

咳・痰と気道クリアランスの薬理基盤構築：新しい視点からの治療薬開発と  
治療法改善へのアプローチ

宮田 健

**Novel Approach to Respiratory Pharmacology—Pharmacological Basis  
of Cough, Sputum and Airway Clearance**

Takeshi MIYATA

*Department of Chemico-Pharmacological Sciences, Graduate School of Medical and Pharmaceutical  
Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oehonmachi, Kumamoto 862-0973, Japan*

(Received August 11, 2003)

Disturbance of the normal mucociliary clearance due to hyperproduction of mucus and modification of its physicochemical characteristics is a common finding in airway diseases. Drugs that affect airway secretion have been developed and used to cleanse the respiratory tract for many centuries and in many countries. On the basis of the mechanism of their actions, the mucoactive drugs are classified into several groups. Some mucoactive drugs have direct effects on the production or composition of airway secretions, resulting in increased effectiveness of mucociliary clearance. Other mucoactive drugs do not have a specific action on mucus, but have beneficial effects on airway structure and function, which lead to correction of the pathophysiologic mechanisms that result in abnormal secretions. However, since many drugs have overlapping effects, it is difficult to classify these drugs into groups based on their major actions. Taken together with previous findings on mucoactive drugs, it appears that an antioxidant effect is a common property of mucoactive drugs and that it is a crucial action to exert their effects against airway diseases. In light of this idea, we must use specific experimental models to simulate pharmacologic events in airway inflammation. The development of new techniques has made it possible to identify and measure the mucus components, measure the rheologic parameters more accurately, and evaluate mucociliary clearance precisely in animals and humans. Therefore, with modifications of methods, we have investigated airway-cleansing drugs from various points of view to reflect actions in inflammatory states for more than two decades. Here, I introduce the methods we have used to study many of the parameters involved in airway clearance, including cough reflex, and describe some of the mucoactive-antitussive drugs that we have studied recently. There is an increasing usage of traditional Chinese herbal medicines in clinics and hospitals, because they tend to have moderate side effects and sometimes remarkable efficacy. To renormalize overall defects in airway disorders, Chinese medicines may be adequate, because they are composed of various herbs with weak but ubiquitous pharmacologic activities. We have been investigating Bakumondo-to. Bakumondo-to has been used for the treatment of bronchitis and pharyngitis accompanying severe dry cough. We found that unlike codeine Bakumondo-to had a notable antitussive activity against the cough associated with bronchitis and the cough increased by angiotensin-converting enzyme inhibitors. Recently, we have found that, in alveolar type II cells, Bakumondo-to attenuated phosphatidylcholine secretion increased by oxygen radicals from activated PMNLS. In addition, we found that Bakumondo-to itself stimulated phosphatidylcholine secretion and increased  $\beta$ -adrenoceptor gene expression in rat alveolar type II cells. We studied the mechanism of action and clarified that Bakumondo-to increased glucocorticoid-sensitive promoter activity. The effect may contribute to its ubiquitous effectiveness in the treatment of airway diseases. Various parameters (chemical properties, physical properties, mucus production, surfactant phospholipid production, and mucociliary clearance) are considered to be important for the dynamics and mobilization of airway secretions. Pharmacologic investigation, with appropriate techniques, of the ability of an agent to modify these parameters can provide useful information about its mechanism of action. However, since these parameters are interconnected, it is very complicated to elucidate the precise mechanisms of action of mucoactive drugs. This means that the goal of treatment cannot always be achieved by the modification of a single parameter, but should, more realistically, be aimed at a renormalization of several parameters. On the basis of this idea, glucocorticoids are ideal mucoactive drugs because they exert various pharmacologic effects in the lung. From a polypharmacologic point of view, a traditional Chinese medicine can be classified as a glucocorticoid-

熊本大学大学院医学薬学研究部薬物活性学分野 (〒862-0973 熊本市大江本町 5-1)

\*本総説は、平成 15 年度日本薬学会学術貢献賞の受賞を記念して記述したものである。

e-mail: tmiyata@gpo.kumamoto-u.ac.jp

like drug because Chinese medicines consist of many types of active components that have various pharmacologic effects. As one future course of research, we believe that efforts to seek compatible actions between glucocorticoids and Oriental medicines may lead to new opportunities for development of ideal airway-cleansing drugs with specific actions, *i.e.*, suppression of gene expression.

**Key words**—cough; sputum; mucociliary transport; type II pneumocytes; mucin gene; Bakumondo-to

## はじめに

1980年代後半まで気道系薬理学研究は未開拓の分野であり、特に慢性気管支炎や肺気腫などの咳と痰を伴う慢性閉塞性呼吸器疾患（COPD）については、十分な理解が得られておらず、満足な治療薬もなかった。その最大の理由は、気道の働きが粘膜上皮による防御、気道液の分泌、粘液線毛輸送、血管の透過性、神経の興奮性などの多様な機能が密接に関連して営まれているのに、それまでの研究は、特定の1つの機能とその修復を意図していたからである。

我々は「気道炎症」を念頭に置き、個体・細胞・分子レベルの気道炎症モデル実験系を確立し、気道炎症に伴う多彩な病態の本質を解明することに意を注ぐとともに、分子病態薬効解析へ応用・展開することにより、気道クリアランス修復という新しい視点からの治療概念を提唱してきた。本稿では、我々の知見を中心に、近年、急速な進展を見せつつある気道薬理学研究の成果の概要と今後の展望を述べる。

### 1. 咳の発症・制御機構

咳は、本来、粘液線毛輸送や免疫性機序とともに、気道クリアランスに必須の生体防御機構である。一方、咳の原因は多岐にわたり本来の生体防御反応から逸脱し諸種の生体機能に障害を与える場合も多い。臨床的に問題になる咳は多種多様であり、特に気道炎症時の咳は多成分からなる複合反射と考えられる。咳を止めるには、反射経路のうち咳中枢を抑制するか（中枢性鎮咳薬）、求心性あるいは遠心性経路を末梢のどこかで遮断するか（末梢性鎮咳薬）、又は調節機構を変化させればよい。<sup>1)</sup> 一方、咳反射自体を対象にした研究は少なく、咳の生理・薬理について残された課題は多い。

**1-1. 咳の反射弓** 咳は、ふつう気道粘膜に存在する rapidly adapting receptor や C-線維末端にある咳受容体が化学物質により、あるいは物理的に刺激を受けることによって発現する。その刺激は求心性神経の有髄の A $\delta$ -線維あるいは主に気管支領

域から立ち上がる無髄の C-線維を介して延髄の孤束核に入り、以後、延髄の咳反射の統合回路を経て、各種の遠心性神経に伝えられる。この反射弓を念頭においてみると、A $\delta$ -線維を介して起こる咳と気管支 C-線維を介して起こる咳が、生理学的・薬理的に同一のものであるのかいなかという疑問が生じる。事実、臨床的に ACE 阻害薬の副作用として発現する咳や cough variant asthma において発現する咳は従来の鎮咳薬が奏効しにくい。モルモットの咳でも気道粘膜の器械的刺激やクエン酸（CA）吸入による咳とカプサイシン（CS）やサブスタンス P の吸入による咳とはその挙動は明らかに異なる。すなわち、前者は吸息に続く大きい呼息反応からなり、大きい咳嗽音を伴う点で、後者とは明らかに異なる。このように、咳という現象は、生理学的・薬理的に画一的なものではないと考えられる。<sup>2)</sup>

**1-2. A $\delta$ -線維と C-線維の分布と役割** 咳の求心性神経の A $\delta$ -線維と気管支 C-線維の中で、後者はタキキニンや CGRP を含むペプチド作働性線維で、CS により刺激を受けやすい。<sup>3,4)</sup> この C-線維は喉頭部より気管分岐部に多く分布している。一方、器械的刺激に反応するとされる A $\delta$ -線維は、Widdicombe の成績などから喉頭部に多く分布することが示唆される。<sup>5)</sup> 我々は喉頭部の器械的刺激による咳は気管分岐部刺激による咳よりコデインで強く抑制されること、また、CS の連投により C-線維を破壊した条件下では、喉頭部、気管分岐部いずれの刺激で起こした咳も CS 未処置群に比べてコデインの鎮咳作用が強くなることを見出した（Fig. 1）。<sup>6)</sup> これらの成績は、上述の知見と符合している。また、コデインは A $\delta$ -線維を介する咳には奏功するが、C-線維を介する咳には奏功しにくい可能性を示している。ACE 阻害薬の副作用としての咳など乾性の咳は気管支 C-線維を介すると考えられ、<sup>7)</sup> これらの咳は一般に鎮咳薬が奏効しにくいことが問題となっているが、上記の成績は、これらの事実を裏付ける

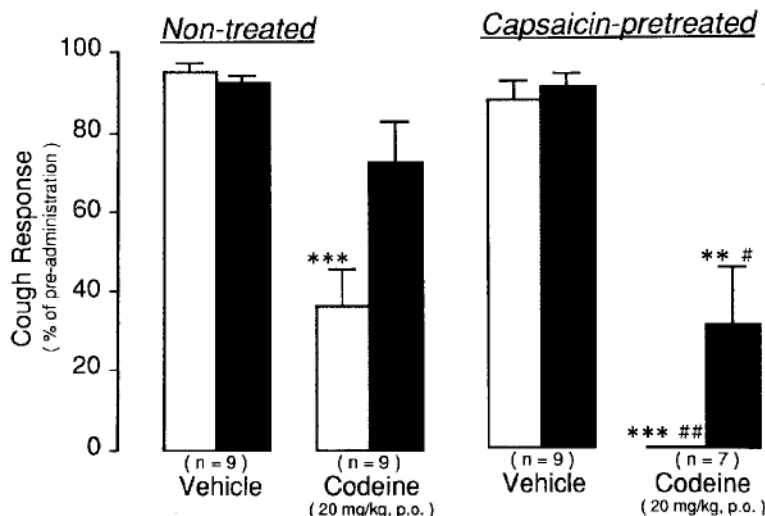


Fig. 1. The Effects of Codeine on the Cough Response Induced by Mechanical Stimulation to the Larynx (Open Columns) and to the Bifurcation of the Trachea (Filled Columns) in Capsaicin-treated Guinea-pigs

Each value shows the mean  $\pm$  SE. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , significantly different from the vehicle. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , significantly different from the corresponding non-treated group.

ものとも言えよう。この鎮咳効果の“刺激部位依存性”に関する知見は、鎮咳薬の薬効評価に際して、咳自身の性質を明らかにしておくことの重要性を示している。咳の求心性神経としてのC-線維の役割については異論もあるが、<sup>8)</sup>誌面の都合で今回は触れない。

**1-3. 難治性咳の実験モデル** 以上の問題についてさらに検討するために、我々は独自に考案した、一定濃度の刺激剤を気道の喉頭部や気管分岐部周囲に限局して噴射させることができる方法を用いてCAの5%溶液10  $\mu$ lを喉頭部及び分岐部にそれぞれ30ミリ秒間で噴射すると、噴射後10分間に前者では平均 $5.1 \pm 0.9$ 回、後者では平均 $8.3 \pm 0.6$ 回の咳反射を起こした。興味深いことにCSの噴射では、分岐部周辺の刺激においてのみ反応がみられた。<sup>9)</sup>この成績は、分岐部周辺にC-線維が分布しているという知見とも一致する。CA及びCSによる反応は、刺激部位における反応回数の違いだけでなく、反応自体、例えば、振幅の大きさや最大振幅に達するまでの時間などの点で明らかに異なっていた。また、CAや器械的刺激による咳は鎮咳薬コデインで抑制されたが、CSによる反応は抑制されなかった。CSによる反応は、タキキニンのNK2受容体のブロッカーや鎮咳活性を持つ漢方薬、麦門冬湯の活性成分オフィオポゴニンなどで抑制された。<sup>9)</sup>我々はNK2受容体の内在性アゴニストのニ

ューロキニンAがコデイン抵抗性の咳を起こすこと、<sup>10)</sup>麦門冬湯やオフィオポゴニンはコデインが効きにくい炎症時の咳やACE阻害薬による咳の増強を抑制する一方で粘液纖毛クリアランスを改善することなどを見出している。<sup>11,12)</sup>したがって、気管分岐部へのCSの噴射によって惹起された咳様の反応は難治性咳のモデルである可能性が考えられる。動物実験において、CAやCSの吸入による咳は、コデインの大量投与によっても完全には抑制されない。しかし、コデインにNK2受容体のブロッカーSR-48968を併用するとほぼ完全に抑制されるという成績も得ている。上記の考えが正しいことを示していると言えよう。

