

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461201

研究課題名(和文) 気道平滑筋の遊走能と収縮能の制御に基づく喘息分子標的療法

研究課題名(英文) Molecularly-targeted therapy for asthma with a focus on migration and contractility of airway smooth muscle cells

研究代表者

久米 裕昭 (KUME, Hiroaki)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：50303631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：喘息の病態を気道平滑筋の表現型の変化として捉え、鍵となる蛋白を検索し、根元的な分子標的治療の確立を目的とした。その結果、病態の大部分は収縮性、増殖性の表現型の変化で生じ、それらの機序として、Ca²⁺-activated K⁺ channel/voltage-dependent Ca²⁺ channel の連関に由来する Ca²⁺ dynamics、および、RhoA/Rho-kinase 系を介する Ca²⁺ sensitization の関与を解明した。これらの Ca²⁺ signaling は、喘息治療のあらたな標的蛋白と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Alteration of contractility in airway smooth muscle (ASM) contributes to airflow limitation, airway hyperresponsiveness (AHR), and beta2-adrenergic desensitization. Alteration of synthesis contributes to airway remodeling via facilitation of the proliferation and migration in ASM. In our observation, Ca²⁺ dynamics through the large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel/L-type voltage-dependent Ca²⁺ channel linkage, and Ca²⁺ sensitization through the RhoA/Rho-kinase pathway contribute not only to alterations in the contractile phenotype involved in airflow limitation, AHR and tolerance to beta2-adrenergic receptors, but also to alteration of the synthetic phenotype involved in airway remodeling. The Ca²⁺ signaling also contribute to the synergism (cross talk) in combination of beta2-adrenergic receptor agonists with muscarinic receptor antagonists. Therefore, the phenotype change in ASM via the Ca²⁺ signaling may be a novel target for development of asthmatic agents.

研究分野：医歯薬学

 キーワード：喘息 phenotype change 気道平滑筋 G protein Ca²⁺ signaling KCa channel Rho-kinase allosteric effect

1. 研究開始当初の背景

喘息の主要な病態（気流制限、気道過敏性亢進、 β_2 アドレナリン受容体の耐性化、気道リモデリングなど）は、気道炎症だけでなく、気道収縮に影響をあたえる多様な因子が複雑に絡み、根本的な解明がなされていない。そして、この疾患を治癒させる薬物の開発もなされていない。

2. 研究の目的

喘息や慢性閉塞性肺疾患（COPD）の難治化の主因で、機序が未解決である気道リモデリングに対する予防・治療の方法を進展させ Future Risk を回避することが可能になるために、根本的な喘息の主要病態を標的細胞の表現型の変化（phenotype changes）として捉え、これらの変化の成因において鍵となる蛋白を検索し、上記の疾患に対する根元的な分子標的治療を確立することを目的としている。

3. 研究の方法

モルモット気管平滑筋の切片を作製し、カルシウム蛍光色素である fura-2 で処理した後に浴槽内に固定して等尺性張力と細胞内 Ca^{2+} 濃度の指標である F340/F380 を同時に測定した。ムスカリン受容体刺激薬（メサコリン、MCh）による収縮とそれに対する各種 β_2 アドレナリン受容体刺激薬の弛緩効果を記録し、同時に F340/F380 の変化を調べ、平滑筋の機械的な反応に対する細胞内 Ca^{2+} 動態（dynamics）、 Ca^{2+} 感受性（sensitization）との関連性を分析した。さらに、培養ヒト気管支平滑筋細胞をチャンバー内に留置し、遊走能における気道収縮物質（エンドセリン）の影響とその機序として Ca^{2+} signaling の関与について検討した。

