

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461163

研究課題名(和文) 気管支喘息における非神経性コリン性炎症の関与と制御に関する研究

研究課題名(英文) The investigation of non-neuronal cholinergic inflammation in bronchial asthma

研究代表者

東元 一晃 (Higashimoto, Ikkou)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：60363628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：気管支喘息の病態における「コリン作動性炎症」の役割を解明することを目的に、抗コリン薬(M3受容体拮抗薬；tiotropium: T10)のアレルギー性気道炎症への効果とそのメカニズムを検討し、喘息患者の抗コリン薬投与前後の気道炎症を検討した。喘息モデルマウスでは、T10投与により、好酸球性炎症が抑制されることが確認され、全肺およびBALF中のTh2サイトカインもT10投与により低下する傾向が認められた。また、OVA感作曝露により、ChATの発現が低下する傾向がみられるとともに、M3RはT10投与により発現が亢進した。臨床的には喘息患者のT10追加投与による気道炎症の指標に変化を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the role of cholinergic inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma. We evaluate whether the anti-cholinergic drugs, the muscarinic(M3) receptor antagonists, could control the allergic inflammation, and clarify the mechanisms of effects of M3R antagonists. Treatment with tiotropium(T10) on mice sensitized and challenged with OVA reduced eosinophilic inflammation and the Th2 cytokine production, and the expression of ChAT. However the expression of M3r was upregulated with T10. In clinical settings, the biomarker of bronchial eosinophilic inflammation in asthma patients (eg FeNO, peripheral eosinophil counts) had not change after addition of tiotropium.

研究分野：呼吸器

キーワード：喘息 アセチルコリン ムスカリン受容体 好酸球 気道炎症

1. 研究開始当初の背景

長時間作用性抗コリン薬（long-acting muscarinic antagonists; LAMA）が気管支喘息治療に適用され、その気管支拡張効果のみならず、増悪の抑制にも有効であることが報告された。

また、アセチルコリン(ACh)反応を伝達するムスカリン受容体が気道平滑筋のみならず、気道上皮細胞など肺の構築細胞や免疫細胞にも発現し、さらに T リンパ球の一部が ACh を産生していることが報告され、それらを介して炎症反応をコントロールする“非神経性”コリン作動性炎症が新たな炎症機構として注目されるようになった。このメカニズムが慢性炎症性気道疾患としての喘息や COPD の病態にも関与する可能性が認識されつつある。

これまで、いくつかの研究において、抗コリン薬（ムスカリン M3 受容体拮抗薬；Tiotropium）が喘息の気道炎症に関与する可能性の報告がなされているが、喘息病態における非神経性コリン性炎症の果たす役割については未だ解明されていない点が多い。また、近年、理解が進んできた喘息の気道アレルギー性炎症メカニズムも、とくに難治性喘息や慢性化、リモデリングの病態や発生機序について、解明されるべき課題が多く残る。

2. 研究の目的

本研究は、喘息を発症した気道／肺におけるアセチルコリン産生の動向とムスカリン受容体の発現、ムスカリン受容体の気道炎症における役割（M3 受容体刺激を介した細胞機能および細胞間相互作用における変化）、抗コリン薬による気道炎症制御の可能性とメカニズムを解析することを目的とした。喘息コリン作動性炎症制御という新しい治療戦略を提供することができ、気管支喘息のリモデリングの制御やとくに難治性喘息のコントロールに大きく貢献できる可能性がある。

3. 研究の方法

（1）OVA 喘息モデルマウスの作成と M3 受容体拮抗薬 Tiotropium の投与実験

牝 6～8 週齢 C57BL/6 マウスを用いて、図 1 に示すようなスケジュールで OVA 感作曝露を行い、喘息モデルを作成した。M3 受容体拮抗薬 TIO は OVA 曝露の各 1 時間前に点鼻投与を行っている。最終曝露後 24 時間で BAL および剖検を行い、全肺を摘出し、組織学的検討と RNA の抽出を行った。

