

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591456

研究課題名(和文)プロトン感知性受容体刺激のアレルギー性気道炎症と線維化へ及ぼす影響に関する研究

研究課題名(英文)Possible involvements of proton-sensing receptors in allergic airway inflammation and fibrosis

研究代表者

石塚 全 (ISHIZUKA, TAMOTSU)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：50302477

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)：プロトン感知性受容体Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 (OGR1)は細胞外プロトンによって活性化される。OGR1ノックアウトマウスを用いて作成したアレルギー性喘息モデルでは野生型マウスと比較して、気道への好酸球集積、気道過敏性亢進、気道上皮細胞の杯細胞化といった主要な徴候が抑制された。また、ヒト気管支平滑筋細胞は細胞外酸性刺激によりConnective tissue growth factor (CTGF)を産生し、酸性条件下ではTransforming growth factor-beta刺激によるCTGF産生は著明に増強した。

研究成果の概要(英文)：Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 (OGR1) stimulation by extracellular protons causes the activation of G proteins and subsequent cellular functions. We showed that OGR1-deficient mice are resistant to the cardinal features of asthma, including airway eosinophilia, airway hyperresponsiveness, and goblet cell metaplasia in a murine allergic asthma model. On the other hand, acidic pH alone induced a substantial production of connective tissue growth factor (CTGF) and enhanced transforming growth factor-beta-induced CTGF mRNA and protein expression through OGR1 in human airway smooth muscle cells. Our results suggest that OGR1 plays an important role in the pathogenesis of allergic airway inflammation and airway remodelling and OGR1 may be a therapeutic target of asthma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：プロトン OGR1 GPCR 気道炎症 気管支喘息 樹状細胞 気管支平滑筋

1. 研究開始当初の背景

細胞外酸性の慢性気道炎症へ及ぼす影響に関して細胞レベルでの機能解析を行っている。血液の酸塩基平衡は厳格に pH 7.35~7.45 に保たれているが、気道炎症巣では細胞外環境が酸性へ傾くことが知られており、気管支喘息患者の気道炎症局所では pH が 5.2 まで低下することが報告されている。酸を感知するメカニズムとして知覚神経に存在するカプサイシン感受性 TRPV1 イオンチャンネル型受容体や ASIC (acid-sensing ion channel: 酸感受性イオンチャンネル) が知られていた。近年、脂質をリガンドとすると推定されていた三量体 G 蛋白質共役型受容体(GPCR)が細胞外のプロトン(H⁺)を感知し、活性化することが明らかにされてきた。現在までにプロトン感知性受容体として Ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1)、GPR4、T cell death-associated gene 8 (TDAG8)、G2A の 4 種類の受容体が同定されている。

2. 研究の目的

ヒト気管支平滑筋細胞からのプロトン感知性受容体 OGR1 を介するサイトカインや増殖因子の産生機構を細胞レベルで解明するとともに、OGR1 ノックアウトマウスを用いて、アレルギー性喘息モデルを解析し、アレルギー性気道炎症、気道リモデリング、におけるプロトンおよび OGR1 の病態への関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 正常ヒト気管支平滑筋細胞 (BSMC) からのプロトン刺激による Connective tissue growth factor (CTGF) 産生の検討

正常ヒト気管支平滑筋細胞 (BSMC) は 10% FBS、Insulin、EGF、basic FGF を含む D-MEM 培養液中で培養する。12 well プレートで培養した BSMC を 0.1% BSA 含有 D-MEM で 16 時間 incubation した後、pH 7.4、6.3 に調整した 25 mM HEPES、27 mM NaHCO₃、0.1% BSA 含有 D-MEM に交換し、所定時間培養し、培養上清中の CTGF を ELISA キットで測定する。プロトン刺激による CTGF 産生の Time course を検討する。プロトン単独刺激と同様に CTGF は BSMC を TGF-β1 で刺激した時にも産生されるので、pH 7.4、6.3 の培養液中で、TGF-β1 刺激した時の CTGF 産生を検討する。BSMC からのプロトン刺激による CTGF の mRNA レベルでの検討も併せて行う。6 cm dish で培養した BSMC を pH 7.4、6.3 に調整した 0.1% BSA 含有 D-MEM で所定時間培養し、細胞から RNA を抽出し、DNase 処理、逆転写反応後、TaqMan プローブを用いた Real

time PCR 法で CTGF の mRNA 発現を解析し、標準とする GAPDH mRNA の何倍発現しているのかを定量する。

(2) BSMC からのプロトン刺激による CTGF 産生における OGR1 の関与

OGR1 の siRNA または non-targeting RNA を RNAiMAX[®] を用いて導入し、3 日後に pH 7.4 および pH 6.3 に調整した 0.1% BSA 含有 D-MEM で所定時間培養し、pH 6.3 の培養液中で有意な増加が予想される CTGF の蛋白レベルおよび mRNA レベルでの発現が OGR1 siRNA を導入した細胞で抑制されるか否かを解析する。