**1-4. 病態時咳の発現機序** まず、気管支炎モデル動物における咳はその挙動が健常動物を用いた器械的あるいは化学的刺激による咳と全く異なり、増強・頻発するのみならず、閾値低下を伴うことを明らかにした。咳を増強すると考えられる因子の中で、炎症性メディエーター、バリアーとしての気道上皮、及びニュートラルエンドペプチダーゼ(NEP)活性について検討した。その結果、炎症時の咳増強の主因は上皮の傷害や密着結合部(tight junction)の損傷によるものではなく、NEP活性の低下を伴うタキキニンやブラディキニンの作用増強によるもので(Fig. 2)、アンギオテンシン変換酵素阻害薬(ACE阻害薬)を投与された患者におけ

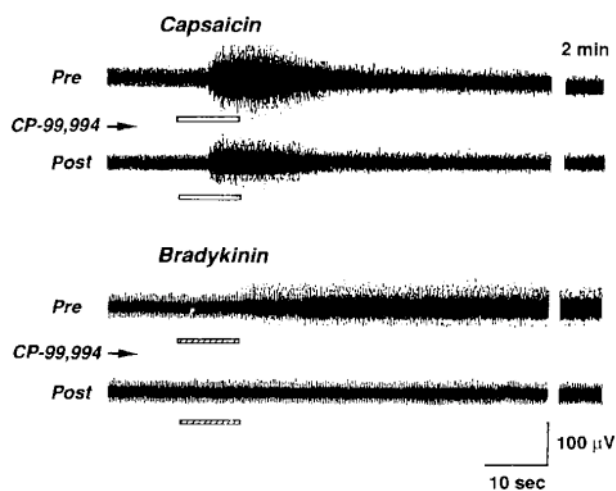


Fig. 2. Pharmacological Properties of Capsaicin- and Bradykinin-induced Discharges of the Vagal Afferent Nerves in Guinea Pigs

Capsaicin-induced discharges were not depressed by 3  $\mu$ mol/kg of CP-99994, a NK1 blocker. Capsaicin (0.3 nmol/kg) and bradykinin (1 nmol/kg) were administered into the closed artery of the tracheo-bronchial region. Pre: pre-administration, Post: post-administration.

る難治性乾性咳嗽も同じ発現機序によることが分かった。さらに、これらの咳に対しては末梢性鎮咳薬(麦門冬湯)が有効で、コデインなどの中枢性鎮咳薬はむしろ悪影響を及ぼすことを実験的に証明した。<sup>11)</sup>呼吸器内科医師の、咳に対する診療指針の1つになっている。

咳を修飾する気道系の要因は、他に、気道平滑筋の収縮、気道液・肺表面活性物質の分泌、粘液線毛輸送能、気道粘膜の微小循環、気道上皮のイオン輸送、さらには各種の炎症性細胞などが考えられ、これらについては後述する。

**1-5. 中枢性制御と鎮咳薬の作用機序** 近年、末梢性鎮咳薬が開発されつつある。<sup>13,14)</sup>麻薬性の中枢性鎮咳薬も気道の $\mu$ や $\kappa$ などのオピオイド受容体に作用点を持つことが知られている。我々が見出した、強い鎮咳活性を示す麦門冬湯の作用も末梢性の機序による。<sup>11,15)</sup>しかし、現在なお、臨床でよく使用されている鎮咳薬は中枢性鎮咳薬である。中枢性鎮咳薬の作用点は延髄の咳中枢にあると確信されてきた。中でも、麻薬性鎮咳薬については、その作用が麻薬拮抗薬によりほぼ完全に抑制されることから、その作用点はオピオイド受容体にあると考えられてきた。麻薬性鎮咳薬の機序として、オピオイド受容体 $\mu_2$ 受容体を介する鎮咳作用は、 $\delta_1$ 受容体を介して抑制的な、 $\delta_2$ 受容体を介して促進的な影響

を受けることなどが報告されている。<sup>16)</sup>さらに、各種神経伝達物質受容体のアンタゴニストやアゴニストを用いた薬理学的実験や神経化学的実験により、麻薬性、非麻薬性を問わず鎮咳作用の発現には、5-HT<sub>1A</sub>受容体が重要な役割を担っており、鎮咳薬は何らかの機序により5-HTの遊離を促進することにより鎮咳効果を発現することが示唆されている。<sup>15,16)</sup>また、非麻薬性鎮咳薬のデキストロメトルファンの脳内結合部位は $\sigma$ -サイトに類似しており、 $\sigma$ -サイトが鎮咳作用の発現に関与していると推定されている。<sup>16)</sup>以上の知見は薬理学的な拮抗実験により見出されたものであり、最近まで咳の制御及び鎮咳薬の作用機序についてのニューロンレベルでの報告は皆無に近かった。我々は薬理的、電気生理学的、及び神経化学的手法を用いて検討した結果、1) 孤束核及びその周辺ニューロン群の局所刺激により咳を誘発する、2) マイクロダイアリス法による検討で咳発現に伴い孤束核のグリシンレベルの上昇が見られる、3) 中枢性鎮咳薬は共通の薬理活性としてグリシン惹起電流抑制作用を示す、4) パッチクランプ法による解析から、最も強いグリシン惹起電流抑制作用を示すデキストロメトルファンはグリシン受容体に作用していることを明らかにした(Fig. 3)。<sup>17)</sup>咳発現の中枢機序にグリシンが関与しているものと考えられる。

以上、咳の生理・薬理について、咳の多様性・多成分性と中枢性鎮咳薬の作用機序に関する最近の研究の現状を紹介した。咳は画一的なものではないという認識は重要である。秒オーダー以下の短い時間軸の中に、気道粘膜の受容体の刺激、吸息筋、呼息筋、声門筋など多くの筋の収縮と弛緩など多くの成分が含まれ、これらが、咳の開始、強度、頻度などの要素に複雑に関与する。咳そのものを対象とする総合的解析的研究の進展は、より優れた医薬品が求められる高齢化社会の中で、いわゆる“高品位”の鎮咳薬の開発に貢献するだけでなく、临床上その開発が望まれながら、いまだにその手掛かりすら掴めていない咳反射賦活薬のような脳幹反射賦活薬の開発のための糸口の発見に繋がる可能性も秘めていると言えよう。

## 2. 気道分泌の制御機構と病態生理

**2-1 肺サーファクタント分泌機序とシグナル伝達系のクロストーク** 肺サーファクタントは肺胞

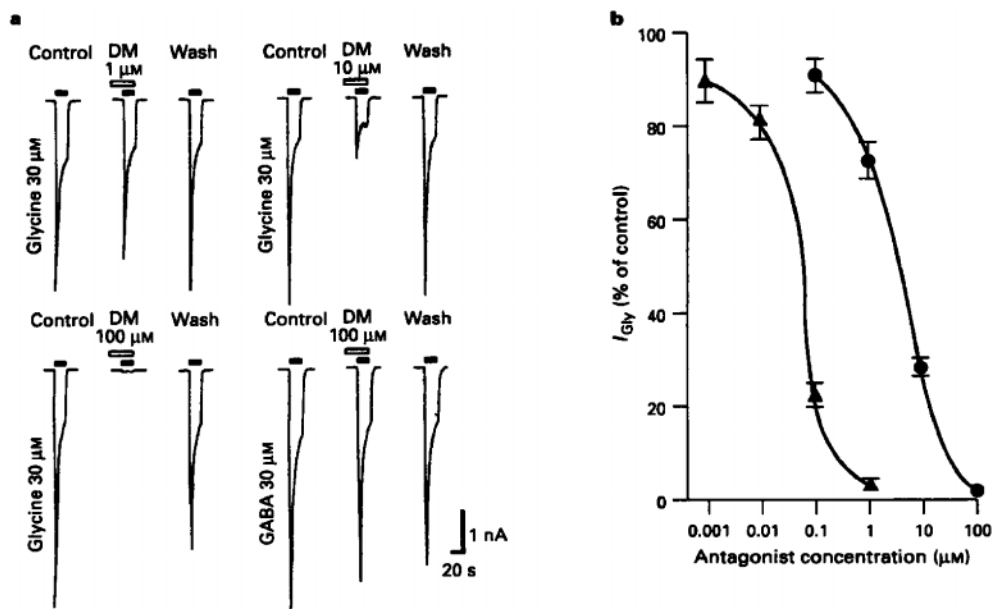


Fig. 3. Concentration-dependent Inhibitory Effect of Dextromethorphan (DM) and Strychnine in NTS Neurons

(a) A neuron was voltage-clamped at  $-50$  mV. DM depressed  $30 \mu\text{M}$  glycine-induced  $\text{Cl}^-$  current  $I_{\text{Gly}}$  in a concentration-dependent manner, but did not change the current induced by  $30 \mu\text{M}$  GABA. An apparent depression of the  $I_{\text{GABA}}$  was due to a run-down of the response. All responses were obtained from the same neuron. (b) Concentration response curve for the inhibitory effects of DM (●) and strychnine (▲) on  $I_{\text{Gly}}$ . Each point denotes mean from 4–5 experiments; vertical lines show SE mean.

II型上皮細胞により合成・分泌され、肺胞上皮表面に単分子膜を形成する。それにより直径  $200 \mu\text{m}$  内外の大小の球形を呈するテニスコートの広さにも匹敵する肺胞表面をわずかに約  $20 \text{ ml}$  で被い、肺胞自体の弾性と界面の表面張力による収縮作用、特に肺胞気-液界面の表面張力を低下させ、肺胞の虚脱による無気肺化を防ぎ、安定した換気能力を維持する。

II型細胞からの肺サーファクタント分泌は少なくとも3種のプロテインキナーゼ、すなわちAキナーゼ (PKA)、Cキナーゼ (PKC) 及び  $\text{Ca}^{2+}$  カルモジュリンキナーゼ依存性のシグナル伝達系を介して同様に促進されることが知られている。<sup>18)</sup> 我々は各種薬物による肺サーファクタント分泌の研究から、作用点の異なる複数のシグナル伝達系の間で生じる相乗的なクロストークが重要であると考えた。<sup>19–21)</sup> そこで、異なる伝達系に対する2種類の作用薬を併用し、肺サーファクタント分泌について調べた。その結果、terbutaline 及び PMA の併用による分泌促進作用は相乗的であった (Fig. 4)。Terbutaline と PMA の併用と同様の相乗効果は、terbutaline と oleoylacylglycerol, forskolin と PMA あるいは 8-bromo cyclic AMP と PMA など、検討したすべての PKA と PKC の賦活薬の併用によ

て認められた。すなわち、相乗作用の発現には PKA 及び PKC の両プロテインキナーゼの活性化が重要であることが示唆された。また興味深いことに、これらの薬物はいずれも単独では細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に影響しないにも関わらず、併用時には著明な上昇を示した。したがって分泌の相乗作用は  $\text{Ca}^{2+}$  によって調節されていると考えられる。Terbutaline と PMA の併用によって誘発された  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇はフォスファチジルイノシトール代謝回転の賦活を伴わず、本  $\text{Ca}^{2+}$  動員機構は  $\text{IP}_3$  に依存しない。一方、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  を除去すると、併用時の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇は著明に減弱した。したがって terbutaline と PMA の併用による  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇には細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が一部関与すると考えられた (Fig. 5)。<sup>22)</sup> このような  $\text{Ca}^{2+}$  流入を介した PKA 及び PKC 間のクロストークは現在まで他の細胞では報告されていない。一方、ヒト肺胞上皮由来の細胞株である A549 細胞を用いても同様に  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を生じた。したがって、この  $\text{Ca}^{2+}$  動員機構が肺胞上皮細胞に特異的な機構によって調節されている可能性も考えられ興味深い。