4. 研究成果

気道過敏性の亢進は MCh に対する反応性の亢進として現われる。抗原刺激でマスト

細胞から放出されるスフィンゴシン1リン酸、あるいは、炎症反応で傷害された上皮から放出される ATP を気管平滑筋に 15 分間曝露し洗い流した後、MCh 収縮は約 30% 増加したが、細胞内 Ca^{2+} 濃度は増加しなかった。この気道過敏性の亢進には、RhoA/Rho-kinase 系による Ca^{2+} sensitization が関与していた。1 μ M MCh 収縮を イソプレナリン (ISO) は著明に阻害し、抑制率は約 90% であった。喘息の炎症で生成されるリゾフォスファチジルコリン、あるいは活性化したマスト細胞から放出される組織傷害蛋白であるトリプターゼを 15 分間曝露した後では、ISO の弛緩作用は著明に低下し、抑制率は約 55% に減少したが、細胞内 Ca^{2+} 濃度は影響を受けなかった。この現象には、RhoA/Rho-kinase 系による Ca^{2+} sensitization が関与していた。一方、成長因子 (TGF β 1, PEGF) を 15 分間曝露した後、ISO の弛緩作用は著明に低下したが、細胞内 Ca^{2+} 濃度は有意に上昇した。さらに、MCh 収縮に ISO を 30 分ごとに繰り返し投与すると、弛緩作用がしだいに減弱すると同時に、細胞内 Ca^{2+} 濃度はしだいに上昇した。この現象には、large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (K_{Ca}) channel/L-type voltage-dependent Ca^{2+} (VDC) channel 連関を介した Ca^{2+} dynamics が関与していた。このように、 β_2 アドレナリン受容体の耐性化には、 Ca^{2+} dynamics と、 Ca^{2+} sensitization の両者が関与している。しかし、このような β_2 アドレナリン受容体の耐性化は、full agonist である ISO は生じやすいが、現在、臨床的に使用されている partial agonist（ホルモテロール、インダカテロール、ヴィランテロール、プロカテロール、など）では起こし難かった。抗コリン薬（チオトロピウム、グリコピロニウム、アトロピン、など）と、 β_2 アドレナリン受容体刺激薬（インダカテロール、オロダテロール、プロカテロール、など）を併用すると、弛緩作用が相乗的に増加した。その機序として、G protein/ K_{Ca} channel/VDC channel 連関による

Ca²⁺ dynamics が関与するだけでなく、allosteric modulation に基づく両受容体の cross talk であることも解明した。この allosteric modulation は、β₂ アドレナリン受容体刺激薬の固有活性を下げ、partial agonist として作用する機序になることも判明した。エンドセリンと投与すると、収縮作用を起こさない低濃度から濃度依存性に気管支平滑筋の遊走能は増加した。この現象は、増殖能の増加と同様に、RhoA/Rho-kinase 系による Ca²⁺ sensitization が関与していた。

喘息の主要な病態、すなわち、気流制限、気道過敏性亢進、β₂ アドレナリン受容体の耐性化、気道リモデリングなど、にかかわる収縮性、増殖性における表現型の変化は、Ca²⁺ dynamics、Ca²⁺ sensitization により影響を受ける。これらの Ca²⁺ signaling を制御している G protein/K_{Ca} channel/VDC channel の連関、および、RhoA/Rho-kinase 系は、喘息の治療の標的分子である可能性が考えられる。

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 12 件)

Kume H, Fukunaga K, Oguma T. Research and development of bronchodilators for asthma and COPD with a focus on G protein/K_{Ca} channel linkage and β₂-adrenergic intrinsic efficacy. *Pharmacol Ther*, 156: 75-89, 2015. 査読：有
久米 裕昭. 【呼吸器疾患の分子病態に迫る】気道平滑筋. *Respiratory Medical Research*, 3 (2): 110-117, 2015. 査読：無
久米裕昭, 東田 有智. 新薬の最近の話題 ホルモテロールフマル酸塩水和物(解説). *分子呼吸器病*, 18 (1): 94-98, 2015. 査読：無

Shirai T, Kawayama T, Nagase H, Inoue H, Sato S, Asano K, Kume H. Exhaled nitric oxide measurement may predict asthma exacerbation after stepping down formoterol/budesonide combination therapy in adult asthma. *J Allergy Ther*, 5 (3): 100073, 2014. 査読：有

Muraki M, Wada S, Ohno T, Hanada S, Sawaguchi H, Iwanaga T, Kume H, Tohda Y. Effects of inhaled aminophylline on airway constriction

and inflammation in ovalbumin-ensitized guinea pigs. *Drug Deliv*, 21(5): 321-7, 2014. 査読：有
久米 裕昭, 東田 有智. 好酸球性気道炎症が潜伏する慢性閉塞性肺疾患に対する吸入長時間作用性β₂刺激薬、吸入ステロイド薬併用の有効性 Asthma-COPD Overlap Syndrome (ACOS)の概念を踏まえて. *アレルギー・免疫*, 21 (12): 1966-76, 2014. 査読：有
久米 裕昭. SMART 療法の有効性と安全性の検討. *臨床免疫・アレルギー科*, 61(5): 513-9, 2014. 査読：無
久米 裕昭. 気道平滑筋による気道過敏性機序とその治療. *アレルギーの臨床*, 34 (3): 227-232, 2013. 査読：無
久米 裕昭, 西山 理, 東本 有司, 中島 宏和, 村木 正人, 東田 有智. ムスカリン受容体刺激による気道平滑筋収縮に対する長時間作用性抗コリン薬と長時間作用性 β₂ 刺激薬の相乗作用. *アレルギー・免疫*, 20 (12): 1856-64, 2013. 査読：有
久米 裕昭. RhoA/Rho-kinase 系に基づく喘息の分子標的療法開発の可能性. *Progress in Medicine*, 33 (12): 2741-50, 2013. 査読：無
久米 裕昭, 東田 有智. 【新たな展開を見せる COPD 治療と新治療薬オーキシスへの期待】オーキシスの薬理学的特性. *吸入療法*, 5 (2): 21-31, 2013. 査読：無
久米 裕昭, 岩永 賢司, 忌部 周, 佐藤 隆司, 西山 理, 東本 有司, 中島 宏和, 東田 有智. ムスカリン受容体を介する気道平滑筋収縮に対する長時間作用性抗コリン薬、および β₂ 刺激薬の抑制効果. *アレルギー・免疫*, 20 (5): 766-75, 2013. 査読：有

