

## ●ファイザーフェローシップ報告

## COPD 病態におけるアセチルコリンの役割の解明

小荒井 晃

## はじめに

今回、ファイザーフェローシップによる助成を受け、2004年10月1日～2006年9月6日の約2年間、London, Imperial 大学国立心肺研究所気道疾患部門にて LE Donnelly 先生, PJ Barnes 先生のご指導のもと、貴重な留学の機会を経験することができた。以下、その研究成果を簡単に報告する。

## 課 題

COPD の病態におけるアセチルコリン (acetylcholine : ACh) の役割を解明することを課題として与えられ、SL Traves とともに①ACh の炎症細胞に与える影響<sup>1)</sup>、および②末梢気道における ACh による気道収縮反応の制御<sup>2)</sup>に関して検討を行った。

## ACh の炎症細胞に与える影響の検討

## 1. 背 景

ACh は、ムスカリン性 ACh 受容体 (ムスカリン受容体) やニコチン性 ACh 受容体 (ニコチン受容体) を刺激し神経伝達、分泌、平滑筋収縮、血管拡張など多くの重要な活動を制御している物質である。気道では神経系気道収縮経路においてコリン性気道径制御が優位であり、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) では抗コリン薬が気道閉塞症状軽減に用いられている。

肺胞マクロファージは COPD の病態生理に重要であり、IL-8 や IL-6 などの炎症性サイトカインや LTB<sub>4</sub> を放出する。近年、ウシ肺胞マクロファージは ACh 刺激により好中球、単球、好酸球遊走刺激物質を放出し<sup>3)</sup>、また COPD 患者の喀痰細胞は ACh 刺激により LTB<sub>4</sub> 放出を増強するという報告もある<sup>4)</sup>。以上より ACh は、マクロファージからの炎症性メディエーターの放出を刺激して COPD の病態生理に関与し、ムスカリン受容体拮抗

薬は抗炎症作用を有する可能性がある。

## 2. 目 的

ヒトマクロファージにおけるムスカリン受容体の発現および機能を検討した。

## 3. 方 法

単球、単球由来マクロファージ [monocyte-derived-macrophages (MDM) : 末梢血単球を GM-CSF で 12 日間培養]、気管支肺胞洗浄マクロファージ、手術肺マクロファージ (手術肺の洗浄により得られたマクロファージ) から RNA を採取し、M<sub>1</sub>～M<sub>5</sub> 受容体発現を real-time PCR 法を用いて検討した。また、M<sub>2</sub> および M<sub>3</sub> 受容体を免疫染色で確認した。受容体機能評価のため MDM および手術肺マクロファージを 100 μM カルバコール (carbachol : CCh) で 30 分間刺激し、LTB<sub>4</sub> 放出量を測定した。

## 4. 結 果

マクロファージの分化において M<sub>2</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub> 受容体発現に違いはなかった (図 1)。手術肺マクロファージでは、単球や MDM より M<sub>1</sub> mRNA の発現は有意に高かった (図 1A)。また、手術肺マクロファージや気管支肺胞洗浄マクロファージでの M<sub>3</sub> mRNA 発現は、単球や MDM に比べ有意に高かった (図 1C)。COPD では健常者と比べ受容体発現に違いがなかった。免疫染色では M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> 受容体はすべてのサンプルで認められた (図 2)。健常者、喫煙者、COPD 患者のマクロファージでは M<sub>2</sub> および M<sub>3</sub> 受容体の染色性に明らかな差は認めなかった (n=3) (図 2)。CCh は、MDM (278.9±84.9 vs 230.4±84.8 pg/ml, n=6) ではなく手術肺マクロファージ (325.9±113.2 vs 1,789±994.3 pg/ml, n=9, p<0.05) で、LTB<sub>4</sub> の放出を増加させた (図 3)。

## 5. 結 論

COPD 患者においてマクロファージ上のムスカリン受容体は、LTB<sub>4</sub> 放出を介し気道炎症に影響を与えている可能性があり、ムスカリン受容体拮抗薬は抗炎症作用を有する可能性が示唆された。