メサコリン刺激による気道過敏性試験も並行して行っているが、OVA マウスでは気道過敏性が亢進しており、TIO 投与を行ったマウスでは気道抵抗の増強がほぼ完全に抑制されており、TIO の点鼻投与がコリン刺激を抑制することが確認されている。

（2）全肺 mRNA の発現解析

剖検により肺を摘出し、全肺より RNA を TRIzol RNA isolation reagents(Thermo Fisher scientific)で抽出。Real-time PCR は TaqMan 法(Applied Biosystems(Thermo Fisher scientific))にて、Il-4、Il-5、Il-13、Ccl11、ChAT、M3r について発現量の測定を行った。

（3）BALF 中サイトカイン測定

BALF 中のサイトカインは IL-4、IL-5、IL-13 について ELISA (eBioscience) により測定を行った。

（4）臨床的検討：重症喘息患者における抗コリン薬投与前後の気道炎症マーカーの検討

対象は 2014 年 4 月～2016 年 12 月までに呼吸器内科外来で重症コントロール不良により、TIO を導入した成人喘息患者（鹿児島大学倫理規定 27-190）とし、TIO 導入前と、導入後初回外来測定時（4～8W）のデータを後方視的に比較検討した。評価項目として臨床症状 ACT（asthma control test）、呼吸機能 1 秒量（FEV1）、末梢血好酸球数、呼気一酸化窒素濃度（FeNO：Fractional exhaled nitric oxide）を測定した。FeNO 測定は Chest 社 NIOX MINO による。

(5) 統計解析

結果の数値は平均値±SEM で表記し、2 群間比較は Student's T test を、3 群以上の比較は Bonferoni 法を用いて検定した。解析には SPSS statistics 22 を使用した。

4. 研究成果

(1) OVA 喘息モデルマウスにおけるアセチルコリン産生と M3 受容体の発現

マウス全肺においてアセチルコリン産生を示すコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) とアセチルコリンの受容体であるムスカリン受容体 (M3R) の発現が Realtime-PCR により確認された。OVA 感作曝露 24 時間後の発現は、ChAT は減少傾向を示し、また、M3R はほぼ変化しなかった。

当初、われわれは好酸球性炎症が増幅する中で ChAT が増加するという仮説で実験を行ったが、逆の結果となった。他の実験系において、より短時間での ChAT は増加傾向を示す結果も示唆されており、一過性に ChAT が亢進してアセチルコリンが合成されたのち、ネガティブフィードバックによって抑制されるなどの機序がはたらいたのではないかと考察しているが現在のところ明確な解答は得られていない。

(2) OVA 喘息モデルマウスの好酸球性炎症 (BALF、肺組織) に対する抗コリン薬 (M3 受容体拮抗薬: TIO) の影響

図 2 に示すように OVA 喘息モデルマウスにおいて、BALF 中では総細胞数や好酸球数が増加していたが、曝露 1 時間前に TIO 投与を行うことによって、総細胞数、好酸球数とも優位に減少した。また、肺の組織学的検討では、OVA で増強された気道周囲の炎症細胞浸潤も TIO 投与により抑制されていることが確認された。

このことにより、OVA で誘発されたアレルギー性気道炎症；好酸球性炎症が M3 受容体のブロック (アセチルコリン刺激の抑制?) によって制御さ

れる可能性が示唆された。

(3) Th2 サイトカインおよびケモカイン発現に対する M3 受容体拮抗薬の効果と ChAT および M3R の発現の変化

この好酸球性炎症に対する TIO の抑制効果のメカニズムを解明するために、好酸球集積に重要な働きを持つ Th2 サイトカイン、ケモカインの発現とアセチルコリン合成系である ChAT と、受容体 M3R の発現について、それらの mRNA を realtimePCR 法によって検討した。