(3) マウスのアレルギー性喘息モデルの解析

連携研究者の岡島教授の研究室で作成された OGR1 ノックアウトマウスを C57/B6 系から BALB/c 系へ交配を繰り返し、系統変換したマウスを使用する。野生型および OGR1 ノックアウトマウスに Ovalbumin (OVA) 10 μg と水酸化アルミニウム 1 mg を day 0、day 14 に腹腔内投与し、day 28、day 29、day 30 に 1% OVA/PBS を 3 日間吸入させる。最後の吸入の 48 時間後 (day 32) にメサコリン吸入による気道反応性を Buxco 社の Whole body plethysmography を用いて Penh として測定する。また、気管支肺胞洗浄を施行し、総細胞数、細胞分画を測定するとともに、病理組織学的検討を行う。気管支肺胞洗浄液中の IL-4、IL-5、IL-6、IL-13、IFN-γ、RANTES などを Bio-Plex Suspension Array System を用いて測定する。併せて血清中 Anti-OVA IgE 濃度を測定し、野生型とノックアウトマウスで比較する。病理組織学的検討 (炎症細胞浸潤、気道上皮の杯細胞化) も併せて行う。

4. 研究成果

(1) ヒト気管支平滑筋細胞 (BSMC) における細胞外酸性刺激による OGR1 を介する CTGF 産生

BSMC を細胞外 pH 6.3 で培養すると、8~24 時間で有意な CTGF 産生がみられ、TGF-β 刺激による CTGF 産生量は細胞外 pH 7.4 の場合と比較して、pH 6.3 では約 3 倍に増加した。OGR1 の刺激による CTGF 産生量は細胞外 pH 7.4 の場合と比較して、pH 6.3 では約 3 倍に増加した。OGR1 の発現を siRNA によってノックダウンした BSMC ではプロトン刺激 (pH 6.3 刺激) による CTGF の蛋白および mRNA レベルでの増加が抑制された。また、プロトン刺激による CTGF mRNA 誘導および CTGF の細胞上清への分泌は三量体 G 蛋白質のなかの Gαq 阻害薬 YM-254890 およびイノシトール 3 リン酸 (IP3) 受容体拮抗薬 2-APB によって抑制された。以上の結果より、細胞外酸性 (プロトン) 刺激によって OGR1 を介して phospholipase C が活性化し、

IP3 産生と細胞内 Ca 動員が惹起され、CTGF 産生に至るものと予想された。CTGF は気管支喘息などの炎症性疾患の気道リモデリングに重要な役割を果たすものと予想され、炎症性疾患で気道局所が酸性に傾くことは、気道リモデリングを促進するものと思われる。

(2) マウス喘息モデルの喘息病態発症における樹状細胞上の OGR1 発現の重要性

喘息モデルにおける野生型マウスと OGR1 ノックアウトマウスの比較

OVA の感作によるマウスアレルギー性喘息モデルを野生型マウスと OGR1 ノックアウトマウスで比較し、以下の所見が観察された。すなわち、野生型でみられた気道過敏性亢進（気管内挿管による気道抵抗および無拘束下での Penh による測定）がノックアウトマウスではみられなかった。また、気道への炎症細胞浸潤、気道上皮細胞の杯細胞化がノックアウトマウスでは減弱した。野生型マウスでみられた気管支肺泡洗浄液中の総細胞数、リンパ球数、好酸球数の増加、IL-4、IL-5、IL-13 の増加がノックアウトマウスでは減弱した。血液中の OVA 特異的 IgE の増加が野生型では確認されたが、ノックアウトマウスでは減少した。

樹状細胞上の OGR1 の機能

OGR1 ノックアウトマウスの骨髄細胞から IL-4、GM-CSF 存在下で培養した樹状細胞では、OGR1 の発現がないため、酸性刺激による細胞内 Ca 増加が惹起されなかった。野生型マウスの骨髄から培養した樹状細胞を OVA で感作し、野生型マウスの気管内へ移入すると、OVA 吸入により、気道過敏性の亢進、気管支肺泡洗浄液中の総細胞数、リンパ球数、好酸球数の増加が観察されたが、ノックアウトマウス由来樹状細胞を OVA 感作後、野生型マウスへ移入した場合には、いずれも減弱した。また、蛍光標識した樹状細胞を気管内へ移入し、気管支周囲リンパ節への遊走能を検討すると、ノックアウトマウス由来樹状細胞を OVA で感作しても、野生型マウス由来樹状細胞を OVA で感作した場合に比べて、リンパ節への遊走能が低下していた。この理由として樹状細胞上 CCR7 の OVA 感作後の発現誘導が OGR1 ノックアウト樹状細胞では野生型樹状細胞と比べ減弱しており、CCL19 や CCL21 によるケモタキシスの低下が観察された。

以上の結果より、樹状細胞上の OGR1 がアレルギー性喘息発症に重要な役割を果たすことが予想される。

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 15 件)

石塚 全: 重症喘息に対する顆粒球・単球吸着療法および白血球除去療法.

