

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463058

研究課題名(和文) 気管上皮を介した気管支平滑筋弛緩機構の解明

研究課題名(英文) Airway smooth muscle relaxation by crosstalk with tracheal epithelium

研究代表者

脇田 亮 (Wakita, Ryo)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：60376712

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)：気管支平滑筋細胞へのTrifolirhizin前処理で細胞内カルシウムイオン濃度抑制が認められた。しかし漢方生薬を添加した気管上皮細胞の培養液で処理した気管支平滑筋細胞ではホスホキナーゼA活性化による収縮抑制経路は活性化されず、Ca²⁺低依存性の経路の関与が示唆された。またカルシウムイオン測定代わりにミオシン軽鎖のリン酸化を収縮の指標に用いるべく検討中である。

一方TrifolirhizinはホスホキナーゼCを介する経路の抑制に関与している可能性を見出した。これはPC2-Bの併用で増強することが判明し、RhoAを標的として経路を探索中である。

研究成果の概要(英文)：Pre-treatment of primary cultures of airway smooth muscle by trifolirhizin inhibited the increase of intracellular calcium ion concentration. However the activation of phosphokinase A was not observed in the airway smooth muscle cells pretreated with culture of airway epithelial cells which were exposed to herbal medicine, and continuing suppression of muscle contraction was not also observed. Therefore, the involvement of low calcium ion dependent pathway is suspected, and the use of phosphorylation of myosin light chain as an index of contractile is expected to further investigation.

Meanwhile we found the possibility that trifolirhizin can work by inhibiting the PKC pathway. In addition, the combination use of PC2-B and trifolirhizin obtained enhanced inhibition of intracellular calcium increase, so that alternative pathway like Rho is required to consider as a target.

研究分野：歯科麻酔

キーワード：気管支平滑筋 漢方薬 カルシウムイオン trifolirhizin ホスホキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は慢性化した気管支炎症により、気道過敏性の亢進、可逆性の気道狭窄を起し喘鳴・咳などの症状をきたす疾患である。その発症機序や誘因として、アレルゲンなどの環境因子や種々のストレス因子が誘因となり、気管支平滑筋収縮、粘膜肥厚、気道分泌亢進により気道の狭窄・閉塞が起こるとされておりその病態生理に関し様々な研究がなされているが不明な点も多い。治療に関しては発作時には気管支拡張剤とステロイド剤の使用による気管支狭窄の解除、緩解時にはステロイドなどによる気道炎症のコントロールや長時間作用性の気管支拡張剤、ロイコトリエン拮抗薬の併用が行われているが、症状の安定化を図るのは困難を伴うことが多い。また同時に日常生活での自己管理も重要であり、服薬とともに患者の負担は大きなものとなっている。

欧米では近年、漢方の処方積極的に取り入れられ始めており、副作用発現減少や難治性の症状改善を目的とした使用も増加している。それに伴い漢方成分の薬理効果に注目が集まっており申請者らの属する研究グループも漢方生薬の合剤である ASHMI を実際の臨床で呼吸器疾患治療に応用しているグループと共同研究を行っている。この ASHMI に含まれる苦参には Trifolirhizin が含まれているが、これには近年抗アレルギー作用が示唆されている。

プロスタグランジン (PG) E₂ は細胞膜リン脂質より切り出されたアラキドン酸より生ずる生理活性脂質の一種で受容体サブタイプ (EP₁~EP₄) を介して全身に多種多様な生理活性を示す。EP₂、EP₄ はアデニル酸シクラーゼの活性化に共役し、細胞内 cAMP レベル増加の結果、PKA 活性化による気管の弛緩に関与することが知られている。その他にも気管支平滑筋の収縮機序に関する膜受容体を介した経路は多くの研究がなされているが漢方成分の作用は不明な点も多く、高い臨床効果に対して説明がつかない部分も多い。我々は漢方生薬の一部成分は気管上皮へ作用し、その結果産生されたメディエータが気管支を二次的に弛緩させるという気道クlostok 仮説を考えた。

