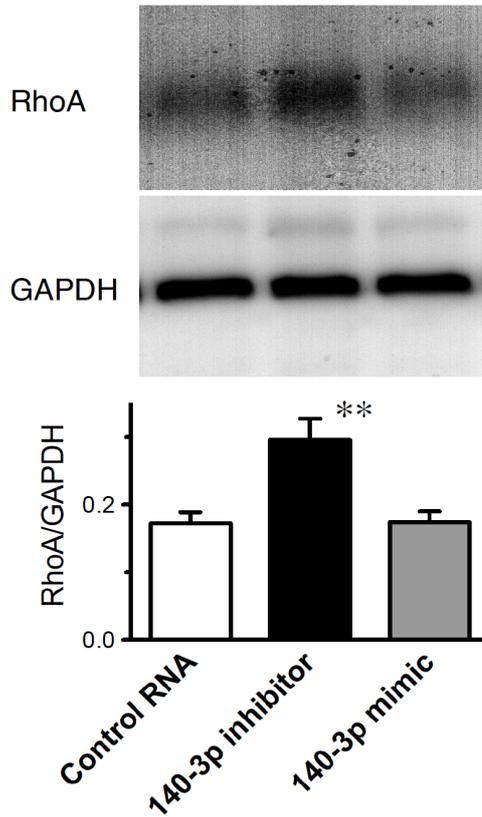


図 4.

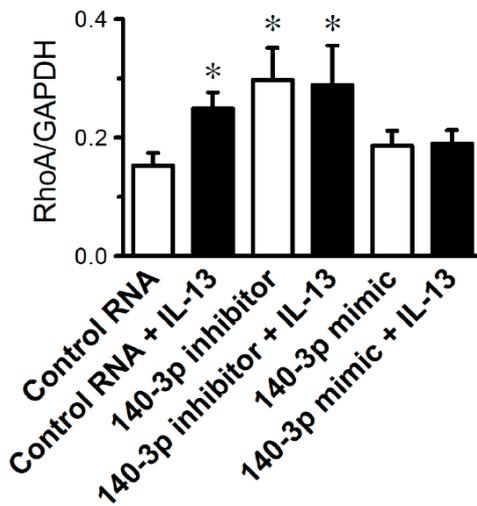


図 5.

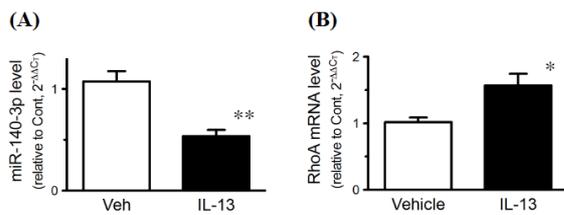


図 6.

miR-140-3p のターゲットとしての CD38

の可能性: 図 1 や図 6A に示したように、アレルギー性気管支喘息時の気管支平滑筋細胞において miR-140-3p の down-regulation を証明し、上述の通り、この miR-140-3p のターゲットの一つとして RhoA の可能性を示した。しかしながら、ある microRNA のターゲットとして複数の遺伝子が存在することが予想され、実際にバイオフィオマティック解析の結果、図 7 に示すように、CD38 mRNA も miR-140-3p のターゲットとなることが予想された。そこで次に、CD38 に焦点を当てて検討を行った。

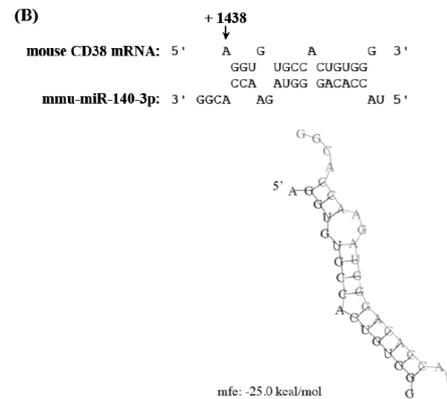
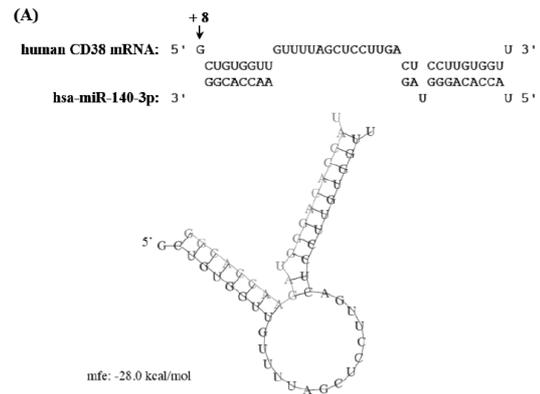


図 7.