2-2. 肺サーファクタントと気管支喘息病態関連因子 肺サーファクタントは、肺がその機能上常

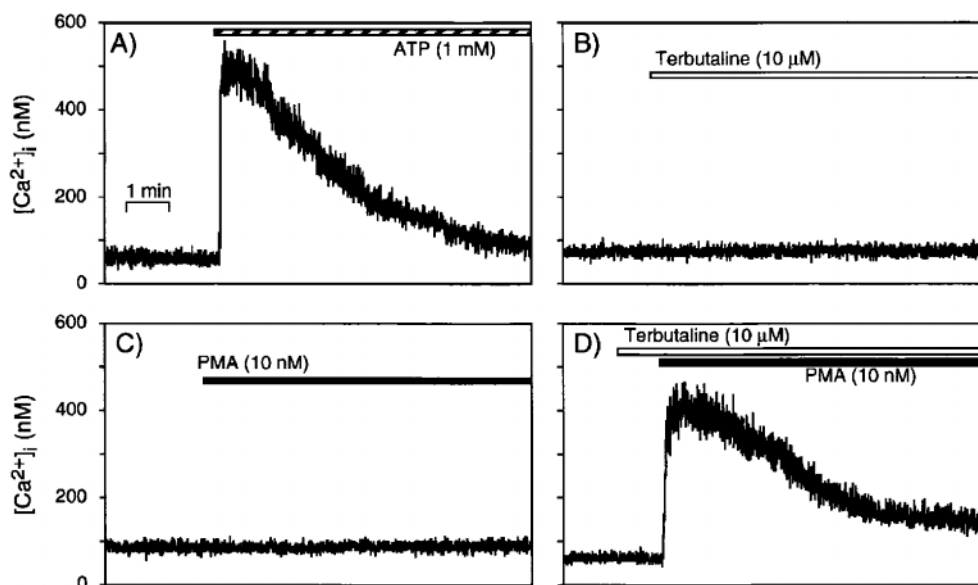


Fig. 4. Representative Trace of the Cytoplasmic Free  $\text{Ca}^{2+}$  Concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in Alveolar Type II Cells in Response to Terbutaline, PMA and Their Combination

Cultured alveolar type II cells were loaded with  $10 \mu\text{M}$  fura2/AM for 60 min. One mM ATP (A),  $10 \mu\text{M}$  terbutaline (B),  $10 \text{ nM}$  PMA (C) or combination of terbutaline and PMA (D) were applied to the cells, as indicated by the above tracings.

に外界と直接接する器官であることから生じる大気中の種々の異物、病原微生物、あるいは大気汚染物質の侵襲による上皮組織の傷害を肺胞マクロファージの遊走、貪食作用の活性化を介して抑制する生体防御機構に深く関与している。しかしながら疾患との関連については、肺サーファクタントの欠乏が呼吸窮迫症候群 (respiratory distress syndrome: RDS) の最大の原因となること以外ほとんど明らかにされず、特に臨床で最も問題になる気管支喘息と肺サーファクタントの分泌動態に関しては全く解明されていない。

気管支喘息の病態は、単に気管支痙攣による気道収縮に起因する発作性の呼吸困難と喘鳴が主症状であると言う単純なものではなく、上皮傷害や分泌異常を伴う気管支炎が中心的役割を担っていることが明らかとなってきた。特に気管支喘息病態における遅発型喘息反応 (late asthmatic response: LAR) は気道炎症に起因するものであり、その主要原因物質は好酸球である。このことは、LAR の症状に一致して気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage: BAL) を行うと、BAL 液 (BAL Fluid: BALF) 中に好酸球の増加がみられ、LAR 陰性の患者では BALF 中の好酸球の増加がみられないことから明らかである。このように気管支喘息病態は外来性物

質と併せ内因性の物質が起因物質として複雑に関与し合い発症するものと考えられる。<sup>23)</sup> したがって、複雑な病態を惹起する内因性物質について新しい視点から研究することは病態生理学的に大きな意義を持ち、ひいては新規の治療薬の開発に貢献できるものと思われる。

我々は肺胞 II 型上皮細胞に対する、気管支喘息病態形成における原因物質とされる好酸球の影響を明らかにするため、両細胞の混合培養系の確立と、好酸球特異顆粒蛋白の肺胞 II 型上皮細胞に対する直接的作用について検討し、さらにこの混合培養系を気管支喘息病態の一端を反映した *in vitro* の実験系として用い、代表的気管支喘息治療薬であるキサンチン系薬物の作用とそのメカニズムについて検討した。また、最近気管支喘息病態時の患者血清中の濃度が上昇していることが報告され、肺組織に高濃度に存在する新規のペプチドである adrenomedullin (AM) の肺胞 II 型上皮細胞からの肺サーファクタント分泌に対する作用についても検討した。以下に得られた知見について要約する。

まず、肺胞 II 型上皮細胞からの肺サーファクタントの主要構成成分である phosphatidylcholine (PC) 分泌に対する好酸球の作用を検討した結果、好酸球は活性化されることにより PC 分泌を有意に

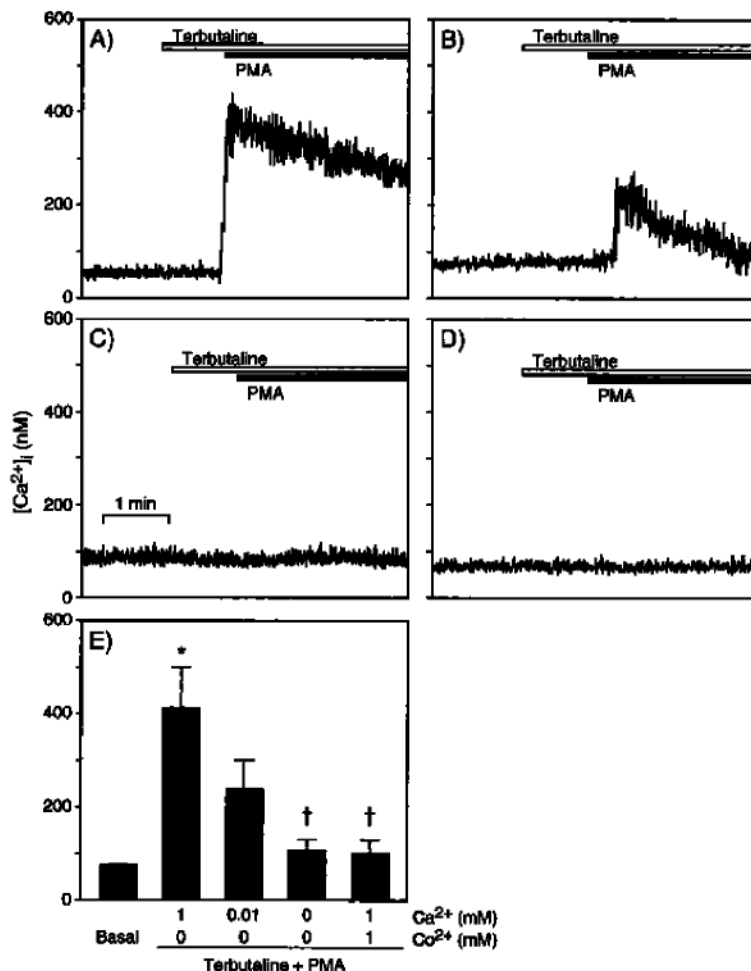


Fig. 5. Influence of Extracellular  $Ca^{2+}$  and  $Co^{2+}$  on the Increase of  $[Ca^{2+}]_i$  Induced by the Combination of Terbutaline with PMA in Alveolar Type II Cells

Fura-2-loaded cells were incubated in control buffer containing 1 mM of  $Ca^{2+}$  (A), in buffer containing 0.01 mM  $Ca^{2+}$  (B), in  $Ca^{2+}$ -free buffer containing 1 mM EGTA (C), or in the buffer containing 1 mM  $Ca^{2+}$  and 1 mM  $Co^{2+}$  (D). Ten  $\mu$ M terbutaline and 10 nM PMA were applied to the cells, as indicated by the above tracings. E: Mean peak  $[Ca^{2+}]_i \pm SE$  elicited with indicated agonists. Each bar corresponds to 12 cells (3 different experiments). Significance was determined by ANOVA followed by Newman-Keuls test: \* $p < 0.05$  for difference from the basal  $[Ca^{2+}]_i$ , † $p < 0.05$  for difference from 1 mM  $Ca^{2+}$  without  $Co^{2+}$ .

促進した。この PC 分泌促進は superoxide dismutase (SOD) と catalase の前添加により有意に抑制されたことから、活性化好酸球から放出される活性酸素種が関与していると考えられた。しかし、抑制が完全でなかったことから、好酸球の特異顆粒蛋白による PC 分泌に対する直接的作用を検討したところ、特異顆粒蛋白の中でも特に major basic protein (MBP) が PC 分泌を促進することが明らかとなった。この PC 分泌促進は protein kinase C (PKC) に対する選択的な阻害薬である H-7 及び  $Ca^{2+}$  キレート薬である BAPTA-AM により有意に抑制され、protein kinase A (PKA) の選択的な阻害薬である H-89, H-7 の対照薬である HA1004 によって抑制されなかったことから、そのメカニズムと

して PKC と細胞内  $Ca^{2+}$  が関与していることが示唆された (Fig. 6).<sup>24,25)</sup> このことは、肺胞 II 型上皮細胞が気管支喘息病態形成の原因細胞として捉えられてきた好酸球が活性化により放出される histamine, leukotrienes, PAF などのケミカルメディエーターを逆に利用し、肺サーファクタントを促進して肺胞腔の上皮細胞を被覆層で被うことにより、保護機構として機能している可能性を示唆するものであり、気管支喘息の病態生理を理解する上で新たな見解を提示する。

次に、今日気管支喘息治療薬として汎用されているキサンチン系薬物である theophylline の肺胞 II 型上皮細胞と好酸球の混合培養における PC 分泌に対する作用を検討した結果、theophylline は PC 分

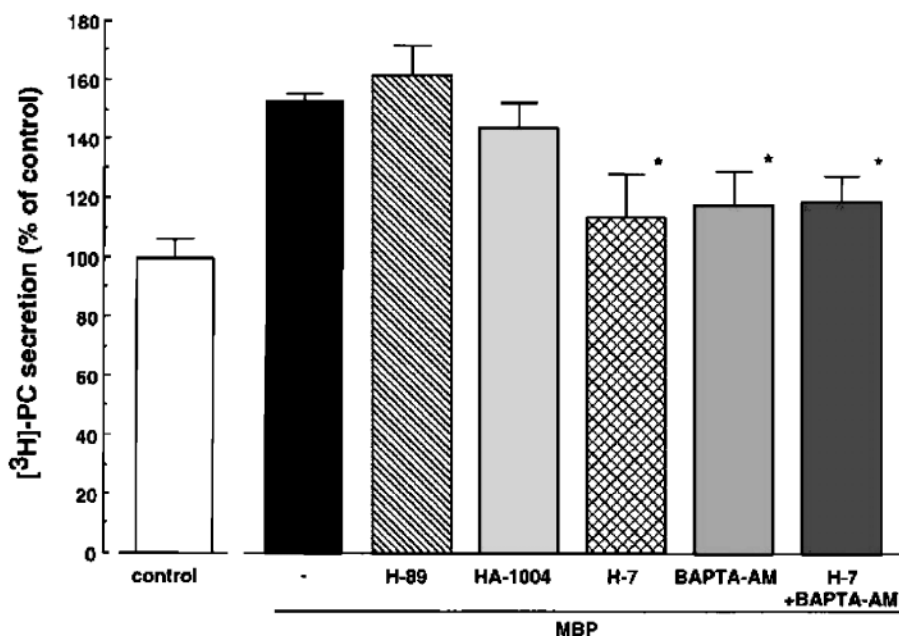


Fig. 6. Effects of Several Inhibitors on MBP-induced PC Secretion in Type II Pneumocytes

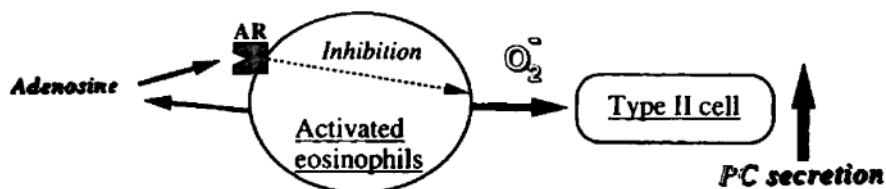
Each inhibitor was added 10 min before addition of MBP ( $8 \times 10^{-9}$  M), followed by further incubation for 90 min. H-89 ( $6 \times 10^{-6}$  M), HA-1004 ( $1 \times 10^{-5}$  M), H-7 ( $1 \times 10^{-5}$  M), and 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (BAPTA)-AM ( $5 \times 10^{-6}$  M) were used as inhibitors of PC secretion pathways. In presence of MBP alone. Values are means  $\pm$  SE from 6 experiments. [ $^3$ H] PC secretion after 90 min was  $0.88 \pm 0.06\%$  in control cultures ( $n=5$ ). \*Significant difference from MBP alone,  $p < 0.05$ .