連絡先：小荒井 晃

〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町 1-1

東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座呼吸器内科学分野

(E-mail: koarai@rm.med.tohoku.ac.jp)

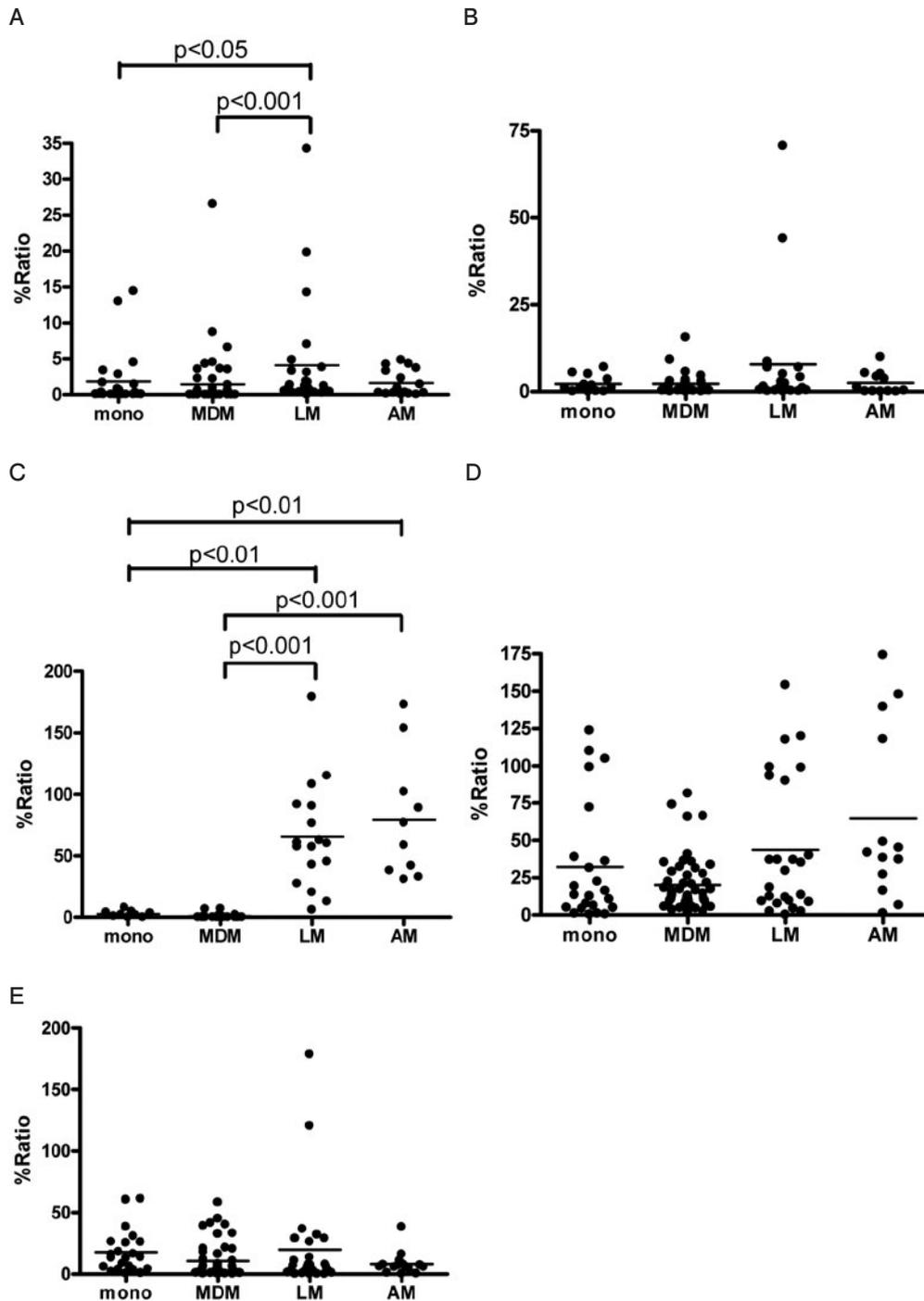


図1 単球, MDM, 手術肺マクロファージ, 気管支肺胞洗浄マクロファージにおけるムスカリン受容体発現の検討. real-time PCRを用いてそれぞれのサンプルの, (A) M<sub>1</sub> mRNA, (B) M<sub>2</sub> mRNA, (C) M<sub>3</sub> mRNA, (D) M<sub>4</sub> mRNA, (E) M<sub>5</sub> mRNAの発現を測定した. 