

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 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：2011～2013

課題番号：23591127

研究課題名(和文)長時間作用性 2 刺激薬による気道粘液分泌亢進と気道クリアランス障害の分子病態

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of airway mucus hypersecretion and airway clearance dysfunction induced by long-acting beta-2 agonist

研究代表者

玉置 淳(Tamaoki, Jun)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：60147395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：マウス気管上皮細胞におけるDNA合成およびタンパク合成を測定した実験系では、サルメテロールの存在下で濃度依存的に増加し、 β_2 受容体アンタゴニストにより完全に抑制された。また、サルメテロール刺激は上皮細胞EGFRのリン酸化とMUC5AC発現を誘導し、これらの反応はEGFRチロシンリン酸化阻害薬やH-Rasのdominant negative mutantにより有意に抑制されたことより、上記の細胞内シグナル伝達におけるRas-ERKの関与が示唆された。さらに、サルメテロールはマウス気管粘膜における粘液線毛輸送速度や線毛運動周波数を増加させ、気道クリアランスの賦活作用を有することも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Stimulation of mouse tracheal epithelial cells with the long-acting beta-2 agonist salmeterol increased DNA and protein synthesis in a concentration-dependent manner, an effect that was abolished in the presence of a specific beta-2 receptor antagonist. Salmeterol also induced phosphorylation of EGFR and upregulated the expression of MUC5AC in cultured tracheal epithelial cells, and these effects were significantly inhibited by a EGFR tyrosine kinase inhibitor and transfection of dominant negative mutant of H-Ras, indicating that Ras-ERK cascade may be involved in the salmeterol-induced cell responses. Moreover, salmeterol increased mucociliary transport rate from the carina toward oropharynx in the mouse airway. Ciliary beat frequency of tracheal epithelial cells determined by a photoelectric method was increased in response to salmeterol. These findings suggest that stimulation of airway epithelial cells with long-acting beta-2 agonist causes an improvement of airway clearance.

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

キーワード：気道クリアランス 粘液線毛輸送 気道上皮細胞 線毛運動 β_2 受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 長時間作用性₂刺激薬は、強力かつ長時間にわたる気管支拡張効果を発揮することから、吸入ステロイドとならんで喘息のコントローラー治療に広く用いられている。ところが、本薬剤の長期使用による有害事象として喘息の増悪や気道過敏性の亢進が報告されており、2010年米国食品医薬品局 (FDA) は、喘息に対する長時間作用性₂刺激薬を単独使用することを禁忌とした。そのメカニズムは不明であるが、₂刺激薬による G 蛋白共役受容体の刺激が Ras-ERK (extracellular signal-regulated kinase)カスケードを活性化させ細胞増殖を亢進させることが報告された (Cell 80: 179-185, 1995)。また、このような細胞反応における上皮成長因子受容体 (EGFR) とそれに関連する様々なアダプター分子との会合の役割が明らかにされ (Curr Opin Cell Biol 11: 177-183, 1999)、さらに近年では EGFR のリン酸化には HB (heparin binding)-EGF が内因性のリガンドとして重要であることも想定されていた。

(2) 一方我々は、これまでに気道上皮細胞における cAMP の増加が線毛運動を亢進させること (Am J Physiol 268: C1342-C1347, 1995)、上皮細胞の増殖・分化を促進させること (Eur Respir J 20: 353-358, 2002) を報告し、また EGFR の活性化が気道ムチンの発現を遺伝子レベルで亢進させることも明らかにしてきた (Clin Exp Allergy 38: 857-865, 2008)。このような従来の研究成果を踏まえ、今回は長時間作用性₂刺激薬による喘息の増悪において、粘液分泌の亢進、気道クリアランスの障害、気道リモデリングに基づく気道過敏性の亢進などが重要な役割を果たしている可能性を想定した。さらに、これらの病態は EGFR から Ras-ERK に至る細胞内シグナル伝達を介する可能性も推測された。

