

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32710
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25463203
研究課題名(和文) Neurokinin receptorを介する気管支喘息の発生機序の解明

研究課題名(英文) Neurokinin receptor signaling in Asthma

研究代表者

船山 ひろみ (FUNAYAMA, Hiromi)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：00359530

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)：喘息は気道過敏性の亢進，気道狭窄を特徴とする慢性閉塞性の肺疾患である．Gタンパク質結合受容体はAktのリン酸化を含むシグナル伝達を介して気管支平滑筋(ASM)の細胞増殖を促進する事が報告されている．またNeurokinin-1(NK1)は気道収縮を引き起こすことが知られている．当初NK1受容体の活性化は病的なASM増殖を促進すると考えたが，予想に反してNK1受容体作動薬のSM-SubPは，NK1を高発現させたASM細胞を用いた実験で，成長因子による細胞増殖とAktのリン酸化を阻害した．ASMの細胞増殖に関わる分子シグナル伝達経路は，喘息由来の気管支狭窄に対して潜在的治療標的となる可能性がある．

研究成果の概要(英文)：Asthma is a chronic obstructive pulmonary disease characterized by inflammation, airway hyperresponsiveness, and smooth muscle remodeling. Molecular pathways regulating airway smooth muscle (ASM) proliferation could serve as potential therapeutic targets to reduce asthma-related airway narrowing. G-protein coupled receptors (GPCRs) have been found to promote ASM proliferation through signaling that involves phosphorylation of Akt. Tachykinin neurokinin-1 (NK1) receptor is known to be pro-contractile in the airway. Since NK1 activation in various tumor models enhances mitogenesis, we originally hypothesized that NK1 receptor activation would promote pathogenic ASM proliferation. But the activation of NK1 receptors by NK1 receptor agonist, SM-SubP inhibited growth factor-induced cell proliferation and Akt phosphorylation in human ASM-NK1 cells. The NK1 GPCR may be a unique anti-proliferation target in ASM cells to mitigate ASM remodeling in asthma.

研究分野：炎症免疫

キーワード：Neurokinin receptor 気管支喘息 気管支平滑筋 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

(1) 気管支喘息の特徴：気管支喘息 (Bronchial Asthma) はアレルギー反応や細菌・ウイルス感染などが発端となった気管支の炎症が慢性化することで気道過敏性の亢進、可逆性の気道狭窄を起こし、発作的な喘鳴、咳などの症状をきたす呼吸器疾患である。全世界に3億人以上の喘息患者がおり、年間25万人以上の人々が喘息で死亡している。日本では1960年代は小児、成人とも有症率は1%程度であったものが近年増加の傾向にあり、数倍から十数倍程度増加している。細菌・ウイルス感染、過労、ハウスダスト・食物・薬物などの環境刺激因子 (アレルゲン)、運動、タバコ、アルコール、気圧変化等のストレス刺激が引き金となり、これらに対する過敏反応として気管支平滑筋収縮、気道粘膜のむくみ、気道分泌亢進などにより気道の狭窄・閉塞が起こることが分かっているが、気管支喘息の病態生理はまだはっきりしていない部分が多い。気管支平滑筋の細胞増殖に関わる分子シグナル伝達経路は、喘息由来の気管支狭窄に対して潜在的治療標的になる可能性がある。

(2) Tachykinins と Neurokinin (NK) Receptor: タキキニン は C 末端構造に Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ を有する一群のペプチドの総称であり、哺乳類に存在する主要なタキキニンは Substance P, ニューロキニン A およびニューロキニン B である。軸索反射などで、C線維の末端から放出される神経タキキニンは、平滑筋収縮 (気道収縮、気管支収縮)、血管拡張 (皮膚発赤、血流増加)、血管透過性亢進 (血漿蛋白漏出による浮腫、粘膜の腫脹、皮膚の膨疹)、粘液分泌亢進、肥満細胞活性化 (ヒスタミン遊離) などの作用を示す。その作用は NK1, NK2 および NK3 と呼ばれる受容体を介して発現する。これら 3 つのタキキニン受容体すべてに対して Substance P, ニューロキニン A およびニューロキニン B は作動薬として作用するが、それぞれの受容体に対して異なる親和性を有している。