泌を低濃度で促進したが、高濃度では著しい影響を与えなかった。この低濃度における PC 分泌促進は SOD と catalase の前添加により抑制されたのに対し、高濃度における PC 分泌は抑制されなかった。また好酸球からの活性酸素の放出に対して theophylline は低濃度において促進し、高濃度において抑制する二相性の作用を示した。その機序について検討した結果、theophylline の作用は肺胞 II 型上皮細胞に対する phosphodiesterase 阻害作用を介した直接的に PC 分泌を促進する機序と、adenosine 拮抗作用を介した adenosine による好酸球からの活性酸素種放出抑制作用の遮断により放出された活性酸素種が PC 分泌を促進する二次的な機序の 2 つの異なる機序が複雑に関与して現れることが示唆された (Fig. 7)。<sup>26)</sup> このことは、薬物の作用やその機序を解明するにあたり、適応となる疾患の病態を実験系においてもいかに忠実に再現できるかが重要であることを示唆している。この点において、我々が確立した混合培養系による評価系は気管支喘息病態における肺サーファクタント分泌に関する薬理学的評価に十分応用可能で、新規呼吸器疾患治療薬の開発のためのスクリーニング系として寄与するものと思われる。

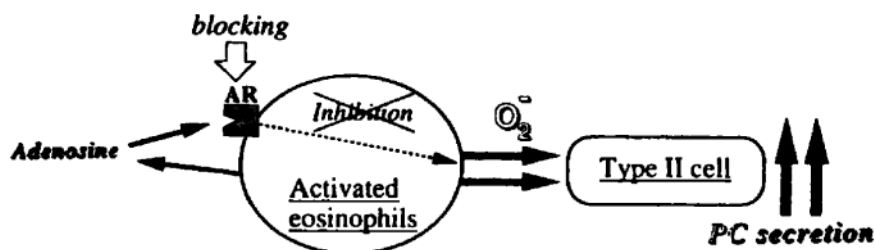
最後に AM による肺胞 II 型上皮細胞からの PC 分泌に対する作用を検討した結果、AM は PC 分泌を有意に促進した。この AM による PC 分泌促進は H-7 及び BAPTA-AM により有意に抑制され、これら両薬物の併用により完全に抑制された。さらに PKC の isozyme の阻害剤を用いた検討により、AM による PC 分泌促進に PKC- $\beta$  が関与していることが示された (Fig. 8)。また、肺胞 II 型上皮細胞上に AM 及び AM の受容体の mRNA が発現していたことから、AM が肺胞 II 型上皮細胞からの肺サーファクタント分泌制御における autocrine 及び paracrine としての調節機構因子として働いている可能性が示唆された。<sup>27)</sup> AM については末梢血管に対し生理活性を有し、そのメカニズムが細胞内 cAMP の上昇及び  $Ca^{2+}$  動員に基づくことが明らかにされている。<sup>28,29)</sup> しかし呼吸器における生理学的あるいは病態生理学的意義についてはほとんど明らかにされておらず、本成績から AM が従来の報告と異なる作用メカニズムを介し呼吸器、特に肺組織に生理活性を有することが明らかになったことは大変興味深く、今後気管支喘息を始めとした呼吸器疾患の病態における AM の役割に関する研究への展開を期待されるものである。



### A) No xanthines



### B) Theophylline (low conc.) & 8-Phenyltheophylline



### C) Theophylline (high conc.) & Pentoxifylline

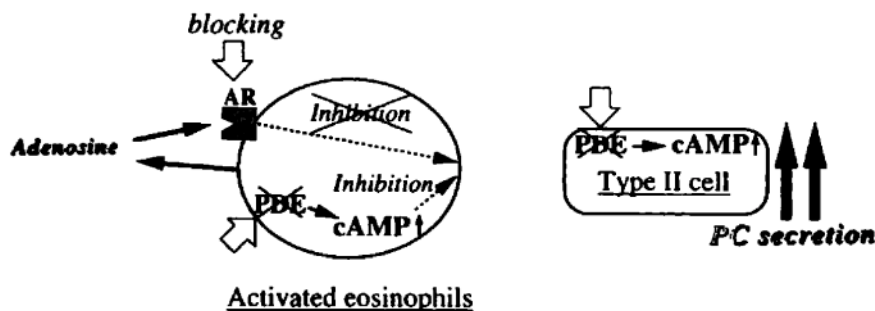


Fig. 7. Possible Mechanisms of Action of Xanthine Derivatives on the PC Secretion in Type II Pneumocytes in the Presence of Activated Eosinophils

A: Activated eosinophils generate superoxide anions ( $O_2^-$ ) to induce PC secretion in type II pneumocytes. Endogenous adenosine may be released from eosinophils by itself to suppress superoxide anions generation through its own adenosine receptor (AR) in eosinophils. B: Theophylline at  $10^{-5}$  M and 8-phenyltheophylline antagonize adenosine receptors on the eosinophils, which increase the release of superoxide anions, because exogenously applied adenosine suppressed the superoxide anion generation from activated eosinophils. Thereby, the superoxide anions induce PC secretion in the pneumocytes. An open arrow indicates the site of action of xanthine derivatives. C: Theophylline at  $10^{-3}$  M and pentoxifylline inhibit phosphodiesterases (PDE) in the eosinophils as well as the pneumocytes. The inhibition of phosphodiesterases in eosinophils decrease the release of superoxide anions through the increase of intracellular cAMP. Thus, the PC secretion increased by superoxide anions is suppressed by theophylline. At the same time, however, the increase of intracellular cAMP in the type II pneumocytes induces the PC secretion. Open arrows indicate the site of action of xanthine derivatives.

以上、肺サーファクタント分泌を促進する新規の物質として気管支喘息病態に関連のある好酸球と好酸球由来の特異顆粒蛋白質である MBP 及び AM を見い出した。これらの成績は気管支喘息の病態に関わる生体内因性物質が肺サーファクタント分泌にも関与していることを明らかにした初めての知見であり、気管支喘息の病態生理のさらなる解明、並び

に新規作用メカニズムを有する治療薬の研究開発に貢献するとともに、肺サーファクタント分泌制御に関与する新たな生体内因性物質の発見に寄与するものと考ええる。

2-3. 気道上皮杯細胞の分化・増殖及び粘液合成・分泌制御機構 気道クリアランス低下と密接な関係にあり、病態生理学的に重要な気道上皮杯細

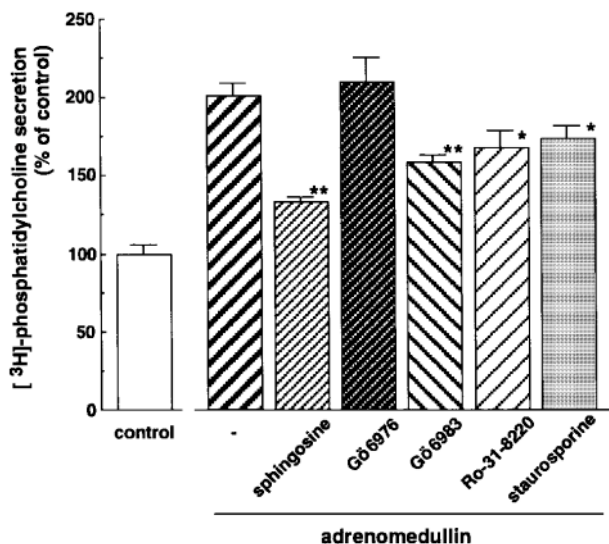


Fig. 8. Effects of Protein Kinase C Inhibitors on Adrenomedullin-induced Phosphatidylcholine Secretion in Rat Type II Pneumocytes

Inhibitors were added 15 min prior to the addition of adrenomedullin ( $1 \times 10^{-7}$  M), and the mixture was incubated for a further 90 min. The protein kinase C inhibitors tested were sphingosine ( $5 \times 10^{-6}$  M), Gö6976 ( $1 \times 10^{-7}$  M), Gö6983 ( $1 \times 10^{-7}$  M), Ro-31-8220 ( $1 \times 10^{-7}$  M) and staurosporine ( $1 \times 10^{-6}$  M). Secretion is expressed as the amount of [<sup>3</sup>H]phosphatidylcholine released into the medium after a 90-min incubation, as a percentage of that in the cells plus medium. [<sup>3</sup>H]phosphatidylcholine secretion over 90 min was  $0.76 \pm 0.1\%$  (mean  $\pm$  SE,  $n=5$ ) in control cultures. Data represent the means ( $\pm$  SE) of five experiments. \* and \*\*, Significant at  $p < 0.05$  and  $0.01$  compared with adrenomedullin alone using Dunnett's test after the ANOVA, respectively.

胞に着目した。この細胞の分化・増殖及び粘液合成・分泌制御機構を解明することは呼吸器系の新しい研究領域を開拓・提供し、また、現在臨床で切望されている COPD 治療薬の開発研究に大きく貢献するものと思われる。

そこで、まず、気道上皮杯細胞の細胞レベルでの研究モデルを確立しようと試みた。その結果、ハムスター気管上皮細胞 (HTE cell) を collagen gel 上で培養することで、細胞内に Periodic acid-Schiff 陽性の顆粒状物質の存在が確認され、細胞内及び培養上清中に hyaluronidase 抵抗性を示し、また、弱アルカリで分解される、という点において気道粘液と同様の性質を有する分子量 2000 kDa 以上の高分子糖蛋白を合成・分泌する細胞へ分化させることに成功した。<sup>30)</sup>

ついで、正常時及び病態時における杯細胞の気道粘液の分泌制御機構を解明するために、本培養系の薬理的評価系を考案し、その応用の妥当性について検討したのち、気道において生理学的及び病態生

理的に重要性が示唆されている種々神経伝達物質あるいは炎症性メディエーター、また病態時における気道への浸潤が顕著な PMNs の粘液分泌に及ぼす影響について検討した。まず、薬理的評価系としての応用の妥当性について検討した結果、杯細胞の粘液分泌を調節する内因性リガンドである可能性が示唆されている ATP が細胞内情報伝達機構の活性化を介し、機能的に粘液分泌を亢進した。<sup>31,32)</sup> このことより、本評価系が気道粘液分泌に関する薬理的評価に十分に応用可能であることが示された。この評価系は新規呼吸器疾患治療薬の開発のためのスクリーニング系として大きく貢献するものと思われる。事実、最近開発されたフドステインは、杯細胞の増殖と炎症性刺激誘発過分泌を明らかに抑制し、新規去痰薬として分類されている。

一方、正常時における杯細胞の気道粘液の分泌機序に関する検討の結果、 $\beta$ -adrenergic な機序により粘液分泌が抑制された。このことは、杯細胞が  $\beta$ -adrenergic な支配を受けていることを示唆するばかりでなく、COPD 時の治療薬として汎用されている  $\beta$ -agonist の作用機序の一端を担っている可能性があり、非常に興味深い知見である。さらに、細胞内情報伝達系に関する検討で、杯細胞からの粘液分泌への protein kinase C の関与が強く示唆された。そして、病態時における杯細胞の気道粘液の分泌制御に関する検討の結果、活性化 PMN が粘液分泌促進作用及び分泌された粘液を分解する作用を有しており、それらの作用が PMN から放出される elastase によるものであることを明らかにした (Fig. 9)。このことは、炎症時に気道に浸潤した PMNs の活性化を介した一連の機序が、気道炎症時の粘液過剰分泌の要因の 1 つであることを示している。最後に、COPD の治療上最もその有効性が示唆されている glucocorticoid の粘液合成及び分泌に及ぼす作用、及びそのメカニズムについて検討した。その結果、dexamethasone は気道上皮細胞からの粘液分泌を濃度依存的に抑制することが明らかになった。また、その作用メカニズムとして、mucin gene の mRNA 発現を抑制することにより、粘液糖蛋白の合成が抑制された結果生じた二次的な作用であることが示唆された (Fig. 10)。また、前駆物質の取り込み抑制も合成抑制により生じた結果と考えられる。<sup>33)</sup> 本研究で明らかになった glucocorticoid