以上

[学会発表](計 27 件)

H. Kume, H. Higashimoto, Y. Tohda. Effects of combination LABA with ICS on COPD with airway eosinophilia. 20th the Congress of Asian Pacific Society of Respiriology, 2015/12/4, Kuara Lumpur, Malaysia

久米 裕昭. 薬物の特性とデバイスの特徴の両面から - 質の高い吸入療法を目指して - (教育セミナー). 第 64 回日本アレルギー学会学術大会 2015/5/28 グランドプリンスホテル新高輪(東京)

久米 裕昭, 福永 健太郎, 小熊 哲也, 東田 有智, 中野 恭幸. チオトロピウムの喘息に有効性を示唆する付加的作用 - SABA の増強、ヒスタミン収縮の抑制(ミニシンポジウム). 第 64 回日本アレルギー学会学術大会 2015/5/26 グランドプリンスホテル新高輪(東京)

H. Kume, O. Nishiyama, Y. Tohda. Effects of combination LABA with ICS

and evaluation of ACOS in COPD with airway eosinophilia. (Poster Discussion Session). ATS 2015 International Conference, 2015/5/19, Denver, Colorado, U.S.A.

H. Kume, K. Fukunaga, T. Oguma, Y. Tohda, Y. Nakano. Role of Ca^{2+} homeostasis in the synergistic action between anticholinergic agents and β_2 -adrenergic receptor agonists in airway smooth muscle. ATS 2015 International Conference, 2015/5/19, Denver, Colorado, U.S.A.

久米 裕昭, 福永 健太郎, 小熊 哲也, 東田 有智, 中野 恭幸. 抗コリン薬、 β_2 刺激薬の相乗作用における L 型 Ca^{2+} channel (VDC) / Ca^{2+} -activated K^+ channel (K_{Ca}) 連関の関与 - 細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスの役割. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会 2015/4/19 東京国際フォーラム (東京)

久米 裕昭. β_2 刺激薬の展望と問題点を探る - 基礎から臨床、そして気道閉塞からリモデリングまで (ランチョンセミナー). 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会 2015/4/17 東京国際フォーラム (東京)

久米 裕昭, 西山 理, 平田 勝彦, 東本 有司, 東田 有智. 慢性閉塞性肺疾患の気管支拡張療法における LABA, LAMA 併用の有効性. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会 2015/4/17 東京国際フォーラム (東京)

久米 裕昭. COPD 治療の夜明け ~ LABA/LAMA 配合剤を用いた気管支拡張療法の進展 (ランチョンセミナー). 日本超音波医学会 第 41 回関西地方会学術集会 2014/11/22 ホテルグランディア京都 (京都)

H. Kume, S. Imbe, T. Iwanaga, O. Nishiyama, Y. Higashimoto, Y. Tohda. Role of L-type Ca^{2+} channel/ K_{Ca} channel linkage in the synergistic response between anticholinergic agents and β_2 -adrenergic receptor agonists in airway smooth muscle. 19th the Congress of Asian Pacific Society of Respiriology, 2014/11/14, Bali, Indonesia.

H. Kume, S. Imbe, O. Nishiyama, T. Iwanaga, Y. Higashimoto, Y. Tohda. Involvement of K_{Ca} channels via G_i , G_s , in the synergistic effects between anticholinergic agents and β_2 -adrenoceptor agonists in airway smooth muscle. (Poster Discussion Session) ATS 2014 International Conference, 2014/5/21, San Diego, California, U.S.A.

久米 裕昭, 西山 理, 山縣 俊之, 佐野 博幸, 岩永 賢司, 東本 有司, 中島 宏

和, 東田 有智. 慢性閉塞性肺疾患に潜む好酸球性気道炎症と気道過敏性亢進 - 喘息合併の検索 (ミニシンポジウム). 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014/5/10 国立京都国際会館 (京都)

久米 裕昭. SART 療法への期待 - 患者さんのニーズに応え、より良い喘息コントロールを提供する治療法とは (ランチョンセミナー). 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 2014/4/27 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル (大阪)

久米 裕昭, 忌部 周, 西山 理, 岩永 賢司, 東田 有智. μ スカリン受容体を介する気道平滑筋収縮に対する抗コリン薬、 β_2 刺激薬の相乗作用. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 2014/4/26 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル (大阪)