2. 研究の目的

気管支喘息は、歯科治療の際遭遇する最も多い疾患の一つであるが、その発症機序や発作の誘因などたくさんの報告があるものの不明な点が多い。近年、環境や食生活の変化に伴い、喘息患者は増え続けている。しかも、歯科疾患または歯科治療自体がその発症や発作誘因の原因となりうる可能性を大いに含んでいる。本研究では、特に気管支喘息による気道の狭窄・閉塞に関して、培養細胞を用い、分子生物学的な観点から実験を行った。Tachykinins と NK 受容体を介する気管支平滑筋細胞への作用について、気管支平滑筋の cell line および初代培養細胞を用いて細胞収縮・増殖に関する基礎的データを得る。必要に応じて遺伝子導入した気管支平滑筋細胞を用いて、分子生物学的な検索も行う。in

vitro での NK 受容体を介した平滑筋細胞増殖抑制機構を解明し、気管支喘息の発生機序の解明、疾患の治療、そして予防を目指す。

3. 研究の方法

ヒト気管支平滑筋培養細胞の cell line および初代培養細胞を用いて、NK1 受容体を介する細胞増殖について評価する。必要に応じてヒト気管支平滑筋細胞にレンチウイルスを用いた NK1 受容体の遺伝子導入を行う。細胞増殖の評価については、各種 growth factor (Platelet Derived Growth Factors: PDGF (Calbiochem) など) を用いて細胞増殖試験 (BrdU の取り込み: Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) (Roche)) を検討する。NK1 作動薬 (Substance P などの Tachykinins: [Sar⁹, Met(O₂)¹¹]-substance P (SM-SP) (Tocris)) の細胞増殖への関与を模索する。また、細胞増殖に係わる分子 (ERK, Akt, Stat3, P70S6K, mTOR など) の活性化も Western blot 法や Phosphatase Assay を用いて確認する。なお遺伝子組換え生物等の実験は、鶴見大学歯学部 DNA 実験・バイオセーフティ委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) NK1 作動薬による Akt リン酸化のダウンレギュレーション

まず初めに、細胞増殖に関わる分子 (ERK, Akt, Stat3, P70SK6) の活性化を Western blot 法を用いて確認した。遺伝子導入を行い NK1 受容体を高発現させたヒト気管支平滑筋由来の初代培養細胞に PDGF を作用させると、Akt の活性化の指標であるリン酸化 Akt が増加した。NK1 作動薬の Substance P で前処理すると、この Akt のリン酸化が抑制された。

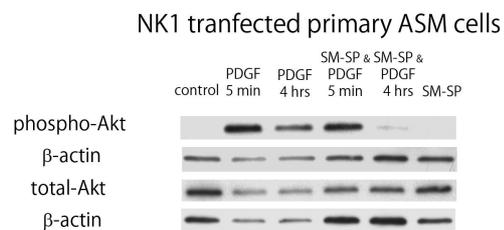


図 1 a. Western blot 法を用いたリン酸化 Akt の検出

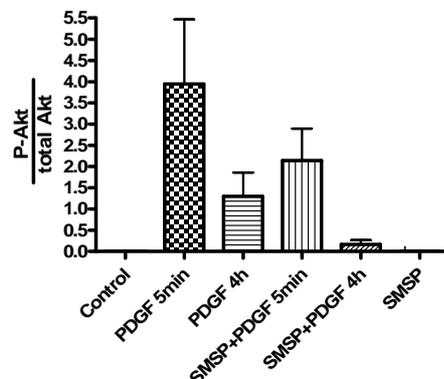


図 1 b. phospho/total Akt 比.

(2)NK1 作動薬による気管支平滑筋細胞の増殖抑制

次に、細胞増殖アッセイキット CyQuant (Thermo Fisher) を用いて気管支平滑筋の細胞株およびヒト気管支平滑筋由来の初代培養細胞に、各種成長因子 (EGF, FGF, LPA, PDGF) および IL-4/IL-13 などを作作用させて予備実験を行った。各種成長因子およびサイトカインの添加により、気管支平滑筋細胞の増殖が確認された。

更に、気管支平滑筋細胞に適した細胞増殖試験として BrdU の取り込みを利用した細胞増殖定量キットを用いて実験を行った。遺伝子導入を行い NK1 受容体を高発現させたヒト気管支平滑筋由来の初代培養細胞に 10%FBS または PDGF を作用させると、細胞増殖の指標である BrdU の取り込みが増加した。NK1 作動薬の Substance P で前処理すると、この BrdU の取り込みは抑制される。