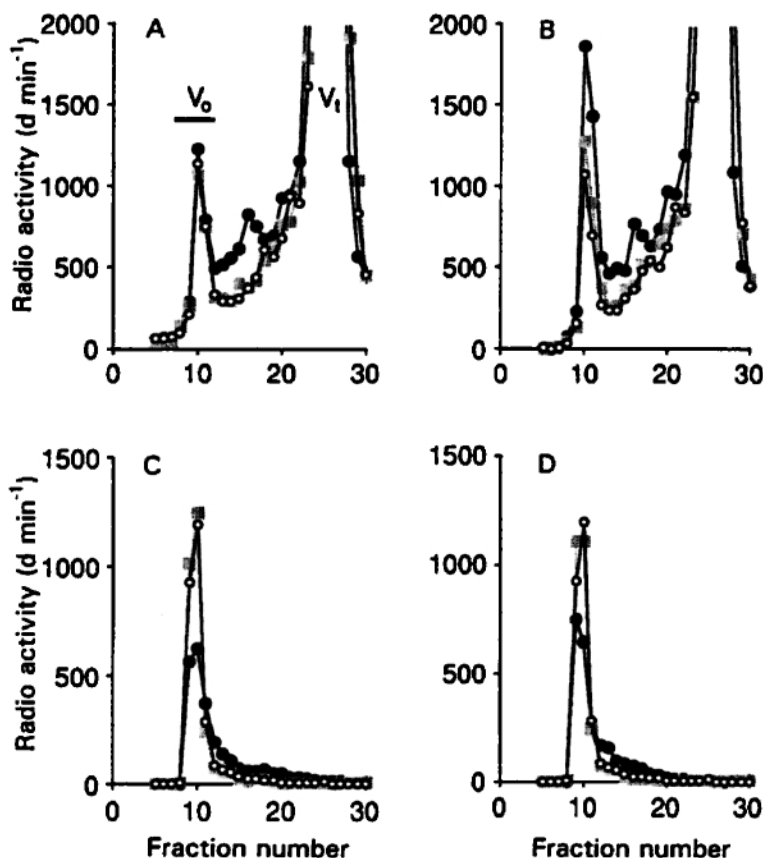


Fig. 9. Representative Data of Sepharose CL-4B Column Chromatography of [ $^3\text{H}$ ]HMWG Digested by FMLP-activated PMNs (A, C) or Human Neutrophil Elastase (HNE) (B, D)

A, B: confluent cultures were labelled with [ $^3\text{H}$ ]glucosamine for 24 h and challenged for 30 min in the presence of FMLP ( $1\ \mu\text{M}$ )-activated PMNs ( $1 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ) (A) or HNE ( $10\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$ ) (B). C, D: samples of [ $^3\text{H}$ ]HMWG from confluent cultures were incubated in the presence of FMLP-activated PMNs (C) or HNE (D) in plain medium for 30 min at  $37^\circ\text{C}$ . At the end of incubation, the reaction mixture was applied to the column. A and C:  $\circ$ : no treatment,  $\bullet$ : treatment with activated PMNs,  $\blacksquare$ : treatment with activated PMNs in the presence of ONO-5046 ( $10\ \mu\text{M}$ ). B and D:  $\circ$ : no treatment,  $\bullet$ : treatment with HNE,  $\blacksquare$ : treatment with HNE in the presence of ONO-5046. These representative data were selected from four experiments. Among the four experiments, there were no significant differences.

の粘液合成及び分泌抑制作用は、現在、臨床において COPD 時の気道粘液過剰分泌に対し最も有効な glucocorticoid 吸入療法の作用メカニズムの一端を解明するばかりでなく、消化器系の上皮細胞からの粘液分泌に関する研究、あるいは粘液の存在意義を追求するための有益な知見になり得るとともに、今後、呼吸器に限らず新規の難治性疾患治療薬開発研究の一助となるであろう。<sup>12,34)</sup>

**2-4. 気道上皮細胞の分化制御に関与する Ets 転写因子** 慢性呼吸器疾患や喘息に代表される気道病態時、気道上皮は著明な病理組織学的構造変化を示す。そこで我々はこの構造変化のメカニズム解明が、呼吸器疾患に対する新たな治療薬及び治療法の開発を探索するきっかけとなると考え、気道病態時の粘膜下腺及び気道上皮組織における病理組織学的変化に注目した。

気道病態時の粘膜下腺においてその構成細胞である漿液細胞と粘液細胞は互いに分化転換するという仮説が提唱されている。<sup>35)</sup> ハムスター気道上皮細胞 (HTE cells) を用い、この仮説を検証した結果、plastic plate 上で培養した HTE cells は漿液細胞様の性質を示し、collagen gel 上で培養した HTE cells は粘液細胞様の性質を示した。次に、細胞外マトリックスに依存した細胞分化を誘導する因子を同定するため、漿液細胞のマーカー遺伝子である lysozyme 遺伝子の発現調節に関与する転写因子を検索した。その結果、Ets 転写因子 TEP-1 及び MEF が漿液細胞特異的な lysozyme 遺伝子発現調節に対して重要な役割を果たすと同時に、漿液細胞の機能発現に関与する可能性が示唆された。<sup>36)</sup> ところで、Ets 転写因子群は共通した塩基配列 5'-GGAA/T-3I を認識することから、どの Ets 転写因子が漿液細胞

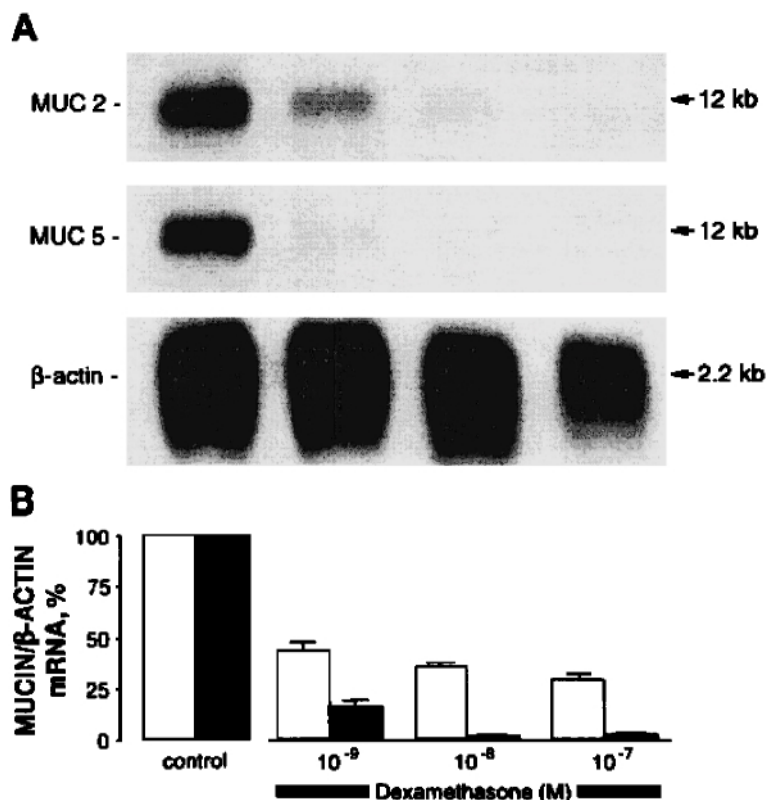


Fig. 10. Effect of Dexamethasone on Steady-state mRNA Levels of MUC-2 and MUC-5AC Mucin Gene in NCI-H292 Cells

A: cultured cells were incubated with dexamethasone for 24 h. Three micrograms of poly (A)<sup>+</sup> RNA was electrophoresed on a formaldehyde-agarose gel, transferred to a nylon membrane, and hybridized with the [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP-labeled MUC-2 cDNA (SMUC41). After hybridization, the filter was washed and autoradiographed. The same filter was rehybridized with the MUC-5AC cDNA fragment (274 bp) made by reverse transcription-polymerase chain reaction and with a chicken  $\beta$ -actin probe as internal control. B: densitometric study of mRNA transcript levels of MUC-2 (open bars) and MUC-5AC (solid bars). mRNA levels were calculated as the ratio of MUC-2 or MUC-5AC to  $\beta$ -actin mRNA expression and expressed as % control expression in 3 experiments.

に特異的な lysozyme 遺伝子発現を調節するか探索した。そこで、漿液細胞特異的な lysozyme 遺伝子発現調節機構に対する代表的な Ets 転写因子の関与について検討し、本研究においてクローニングした転写因子の特異性を評価した。その結果、MEF は特異的に lysozyme 遺伝子発現を調節していることが明らかとなった (Fig. 11)<sup>36)</sup> さらに、MEF stable-transfectant において細胞の分化が観察され、漿液細胞様の形態を示したことは、MEF が漿液細胞のマスター遺伝子である可能性を示唆した。しかし、EBS 単独での lysozyme 遺伝子転写活性はかなり低いことから、lysozyme 遺伝子発現に対して MEF が他の転写因子 (エンハンサー) と相互作用を示すことが考えられる。そこで、lysozyme 遺伝子発現に対する他の転写因子の関与について検討した。その結果、lysozyme 遺伝子の発現調節機構に分子量約 55 kDa の未知の転写因子が介在することが明らかとなった。しかし、エンハンサーを同定

するには至らなかった。さらに、気道における lysozyme 遺伝子の発現は炎症性シグナルにより上昇することが予想されることから、MEF の lysozyme 遺伝子発現調節機構に関して、何らかのシグナル受容機構の存在が考えられる。特に、MEF は自身に数多くのリン酸化部位を有していることから、MEF はリン酸化によって活性化され、lysozyme 遺伝子発現に対して転写活性を示すと考えた。そこで、MEF の機能発現に対する各種リン酸化酵素の関与について検討した。<sup>37)</sup> その結果、MEF の転写活性化に対して protein kinase A, protein kinase C 及び MAP kinase の関与は認められなかった。これらのことから、MEF はシグナル受容機構を持たず恒常的に核に存在し、標的遺伝子の転写活性を調節していることが予想された。<sup>37)</sup>

**2-5. 上皮細胞の維持に關与する Ets 転写因子**  
慢性呼吸器疾患や喘息に代表される気道病態時、上皮細胞はその細胞傷害性により気道上皮から剥離、

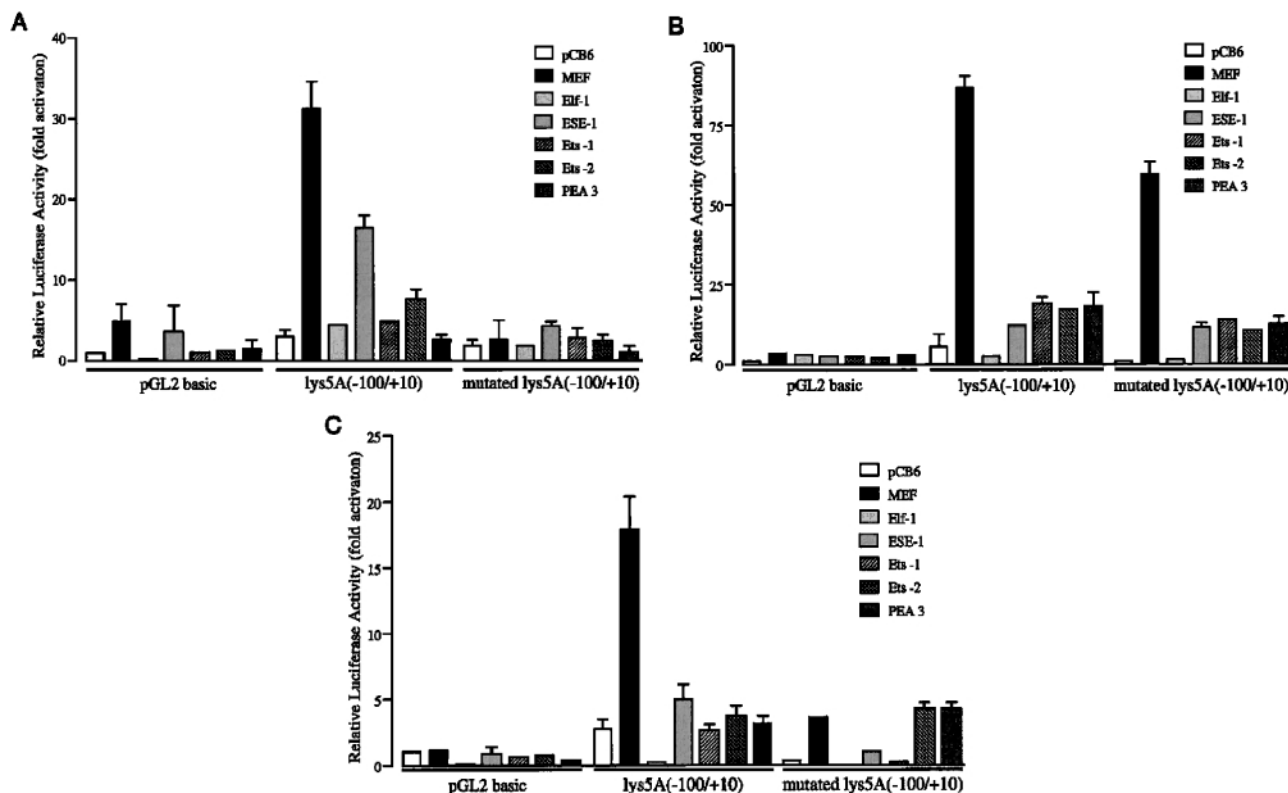


Fig. 11. Transcriptional Activation of the Lys5A Promoter in A549 Cells (A), Caco-2 Cells (B), and NIH3T3 Cells (C) by the ETS Gene Family Members

The cells were cotransfected with the indicated ETS protein expression vectors and luciferase vectors containing the lys5A promoter (lys5A(-100/+10) or mutated lys5A(-100/+10)) or the parental pGL2-basic vector. Luciferase activity in the lysates was determined 48 h after transfection and is expressed as -fold activation over the pGL2-basic vector.