久米 裕昭, 西山 理, 岩永 賢司, 佐野 博幸, 東本 有司, 中島 宏和, 東田 有智. 好酸球性気道炎症を有する慢性閉塞性肺疾患に対する吸入ステロイド薬の追加効果. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 2014/4/25 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル (大阪)

久米 裕昭. 高齢者喘息と COPD の鑑別そして、ICS 投与の理論と実際 (ランチョンセミナー). 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 2014/4/25 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル (大阪)

久米 裕昭. 喘息・COPD の薬物療法の発展に寄与する薬理特性の探求 - 基礎と臨床の両面からの検討 (ランチョンセミナー). 第 87 回 日本薬理学会年会 2014/3/19 仙台国際センター (宮城)

久米 裕昭. 気管支喘息の治療における SMART 療法の有効性と安全性の検討 (ミニシンポジウム). 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013/11/30 ホテルニューオータニ (東京)

H. Kume, S. Imbe, O. Nishiyama, T. Iwanaga, H. Sano, H. Nakajima, Y. Tohda. Possible intracellular mechanisms underlying the synergistic action between LAMAs and LABAs against muscarinic contraction in airway smooth muscle. (Oral Presentation) 18th the Congress of Asian Pacific Society of Respiriology, 2013/11/14, パシフィコ横浜 (神奈川).

H. Kume, O. Nishiyama, Y. Higashimoto, H. Nakajima, Y. Tohda. Effects of ciclesonide on the management of stable COPD with airway eosinophilia. ERS Annual Congress Barcelona 2013, 2013/9/10, Barcelona, Spain.

21 H. Kume, S. Imbe, T. Iwanaga, O. Nishiyama, Y. Higashimoto, Y. Tohda. Involvement of the BK channels/G proteins processes in the synergistic effects between anticholinergic agents and

- beta₂-adrenoceptor agonists in airway smooth muscle. (Oral Presentation) ERS Annual Congress Barcelona 2013, 2013/9/9, Barcelona, Spain.
- 22 H. Kume, S. Imbe, T. Iwanaga, O. Nishiyama, Y. Higashimoto, Y. Tohda. Involvement of G proteins in the synergistic effects between anticholinergic agents and beta₂-adrenoceptor agonists in airway smooth muscle. ATS 2013 International Conference, 2013/5/19, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.
- 23 久米 裕昭, 東田 有智. 気道平滑筋の気道過敏性獲得機構(シンポジウム). 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 2013/5/11 パシフィコ横浜(神奈川)
- 24 久米 裕昭, 東田 有智. 新たな喘息スマート療法は有用か? Con の立場から(教育セミナー). 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 2013/5/11 パシフィコ横浜(神奈川)
- 25 久米 裕昭, 東田 有智. 喘息とCOPDのoverlap(シンポジウム). 第53回日本呼吸器学会学術講演会 2013/4/21 東京国際フォーラム(東京)
- 26 久米 裕昭. ムスカリン受容体を介する気道平滑筋収縮に対する抗コリン薬、₂刺激薬の相乗作用. 第53回日本呼吸器学会学術講演会 2013/4/21 東京国際フォーラム(東京)
- 27 久米 裕昭. 慢性閉塞性肺疾患の症状、最大吸気量の改善に対するインダカテロールの有効性. 第53回日本呼吸器学会学術講演会 2013/4/19 東京国際フォーラム(東京)

以上

〔図書〕(計4件)

Kume H. Research and development for anti-asthmatic agents with a focus on phenotype changing by Ca²⁺ signaling in airway smooth muscle cells. In: Rahman AU Ed. Frontiers in clinical drug research - anti allergy agents. Bentham, Sharjah, United Arab Emirates, in press.2016. 査読：有

Kume H. Ca²⁺ dynamics and Ca²⁺ sensitization in the regulation of airway smooth muscle tone. In: Sakura K, Ed. Muscle Cell and Tissue. pp. 289-330, In Tech, Rijeka, Croatia, 2015. 査読：有

久米 裕昭. 吸入 β₂ 刺激薬の特性と使い分けの実際は? 永井 厚志(監修)、一ノ瀬 正和、井上 義一、館田 一博、弦間 昭彦(編集) 2016-2017 EBM 呼吸器疾患の治療 pp. 43-49、中外医学社、東京、2015. 査読：無

Kume H.

Large-conductance calcium-activated potassium channels. In: Wang YX, Ed. Calcium Signaling In Airway Smooth

Muscle Cells. pp. 49-83, Springer, New York, U.S.A, 2013. 査読：有

以上

〔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

久米 裕昭 (KUME, Hi roaki)
近畿大学・医学部・准教授
研究者番号：50303631

(2) 研究分担者

(なし)

研究者番号：

(3) 連携研究者

(なし)

研究者番号：