喘息マウスの気管支平滑筋組織における CD38 発現について検討を行ったところ、CD38 タンパク質発現レベルの著明かつ有意な増加が認められたが(図 8A)、CD38 mRNA 発現レ

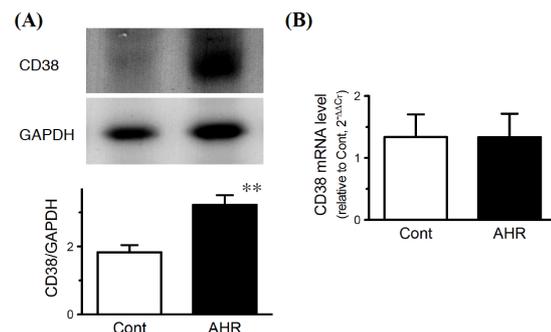


図 8.

ベルはコントロールレベルであった(図 8B)。したがって、喘息時の気管支平滑筋における CD38 up-regulation には、その翻訳レベルでの変化が関与している可能性が示唆された。

次に hBSMCs を用いて検討を行った。hBSMCs に miR-140-3p inhibitor を transfect したところ、CD38 タンパク質発現の有意な増加が認められた(図 9)。さらに、hBSMCs に IL-13

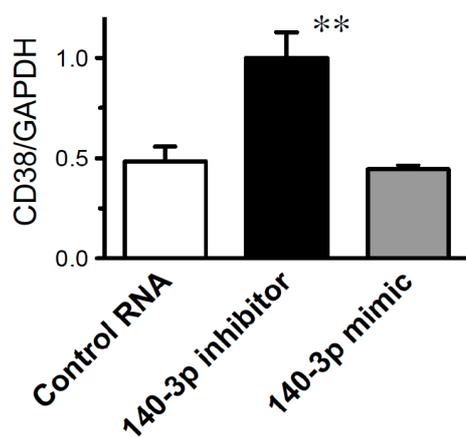
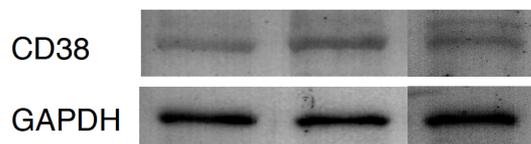


図 9.

を処置することにより、抗原誘発 AHR マウスの気管支平滑筋組織で認められたような CD38 up-regulation が惹起された(図 10)。

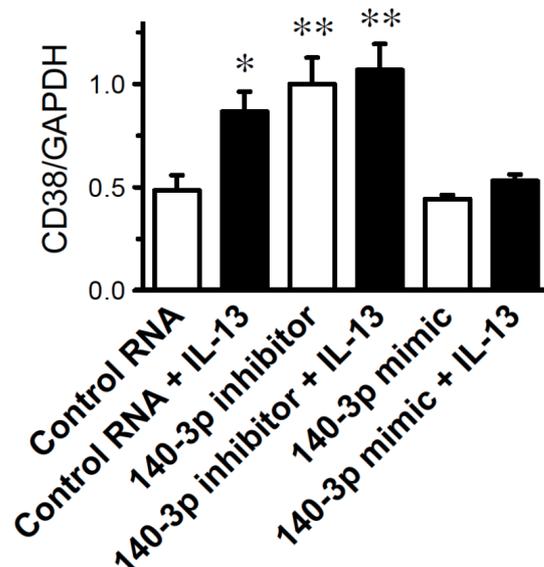
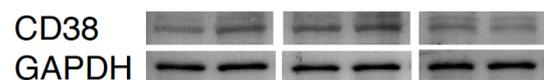


図 10.

一方、miR-140-3p mimic を transfect した hBSMCs において、この IL-13 誘発 CD38

up-regulation が有意に抑制された(図 10)。さらに、IL-13 処置した hBSMCs において、miR-140-3p 発現が有意に低下しており(図 11A)、このとき CD38 mRNA 発現レベルはコントロールレベルであった(図 11B)。したがって

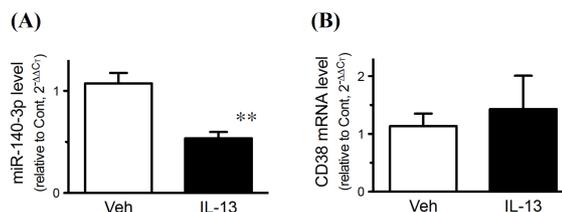


図 11.