脱落する。その後、上皮細胞及び線維芽細胞などから細胞増殖因子、遊走因子、細胞外基質などが分泌され、修復に至る。この一連の病理組織学的構造変化は上皮細胞特異的な機能発現に対して重要であることが示唆された転写因子 ESE-1b の発現変化によるのではないかとこの仮説を立てた。そこで、この仮説を実証するため、多くの呼吸器疾患において関与が明らかな緑膿菌を用いた *in vitro* 気道感染モデルを作製し、上皮細胞特異的な遺伝子の発現を検討した (Fig. 12)。その結果、感染時と同様の細胞の剥離・脱落像が見られ、ESE-1b 遺伝子の発現は抑制された。また、通常の NCI-H292 cells における ESE-1b 遺伝子発現は NF- $\kappa$ B と Ets 転写因子により調節されていることが分かった。<sup>38)</sup> 一方、気道感染モデルにおいて ESE-1b 遺伝子の発現調節に対し NF- $\kappa$ B は作用せず、前述の Ets 転写因子と異なる転写因子によって遺伝子発現が抑制されることが分かった。Ets-1 の発現が炎症組織において上昇することが報告されていること、しかも Ets-1 は本研究

において ESE-1b 遺伝子のプロモーター活性を抑制することから、気道感染時に ESE-1b 遺伝子の発現を抑制する Ets 転写因子は Ets-1 である可能性が示唆された。さらに、上皮細胞に対する ESE-1b の影響について検討するため、マウス線維芽細胞 NIH3T3 cells に ESE-1b を導入し、細胞の変化を観察した。その結果、線維芽細胞の上皮細胞化が観察され、著明な細胞増殖率の低下を示した。これらは、上皮細胞の機能発現に対して ESE-1b 遺伝子が必須であるのかという問いに対する直接の解答としては十分ではない。しかし、線維芽細胞に ESE-1b 遺伝子を発現させることにより上皮化が観察されたことから、ESE-1b 遺伝子が上皮細胞の機能発現及びその形態形成に一部関与していることは明らかである。<sup>39)</sup>

以上、本研究を通じて、気道上皮細胞の分化に対する Ets 転写因子 MEF 及び ESE-1b の作用の一端が解明された。これらの結果は、気道上皮細胞の分化様式を明らかにするだけでなく、呼吸器疾患に対

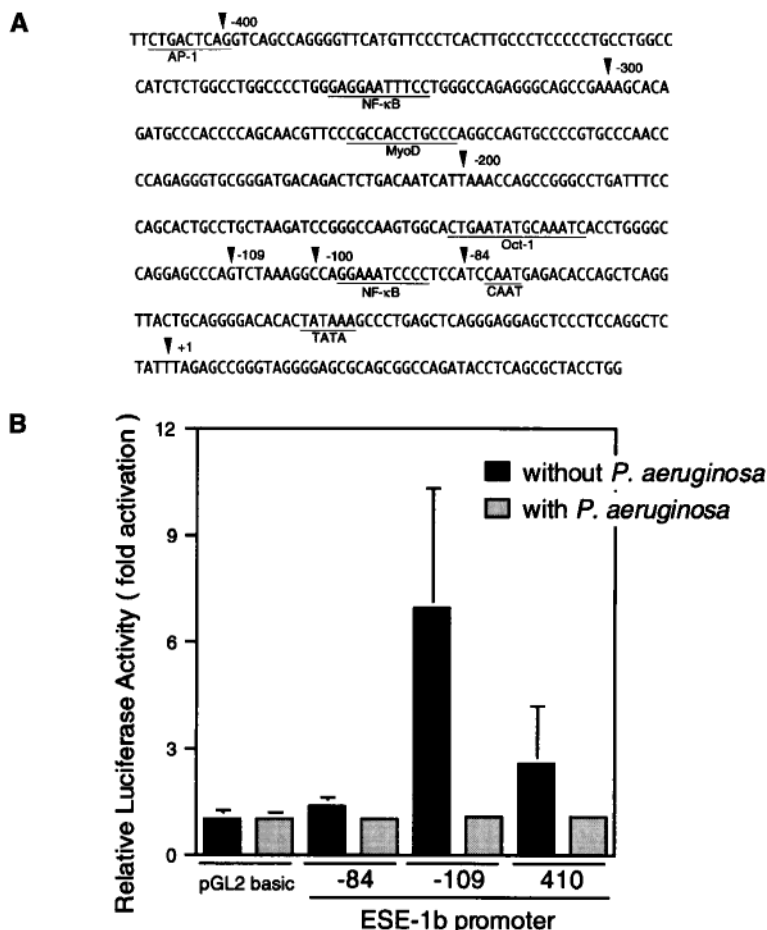


Fig. 12. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* on Promoter Activity of ESE-1b in NCI-H292 Cells

A: The sequence of 5'-region of ESE-1b gene. B: The cells were transfected with the indicated luciferase vectors containing the ESE-1b promoter or the parental pGL2-basic vector. Luciferase activity in the lysate was determined 48 h after transfection. Data for each experiment is presented as fold activation over the pGL2-basic vector and the means  $\pm$  SE of four experiments. The numbers under the panel show regions of ESE-1b promoter from the transcription start site.

する新規治療薬及び治療法の開発において有用な基礎データになるものと考えられる。

**2-6. 気道上皮細胞における防御因子 (Hsp) の機能と発現** 生物は外界である環境から常に有害な刺激 (ストレス) を受けている。生物は生命を維持していくため、これらのストレスに適応しようと生体防御因子を発達させてきた。生体が防御しなければならないストレスの1つに、細菌やウイルスなどの感染がある。これらの感染は生体に死をもたらすこともあり、感染防御因子は、生体にとって生命を維持していく上で重要である。本研究では、嚢胞性線維症 (cystic fibrosis; CF) という遺伝性疾患の原因タンパク質で、感染防御に重要である CF transmembrane-conductance regulator (CFTR) タンパク質と、致死的なストレスを受けた細胞の生存を確保するための防御因子である熱ショックタンパ

ク質 (Hsp) の機能と発現に注目し、上皮細胞における生体制御と言う観点から研究を行った。

気道における CFTR と感染との関連性を追究する基礎的な研究の一環として、感染実験の *in vitro* でのよいモデルであるヒト気道上皮細胞株 NCI-H292 cell の易感染性を明らかにするため、CFTR チャンネルが正常に発現していないのではないかとこの予測の下に、NCI-H292 cell について、CFTR の遺伝子発現レベル、タンパク発現レベル、及びチャンネルとしての機能について検討した。その結果、NCI-H292 cell は、CFTR mRNA 高発現株である T84 cell と比較して、CFTR の遺伝子発現レベルは低い、タンパク質レベルは低くなく、細胞膜上に発現しており、チャンネル機能も正常であることが分かった (Fig. 13)。<sup>40)</sup> このように、予測に反した結果となった。そこで、さらに、CFTR が活性を調節

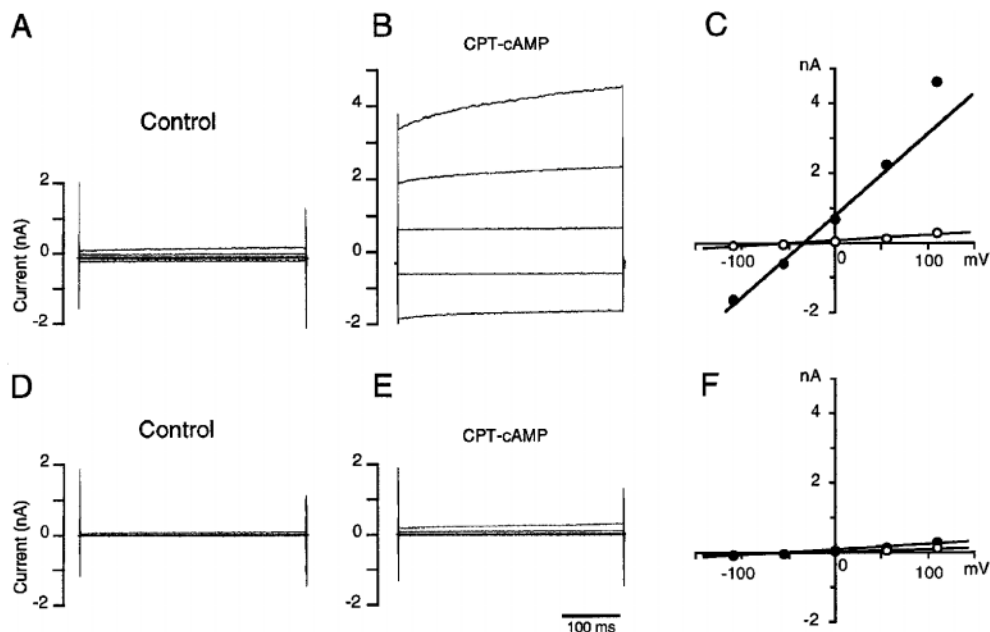


Fig. 13. Representative Whole-cell Current Recordings from Airway Epithelial Cells

A and B: Current recordings before and after the application of 1 mM CPT-cAMP in NCI-H292 cell. C: Corresponding current-voltage relationships of the current records shown in A and B. D and E: Current recordings before and after the application of 1 mM CPT-cAMP in CFTE290-cell. F: Corresponding current-voltage relationships of the current records shown in D and E. Membrane voltage was held at  $-70$  mV.