内因性コントロールであるヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ mRNAに対する割合で表記した. 水平の線は平均値を表している. mono: 単球, MDM: 単球由来マクロファージ, LM: 手術肺マクロファージ, AM: 気管支肺胞洗浄マクロファージ.

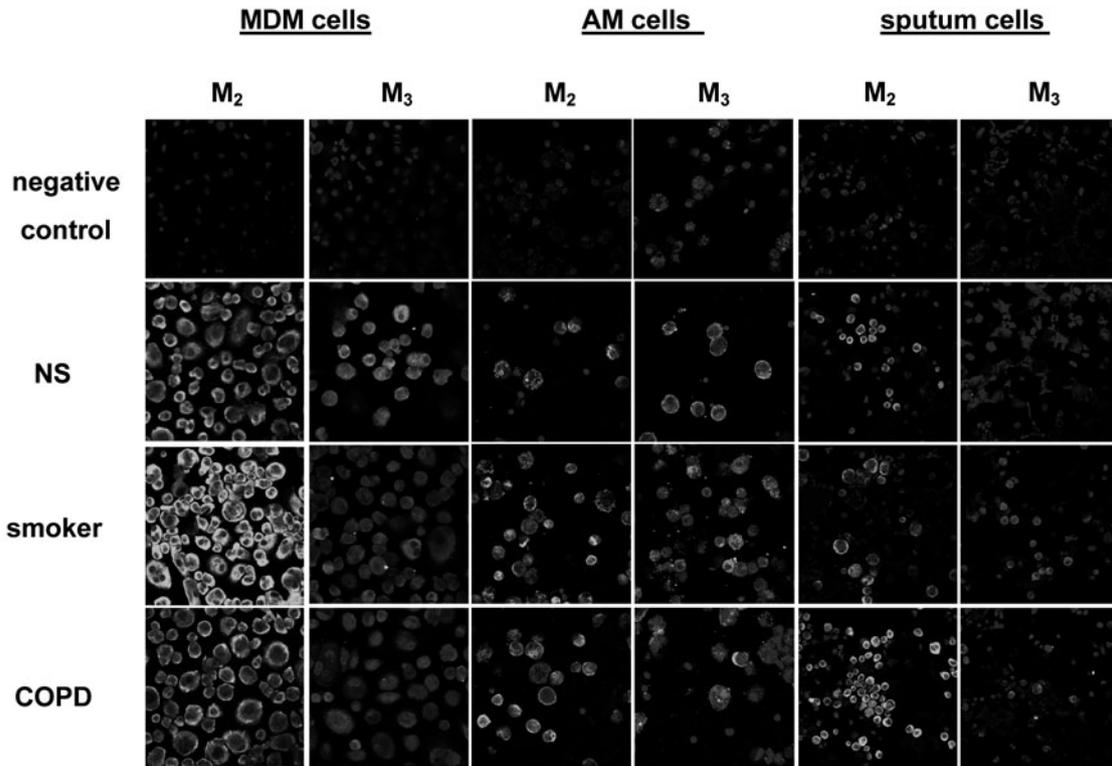


図2 免疫染色を用いた M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> 受容体発現の検討. 健常者, 喫煙者, COPD 患者からの MDM, 気管支肺胞洗浄マクロファージ (AM), 喀痰細胞 (sputum) における細胞免疫の結果として, それぞれグループ (n=3) の代表的な画像を示した. negative control: 一次抗体としてウサギ IgG を使用し, オレンジ色は autofluorescence を示す. NS: 健常者, smoker: 喫煙者, COPD: COPD 患者.