て、喘息時に気道局所で増加する IL-13 が miR-140-3p の down-regulation を引き起こし、その結果 CD38 translation が亢進して AHR が惹起される可能性が示唆された。一方、CD38 はその活性化により cyclic ADP-ribose (cADPR) を産生し、この cADPR が細胞内 Ca²⁺ 濃度を上昇させることが報告されている。しかしながら平滑筋細胞における機能については不明な点が多い。そこで次に、マウス摘出気管支平滑筋の張力に及ぼす cADPR およびその antagonist である 8-Br-cADPR の効果について検討を行った。まず baseline tension に及ぼす効果について検討を行ったところ、cADPR および 8-Br-cADPR ともに収縮も弛緩も認められなかった (data not shown)。さらに、あらかじめ acetylcholine (10⁻⁵ M) にて収縮させた気管支平滑筋組織においても、cADPR および 8-Br-cADPR ともに影響を及ぼさなかった(図 12)。したがって、気管支平滑

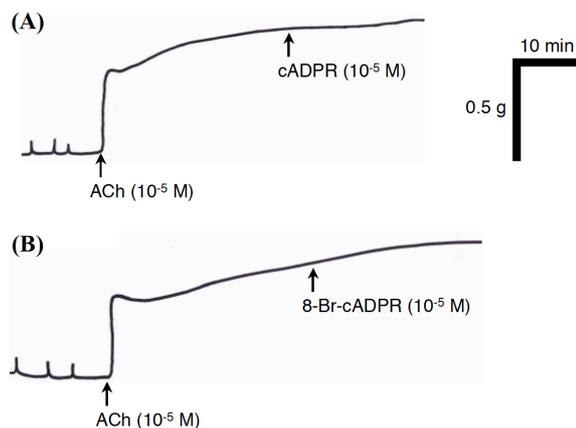


図 12.

筋における CD38 の機能について、さらに喘息時の気道過敏性発現における CD38 の役割について、今後さらに詳細に検討していく必要がある。

アレルギー性気管支喘息時の気管支平滑筋 TLR4 up-regulation における miR-140-5p の役割:

(紙数の都合で割愛)

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 13 件)

1. Chiba, Y., Todoroki, M. and Misawa, M. Antigen exposure causes activations of signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) and STAT1, but not STAT3, in lungs of sensitized mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **33**, 43-48, 2011.
2. Chiba, Y., Takeuchi, H., Sakai, H. and Misawa, M. Sphingosine-1-phosphate augments agonist-mediated contraction in bronchial smooth muscles of mice. *Pharmacol. Rep.* **63**, 544-547, 2011.
3. Sakai, H., Fujita, A., Watanabe, A., Chiba, Y., Kamei, J. and Misawa, M. Different effects of smoke from heavy and light cigarettes on induction of bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in rats. *J. Smooth Muscle Res.* **47**, 1-10, 2011.
4. Sakai, H., Enzaka, J., Sakai-Oshita, M., Chiba, Y. and Misawa, M. Involvement of K⁺ channels in the augmented nasal venous responsiveness to nitric oxide in rat model of allergic rhinitis. *Microvas. Res.* **81**, 129-134, 2011.
5. Sakai, H., Hirahara, M., Chiba, Y. and Misawa, M. Antigen-challenge influences various transcription factors of rat bronchus: Protein/DNA array study. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 1133-1136, 2011.
6. Chiba, Y., Goto, K. and Misawa, M. Interleukin-13-induced activation of signal transducer and activator of transcription 6 is mediated by an activation of Janus kinase 1 in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Pharmacol. Rep.* **64**, 454-458, 2012.
7. Yu, Y., Sakai, H., Misawa, M. and Chiba, Y. Matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) and -12 are upregulated in the airways of mice with chronic airway inflammation and remodeling. *ISRN Pulmonology* 2012, Article ID 840489, 7 pages, 2012.
8. Yoshioka, N., Hanazaki, M., Fujita, Y., Nakatsuka, H., Katayama, H. and Chiba, Y. Effect of sugammadex on bronchial smooth muscle function in rats. *J. Smooth Muscle Res.* **48**, 59-64, 2012.
9. Sakai, H., Watanabe, Y., Honda, M., Tsuiki, R. Ueda, Y., Nagai, Y., Narita, M. and Chiba, Y. Involvement of the Tyr kinase/JNK pathway in carbachol-induced bronchial smooth muscle contraction in the rat. *Anesthesiology* **118**, 1076-1085, 2013.
10. Sakai, H., Hara, T., Todoroki, K., Igarashi, Y., Misawa, M., Narita, M. and Chiba, Y. Elevated guanylate cyclase and cyclic-guanosine monophosphate-dependent protein kinase levels in nasal mucosae of antigen-challenged rats. *Microvas. Res.* **90**, 150-153, 2013.
11. Sakai, H., Sato, K., Takase, K., Hirosaki, A., Jo, A., Sugiyama, R., Chiba, Y. and Narita, M. The gene expression of aquaporins in various cutaneous tissues of the mouse. *J. Exp. Integr. Med.* **4**, 75-79, 2014.
12. Sakai, H., Sagara, A., Arakawa, K., Sugiyama, R., Hirosaki, A., Takase, K., Jo, A., Sato, K., Chiba, Y., Yamazaki, M., Matoba, M. and Narita, M. Mechanisms of cisplatin-induced muscle atrophy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (in press).
13. Sakai, H., Watanabe, A., Fujita, A., Misawa, M., Narita, M. and Chiba, Y. Augmented bronchial smooth muscle contractility induced by aqueous cigarette smoke extract in rats. *J. Smooth Muscle Res.* (in press).