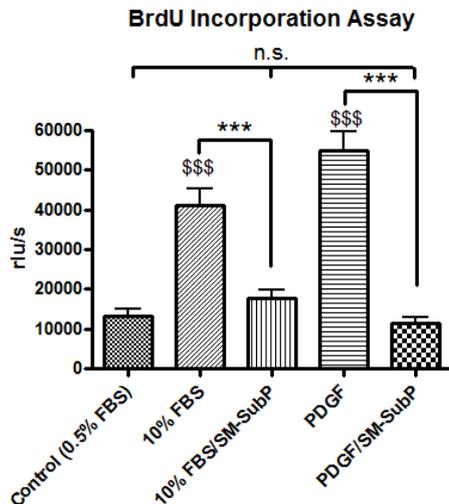


図 2. NK1 受容体を高発現させたヒト気管支平滑筋細胞の細胞増殖における NK1 作動薬の効果

(3)NK1 作動薬による PTEN の活性化

NK1 の細胞増殖抑制のメカニズムに係わるより上流の分子を明らかにするため、腫瘍抑制因子として同定され、細胞増殖抑制に深く関与する PTEN をターゲットとして NK1 作動薬を用いた実験を行ったところ、高い PTEN フォスファターゼ活性を認め、NK1 が PTEN を介して気管支平滑筋の細胞増殖抑制に強く関与する可能性を示す結果を得た。

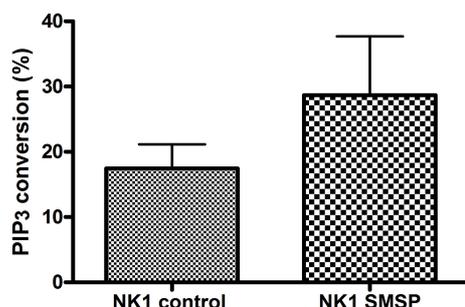


図 3. PTEN フォスファターゼ活性. NK1 作動薬により活性化が増加する。

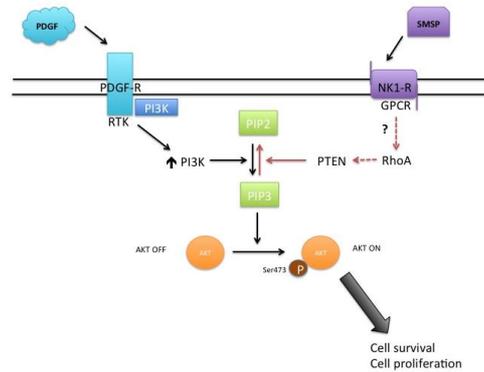


図 4. 気管支平滑筋の細胞増殖に関する分子シグナル伝達経路の研究代表者らの仮説

G-protein coupled receptors (G タンパク質結合受容体: GPCRs) は Akt のリン酸化を含むシグナル伝達を介して ASM の細胞増殖を促進する事が報告されている。種々の腫瘍モデルでの NK1 の活性化が有糸分裂を増進するため、我々は当初、NK1 受容体の活性化は病的な ASM の増殖を促進すると考えた。しかし予想に反して、NK1 受容体作動薬の SM-SubP は、NK1 受容体を高発現させた気管支平滑筋細胞を用いた実験で、細胞増殖因子の PTEN の活性化、成長因子 (PDGF) による細胞増殖と Akt のリン酸化を阻害した。NK1-GPCR は、喘息における ASM の細胞増殖を軽減するユニークで有力な細胞増殖抑制の標的となり得ると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Bernstein K, Vink JY, Fu XW, Wakita H, Danielsson J, Wapner R, Gallos G. Calcium-activated chloride channels anoctamin 1 and 2 promote murine uterine smooth muscle contractility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 査読有り, 211(6), 2014, 688.e1-10.

DOI: 10.1016/j.ajog.2014.06.018.

Townsend EA, Zhang Y, Xu C, Wakita R, Emala CW. Active components of ginger potentiate -agonist-induced relaxation of airway smooth muscle by modulating cytoskeletal regulatory proteins. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 査読有り, 50(1), 2014, 115-24.

DOI: 10.1165/rcmb.2013-01330C.

加藤 靖隆, 船山 ひろみ, 宗正 隆明, 黒田 翠, 平山 展大, 朝田 芳信. 再生医療を推進するための歯髄細胞のバンキングに対する意識調査. *鶴見歯学*, 査読有り, 40(1), 2014, 1-6.

Gallos G, Remy KE, Danielsson J,

Funayama H, Fu XW, Chang HY, Yim P, Xu D, Emala CW Sr. Functional expression of the TMEM16 family of calcium-activated chloride channels in airway smooth muscle. Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol. 査読有り, 305(9), 2013, L625-34.
DOI: 10.1152/ajplung.00068.2013.