### 末梢気道における ACh による気道収縮反応の制御に関する検討

#### 1. 背景

気道では神経系気道収縮経路においてコリン性気道径制御が優位であり, COPD では抗コリン薬が気道閉塞症状軽減に用いられている<sup>5)</sup>. ACh は神経末端より放出され, 平滑筋上に存在する M<sub>3</sub> 受容体を介して気道収縮させる. M<sub>3</sub> 受容体刺激は G<sub>q</sub> 蛋白質を介しホスホリパーゼ C を活性化し, IP<sub>3</sub> の増加および細胞内 Ca<sup>2+</sup> を増大させ平滑筋の収縮を生じる. ACh はまた, M<sub>2</sub> 受容体刺激により G<sub>i</sub> 蛋白質を介し cAMP を減少させ, 平滑筋の弛緩反応を減弱させることで気道収縮に関与しているとも考えられている<sup>6)</sup>. しかしながら現在までこれらの気道収縮の機序は中枢気道を用いた検討により確立されたものである.

最近, 末梢気道病変が COPD の重症度と相関のあることが認められ<sup>7)</sup>, COPD 病態生理における末梢気道病変の重要性が脚光をあびているが, 末梢気道における気道収縮反応の制御に関してはいまだ不明であり, 末梢気道における ACh による気道収縮反応の制御を明らかにすることを目的に, 顕微鏡下で末梢気道収縮反応を観察

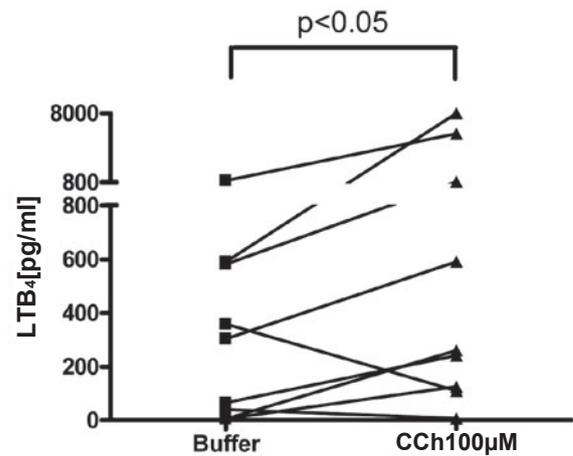


図3 100 μM carbachol による手術肺マクロファージ LTB<sub>4</sub> 放出増強効果. 100 μM carbachol で 30 分間刺激後の手術肺マクロファージからの LTB<sub>4</sub> 放出量の比較 (n=9). Wilcoxon matched paired テストを用いた.

できる precision cut lung slices (PCLS) システムを用いて検討を行った<sup>8)</sup>.