2. 研究の目的

本研究では、気道粘液分泌、気道クリアランス、気道リモデリングに対する長時間作用性₂刺激薬の影響を検討し、その細胞内メカニズムを解明するとともに、シグナル伝達に関わる分子群を同定することを目的とした。(1) マウス気管上皮細胞を長時間作用性₂刺激薬 (サルメテロール) の存在下で培養し、細胞増殖を評価するため、DNA 合成とタンパク合成の測定を行う (Am J Physiol 287: L1127-L1133, 2004)。

(2) 上記と同様の実験系において、EGFR 遺伝子の発現と EGFR 蛋白のリン酸化を検討する。

(3) また、同様にマウス気管上皮細胞をサルメテロールの存在下で培養し、MAC5AC の遺伝子およびタンパク発現に与える影響を

検討する。

(4) さらに、HB-EGF の遺伝子発現と蛋白の shedding から EGFR のリン酸化、さらに Ras の活性化に至る過程で惹起される種々のアダプター分子のアセンブリー、Ras-ERK カスケードの活性化などの関与を明らかにする。

(5) また、in vivo の系における気道クリアランスを評価する目的で、マウス気管粘膜表面に滴下した Evans blue dye の移動速度を測定する。さらに培養上皮細胞を用い、photoelectric 法により線毛運動周波数に対するサルメテロールの効果を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

本研究では、in vitro と in vivo の 2 実験系を用いて遂行した。In vitro の系では培養上皮細胞の増殖・分化、ムチン (MAC5AC) 遺伝子および蛋白発現、細胞内シグナル伝達分子 (EGFR~Ras-ERK カスケード) 活性化の評価を行い、また線毛運動周波数の反応性は photoelectric 法により測定した。Ex vivo ではマウス気管粘膜における Evans blue dye の移動速度を測定し、粘液線毛輸送能の指標とした。

(1) マウス気管粘膜より採取した上皮細胞を種々の濃度のサルメテロールの存在下で最長 72 時間まで培養し、タンパク合成と DNA 合成の指標として、各々 [³H]-thymidine と [³H]-leucine の取り込みを評価した。すなわち、培養終了前に 1 μCi/ml の [³H]-thymidine あるいは [³H]-leucine を添加し、細胞内におけるトリクロロ酢酸非溶解の放射活性を測定した。ムチン分泌は、サルメテロール刺激による MAC5AC mRNA 発現を RT-PCR と Northern blot により評価し、MAC5AC 蛋白の発現は免疫染色によって確認した。また、これらの反応において実際に₂受容体の活性化を介しているか否かを確認する目的で、選択的₂受容体ブロッカー (ICI-118551) を添加しその影響を観察した。さらに、Ras-ERK カスケードの関与を明らかにするため、アデノウイルスにて dominant-negative Ras mutant (AdRasY57) を上皮細胞にトランスフェクトした系でサルメテロールの効果も検討した。

(2) ERK の活性化は、免疫細胞化学と Western blot にて評価した。サルメテロールとともに培養した気道上皮細胞において、ERK (非活性化型) とリン酸化 ERK (活性化型) のそれぞれのモノクローナル抗体を用いた免疫染色を施し、また、Northern blot と Western blot により、サルメテロール刺激によるリン酸化 ERK mRNA の発現および同蛋白発現を解析した。さらに、ERK の直接的な評価として、培養上清中の ERK 活性を phenylmethyl sulfonyl fluoride の存在下でアッセイキッ

ト (Amersham BioTec) を用いた測定を行った。

(3) アダプター分子の会合の解析は、EGFR と Grb2 関連蛋白のイムノプロット解析を行い、サルメテロールによる EGFR のリン酸化以降の細胞内シグナル、特に Ras-ERK カスケードの関与を検討した。本実験では GST (glutathione-S-transferase)-Grb2 fusion protein を用いて、サルメテロール刺激による EGFR および Shc の発現を観察し、またアダプター分子の会合における HB-EGF の役割を解明するため、Shc のリン酸化に対する [Glu⁵²]diphtheria toxin (特異的 HB-EGF ブロッカー) の阻害効果を検討した。