アレルギーの臨床 451: 1249-1253, 2013
査読無

石塚 全: FeNO の正常値と疫学調査への応用. 喘息 26: 112-117, 2013
査読無

Aoki H, Mogi C, Hisada T, Kamide Y, Ichimonji I, Tomura H, Tobo M, Sato K, Tsurumaki H, Dobashi K, Mori T, Harada H, Yamada M, Mori M, Ishizuka T, Okajima F: Proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 on dendritic cells is required for airway responses in a murine asthma model. PLoS ONE 8 (11) : e79985, 2013

査読有

doi: 10.1371/journal.pone.0079985.

Seki K, Hisada T, Kawata T, Kamide Y, Dobashi K, Yamada M, Mori M, Okajima F, Ishizuka T : Oxidative stress potentially enhances FcεRI-mediated leukotriene C₄ release dependent on the late-phase increase of intracellular glutathione in mast cells. Biochem Biophys Res Commun 439: 357-362, 2013

査読有

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.081>

石塚 全, 久田剛志, 上出庸介, 青木 悠, 関 香織, 草野元康: 成人喘息患者における喘息症状および鼻・副鼻腔炎症状のコントロールを把握するための G スケール問診票の開発. Progress in Medicine 33:1643-1648, 2013

査読無

上出庸介, 石塚 全, 岡島史和: pH とマスト細胞機能 臨床免疫・アレルギー科 60: 324-329, 2013

査読無

久田剛志, 石塚 全, 草野元康: 呼吸器疾患と GERD *Up-to-date* 呼吸と循環 60: 953-960, 2012

査読無

石塚 全: 欧米の職業性喘息ガイドラインと日本における職業性喘息の現状 アレルギー・免疫 19: 1198-1206, 2012

査読無

関 香織, 石塚 全: マスト細胞のロイコトリエン産生と細胞内グルタチオン 臨床免疫・アレルギー科 57: 617-624, 2012

査読無

石塚 全: 内分泌学的観点(肥満・妊娠・

性差)喘息 25(1): 38-44, 2012
査読無

石塚 全: 難治性喘息に対する白血球除去療法 臨床免疫・アレルギー科 55, 202-209, 2011
査読無

松崎晋一、石塚 全、久田剛志、森 昌朋: フルチカゾン/サルメテロール配合剤からブデソニド/ホルモテロール配合剤へ変更し、著明な改善を認めた難治性気管支喘息の 1 例. Therapeutic Research 32, 231-235, 2011
査読無

Kamide Y, Utsugi M, Dobashi K, Ono A, Ishizuka T, Hisada T, Koga Y, Uno K, Hamuro J, Mori M: Intracellular glutathione redox status in human dendritic cells regulates IL-27 production and T-cell polarization. Allergy 66: 1183-1192, 2011
査読有
doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02611.x.

Ishizuka T, Matsuzaki S, Aoki H, Yatomi Y, Kamide Y, Hisada T, Tsuburai T, Dobashi K, Ohshima K, Akiyama K, Mori M: Prevalence of asthma symptoms based on the European Community Respiratory Health Survey questionnaire and FENO in university students: gender differences in symptoms and FENO Allergy Asthma Clin Immunol 7: 15, 2011
査読有
doi: 10.1186/1710-1492-7-15.

Matsuzaki S, Ishizuka T, Yamada H, Kamide Y, Hisada T, Ichimonji I, Aoki H, Yatomi Y, Komachi M, Tsurumaki H, Ono A, Koga Y, Dobashi K, Mogi C, Sato K, Tomura H, Mori M, Okajima F: Extracellular acidification induces connective tissue growth factor production through proton-sensing receptor OGR1 in airway smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 413: 499-503, 2011
査読有
doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.087

[学会発表](計 12 件)

石塚 全、久田剛志、上出庸介、青木悠、関 香織、小野昭浩、古賀康彦、土橋邦生、本定千知、住田泰之、安斎正樹、門脇麻衣子、森川美羽、梅田幸寛、飴嶋慎吾、石崎武志、草野元康、森 昌朋: 喘息コントロール評価のための G スケール問診票の有用性. 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2013.5.11 横浜市