図 3 に示すように Th2 サイトカイン；IL-4、IL-5、IL13、好酸球の強い遊走活性を持つケモカイン；CCL11 (エオタキシン) は OVA 刺激によって明らかに増加するが、TIO 投与により、いずれも低下した。(IL-5 以外は有意差あり)。

ChAT は OVA 感作曝露によって減少し、TIO では変化なし。また、M3R は OVA ではかわらず、TIO 投与によって発現が亢進したという結果が得られた。

この結果は、BAL 中サイトカインレベルにおいても同様であることを ELISA により測定し、図 4 に示すように確認された。

(4) 重症喘息患者に対する抗コリン薬 (LABA; 長時間作用性 M3 受容体拮抗薬) の効果

対象となった患者は 10 例(男性 4 例・女性 6 例)、平均年齢 65.70±3.59 歳(44-79 歳)。TIO 導入前治療は ICS/LABA 4 例、ICS/LABA+LTRA 6 例。非喫煙 4 例、既喫煙 6 例(13.5-60 pack-years)。末梢血好酸球数： 275.35±48.89 / μ l、血清 IgE： 608.00±175.41 IU/l。肺機能は FEV1 1.54±0.20 L(63.84±6.66%)。

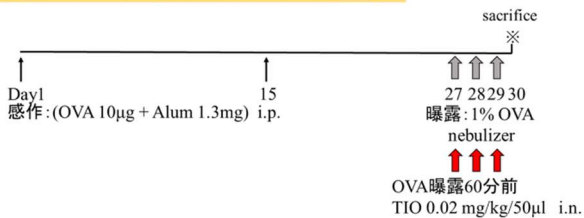
臨床症状としての ACT スコアと気道狭窄の指標としての肺機能 (1 秒量) は図 5 に示すように改善傾向が得られた。しかしながら、気道炎症を示す FeNO と全身性アレルギー性炎症を反映すると考えられる末梢血好酸球数には TIO 投与前後にお

ける明らかな変化は認められなかった (図6)。LAMA の気道炎症効果については、最近の報告でも FeNO を含む炎症マーカーに明らかな変化をもたらしたとの結果は示されていない。すでに ICS が投与されている影響や他のメカニズムの関与なども考えられるため、今後、さらに異なる方法での検討を行う必要があると考えられる。

これらの結果から、アレルギー性炎症により好酸球集簇をきたした肺において ChAT と M3R の発現が確認され、その好酸球性炎症に対して TIO は抑制的に働くこと、その機序には Th2 サイトカインの制御も関与することが推察された。この研究はステロイド以外の抗炎症効果の期待と、ステロイド抵抗性喘息など重症喘息の発症メカニズム解明や治療法の開発にもつながる可能性もあり、今後研究を継続していく予定である。

図1 OVA 感作曝露 喘息モデルマウスに対する TIO 投与；実験スケジュール

実験プロトコール (c57BL/6 ♂:8~10週齢)



評価項目)

- BALF: 細胞数、細胞分画、上清中サイトカイン濃度
- 肺組織: 病理組織学的検討 (HE染色)
- 全肺mRNA: サイトカイン、ACh関連分子 (real time PCR; qPCR)

図2 OVA 喘息モデルマウスの好酸球性炎症における TIO の影響

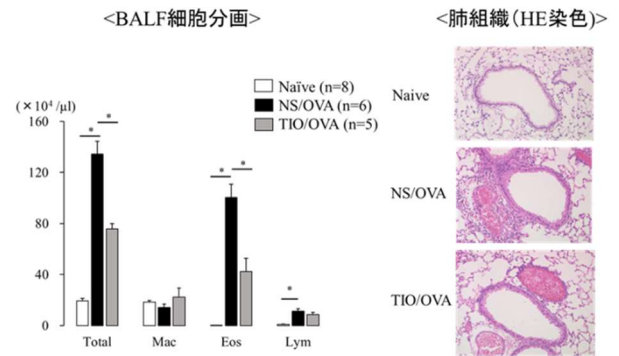


図3 OVA 喘息モデルマウスにおける TIO の影響；Th2 サイトカイン・ACh 関連因子の発現 (全肺；mRNA)