(4) HB-EGF の shedding と metalloproteinase の関与をさらに検証するため、ERK リン酸化に対する [Glu⁵²]diphtheria toxin の効果を検討した。また、HB-EGF の産生・遊離における metalloproteinase の役割については、細胞上清中の酵素活性を ELISA にて測定し、さらに EGFR のチロシンリン酸化に対する選択的 metalloproteinase 阻害薬の効果を検討することによって評価した。

(5) 気道上皮細胞の線毛運動周波数 (in vitro) は、マウス気管上皮細胞を Rose chamber にマウントし、種々の濃度のサルメテロールを灌流し、線毛運動周波数を photoelectric 法により測定しフーリエ解析を行った。

(6) 粘液線毛輸送・気道クリアランスは、マウスを麻酔し、気管を縦切開し粘膜表面を露出させ、気管分岐部直上に Evans blue dye (1 μl) を滴下し、サルメテロールを大腿静脈より投与した。次いで経時的に気管を摘出し、近位部から遠位部まで 4 等分し、各々の組織片中の色素量を測定することにより、粘液線毛輸送速度を評価した (Am J Physiol 282: L566-L562, 2002)。

4. 研究成果

(1) マウス気管上皮細胞をサルメテロール (1nM~100 μM) の存在下で培養し、一方コントロール群では生理食塩水のみを添加して同様に培養を行った。DNA 合成およびタンパク合成は、各々細胞への [³H]-thymidine と [³H]-leucine の取り込みにより評価した。その結果、サルメテロール群では DNA 合成、タンパク合成ともに濃度依存的に増加が認められた。選択的アゴニストであるドブタミン、₃アゴニストである CL316243 による刺激も行ったが、これらの薬剤ではいずれの合成も観察されなかった。また、₂受容体アンタゴニストであるプロプラノロールによる前処置を行うと、サルメテロールの効果は完全に消失したことより、気道上皮細胞の ₂受容体を介する反応であることが確認され

た。次に、サルメテロールの効果における EGFR の関与を検討するため、リン酸化 EGFR モノクローナル抗体を用いて免疫染色を行ったところ、サルメテロール刺激により EGFR のリン酸化が誘導された。さらに、EGFR チロシンリン酸化阻害薬である AG1478 および BIBX1382 は、上皮細胞の無刺激状態における DNA およびタンパク合成自体に影響を与えなかったが、サルメテロールに対する反応を抑制した。次いで、細胞内シグナル伝達における Ras-MEK-ERK カスケードの役割も検討し、上皮細胞に H-Ras の dominant negative mutant (AdRas57) を移入することにより、[³H]-thymidine と [³H]-leucine の取り込みが有意に抑制された。

(2) 上記の同様の系の実験において、サルメテロール存在下で培養したマウス気管上皮細胞の MAC5AC mRNA の発現を RT-PCR 法と Northern blot 法により評価すると、このようなムチン遺伝子の発現が時間および濃度依存的に誘導された。また、上記のいずれの効果も、₂受容体の選択的アンタゴニストである ICI-118551 の前投与により消失した。さらに、サルメテロールの投与後に ERK (非活性型) とリン酸化 ERK (活性型) のそれぞれのモノクローナル抗体を用いた免疫染色を行うとともに、Western blot を施行した。その結果、サルメテロールはリン酸化 ERK の発現を惹起し、さらにメタロプロテアーゼ阻害薬の存在下で測定した ERK 活性も濃度依存的に増加した。アダプター分子の会合を検討するため、EGFR と Grb2 関連タンパクのイムノプロット解析を行った実験では、サルメテロールによる EGFR リン酸化以降の細胞内シグナル 特に関与について評価した。サルメテロール刺激は EGFR および Shc の発現を誘導することが判明し、Shc のリン酸化と得的 HB-EGF ブロッカーであるジフテリアトキシンによって有意に抑制された。

(3) マウス気管上皮細胞の線毛運動周波数は、定常状態では 15~16Hz であったが、サルメテロールの添加により濃度依存的に増加し、最大増加率は 20% 程度であった。以上の効果は、ICI-118551 の前投与によりほぼ完全に消失した。また、in vivo で測定したマウス気管粘膜における粘液線毛輸送速度は、気管粘膜表面に滴下した Evans blue dye がサルメテロールの投与により用量依存的に増加し、₂受容体刺激を介する気道クリアランスの改善効果が認められた。