〔学会発表〕(計10件)

大河内彩子, 田高悦子, 船山ひろみ, 朝田芳信. 多職種協働に向けた「気になる子ども」評価尺度の開発: 小児歯科研究プロトコル. 第74回日本公衆衛生学会総会, 2015年11月4-6日, 長崎ブリックホール(長崎県長崎市).

古屋 吉勝, 船山ひろみ, 加藤 靖隆, 長岡 悠, 平山 展大, 朝田 芳信. 歯髄細胞のパンキングに対する意識調査(第二報) 2010年と2014年の比較. 第53回日本小児歯科学会大会, 2015年5月21-22日, 国際会議場(広島県広島市).

太田 増美, 船山ひろみ, 田島 格, 高橋 沙織, 平山 展大, 朝田 芳信. KLK4遺伝子多型と齲蝕発症の関連性について. 第53回日本小児歯科学会大会, 2015年5月21-22日, 国際会議場(広島県広島市).

清水 雄, 花谷重守, 佐貫千夏, 藤田菜津子, 徳江 藍, 清川あゆみ, 船山ひろみ, 小平裕恵, 清水政紀, 大久保力廣. 障害者の補綴処置(vol. 8)-グライディングを習癖とする患者へ金属構造義歯を装着し経験したトラブル-. 第31回日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2014年11月14-16日, 仙台国際センター(宮城県仙台市).

船山ひろみ, 守安克也, 朝田芳信. 低リン血症性くる病児に咬合誘導を行った1例. 第31回日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2014年11月14-16日, 仙台国際センター(宮城県仙台市).

成山明具美, 船山ひろみ, 守安克也, 井出正道, 朝田芳信. 鶴見大学歯学部小児歯科学講座における学生実習の現状. 第29回日本小児歯科学会関東地方会大会・総会, 2014年9月28日, 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市).

船山ひろみ, 宗正隆明, 脇田亮, 深山治久, 朝田芳信. 副作用軽減を目的とするイオントフォーシスを用いたビスフォスフォネート製剤の新しい投与方法. 第52回日本小児歯科学会大会, 2014年5月16-17日, きゅりあん(東京都品川区).

Yim P, Fu W, Townsend EA, Funayama H, Gallos G. A novel strategy to treat human pre-term labor - targeting the TMEM16/anoctamin chloride channel in human pregnant uterus. 16th Annual Academic Evening, May 29, 2013, New York(USA).

Chang HY, Funayama H, Mizuta K, Emala CW, Gallos G. MD4 Anti-Proliferative Effects of the Neurokinin 1 Receptor in Human Airway Smooth Muscle Cells. American Thoracic Society International Conference, May 17-22, 2013, Philadelphia(USA).

Chang HY, Chang, Fu W, Townsend EA, Funayama H, Emala CW, Gallos G. A novel strategy to treat human pre-term labor - targeting the TMEM16/anoctamin chloride channel in human pregnant uterus. Association of University Anesthesiologists 60th Annual Meeting, April 4-6, 2013, Miami(USA).

〔図書〕(計3件)

船山ひろみ, 熊谷賢一. 株式会社ヒョーロン・パブリッシャーズ, 学童期(混合歯列期)の子どもの治療と対応のポイント, 8. 学童期の歯科小手術, -軟組織: 小帯・粘液嚢胞/硬組織: 上顎正中過剰埋伏歯・歯牙腫. 子どもの患者の治療・対応に上手くなるう! 各成長ステージにおける対応ポイント(朝田芳信 編著), 2015, 160(122-131).

船山ひろみ. 株式会社ヒョーロン・パブリッシャーズ, 1. 乳幼児期(乳歯列期)の子どもの治療と対応のポイント, 10. 乳幼児の治療を安全に行うためのポイント, アレルギー. 子どもの患者の治療・対応に上手くなるう! 各成長ステージにおける対応ポイント(朝田芳信 編著), 2015, 160(68-69).

熊谷賢一, 船山ひろみ. 株式会社ヒョーロン・パブリッシャーズ, 小帯形成術. 一般臨床医のための歯科小手術スキルアップ(今村栄作, 山田浩之 編著), 2014年, 168(100-105).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船山ひろみ(FUNAYAMA, Hiromi)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号: 00359530

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

遠藤 康男(ENDO, Yasuo)
東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師
研究者番号: 50005039

脇田 亮(WAKITA, Ryo)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科(歯)・准教授
研究者番号: 60376712