#### 2. 目的

ラットおよびヒト末梢気道収縮反応における M<sub>2</sub> およ

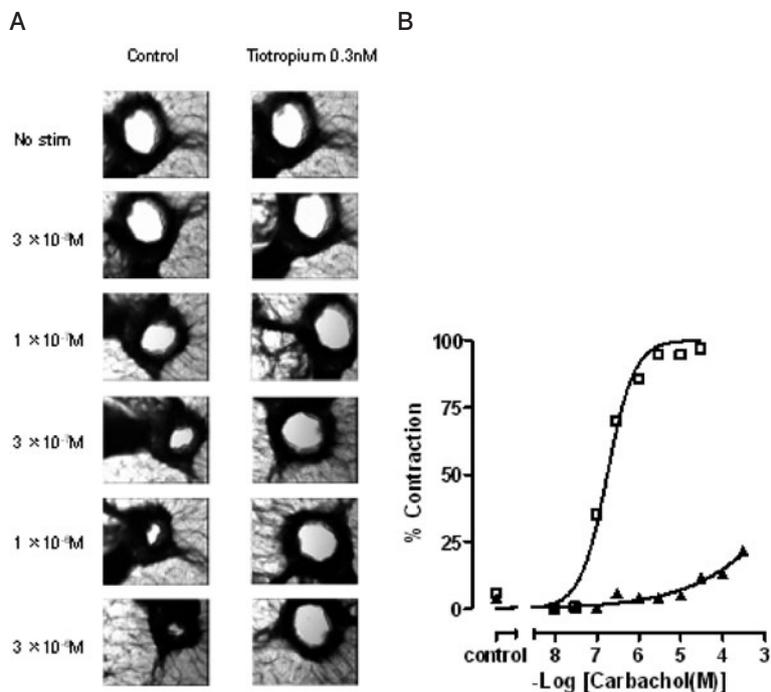


図4 ヒト末梢気道における気道収縮反応および tiotropium の効果. ヒト末梢気道を含んだPCLSをメディアまたは0.3 nM tiotropium とともに90分間培養後 carbachol で低濃度より刺激した. (A) メディアまたは0.3 nM tiotropium で処理したヒト末梢気道の carbachol に対する気道収縮反応の代表的な画像. (B) メディア (□) または0.3 nM tiotropium (▲) で処理したヒト末梢気道の carbachol に対する代表的な用量反応曲線.

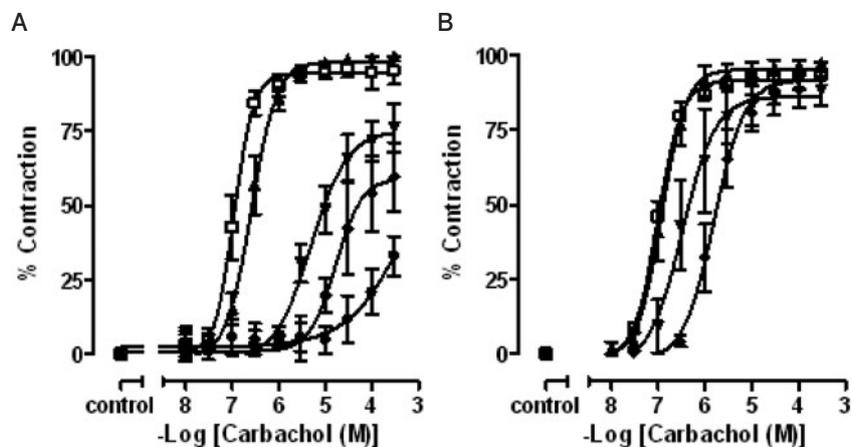


図5 ヒト末梢気道における tiotropium および AF-DX116 の気道収縮反応に対する抑制効果. ヒト末梢気道を含んだPCLSを (A) tiotropium または (B) AF-DX116 とともに90分間培養後 carbachol で低濃度より刺激した. (A) 肺切片をメディア (□, n=5) または tiotropium : 3 × 10<sup>-11</sup> M (▲), 1 × 10<sup>-10</sup> M (▼), 3 × 10<sup>-10</sup> M (◆), 1 × 10<sup>-9</sup> M (●) (n=5) で前処理した. (B) 肺切片をメディア (□, n=5) または AF-DX116 : 1 × 10<sup>-7</sup> M (▲), 1 × 10<sup>-6</sup> M (▼), 1 × 10<sup>-5</sup> M (◆) (n=5) で前処理した. データを平均 ± 標準誤差で表示した.

び  $M_3$  受容体の役割について検討した。

### 3. 方 法

肺組織は肺切除術を受けた患者肺から得て、アガロースを注入拡張後、組織を Kruidieck-Tissue Slicer® を用いて 250~300  $\mu\text{m}$  の厚さで切り出した。培養液で繰り返し肺切片を洗浄することでアガロースを洗い出し一晩培養後、顕微鏡下で実験を行った。末梢気道（ラット：気道径 50~300  $\mu\text{m}$ ，ヒト：100~1,500  $\mu\text{m}$ ）は顕微鏡下に画像を取り込み、刺激前の気道内腔面積を測定しこれを 0%，ムスカリン受容体アゴニストである CCh 刺激により完全閉塞した状態を 100% と定義し、実験を行った。