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 12 件)

1. 玉置淳：経皮吸収型製剤の位置づけと使い方 2014：気管支喘息：気道クリアラン

- ス改善に注目して. Medicament News 2152: 12-13, 2014, 査読無
2. 玉置淳. 粘液線毛輸送系による気道クリアリング: 気道炎症・感染症におけるマクロライドの可能性. 化学療法の領域 29: 1542-1554, 2013, 査読無
 3. 近藤光子, 玉置淳. 喘息・アレルギーと遺伝子 Up-To-Date: 喘息治療の薬理遺伝学. 喘息 26: 42-47, 2013, 査読無
 4. 玉置淳. 気管支喘息の phenotype. 呼吸と循環 61: 349-355, 2013, 査読無
 5. 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. 日本内科学会雑誌 101: 3525-3532, 2012, 査読有
 6. Arimura K, Aoshiba K, Tsuji T, Tamaoki J. Chronic low-grade systemic inflammation causes DNA damage in the lungs of mice. Lung 190: 613-620, 2012, 査読有
 7. Tamaoki J, Saito H. Diagnosis, evaluation and monitoring of asthma. Allergology International 61: 351-352, 2012, 査読有
 8. 玉置淳. 慢性気道疾患における咳・痰のリスクと治療: 主に COPD 患者の喀痰・咳症状を理解し治療することの意義. Therapeutic Research 33: 897-904, 2012, 査読無
 9. 玉置淳. 生物学的製剤を用いた分子標的治療の進歩: 重症難治性喘息の治療における生物学製剤の役割. 東京女子医科大学雑誌 82: 92-96, 2012, 査読有
 10. Kondo M, Nakata J, Arai N, Izumo T, Takeyama K, Tamaoki J, Nagai A. Niflumic acid inhibits goblet cell degranulation in asthma model of guinea pigs. Allergology International 61: 133-142, 2012, 査読有
 11. 玉置淳. 気道の粘液線毛輸送に対するツロブテロールの効果と作用メカニズムに関する検討. アレルギー・免疫 18: 1530-1539, 2011, 査読有
 12. 玉置淳. 気管支喘息および COPD における気道粘液分泌亢進の意義. Results in Asthma/COPD 10: 1-6, 2011, 査読無
- [学会発表](計 15 件)
1. 玉置淳. シンポジウム: 呼吸器感染症における炎症制御: 気道過分泌および粘液線毛輸送の調節. 第 54 回日本呼吸器学会総会. 2014 年 4 月, 大阪. 日呼吸会誌 3 (増刊号): 106 2014.
 2. 玉置淳. 教育講演: 気道クリアランス障害の病態と対策. 第 54 回日本呼吸器学会総会. 2014 年 4 月, 大阪. 日呼吸会誌 3 (増刊号): 81, 2014.
 3. 切土紗織, 多賀谷悦子, 寺西香織, 溝淵莉恵, 久保綾子, 石井成伸, 武山廉, 磯野一雄, 近藤光子, 玉置淳. Role of budesonide/formoterol combination in the treatment of cough variant asthma: comparison with fluticasone monotherapy. 第 54 回日本呼吸器学会総会. 2014 年 4 月, 大阪. 日呼吸会誌 3 (増刊号): 331, 2014.
 4. 近藤光子, 新井尚希, 有村健, 中田潤子, 多賀谷悦子, 武山廉, 玉置淳. モルモット喘息モデルにおける Transmembrane protein 16A の発現. 第 54 回日本呼吸器学会総会. 2014 年 4 月, 大阪. 日呼吸会誌 3 (増刊号): 255, 2014.
 5. 辻真世子, 森島正, 清水一彦, 北原秀治, 玉置淳, 久米努, 江崎太一. Foxc2 ノックアウトマウスにおける肺成熟過程の組織学的解析. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2014 年 3 月, 宇都宮
 6. Tamaoki J. Invited lecture: Regulation of airway cleaning in inflammatory airway diseases. 8th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology. Nov 2013, Yokohama.
 7. 玉置淳. シンポジウム: 気道クリアランス: 気道における粘液線毛輸送系の制御機構と病態. 第 23 回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術集会. 2013 年 10 月, 東京. 日呼ケアリハ学誌 23 (Supl): 111S, 2013.
 8. Arimura K, Aoshiba K, Tsuji T, Tamaoki J. Chronic low-grade systemic inflammation causes DNA damage in the lungs of mice. European Respiratory Society Annual Meeting 2013. Sep 2013, Barcelona.
 9. Tamaoki J. Symposium: Management of mucus secretion airway diseases: Role of airway hypersecretion in COPD exacerbations. 16th Asian Research Symposium in Rhinology. Aug 2013, Yokohama.
 10. Tamaoki J. Symposium: Novel action of macrolide antibiotics: The mechanism of action & future prospects: Regulation of airway clearance in inflammatory airway diseases. The 28th International Congress of Chemotherapy and Infection. June 2013, Yokohama.
 11. 玉置淳. シンポジウム: アレルギー疾患治療におけるステロイド薬の標準化: 喘息. 第 53 回日本呼吸器学会総会. 2013 年 4 月, 東京. 日呼吸会誌 2 (増刊号): 16, 2013.
 12. 多賀谷悦子, 切土紗織, 新井尚希, 奥出梓, 難波麻衣, 近藤光子, 玉置淳. COPD 患者における粘液の過剰分泌および粘液線毛クリアランスにおけるチオトロピウムの効果. 第 62 回日本アレルギー秋季学術大会. 2012 年 11 月, 大阪.
 13. Kondo M, Nakata J, Arai 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. Annual Meeting of The American Thoracic Society. May 2012, San Francisco.