2. 研究の目的

気管支喘息発作の抑制機構として、培養細胞やマウス摘出気管支を使用した EP 受容体を介した調節機構の経路解明と、気管支平滑筋収縮に対する抑制、特に上述した気道クlostok 仮説を証明しこの機構解析を通して、気管支平滑筋の持続収縮機構の機序解明を目指す。ASHMI、Trifolirhizin の細胞内抑制経路の活性系あるいは抑制系を気管支平滑筋細胞株を用い確認するとともに、気管上皮細胞株の Histamine/Bradykinin 等の投与によるケミカルメディエーター産生経路について基礎的探索を行う。さらに生薬由来

成分の影響によるメディエータ産生についても検討を加え、上皮-平滑筋細胞間の情報交換を介した気管支平滑筋収縮調節機構の解明を目指す。

本研究では気管支平滑筋培養細胞および気管支上皮培養細胞を用い、SHMI, trifolirhizin, PC-2A/B 等の生薬由来成分の気道上皮を介する気管支平滑筋弛緩機序の解明を目的として、筋収縮とその持続に関連した細胞内カルシウムイオン再取込および細胞内関連シグナル調節タンパク発現に関して、agonist/antagonist の効果を比較検討するとともに治療法の検索を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 気管支上皮細胞由来成分の気管支平滑筋細胞収縮への影響

培養気管支上皮細胞を ASHMI 及びヒスタミン、各々の溶媒のみ、で 30 分間前処理を行った。処理した細胞培養液を回収し、気管支平滑筋細胞の培養液中に添加した。陰性対照として無処理群、陽性対照として PGE₂ 添加群を設定した。30 分処理後、細胞よりタンパク質を回収し、phospho-Hsp20 産生量を Western blot 法を用い測定した。

(2) ヒスタミン誘発気管支平滑筋細胞収縮における ASHMI / Trifolirhizin / PGE₂ の抑制効果

培養気管支平滑筋細胞を ASHMI / Trifolirhizin / PGE₂ で 30 分間前処理を行った後、ヒスタミン刺激を行った。刺激による細胞内カルシウム濃度を、カルシウムイオン選択性蛍光プローブを用い連続的に測定し、カルシウムイオン濃度の各前処理による抑制度を計測した。

(3) PGE₂ / ASHMI の気管支平滑筋細胞収縮抑制効果における PGE₂ 受容体拮抗薬の影響

培養気管支平滑筋細胞をプロスタグランジン受容体サブタイプである EP₂ および EP₄ 受容体の拮抗薬および溶媒対照で 15 分間処理を行った後、ASHMI、PGE₂、対照で前処理を 30 分行う。その後と同様、各種刺激によるカルシウム濃度変化に及ぼす影響を計測した。

(4) Trifolirhizin の PLC- β 抑制効果

単離されたホスホリパーゼ C (PLC) - β を用い活性反応を DiFMUP という蛍光基質を用い測定した。DiFMUP を、PLC を含む溶媒中に加え、蛍光強度を経時的に 1 時間測定した。同様に PLC を含まない溶媒中の蛍光強度を測定し、両者の比を PLC 活性の指標とした。溶媒に Trifolirhizin および PLC 阻害薬である U-73122 を加え、各々の PLC 活性阻害効果を測定した。

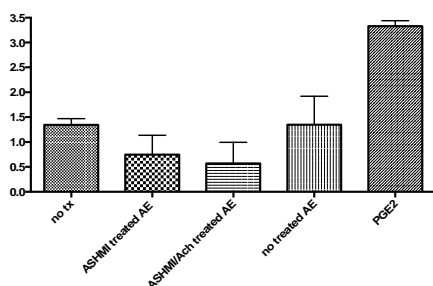
(5) Trifolirhizin の気管支平滑筋細胞収縮

抑制効果における苦参抽出成分 PC2B の影響
 培養気管支平滑筋細胞を Trifolirhizin 単独または Trifolirhizin と PC2B の両者で 30 分間前処理を行った後、(2)と同様にヒスタミン刺激によるカルシウム濃度変化を測定し、各種単独処理と比較した併用による細胞内カルシウム濃度への影響を測定した。