アレルギー学会春季臨床大会 2013.5.11 横浜市

石塚 全、久田剛志、上出庸介、青木 悠、関 香織、西岡正樹、解良恭一、岩崎靖樹、小野昭浩、古賀康彦、砂長則明、土橋邦生、草野元康、森 昌朋: 長期管理薬で治療中の気管支喘息患者における喘息症状、鼻・副鼻腔炎症状と胃食道逆流症状との関連. 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会 2013.4.21. 東京

石塚 全、久田剛志、上出庸介、小野昭浩、古賀康彦、岩崎靖樹、砂長則明、青木 悠、関 香織、土橋邦生、森 昌朋: 喘息患者における胃食道逆流症状、鼻副鼻腔炎症状、喘息症状の相互関係. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012.12.1 大阪市

石塚 全: シンポジウム 11 重症喘息患者での背景因子と治療. 難治性喘息患者に対する白血球除去療法. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2012.5.12 大阪市

石塚 全、久田剛志、上出庸介、青木 悠、松崎晋一、鶴巻寛朗、解良恭一、岩崎靖樹、宇津木光克、小野昭浩、古賀康彦、砂長則明、土橋邦生、森 昌朋: 難治性喘息患者における Pulse LCAP 療法の安全性と有効性に関する検討. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会 2012.4.20. 神戸市

石塚 全、久田剛志、鶴巻寛朗、解良恭一、岩崎靖樹、小野昭浩、古賀康彦、砂長則明、土橋邦生、森 昌朋: 難治性喘息に対する新規治療法としての白血球除去療法の可能性. 第 109 回日本内科学会総会講演会. 2012.4.14 京都市

石塚 全、松崎晋一、青木 悠、矢富正清、上出庸介、久田剛志、粒来崇博、土橋邦生、秋山一男、森 昌朋: 大学生の喘息様症状と呼気 NO 濃度における性差. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011.11.12 東京

石塚 全: シンポジウム 3 職業性アレルギー疾患の最近の動向. 欧米における職業性喘息ガイドラインと日本の現状. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011.11.10 東京

Ishizuka T, Koike A, Hatori M, Matsuzaki S, Kamide Y, Aoki H, Hisada T, Tsurumaki H, Ono A, Koga Y, Dobashi K, Suzuki K, Mori M: Efficacy of high-dose leukocytapheresis using extracorporeal circulation through a

large leukocyte-removal filter column in patients with refractory asthma. European Respiratory Society International Congress 2011. 2011.9.27. アムステルダム

石塚 全, 久田剛志, 松崎晋一, 青木 悠, 矢富正清, 上出庸介, 土橋邦生, 大島喜八, 森 昌朋: アンケート調査に基づく大学生の喘息症状、既往、呼気NO濃度に関する検討. 第 21 回国際喘息学会日本・北アジア部会 2011.7.2 岐阜市

石塚 全, 久田剛志, 小野昭浩, 古賀康彦, 鶴巻寛朗, 松崎晋一, 関 香織, 青木 悠, 上出庸介, 矢富正清, 森 宗昌, 土橋邦生, 森 昌朋: ミニシンポジウム 3 好酸球性肺炎など. 嗅覚障害と篩骨洞病変を有する気管支喘息症例の臨床的検討. 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2011.5.14 千葉市

石塚 全, 松崎晋一, 青木 悠, 矢富正清, 上出庸介, 鶴巻寛朗, 今井久雄, 解良恭一, 小野昭浩, 古賀康彦, 岩崎靖樹, 砂長則明, 久田剛志, 土橋邦生, 森 昌朋: オフライン法による呼気 NO 濃度測定値を利用した喘息有症率調査. 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会 2011.4.22 東京

〔図書〕(計 3 件)

石塚 全 咳・痰 内科処方実践マニュアル 使い分けとさじ加減 (日本臨床内科医会 編) p.487-491 日本医学出版 2013
総ページ数 552

石塚 全 (ガイドライン作成委員の 1 人として分担) 職業性喘息 喘息予防・管理ガイドライン 2012 (一般社団法人日本アレルギー学会 喘息ガイドライン専門部会 監修) p.238-240 協和企画 2012
総ページ数 288

石塚 全 (ガイドライン作成委員の 1 人として分担) 外科手術と喘息 喘息予防・管理ガイドライン 2012 (一般社団法人日本アレルギー学会 喘息ガイドライン専門部会 監修) p.241-243 協和企画 2012
総ページ数 288

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :

出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石塚 全 (ISHIZUKA, Tamotsu)
福井大学・医学部・教授
研究者番号 : 50302477

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

岡島史和 (OKAJIMA, Fumikazu)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号 : 30142748

久田剛志 (HISADA, Takeshi)
群馬大学・医学部・講師
研究者番号 : 10344938