している感染防御因子  $\beta$ -defensins 及び lysozyme の発現について検討した。ところが、各種細胞株で発現は認められず差はなかった。よって、*in vitro* の培養細胞系では、その細胞の易感染性は、CFTR の発現と関連がなく、最近、よく研究されている細胞膜上にある細菌やウイルスの受容体の発現の差が重要である可能性が考えられ、NCI-H292 cell は易感染性と細菌やウイルスの感染に必要な細胞膜上のタンパク質や糖鎖の研究のよい *in vitro* のモデルになる可能性を示した。<sup>40)</sup>

次に、感染も含めたストレスに対する細胞レベルでの防御因子である Hsp70 の発現を誘導する化合物 (Hsp70 誘導剤) の検索を行った。その結果、97 個の化合物のうち、毒性のない Hsp70 を誘導する化合物が 32 個見られ、作用の強いものとして、carbenoxolone を見出した。また、構造としては、ステロイド骨格とポリプレノール骨格に、薬理作用としては、抗潰瘍作用と抗ウイルス作用を持つものに Hsp70 誘導作用があることを示した。

さらに、Hsp70 発現の細胞内シグナルにおける carbenoxolone の作用点について検討し、carbenoxolone はいくつかの細胞において特異的に Hsp70 の発現を誘導すること、また、その作用が HSF1 の

誘導及び活性化に基づき、致死熱ショックや細菌感染に対する細胞保護作用を有することを示した (Fig. 14)。<sup>41)</sup>

本研究は、感染及びストレス防御因子の上皮細胞における機能と発現に関する基礎的な知見を提供した。また、感染症を含む様々な病態の予防、及び治療促進に効果を持つ新しい薬物として副作用のない、臨床応用の広い Hsp70 誘導剤の開発に貢献し得るものと思われる。

### 3. 気道クリアランスと麦門冬湯

漢方鎮咳・去痰薬、麦門冬湯は気道分泌促進作用を併せ持ち、コデイン抵抗性・難治性咳嗽によく奏効する。咳反射のトリガー部位におけるタキキニン受容体 (NK1 及び NK2 レセプター) レベルでの拮抗作用に加え、タキキニンの生成、遊離、分解などの動態に対しても総合的に作用し、これらのタキキニン制御作用が鎮咳作用発現機序として重要であると考えられている。<sup>11,12)</sup> 漢方薬の有効性、有用性については多くの議論があるが、polypharmacy としての漢方薬の治療原理を裏付けられるような薬効特性、分子作用機序を見い出せれば、漢方薬に対する客観的な評価とともに、次世代における新規高品位医薬品のリード物質としての位置付けも可能にな

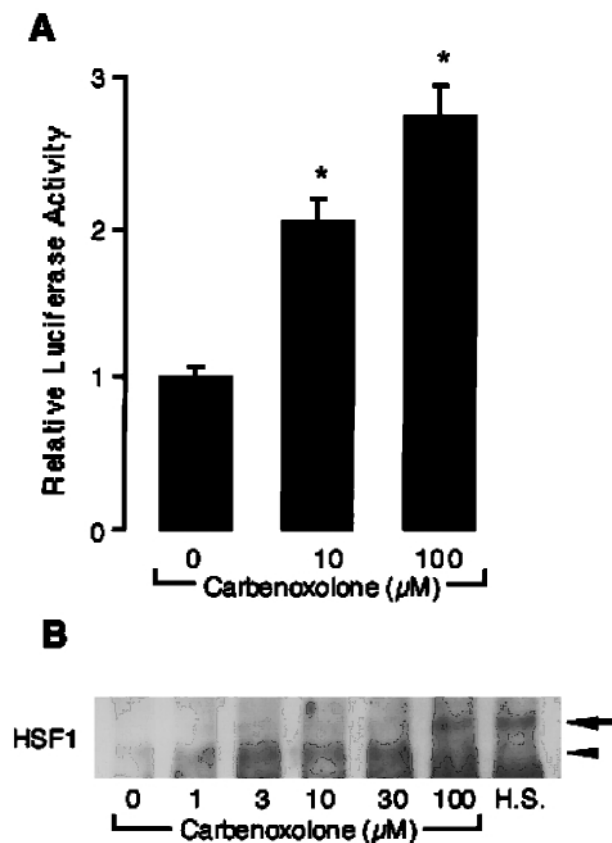


Fig. 14. Activation of Hsp70 Transcription by Carbenoxolone

(A) HeLa cells were transiently transfected with Hsp70 promoter-luciferase reporter construct. Twenty-four hours after transfection, cells were treated for 24 h with carbenoxolone or control diluent. Luciferase activity in the lysates was determined 48 h after transfection. Data for each experiment were normalized to that of control diluent. Values are the mean  $\pm$  SD of four determinations for a representative experiment. \*  $p < 0.05$  vs. control diluent. (B) Increase of HSF1 protein by carbenoxolone. HeLa cells were treated with different concentrations of carbenoxolone or control diluent for 1 h, heat shock for 1 h at 42°C (H.S.). Ten micrograms of whole cell lysate were subjected to Western blotting analysis using antibodies against HSF1. The lower band (arrowhead) of approximately 78 kDa represents HSF1. The upper band (arrow) represents HSF1 as an activated form.

る。このような観点から、麦門冬湯の気道クリアランス促進作用が最近注目されている。

**3-1. 肺サーファクタント分泌に対する作用特性とシグナルトランスダクション** 麦門冬湯は麦門冬、半夏、甘草、大棗、人參及び粳米の6種類の構成生薬から成り、滋潤効果を持つとされ、経験的に痰の切れ難い咳に用いられてきた。最近シェーグレン症候群における唾液分泌促進作用も見出されており、分泌亢進に伴うと考えられる去痰効果を持つ。分泌亢進型去痰薬の場合、肺サーファクタント分泌が重要である。In vitroでの実験は漢方薬の作用の一部のみを観察することになるが、細胞・分子レベ

ルでの作用解析も必須であり、西洋薬との違いをより鮮明にし得るとも考えられたので単離した肺胞II型細胞を用いて詳しく検討した。

麦門冬湯を経口投与したラットから得た血清を単離培養した肺胞II型上皮細胞に作用させると、ジパルミトイルホスファチジルコリン(PC)分泌は明らかに亢進する。一方、何も投与していない動物から得た血清を作用させた場合にも著明なPC分泌が起こる。血清の影響を除くため、麦門冬湯エキスを直接肺胞II型細胞に作用させると $10^{-6}$  g/mlの濃度から分泌が亢進し始め、 $10^{-5}$  g/mlでは $\beta_2$ -agonistであるテルブタリンと同程度の作用が認められるが、さらに濃度を増しても作用は強くなり、いわゆる頭打ち現象(ceiling phenomenon)を示す。この事実はホメオスタシスを治療の根本とする漢方の考え方によく合致する。

Ceiling phenomenonを示す理由については、麦門冬湯の疎水性分画(疎水クロマトグラフィーによる50%アセトン溶出分画; サポニン、アルカロイド類を含む)がPC分泌亢進作用を持つのにに対し、親水性分画(糖類やペプチドを含む)ではPC分泌抑制作用を持つことによる。親水性分画の単独での分泌抑制作用は強くないが、分泌刺激に対する拮抗作用、すなわちantagonistとしての作用は強いので麦門冬湯全体としての作用は濃度を増しても強くない。さらに麦門冬湯も他の分泌刺激物質の作用に対しては拮抗的に働き、partial agonist(あるいはpartial antagonist)としての性質を示す。このことは麦門冬湯が肺サーファクタント分泌に対し多面的な作用を有し、生体内在性活性物質、特に病態時に発現するメディエーターなどによる分泌過多を抑制することを示唆する。<sup>42,43)</sup>

明確なPC分泌促進作用を持つ麦門冬湯疎水性分画を用いて調べてみると、分泌亢進は軽度であるが有意で持続的な細胞内cAMP濃度の上昇を伴い、cAMP依存性蛋白キナーゼ(Aキナーゼ)の選択的阻害薬H-89の前処置により完全に抑制され、 $\beta_2$ -agonistであるテルブタリンと類似の作用態度を示すが、 $\beta$ 遮断薬プロプラノロール前処理で影響を受けない。Cキナーゼ活性化薬であるPMAやCa<sup>2+</sup>イオノフォアであるA23187の分泌亢進作用はH-89によって影響を受けない。したがって麦門冬湯によるサーファクタント分泌亢進作用は少なくとも



一部細胞内 cAMP の上昇とそれに基づく A キナーゼの活性化を介すると考えられる。<sup>44)</sup>

また、細胞内 Ca<sup>2+</sup> キレート剤 BAPTA-AM の前処理も麦門冬湯の分泌亢進作用を抑制する。BAPTA-AM は PMA 及び P<sub>2</sub> プリンレセプター agonist である ATP の作用を抑制するが、テルブタリンの作用にはほとんど影響を与えない。さらに、Fura-2 AM を用いた顕微測光により細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度を測定すると、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の軽度で持続的な上昇が認められる。この場合も有意ではあるが ATP のように著明な作用ではない。

以上の結果より、麦門冬湯の肺サーファクタント分泌亢進作用には細胞内の cAMP に加え Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇が関与すると考えられるが、さらにその作用は比較的選択的な C キナーゼ阻害薬 H-7、また C キナーゼ、G キナーゼ、A キナーゼの非選択的阻害薬 HA-1004 によっても抑制されることから、他の情報伝達機構も含めた、さらに複合的な機序を介する可能性が高い。<sup>44-46)</sup> すなわち、麦門冬湯の分泌促進作用には II 型細胞の複数のシグナル伝達系の間で生じた相乗的なクロストークが重要であると考えられる。この知見は麦門冬湯が、最近注目されているシグナルトランスダクション治療薬としての位置付けを持つことを示唆している。

**3-2. Polypharmacy としての気道クリアランス修復機序—— $\beta$  受容体遺伝子発現から粘液線毛輸送機能賦活まで** 麦門冬湯とオフィオポゴニンサブスタンス P で活性化した多形核白血球による気管上皮細胞及び肺胞上皮細胞からの分泌亢進を抑制し、その機序として活性酸素抑制作用が重要であることを見出ししている。このことから、麦門冬湯が気道分泌に対して多面的な作用を持つことは明らかであり、レセプターの刺激受容機構及び細胞内の情報伝達機構に対して複合的で緩やかな制御的作用を現すと考えられる。今後さらに検討を要する点もあるが、細胞レベルにおいても修飾物質 (modifier) としての性質を示すことは、ホメオスタシスを重視する漢方薬の本質を反映していると言える。

麦門冬湯の気道系に対する作用は遺伝子レベルでの解明も進んでおり、私達は麦門冬湯が c-AMP-A キナーゼ系を介して肺胞 II 型上皮細胞の  $\beta_1$ - アドレナリン受容体 mRNA 発現量を選択的に増加させ、本作用はグルココルチコイド及びサイロイドとは異

なる機序に基づくことを見出ししている。<sup>47)</sup> また、麦門冬湯はエラスターゼ阻害薬と同じようにヒト好中球エラスターゼによる粘液線毛輸送能の低下と気道液中の DNA 量、フコース量、タンパク量の増加を抑制する (Fig. 15)。<sup>48)</sup> さらに、麦門冬湯は酢酸による粘液線毛輸送能の低下を抑制するだけでなく、高濃度酢酸による気道上皮傷害に対して治療的効果を示す。私達が今までに見出ししている麦門冬湯の気道系に対する作用をまとめると Fig. 16 のようになる。

麦門冬湯がステロイド類似及び非類似の多彩な気道クリアランス改善作用を持つことは明らかである。<sup>47,48)</sup> これらの作用は麦門冬湯に含有される活性の強い 1 つの物質に起因するとは考え難く、複数の活性物質による総合的な作用であると考えられる。

漢方薬の特徴は、全身的な生体機能の修復という点にある。漢方薬の作用は、複数生薬すなわち多成分系の全体作用として発現し、各々の構成生薬間の複合作用は、相加作用、相乗作用あるいは拮抗作用

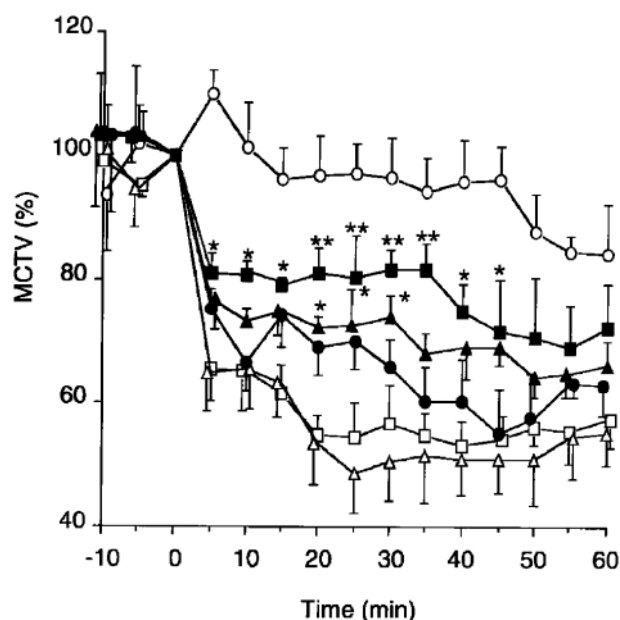


Fig. 15. The Effect of Maimendongtang on HNE-induced Decrease in Mucociliary Transport Velocity (MCTV) in Anaesthetized Quails

Values are expressed as percentages of the respective preapplication values for six animals. Each point and vertical bar represent the mean value and SE. ○: vehicle (PBS (-)), △: 300 µg/kg of HNE, □: 300 µg/kg of HNE and saline, ●: 300 µg/kg of HNE and 100 mg/kg of Maimendongtang, ▲: 300 µg/kg of HNE and 300 mg/kg of Maimendongtang, ■: 300 µg/kg of HNE and 1 g/kg of Maimendongtang. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01; statistically significant difference from the group given 300 µg/kg of HNE (ANOVA).