14. Tagaya E, Tamaoki J, Kirishi S, Isono K, Nagaoka M, Kimura N, Kondo M, Nagai A. Effect of tiotropium on mucus hypersecretion and their impact and nasal mucociliary clearance in patients with COPD. Annual Meeting of The American Thoracic Society. May 2012, San Francisco.
15. 玉置淳. 長時間作用性抗コリン薬と COPD 治療：気管支拡張を超えて：チオトロピウムと気道分泌に関する最新の話題 . 第 52 回日本呼吸器学会総会 2012 年 4 月 , 神戸 . 日呼吸会誌 1(増刊号): 26, 2012.

〔図書〕(計 5 件)

1. Kondo M, Nakata J, Arai N, Tagaya E, Takeyama K, Tamaoki J. The inhibitory effect of niflumic acid on goblet cell degranulation in asthma model of guinea pigs. In: Airway Secretion Research. ed, Tamaoki J. Japanese Association for Airway Secretion Research, Tokyo 2014, p5-p14
2. 玉置淳, 八木理充, 落合克律. 風邪症候群と関連疾患：気管・気管支炎, 肺炎 . ENT 臨床フロンティアシリーズ . 小林俊光, 高橋晴雄, 浦野正美編 . 中山書店, 東京, 2013, p86-p91.
3. 玉置淳, 磯野一雄, 多賀谷悦子, 武山廉 . 薬物療法 . 第 18 回 3 学会合同呼吸療法認定士認定講習会テキスト . 3 学会合同呼吸療法認定士認定委員会編 . 呼吸療法認定士認定委員会事務局 . 東京 . 2013 . p165-p185
4. 玉置淳 . COPD 病態理解のための基礎知識：気道分泌とその障害：慢性閉塞性肺疾患 (COPD) のマネジメント 改訂 3 版 . 橋本修編 . 医薬ジャーナル社 , 東京 , 2013, p66-p70.
5. 玉置淳 . アレルギー性肺疾患：職業性喘

息 . 医学のあゆみ 「呼吸器疾患 State of Arts」 Ver. 6 . 北村諭, 巽浩一郎, 石井芳樹編 . 医歯薬出版, 東京, 2013, p227-p229.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

玉置 淳 (TAMAOKI JUN)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：60147395