[学会発表] (計 14 件)

1. Yoshihiko Chiba, et al. Effects of systemic treatment with immunosuppressants on rat airway smooth muscle contraction. *Anesthesiology* 2011, Oct 15-19, 2011, CA USA.
2. 千葉義彦, 酒井寛泰, ほか. 気道の薬理学的研究 (第

352 報): Soluble epoxide hydrolase 阻害薬による抗原誘発気管支平滑筋過敏性発現の抑制. 第 125 回日本薬理学会関東部会. 2011 年 10 月 15 日. 千葉.

3. 千葉義彦, ほか. 気道の薬理学的研究 (第 353 報): 培養ヒト気管支平滑筋細胞の IL-13 誘発 STAT6 活性化における JAK1 の関与. 日本薬学会第 132 年会. 2012 年 3 月 29 日. 札幌.
4. 千葉義彦, ほか. スガマデクスが気道平滑筋収縮に及ぼす影響. 日本麻酔科学会第 59 回学術集会. 2012 年 6 月 8 日. 神戸.
5. Yoshihiko Chiba, et al. Effects of systemic treatment with immunosuppressants on rat airway smooth muscle contraction. *Anesthesiology* 2012, Oct 15, 2012, DC USA.
6. 千葉義彦, 酒井寛泰, ほか. アレルギー性気管支喘息時の気管支平滑筋細胞において miR-140-3p down-regulation が CD38 up-regulation をもたらす. 第 86 回日本薬理学会年会. 2013 年 3 月 22 日. 福岡.
7. 千葉義彦, 酒井寛泰, ほか. アレルギー気管支喘息時の気管支平滑筋 RhoA up-regulation における miR-140-3p の役割. 日本薬学会第 133 年会. 2013 年 3 月 30 日. 横浜.
8. 千葉義彦, 酒井寛泰, ほか. 苦味受容体である T2R8 遺伝子の組織発現分布ならびに T2R8 を介した平滑筋弛緩作用. 日本薬学会第 133 年会. 2013 年 3 月 30 日. 横浜.
9. Yoshihiko Chiba, et al. Effect of rocuronium-sugammadex clathrate on rat airway smooth muscle contraction. *Anesthesiology* 2013, Oct 14, 2013, CA USA.
10. 千葉義彦, 酒井寛泰, ほか. 培養ヒト気管支平滑筋細胞における interleukin-17A による RhoA タンパク質発現の増加. 第 87 回日本薬理学会年会. 2014 年 3 月 21 日. 仙台.
11. 千葉義彦, 酒井寛泰, ほか. 培養ヒト気管支平滑筋細胞における RhoA 発現に対する LIGHT の効果. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 30 日. 熊本.
12. 千葉義彦, 酒井寛泰, ほか. アレルギー性気管支喘息時の気管支平滑筋 RhoA 発現に及ぼす TSLP の役割. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 30 日. 熊本.
13. 千葉義彦, 酒井寛泰, ほか. アレルギー性気管支喘息時の気管支平滑筋過敏性発現における interleukin-17 の役割. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 30 日. 熊本.
14. 千葉義彦, 酒井寛泰, ほか. アレルギー性気管支喘息時の気管支平滑筋 TLR4 up-regulation における miR-140-5p の役割. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 30 日. 熊本.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hoshi.ac.jp/home/kyoiku/kyoushitsu/hgai/d/25kyoushitsu.seibutsu.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
千葉義彦 (CHIBA YOSHIHIKO)
星薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 00287848
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
酒井寛泰 (SAKAI HIROYASU)
星薬科大学・薬学部・講師
研究者番号: 00328923