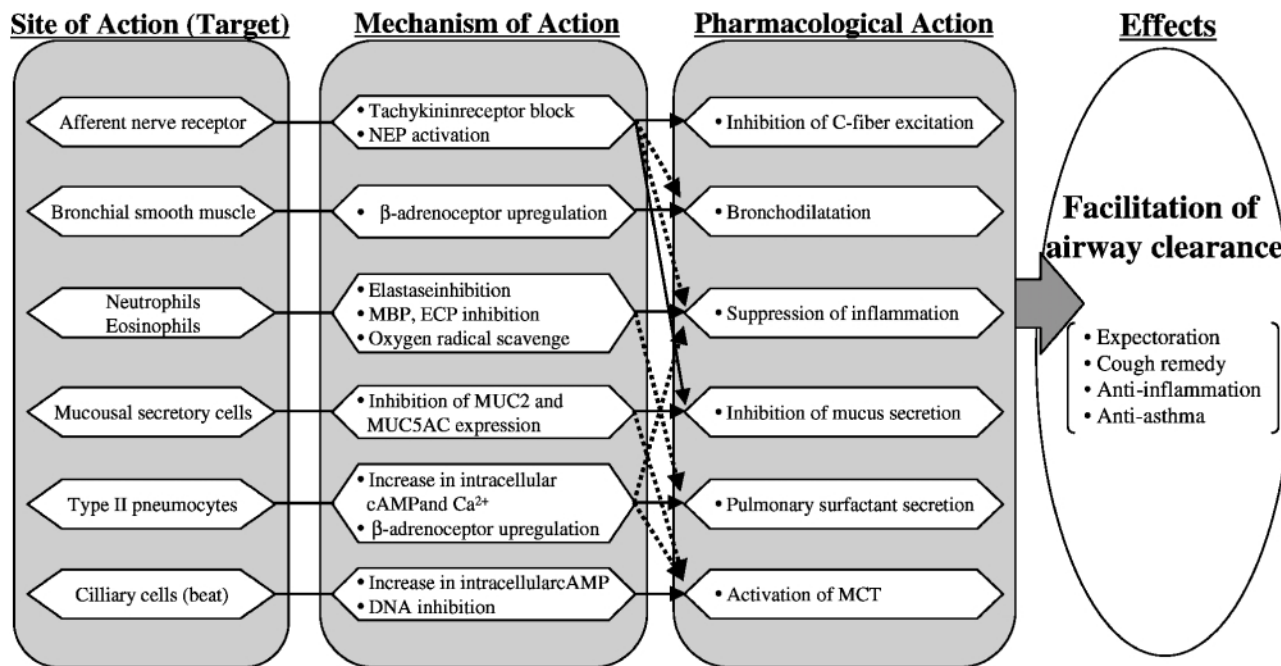


Fig. 16. Effects of Bakumondo-to (Mai-Men-Dong-Tang) on Airway Clearance

というパターンで説明される相互作用の結果として現れる。各構成生薬の作用とともに有効成分についての検索が必要であり、本稿では紙数の関係で成績の詳細は割愛したが、麦門冬湯の構成生薬の作用や主な活性成分であるオフィオポゴニンの作用も明らかになっている。麦門冬湯を単なる鎮咳・去痰薬としてではなく、咳と痰の原因となっている気道病変そのものに対する修復薬、すなわち、総合的気道クリアランス改善薬として捉えることが肝要である。

#### おわりに

社会環境の変化に伴い、気道系疾患の罹患者数が漸次増加している。この傾向はわが国だけに止まらず、欧米諸国を始めとした世界の中に見られる。

咳、気道粘液分泌と粘液繊毛輸送は重要な気道防御機構であり、これらの気道クリアランス機構の障害・異常は時には閉塞性換気障害による死の原因となる。しかし、障害発生機序は、極めて複雑であるために本格的な薬理研究はほとんど行われておらず、治療薬開発の隘路となっていた。私達は *in vivo* 及び *in vitro* 気道炎症モデルの作成とその応用による分子病態薬理学的研究を通じて、従来、不明な点が多かった気道クリアランスの分子レベルにおける生理機構、病態生理（障害発生）と修復の機序の一端を明らかにしてきた。また、麦門冬湯が

polypharmacy として遺伝子の転写調節を介して受容体、セカンドメッセンジャー（シグナルトランスダクション）、酵素蛋白の活性を制御することにより細胞生理機能を調節する Biological Response Modifier (BRM) としての働きを持つことを提示した。このような研究は、多少なりとも病態発生の本質に迫り、疾病の予防と治療原理の確立に貢献し得るものと考えている。今後この領域においては新規治療薬の開発と治療法の改善に寄与し得るトランスレーショナルリサーチが特に必要になっていくものと思われる。

**謝辞** 本研究領域の先駆者として御指導をいただいた故加瀬佳年先生、御教示と御鞭撻をいただいた福田英臣先生にお礼申し上げます。共同研究者の皆様方に深く感謝致します。

#### REFERENCES

- 1) Miyata T., *Respir.*, **3**, 924-928 (1984).
- 2) Takahama K., Miyata T., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **105**, 41-52 (1995).
- 3) Jancso G., Kiraly E., Jancso-Gabor A., *Nature*, **270**, 741-743 (1977).
- 4) Lundberg J. M., Saria A., *Nature*, **302**, 251-

- 253 (1983).
- 5) Widdicombe J. C., *J. Physiol.*, **123**, 55–70 (1954).
  - 6) Takahama K., Wakuda I., Fukushima H., Isohama Y., Kai H., Miyata T., *Eur. J. Pharmacol.*, **329**, 93–97 (1997).
  - 7) Takahama K., Araki T., Fuchikami J., Miyata T., *J. Pharmacol.*, **48**, 1027–1033 (1996).
  - 8) Tatar M., Sant' Ambrogio G., Sant' Ambrogio F. B., *J. Appl. Physiol.*, **76**, 2672–2679 (1994).
  - 9) Wakuda I., Takahama K., Isohama Y., Miyata T., *Jpn. J. Pharmacol.*, **64**, 148 (1994).
  - 10) Takahama K., Fuchikami J., Isohama Y., Miyata T., *Regul. Pept.*, **46**, 236–237 (1993).
  - 11) Fuchikami J., Takahama K., Kai H., Miyata T., *Life Sci. Adv.*, **9**, 37–43 (1990).
  - 12) Miyata T., Kai H., Isohama Y., *Eur. Respir. J.*, **11**, 480–491 (1998).
  - 13) Advenier C., Lagente V., Boichot E., *Eur. Respir. J.*, **10**, 1892–1906 (1997).
  - 14) Widdicombe J. C., *Monaldi. Arch. Chest. Dis.*, **54**, 275–279 (1999).
  - 15) Kamei J., *Pulm. Pharmacol.*, **9**, 349–356 (1996).
  - 16) Kamei J., Mori T., Igarashi T., *Res. Common. Chest. Pathol. Pharmacol.*, **76**, 371–374 (1992).
  - 17) Takahama K., Fukushima H., Isohama Y., Miyata T., *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 690–694 (1997).
  - 18) Rooney S. A., “Lung Surfactant,” Landes, Austin, 1998, pp.139–163.
  - 19) Kai H., Isohama Y., Takaki K., Oda Y., Murahara K., Takahama K., Miyata T., *Eur. J. Pharmacol.*, **212**, 101–103 (1992).
  - 20) Isohama Y., Matsuo T., Kai H., Takahama K., Miyata T., *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **36**, 561–568 (1995).
  - 21) Isohama Y., Kumanda Y., Tanaka K., Kai H., Takahama K., Miyata T., *Jpn. J. Pharmacol.*, **73**, 163–169 (1997).
  - 22) Isoyama Y., Kanemaru M., Kai H., Takahama K., Miyata T., *Life Sci.*, **68**, 2361–2371 (2001).
  - 23) Venge P., Hakansson L., “Asthma,” eds. by Kaliner M. A., Barnes P. J., Persson C. G. A., Dekker, New York, 1991, vol. 49, pp. 477–502.
  - 24) Okumura M., Tsuruoka M., Isohama Y., Kai H., Takahama K., Miyata T., *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **38**, 569–575 (1996).
  - 25) Okumura M., Kai H., Shinozawa H., Isohama Y., Miyata T., *Am. J. Physiol.*, **276**, L763–L768 (1999).
  - 26) Okumura M., Tsuruoka M., Isohama Y., Kai H., Takahama K., Miyata T., *Jpn. J. Pharmacol.*, **67**, 165–168 (1995).
  - 27) Okumura M., Kai H., Arimori K., Iwakiri T., Hidaka M., Shiramoto S., Isohama Y., Miyata T., *Eur. J. Pharmacol.*, **403**, 189–194 (2000).
  - 28) Ishizaka Y., Tanaka M., Kitamura K., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H., Eto T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 642–646 (1994).
  - 29) Eguchi S., Hirata Y., Kano H., Sato K., Watanabe Y., Watanabe T. X., Nakajima K., Sakakibara S., Marumo F., *FEBS Lett.*, **340**, 226–230 (1994).
  - 30) Kai H., Yoshitake K., Isohama Y., Hamamura I., Takahama K., Miyata T., *Am. J. Physiol.*, **267**, L526–L530 (1994).
  - 31) Yoshitake K., Isohama Y., Kai H., Takahama K., Miyata T., *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **36**, 1009–1016 (1995).
  - 32) Yoshitake K., Isohama Y., Kai H., Takahama K., Miyata T., *Pharmacol. Sci.*, **1**, 475–478 (1995).
  - 33) Kai H., Yoshitake K., Hisatsune A., Kido T., Isohama Y., Takahama K., Miyata T., *Am. J. Physiol.*, **271**, L484–L488 (1996).
  - 34) Kido T., Kai H., Hara N., Hamamura I., Isohama Y., Takahama K., Miyata T., *Pharm. Pharmacol. Comm.*, **4**, 219–223 (1998).
  - 35) Basbaum C., Tsuda T., Takeuchi K., Royce F., Jany B., *Chest.*, **101**, 45S–47S (1992).
  - 36) Kai H., Hisatsune A., Chihara T., Uto A., Kokusho A., Miyata T., Basbaum C., *J. Biol. Chem.*, **274**, 20098–20102 (1999).
  - 37) Lu Z., Kim K. A., Suico M. A., Uto A., Seki Y., Shuto T., Isohama Y., Miyata T., Kai H., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **303**, 190–195 (2003).
  - 38) Suico M. A., Koyanagi T., Ise S., Lu Z., Hisatsune A., Seki Y., Shuto T., Isohama Y., Miyata T., Kai H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1557**, 113–120 (2002).

- 39) Seki Y., Suico M. A., Uto A., Hisatsune A., Shuto T., Isohama Y., Kai H., *Cancer Res.*, **62**, 6579–6586 (2002).
- 40) Nagayama S., Kai H., Okiyoneda T., Horikawa S., Miyata T., *FEBS Lett.*, **455**, 215–218 (1999).
- 41) Nagayama S., Jono H., Suzaki H., Sakai K., Tsuruya E., Yamatsu I., Isohama Y., Miyata T., Kai H., *Life Sci.*, **69**, 2867–2873 (2001).
- 42) Miyata T., Kai H., “Cilia, Mucus, and Mucociliary Interactions,” ed. by Baum G. L., Marcel Dekker, New York, 1998, pp. 391–397.
- 43) Miyata T., Isohama Y., Tai S., Kai H., Takahama K., “Pharmacological Research on Traditional Herbal Medicine,” eds. by Shibuya T., Watanabe H., Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1999, pp.121–147.
- 44) Isohama Y., Kanemaru M., Kai H., Takahama K., Miyata T., *J. Trad. Med.*, **18**, 8–14 (2001).
- 45) Isohama Y., Kanemaru M., Kai H., Takahama K., Miyata T., *J. Trad. Med.*, **18**, 15–19 (2001).
- 46) Morsy M. A. M., Isohama Y., Miyata T., *Eur. J. Pharmacol.*, **426**, 21–27 (2001).
- 47) Isohama Y., Moriuchi H., Kai H., Miyata T., *Jpn. J. Orient. Med.*, **53**, 1–9 (2002).
- 48) Tai S., Kai H., Isohama Y., Moriuchi H., Hagino N., Miyata T., *Phytotherapy Res.*, **13**, 124–127 (1999).