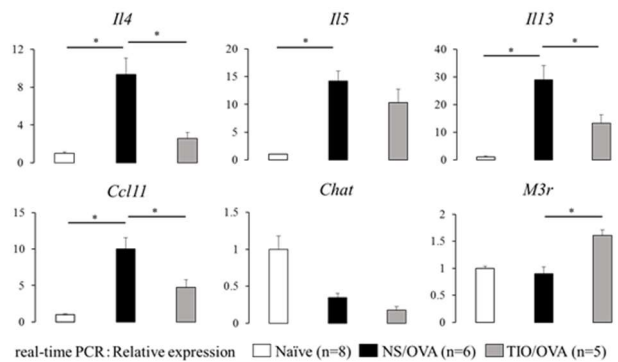


図4 OVA 喘息モデルマウスにおける TIO の影響；Th2 サイトカイン(BALF；ELISA)

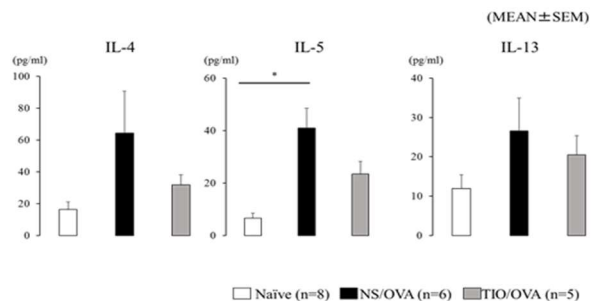


図5 重症喘息患者に対する TIO 投与の効果
：臨床症状と肺機能

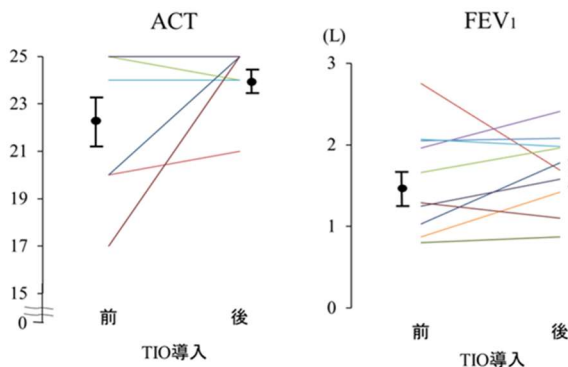
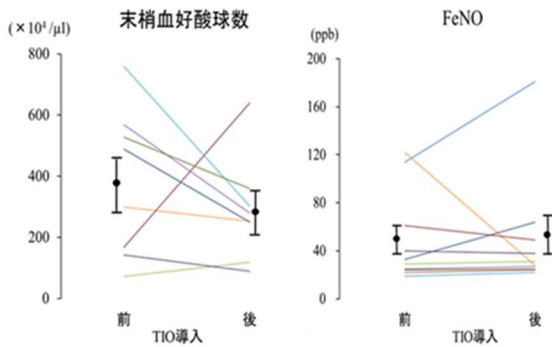


図6 重症喘息患者に対する TIO 投与の効果
：好酸球性炎症



5. 主な発表論文等 論文等

1) 松山崇弘、東元一晁、井上博雅：気管支喘息の分子標的薬療法：アレルギーの臨床 2016, 36, 21-24, (査読無)

学会報告

1) 松山崇弘、東元一晁、田上あさ子、井上博雅
喘息に対する LAMA のコリン作動性炎症制御の可能性、第 78 回日本呼吸器学会九州支部春季学術講演会、2017 年 3 月 11 日、福岡国際医療福祉学院 (福岡県福岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東元 一晁 (HIGASHIMOTO IKKOU)

鹿児島大学医歯学域附属病院

講師

研究者番号：60363628

(2) 研究分担者

井上 博雅 (INOUE HIROMASA)

鹿児島大学医歯学域医学系

教授

研究者番号：30264039