4. 研究成果

(1)気管支上皮細胞由来成分の気管支平滑筋細胞収縮への影響

培養気管支上皮細胞 (BEAS-2B) に ASHMI 単体あるいは ASHMI+アセチルコリンを暴露させた後の培養液を回収し、気管支平滑筋細胞の前処理に用いた。平滑筋弛緩の指標として Gs サブユニットと共役した G タンパク質共役受容体を介したホスホキナーゼ A (PKA) の活性化により発現する Hsp-20 量を用いた。

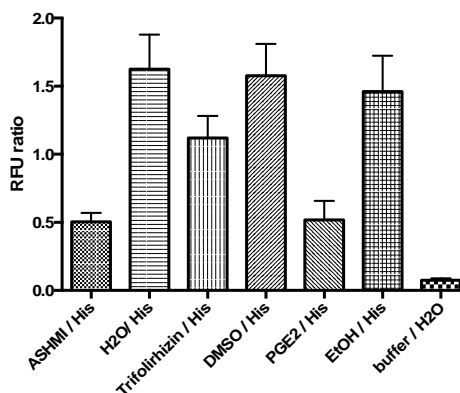


Supernatant of ASHMI treated airway epithelial cell (AE) didn't increase phospho-Hsp20.

PGE2 処理を行った気管支平滑筋では、Hsp-20 産生量の上昇を認めた。その一方 ASHMI 処置した気管上皮培養液、ASHMI+アセチルコリン処理した気管上皮培養液のどちらも、処理しなかった培養液と同様 Hsp-20 を増加させなかった。BEAS-2B 細胞株は ASHMI の存在下で PGE2 等の cAMP の産生に伴う PKA 活性化による気管支平滑筋収縮の抑制効果を有する物質を産生しない可能性がある。その一方で、生体内環境を再現するため、上皮細胞が繊毛など細胞の極性を有した状態での ASHMI 刺激による効果やホスホキナーゼ C (PKC) を介した収縮機構の抑制等を再検討する必要がある。

(2)ヒスタミン誘発気管支平滑筋細胞収縮における ASHMI / Trifolirhizin / PGE2 の抑制効果

平滑筋収縮の指標として、細胞内カルシウムイオン濃度上昇を用いた。ASHMI とその一成分である Trifolirhizin による気管支平滑筋細胞 (ASM) の前処理により、ヒスタミン刺激による細胞内カルシウムイオン濃度上昇は抑制された。この効果は陽性対照である PGE2 と ASHMI は同程度であったが、Trifolirhizin ではその効果は軽度であった。従来 ASHMI の気管支平滑筋収縮抑制の主作用は Trifolirhizin と考えられていたが、本研究の結果、細胞内カルシウム濃度調節に関わる未知の成分が含まれている可能性がある。また Trifolirhizin の作用の一端はカルシウム

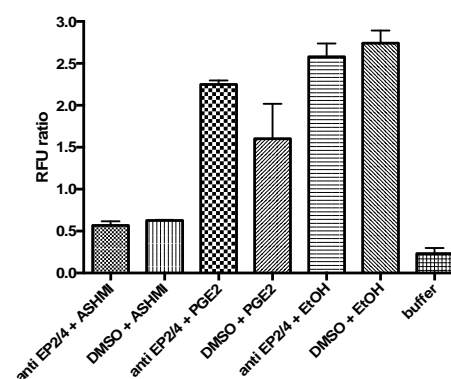


Pretreatment of ASHMI, Trifolirhizin, PGE2 or each vehicle with calcium free buffer inhibited histamine induced calcium release from primary airway smooth muscle cells

濃度上昇をある程度抑制することが判明したが、その程度は PGE2 と比較して軽度であった。同じ経路 (PKA を介する経路) を介しているかどうかは明らかにはならなかった。

(3)PGE2 / ASHMI の気管支平滑筋細胞収縮抑制効果における PGE2 受容体拮抗薬の影響

PGE2 受容体である EP2/EP4 のアンタゴニストで事前処理を行った気管支平滑筋は PGE2 の細胞内カルシウム濃度上昇抑制を減少させるが、ASHMI による上昇抑制に影響を与えなかった。そのため、ASHMI の効果の一部は、直接 EP 受容体、すなわち Gs タンパクと共役した受容体と結合することで、cAMP の産生と PKA を活性化する経路を経ているわけではないと考えた。