### 4. 結 果

ラットおよびヒト末梢気道では、 $3 \times 10^{-5}$  M CCh により最大収縮反応が得られた。ラット末梢気道では、 $1 \times 10^{-6}$  M CCh（最大収縮の 76% の反応）による気道収縮反応に対する抑制効果は、 $M_3$  受容体拮抗薬であるチオトロピウム（tiotropium）および 4-DAMP が  $M_2$  受容体拮抗薬（AF-DX116）よりも大きかった（ $EC_{50}$ ：tiotropium： $1.8 \pm 0.2 \times 10^{-10}$  M，4-DAMP： $2.2 \pm 0.6 \times 10^{-9}$  M，AF-DX116： $8.3 \pm 2.6 \times 10^{-7}$  M， $n=6$ ）。次に末梢気道収縮反応に対する  $M_2$  受容体の関与を調べるために Gi 蛋白阻害薬である百日咳毒素（pertussis toxin）の効果を調べた。ラットでの CCh による気道収縮反応を、pertussis toxin は小さいが有意に抑制した（ $EC_{50}$ ：control： $2.3 \pm 0.3 \times 10^{-7}$  M，pertussis toxin： $1 \mu\text{g/ml} = 9.6 \pm 0.2 \times 10^{-7}$  M，pertussis toxin： $10 \mu\text{g/ml} = 1.1 \pm 0.3 \times 10^{-6}$  M， $p < 0.05$ ， $n=6$ ）。ヒト末梢気道は CCh により濃度依存性に収縮し（ $EC_{50} = 1.7 \pm 0.1 \times 10^{-7}$  M， $n=5$ ），0.3 nM tiotropium 前投与により収縮反応はほぼ完全に抑制された（図 4）。ラット同様ヒト末梢気道でも tiotropium および AF-DX116 は濃度依存性に CCh による気道収縮反応を抑制し、その抑制効果は tiotropium のほうが AF-DX116 よりも大きかった（ $pK_B$ ：tiotropium： $10.05 \pm 0.05$ ，AF-DX116： $6.37 \pm 0.13$ ， $n=5$ ）（図 5）。ヒト末梢気道ではラットとは異なり、pertussis toxin は明らかな気道収縮抑制効果は認めなかった（ $n=5$ ）。

### 5. 結 論

ラットおよびヒト末梢気道では  $M_3$  受容体が気道収縮反応において主な役割をしており、 $M_2$  受容体はラットでは収縮反応に対する関与が認められたが、ヒト末梢気道では認められなかった。 $M_3$  受容体拮抗薬は中枢気道と同様、末梢気道でも気道収縮反応を効果的に抑制する

ことが示された。

## ま と め

本検討により、COPD において ACh がマクロファージを刺激し気道炎症に影響を与えている可能性、および末梢気道での ACh による気道収縮反応が、中枢気道同様  $M_3$  受容体優位であることを示し、COPD 治療におけるムスカリン受容体拮抗薬の有用性の機序の解明に貢献できたと考えられる。

謝辞：本留学の機会を与えてくださった東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座呼吸器内科学分野 一ノ瀬正和教授および東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座感染病態学分野 服部俊夫教授に深甚の謝意を表します。留学を支えてくださった東北大学医学部内科病態学講座感染症・呼吸器病態学分野の医局の先生方に心から感謝いたします。また、ファイザーフェロシップおよびかなえ奨学金による資金面での援助に心より感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Koarai A, et al. Rule of muscarinic receptors on human macrophage. ATS2007 poster. 2007.
- 2) Koarai A, et al. Rule of different muscarinic receptor subtypes in small airways contractions. ERS2006 poster. 2006.
- 3) Sato E, et al. Acetylcholine stimulates alveolar macrophages to release inflammatory cell chemotactic activity. Am J Physiol 1998; 274: L970-9.
- 4) Profita M, et al. Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients. Allergy 2005; 60: 1361-9.
- 5) Fryer AD, et al. Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. Am J Respir Crit Care Med 1998; 158: S154-60
- 6) Kume H, et al. Role of G proteins and KCa channels in the muscarinic and beta-adrenergic regulation of airway smooth muscle. Am J Physiol 1995; 268: L221-9.
- 7) Hogg JC, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med 2004; 350: 2645-53.
- 8) Martin C, et al. Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. Eur Respir J 1996; 9: 2479-87.