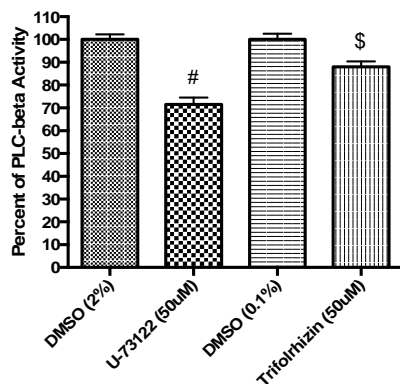


EP2/EP4 antagonist didn't reduce the inhibition of histamine induced calcium release by ASHMI

(4)Trifolirhizin の PLC-β 抑制効果

気管支平滑筋を収縮させる経路である Gq タンパク質と共役した PKC の活性化を介した経路への影響を調べる目的に、単離したホスホリパーゼ α (PLC) に対する Trifolirhizin の直接作用を検討した。陽性対照である U-73122 と同様に Trifolirhizin は PLC 活性を低下させた。これにより、PLC によりホスファチジルイノシトール 2 リン酸 (PIP) から 2 イノシトール 3 リン酸 (IP3) やジアシルグリセロール (DAG) を生成が抑制され、その結果として IP3 を介した筋小胞体内から

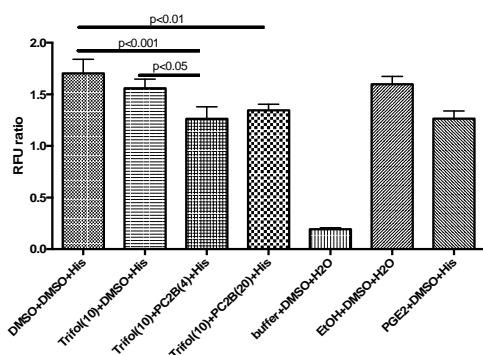
細胞質内へのカルシウムの放出や DAG を介した PKC の活性化によるリン酸化ミオシン軽鎖の脱リン酸化阻害などにより、気管支平滑筋収縮を減弱させる可能性が考えられた。



Suppression of PLC-beta activity by trifolirhizin (\$, p<0.01) and U-73122; PLC inhibitor (#, p<0.001).

(5)Trifolirhizin の気管支平滑筋細胞収縮抑制効果における苦参抽出成分 PC2B の影響

Trifolirhizin 単体よりも ASHMI 処理下で細胞内カルシウム濃度抑制効果が高いことから、ASHMI 成分内に未知のカルシウムイオン調節作用のある成分が考えられた。ASHMI の構成生薬の一つである苦参は気管支平滑筋弛緩作用を主に担っていると考えられており、今回 Trifolirhizin と同様に含まれる PC2-A/B の影響を確認することとした。PC2-B 単体で PC2-A には見られなかったヒスタミン刺激によるカルシウム増加を抑制作用が確認されたがその程度は少なかった。しかし Trifolirhizin との同時投与により、低濃度の Trifolirhizin および PC2-B で高濃度の Trifolirhizin に匹敵する、細胞質カルシウムイオン濃度抑制作用が認められた。今後この相互作用に関し、PKC を介した経路並びに PDE 抑制による PKA 経路の活性化に関し検討する必要がある。更に細胞内カルシウムイオン濃度に依存しない Rho を介するリン酸化ミオシン軽鎖 (pMLC20) の脱リン酸化阻止、すなわち収縮を維持する経路への影響に関しても確認する必要がある。



PC2B enhanced the inhibitory effect of histamine induced calcium release by trifolirhizin.

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

生姜辛味成分による気管支拡張作用の分子機序解明. 脇田 亮. 第 25 回スパイス&ハーブ研究成果セミナー. 2017.2.21, 学生会館(東京都、千代田区)

Selective Pharmacologic Targeting of the GABAA alpha4 subunit in Airway Smooth Muscle to Alleviate Bronchospasm. GT Yocum, R Wakita, MR Stephen, JM Cook, CW Emala, G Gallos. AUA 62nd Annual Meeting, 2015.4.25, Nashville (TN, USA)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

脇田 亮 (WAKITA RYO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 60376712

(2)研究分担者

船山 ひろみ (FUNAYAMA HIROMI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号: 00359530

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし