

学位論文 (博士)

抗原誘発気管支平滑筋過敏性発現における
Rac1 活性亢進を介した収縮反応変化

2020 年 3 月

星薬科大学大学院 薬学研究科
総合薬科学専攻 医療創成科学領域
生体分子薬理学

D751 甲斐 友規

論文目録

本論文は、学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

主論文

1) Sakai H, Kai Y, Sato K, Ikebe M, Chiba Y. Rac1 modulates G-protein-coupled receptor-induced bronchial smooth muscle contraction. Eur J Pharmacol. 2018;818:74-83.

(第一章に使用)

2) Kai Y, Motegi M, Suzuki Y, Takeuchi H, Harada Y, Sato F, Chiba Y, Kamei J, Sakai H. Up-regulation of Rac1 in the bronchial smooth muscle of murine experimental asthma. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2019;125(1):8-15.

(第二章に使用)

3) Kai Y, Motegi M, Suzuki Y, Harada Y, Takeuchi H, Kon R, Ikarashi N, Chiba Y, Kamei J, Sakai H. Increased Rac1 Activation in the Enhanced Carbachol-Induced Bronchial Smooth Muscle Contraction of Repeatedly Antigen-Challenged Mice. Biol Pharm Bull. 2019;42(9):1605-1607.

(第三章に使用)

4) Kai Y, Kon R, Ikarashi N, Chiba Y, Kamei J, Sakai H. Role of Rac1 in augmented endothelin-1-induced bronchial contraction in airway hyperresponsive mice. J Pharmacol Sci. accepted.

(第四章に使用)

略語リスト

本論文では、以下の略語を用いた。

AHR	Airway hyperresponsiveness
BSM	Bronchial smooth muscle
CCh	Carbachol
CPI-17	17 kDa PKC-potentiated inhibitory protein of protein phosphatase I
ET-1	Endothelin-1
ETAR	Endothelin A receptor
ETBR	Endothelin B receptor
GDP	Guanosin 5'-diphosphatase
GEFs	Guanine nucleotide exchange factors
GPCR	G protein coupled receptor
GTPase	Guanosine 5'-triphosphatase
MLB	Mg ²⁺ lysis/wash buffer
MLC	Myosin light chain
MLCK	Myosin light chain kinase
MLCP	Myosin light chain phosphatase
PDBu	Phorbol 12,13-dibutyrate
PKC	Protein kinase C
PTD	Protein transduction domain
VSCC	Voltage dependent calcium channels

序論

気管支喘息は、肺への気流制限を伴う気道閉塞、粘液産生増加を伴う気道炎症および環境刺激物や化学物質への暴露によって引き起こされる気道過敏性 (AHR) に特徴付けられる閉塞性の呼吸器疾患の一つである (1)。喘息の症状として咳嗽、息切れ、胸の圧迫感や喘鳴などがあり、夜間または早朝に最も頻繁に発生する (2)。世界中で約 2 億 3500 万人が罹患している疾患であり、多くの国で有病率が高いため多くの人が喘息で死亡している。さらに、患者数は日々増加しているのが現状である (3)。

喘息の症状の中でも、AHR は特に重要な病態の一つであり、気道平滑筋収縮反応感受性の増強と定義されている (4-6)。軽微な刺激でも反応する過剰な収縮反応感受性の増強は、結果として増悪後の急激な気道内腔の急速な狭窄をもたらす。喘息治療の目標は、気道炎症のコントロール、気管支拡張ならびに気管支収縮反応を拮抗することによる気道狭窄を解消することである。つまり、気管支平滑筋の収縮反応および AHR の機序を解明することは気管支喘息の治療において重要である (7-10)。

気管支平滑筋の収縮反応は、主に myosin light chain (MLC) のリン酸化によって調節されている。さらに、MLC のリン酸化はこれまでの研究により、細胞質 Ca^{2+} 濃度と筋フィラメントの Ca^{2+} 感受性 (Ca^{2+} sensitization) によって調節されていることが明らかになっている。 Ca^{2+} の濃度に依存する経路は、受容体刺激等による受容体作動性 Ca^{2+} チャンネル (receptor-operated Ca^{2+} channel; ROC) や電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (voltage-dependent Ca^{2+} channel; VDCC) の活性化を介し、細胞質内への Ca^{2+} 流入が促進され、 Ca^{2+} の濃度上昇が引き起こされる。この Ca^{2+} の流入により calmodulin (CAM) 1 分子当たり 4 分子の Ca^{2+} が複合体を形成し、MLC Kinase

(MLCK) を活性化し MLC をリン酸化することにより、actin と myosin が相互作用を引き起こし、平滑筋の収縮反応をもたらすと考えられている (11)。

一方、Ca²⁺ sensitization 経路は一定な Ca²⁺ 濃度においても収縮反応を引き起こされ、この経路として RhoA/Rho kinase 経路と PKC/CPI-17 経路の二つが周知されている。これらの経路は MLC phosphatase (MLCP) 活性を抑制することによって MLC をリン酸化させる。G タンパク質を活性化させる GTP γ S (非水解性 GTP アナログ) は MLCP 活性を阻害するので、G タンパク質は Ca²⁺ sensitization に関与することが示唆されている (12, 13)。

Rho GTPase superfamily は、G タンパク質の Ras family に関与する 22 の family で構成され、Rho superfamily の中でも、Cdc42、Rac1 および RhoA は特に糸状仮足、葉状仮足およびストレス線維の形成など細胞骨格形成を含む多数の細胞機能に関連していることが知られている (14)。これらの GTPase は "ON" 状態である GTP の状態と "OFF" 状態である GDP の状態を繰り返しており、この "ON" と "OFF" の状態は、グアニンヌクレオチド交換因子 (GEFs)、GTPase 活性化タンパク質およびグアニンヌクレオチド解離阻害因子などにより制御されている (15)。

AHR については、BALB/c 系マウスに ovalbumin (OVA) 抗原にて感作および反復吸入チャレンジを施し、気道炎症および気道過敏性が観察されるモデル動物を作製し、摘出した気管支組織においても GPCR アゴニスト誘発気管支平滑筋収縮反応が有意に亢進することを当研究グループは確認している (16)。また、このモデル動物では、high K⁺ 脱分極誘発気管支収縮反応は変化が見られないことから、このアゴニスト誘発収縮反応の亢進には Ca²⁺ sensitization が強く関与することを示している (17)。さらに、2018 年には、ダニ抗原を用いた気道過敏性モデル動物の気管支収縮反応の増強に Rac1 が関与することも報告されている (18)。

以上のことから、気管支平滑筋収縮反応および気管支喘息時に特徴的に見られる過剰な気管支平滑筋収縮反応の増強に Rac1 が関与する可能性が考えられるが、気管支平滑筋収縮反応の増強と Rac1 の関係性については詳細な機序が明らかになっていない。そこで本研究では、Rac1 阻害薬である EHT1864 および NSC23766 を用いて、通常ラットおよびマウスの気管支平滑筋における収縮反応に Rac1 が関与するか検討を行なった。その後、マウスにて喘息病態を模した抗原誘発気道過敏性モデル動物を作製し、このモデル動物における気管支平滑筋収縮反応における Rac1 阻害効果、Rac1 関連因子発現変化および Rac1 活性変化を検討した。以上のことより、AHR 時の過剰な気管支平滑筋収縮反応の増強と Rac1 の関係性を明らかにすることで新たな予防法や治療法を見出す一環としてとして研究を行った。

試薬および方法

本論文では以下の試薬および実験方法を用いて研究を遂行した。

・ラットおよびマウス

Wistar 系雄性ラットおよび BALB/c 系雄性マウスは、東京実験動物より購入した。全ての実験は、星薬科大学動物実験指針に基づき行った。全ての実験は星薬科大学動物実験委員会の承認のもと、動物実験規定に則り実施した。

・抗原誘発気道過敏性モデルマウスの作製

Chiba らの報告 (16, 19) に従い動物を作成した。7 週齢の BALB/c 系雄性マウスに無麻酔下、1 匹あたり 8 μ g OVA と 2 mg Imject Alum の混合液を 0.1 mL 腹腔内投与し感作を施した。その 5 日後、同様の方法を用いて追加感作を行った。初回感作から 12、16 および 20 日目に、プラスチックの箱 (130 x 200 x 100 mm) の中に感作を施したマウスを無麻酔、無拘束下の状態を入れた。次いで、5 mg/mL OVA 20 mL を振盪混和した後、アクリル製円柱チャンバー (直径 70 mm、140 mm) に入れて ultrasonic nebulizer を用いてミスト状にし、15 分間、プラスチック箱の中に送り込み、マウスに反復的に抗原を吸入させることを 2 回行い、気管支喘息症状を惹起させた (Chal. 群)。また、コントロール群としては、同様の方法にて感作を施し抗原の代わりに溶媒である saline のみを反復吸入した sensitized control (S.C.) 群を用いた。最終チャレンジ終了の 24 時間後に実験を行なった。

・組織の摘出

Wistar 系雄性ラットおよび BALB/c 系雄性マウスを過量イソフルラン吸入に

て麻酔後、腹部大動脈から瀉血致死させ、開胸し、喉頭直下から肺まで摘出した。その後、直ちに 95 % O₂-5% CO₂ を通気した Krebs-Henselet 液 (組成: NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucose 10 mM) に組織を浸し、結合組織を丁寧に剥離し、左主気管支リング標本 (幅約 3 mm) を作製した。

・気管支平滑筋収縮反応の測定

摘出した左主気管支リングを 95% O₂-5% CO₂ で通気した Krebs-Henselet 溶液 (37°C) の入った organ bath 内に resting tension 1 g にて懸垂し、15 分毎に 3 回洗浄を行って標本を安定化させた後、10 μM CCh 投与を行いその最大収縮反応を基準値とした。その後再び 15 分毎に 3 回洗浄を行って標本を安定化させた後、EHT1864 (3, 10 μM)、NSC23766 (1, 10, 100 μM)、vehicle である saline を 20 分間前処置し、CCh の累積投与 (final conc. 3 x 10⁻⁹, 10⁻⁸, 3 x 10⁻⁸, 10⁻⁷, 3 x 10⁻⁷, 10⁻⁶, 3 x 10⁻⁶, 10⁻⁵, 3 x 10⁻⁵, 10⁻⁴ M)、ET-1 累積投与 (final conc. 3 x 10⁻⁹, 10⁻⁸, 3 x 10⁻⁸, 10⁻⁷, 3 x 10⁻⁷, 10⁻⁶ M)、0.3 μM calyculin-A 投与、K⁺累積投与 (10, 30, 60 mM)、NaF 投与 (ラット; 10 mM、マウス; 30 mM)、Phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) 投与 (60 mM K⁺ 投与後に 1 μM PDBu 投与し、さらに 3 μM GF109203X 投与) および 1 μM 濃度 protein transduction domain (PTD) Rac1 (Q61L) 投与を行った。1 μM CCh を 15 分処置し、EHT1864 累積投与 (1, 3, 10, 30 μM) および 1 μM 濃度 PTD-Rac1 (野生型および T17N) 処置後 CCh 累積投与を行なった。ラットにおいては vehicle 群の CCh 処置の Emax、Normal マウスの CCh 累積投与および PDBu 投与は 10 μM CCh 投与を、K⁺ 投与は vehicle 群の 60 mM K⁺ 投与を、NaF 投与は vehicle 群の 30 mM NaF 投与を 100% として算出した。S.C. および Chal. マウスの収縮反応は

mN または g で表記した。なお収縮力は FD transducer (TB-612T; 日本光電工業) およびひずみ圧力用アンプ (日本光電工業, AP-621G) にて等尺性張力を測定し、PowerLab 4/30 (ADINSTRUMENTS) を用い記録した。なお、使用した PTD-Rac1 (Q61L)、PTD-Rac1 (野生型) および PTD-Rac1 (T17N) は、マサチューセッツ医科大学生理学研究室教授池辺光男先生から提供された。

・ Total タンパク質の抽出

前述した方法により、左主気管支を摘出した。これらの組織を 37°C、95% O₂-5% CO₂ で通気させた Krebs-Henselet 溶液中 15 分毎に 3 回 wash し、組織を安定化させた。この組織に 100 μM NSC23766、10 μM EHT1864、10 μM Y-27632 および vehicle (DMSO および saline) を 20 分間処置した後、1 μM CCh および ET-1 (ラット; 0.1 μM、マウス; 1 μM) を 15 分間処置を行った。続いて、液体窒素にて反応を停止させ TCA/acetone (10% trichloroacetic acid and 10 mM DTT) に浸け、-80°Cにて保存した。なお、CCh および ET-1 処置を行わずに液体窒素にて反応を停止させ同様の手順を行った群を vehicle 群とした。その後 TCA を 1 回目は 800 μL、2 回目以降は 500 μL の acetone で 5 回洗い流し、組織を乾燥させた。これに T-PER (Thermo Fisher Scientific) 200 μL を加えてホモジナイズ後、遠心分離 (9000 g, 5 min) を行った。次に、タンパク質濃度を測定し、検量線の作成を行った。1.5 mL RNase free チューブに 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.125/2, 0.125/4, 0.125/8 mg/mL の BSA を T-PER で希釈した BSA 溶液を作成した。96 マイクロウェルプレートに各濃度の BSA とサンプルを 5 μL ずつアプライし、そこに 1x Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton) を 150 μL 加え、吸光度 (560 nm) を測定した。検量線から、サンプルのタンパク質濃度を算出し、タンパク質濃度を 0.5 μg/μL に T-PER で希釈した。

これに 5 x Sample Buffer (0.125 M pH 6.8 Tris HCl, 10% SDS, 20% Glycerol, 0.04% BPB, 10% 2-mercaptoethanol) を 1x になるように加えた後、5 分間煮沸し、実験に使用するまで -80°C にて保存した。

• Pull down assay

Rac1 Activation Assay Kit (Merck Millipore) を用いて 活性型 Rac1 (GTP-Rac1) のタンパク質を抽出した。Total タンパク質抽出と同様の手順で気管支組織を液体窒素にて反応停止までを行なった。その後、組織を液体窒素下で破碎し、kit 付属 1 x Mg^{2+} Lysis/Wash Buffer (MLB; 125 mM pH 7.5 HEPES, 750 mM NaCl, 5% Igepal CA-630, 50 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA and 10% glycerol) を加えホモジナイズを行なった。遠心分離 (14,000 g, 4°C, 10 min) を行い、上清の一部を total Rac1 用サンプルとして、sample buffer を加え、5 分間煮沸し、-80°C にて保存した。残りの上清に、付属の PAK p21-binding domain (PDB) Agarose beads 懸濁液を加え、4°C で 24 時間インキュベートした。遠心分離 (14,000 g, 10 sec) した後、1 x MLB にて 3 回洗浄し、sample buffer を加え、5 分間煮沸し、-80°C にて Rac1 pull down sample として保存した。その後、SDS-PAGE およびウェスタンブロット法を用いて解析した。

• ウェスタンブロット

タンパク質サンプルは e-PAGEL にて電気泳動を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 法に従って行った (18)。Blotting 操作を行う前に、ろ紙と PVDF 膜 (RPN2020F; GE healthcare) を methanol にて 1 分間浸し親水処理した後、blotting buffer にて 1 時間浸しておく。続いて、Trans-Blot[®]

SD Cell (Bio-Rad) を用いてゲルタンパク質の PVDF 膜への転写 (50 V, 220 mA/90 x 83 mm, 15 W, 30 min) を行った。次に、一次抗体あるいは二次抗体の非特異的結合を阻害する目的で、PVDF メンブランを blocking buffer にて、震盪しながら 1 時間インキュベートした。インキュベート終了後、一次抗体を blocking buffer (ATTO) にて 1000 倍または 5000 倍希釈し、室温で一晩インキュベートを行った。一次抗体としては、p-MLC antibody として Anti-Myosin Light Chain antibody, phosphor-specific (Ser19; Merck)、MLC antibody として MRCL3/MRLC2/MYL9 (FL-172; Santa Cruz Biotechnology)、Phospho-MYPT1 (Thr696) antibody (Cell Signaling Technology)、Phospho-MYPT1 (Thr853) antibody (Cell Signaling Technology)、MYPT1 antibody (Cell Signaling Technology)、Anti-Rac1 antibody produced in Rabbit (Sigma Aldrich)、Anti-Trio-C-terminal region, Rabbit-Poly (Bentyl Laboratories)、Anti Tiam1 (Bentyl Laboratories)、anti-Chrm3 (Santa Cruz Biotechnology)、anti-endothelin A receptor (ETAR; Santa Cruz Biotechnology)、anti-endothelin B receptor (ETBR; Santa Cruz Biotechnology) および anti-GAPDH Monoclonal Antibody (Cell Signaling Technology) を用いた。インキュベート終了後、メンブランの wash (5 分 x 2, 10 分 x 3) を行い、それぞれの一次抗体に特異的な二次抗体として、anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (Cell Signaling Technology) を blocking buffer にて 5000 倍希釈し、インキュベートを行った。インキュベート終了後、上述と同様の方法にて wash を行った。以上の操作終了後、目的とするタンパク質を可視化するために PVDF メンブランを ImmunoStar[®] Basic (和光純薬) を用いて発光させ、画像解析装置 (ImageQuant LAS 500, グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン) にて検出した。その後、各バンドをスキャナーにてコンピューターに取り込み、デンシメトリー (Atto Densitograph Software for Macintosh ver. 4.0; Atto) を行い、各々のタンパク質の相対的

発現量を算出した。

• RNA 抽出

気管支組織を 1.5 mL RNase free チューブに回収し、200 μ L の TRI Reagent を加えてホモジナイズした。その後、TRI Reagent (Sigma Aldrich) を全量が 1 mL になるように加え 23 G 注射針および注射筒を用いて組織を溶解させるとともに、ゲノム DNA を破壊し、この懸濁液に chloroform 200 μ L を加えてよく vortex し、15 分間室温でインキュベートを行った。その後、遠心分離 (18,800 g, 4°C, 15 min) を行い、3 層に分かれていることを確認した。このうち上層のみを 1.5 mL RNase free チューブに分取し、2-propanol 500 μ L を加えてよく vortex した後、-20°C で 30 分以上冷却した。その後、遠心分離 (18,800 g, 4°C, 15 min) を行った。得られた上清を除去し、沈殿物に 75% ethanol 500 μ L を加えてよく vortex し、遠心分離 (18,800 g, 4°C, 15 min) を行い白色沈殿物 (RNA pellet) の生成を確認後、上清を除去した。得られた沈殿物を風乾した後、DEPC-treated water に溶解させ、total RNA サンプルとした。得られたサンプルは NANODROP Lite (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度測定を行い、RNA 濃度 1 μ g/ μ L または 0.5 μ g/ μ L に DEPC-treated water で希釈し、実験で使用するまで -80°C にて保存した。

• quantitative RT-PCR

RNase free 8 連チューブに得られた RNA (0.5 μ g)、およびその全量が 6 μ L になるように ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo) の kit に含まれる H₂O を加え混合した。これを PCR thermal cycler (Thermo Fisher Scientific) にセットし、pre-incubation (65°C, 5 min) を行った。その後、チューブを

取り出し氷上にて 5 分程度インキュベートした。これに 4x DN Master Mix (2 μ L) を加え、PCR thermal cycler にセットし、gDNA 除去反応 (37°C, 5 min) を行った。その後、チューブを取り出し氷上にて 5 分程度インキュベートした。さらに 5x RT Master Mix II (2 μ L) を加え、PCR thermal cycler にセットし、RT 反応 (37°C 15 min, 50°C 5 min, 98°C 5 min, 4°C, ∞) を行なった。作成した cDNA に 90 μ L の DEPC-treated water を加え、10 倍希釈を行い、使用するまで -30°C にて保存した。96 well プレートを用いて RT 反応で得られた cDNA solution 2 μ L DEPC-treated water 1 μ L、F-primer (10 μ M) ならびに R-primer (10 μ M) をそれぞれ 1 μ L、2x Fast SYBR Green (Thermo Fisher Scientific) 5 μ L を加えた。StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific) に 96-well plate をセットし、Pre-incubation (95°C, 20 sec) にて hot start polymerase の活性化を行った後、40 cycle PCR 反応 (1 cycle: 95°C 3 sec, 60°C, 30 sec) を行い、各種遺伝子発現量を定量した。なお real-time PCR primer として Table 1 および Table 2 に示したものを使用した。また、データ解析は $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法にて行った。

・データ解析

データは平均値 \pm 標準誤差 (S.E.) で表した。統計学的検定は、unpaired Student's t-test、one-way analysis of variance (ANOVA)、two-way ANOVA ならびに Bonferroni の post hoc test を用いた。

第一章 ラット気管支平滑筋収縮反応における Rac1 の役割

第一節 緒言

気管支平滑筋は主に MLC のリン酸化によって調節されており、Ca²⁺ 依存的な MLCK を介した経路と、Ca²⁺ 非依存的な MLCP を介した経路 (Ca²⁺ sensitization) の二つの経路が明らかにされている (12, 13)。RhoA は RhoGTPase superfamily の一つで気管支平滑筋収縮反応の Ca²⁺ sensitization に関与することが報告されている (20)。

RhoA 以外の RhoGTPase superfamily である Rac1 は RhoA と比べて平滑筋収縮反応に関与することが明らかにされた報告は少ないが、Rac1 GEFs 特異的阻害薬である NSC23766 が phenylephrine 誘発マウス伏在動脈および CCh 誘発膀胱平滑筋収縮反応を抑制することが知られている (21)。さらに、2015 年に NSC23766 および Rac1 阻害薬である EHT1864 が Ca²⁺ sensitization を介した phenylephrine 誘発ウサギ大腿動脈収縮反応を抑制することが示された (22)。しかしながら、気道の MLC リン酸化反応および平滑筋収縮反応における Rac1 の機能については明らかになっていることが少ない。そこで、本研究では、ラット気管支において Rac1 が MLC のリン酸化および平滑筋収縮反応に関与するかを検討した。

第二節 実験結果

CCh 誘発ラット気管支平滑筋収縮反応は、Rac1 阻害薬である EHT1864 および Rac1 GEFs 特異的阻害薬である NSC23766 の前処置により抑制された (Fig. 1A-E)。しかしながら、無処置である naive 群と溶媒処置群 (vehicle 群) では収縮反応に違いはみられなかった。また、1 μ M CCh 誘発収縮反応に対する EHT1864 の後処置による累積投与の効果を検討したところ、濃度依存的な収縮反応の抑制がみられた (Fig. 1F)。さらに、気管支平滑筋の強力な収縮作用を持つ endothelin-1 (ET-1) による収縮反応に対する Rac1 阻害薬の効果を検討した。ET-1 誘発気管支平滑筋収縮反応は Rac1 阻害薬である NSC23766 および EHT1864 処置により有意に抑制された。

次に、これらの Rac1 阻害薬が MLC のリン酸化反応の変化を引き起こしているかを検討した。CCh および ET-1 処置により認められた MLC のリン酸化反応の亢進は、Rac1 阻害薬である NSC23766 および EHT1864 処置により抑制された (Fig. 2A-D)。さらに、pull down assay を用い Rac1 活性化についても検討を行なったところ、CCh 処置により有意な Rac1 活性化亢進 (GTP-Rac1 の割合の増加) が認められた。この Rac1 活性化の亢進は Rac1 阻害薬である NSC23766 および EHT1864 処置により抑制されたが、RhoA 経路に關与する Rho kinase 阻害薬である Y-27632 処置では抑制されなかった (Fig. 2E and F)。

続いて、Rac1 が気管支平滑筋収縮反応において Ca^{2+} 依存性経路と Ca^{2+} 非依存性経路 (Ca^{2+} sensitization) のどちらに關与するかを検討した。Calyculin-A は強力なタンパク質脱リン酸化阻害作用があり、MLCP の作用を抑制することで平滑筋の収縮反応を引き起こすことが知られている。この calyculin-A 誘発収縮反応は NSC23766 および EHT1864 処置により影響を受けなかった。さらに、 Ca^{2+} 依存性

MLCK 経路を介した収縮反応である high K⁺ 脱分極誘発収縮反応についても検討を行なったところ、high K⁺ 脱分極誘発気管支平滑筋収縮反応も NSC23766 および EHT1864 処置による影響を受けなかった (Fig. 3E-H)。

Ca²⁺ sensitization 経路については RhoA 経路と CPI-17 経路の二つが知られているため、この二つの収縮経路に Rac1 が関与するか検討することにした。NaF は三量体 G タンパク質を活性化し、RhoA 経路の活性化を介して MLCP 活性を抑制することにより収縮反応を引き起こす (23-26)。興味深いことに、NaF 誘発気管支平滑筋収縮反応は、EHT1864 および Y-27632 処置により抑制されたが、NSC23766 処置では収縮反応に変化はみられなかった。さらに、EHT1864 および Y-27632 の共処置は、それぞれの単独投与時と比較して、さらなる NaF 誘発収縮反応の抑制効果はみられなかった (Fig. 4A-D)。そこで、Rac1 阻害薬が RhoA 経路に関与する可能性が示唆されたので、Rac1 が RhoA/MLCP 経路に作用するかをさらに検討した。MLCP ホロ酵素活性に関して、MLCP のサブユニットである MYPT1 の Thr696 と Thr853 2つのサイトが Rho kinase によってリン酸化され、収縮反応が引き起こされることが報告されているため (27)、これらの阻害サイトのリン酸化反応に対する Rac1 阻害薬の効果を検討した (Fig. 5A and B)。Thr696 では、CCh 刺激によりリン酸化反応の変化はみれなかった。一方、Rho kinase の特異的サイトである Thr853 では、CCh 刺激により有意なリン酸化反応の亢進がみられた。さらに、このリン酸化反応の亢進は NSC23766 および EHT1864 処置によって抑制された (Fig. 5A and C)。

そこで、PKC/CPI-17 経路を介した収縮反応に対する Rac1 阻害薬の効果について検討した。気管支平滑筋に PKC 活性化薬である PDBu を処置したところ収縮反応はみられなかったが (Fig. 6A)、high K⁺ 処置後に PDBu を処置すると気管支

平滑筋の収縮反応がみられた。この収縮反応は PKC 阻害薬である GF109293X 処置により抑制された。このことから、この収縮反応は PKC を介していることが示された (Fig. 6B)。しかし、high K⁺ および PDBu 誘発収縮反応は NSCC23766 および EHT1864 処置によって変化はみられなかった (Fig. 6B-E)。

最後に Rac1 活性自体が気管支平滑筋収縮反応に作用するかを様々な protein transduction domain (PTD)-Rac1 を用いて検討を行なった。興味深いことに、恒常的活性化変異体である PTD-Rac1 (Q61L) 投与によって気管支平滑筋収縮反応が引き起こされた (Fig. 7A)。この収縮反応は、NSC23766 処置では変化がなかったが、EHT1864 の処置により抑制された (Fig. 7A and B)。野生型 PTD-Rac1 および dominant negative 変異体である PTD-Rac1 (T17N) を処置したところベースラインに変化はみられなかったが、そこに CCh 累積処置を施すと野生型 PTD-Rac1 処置では CCh 誘発収縮反応の増強がみられた。また、PTD-Rac1 T17N 処置では CCh 誘発収縮反応の抑制がみられた (Fig. 7C-F)。

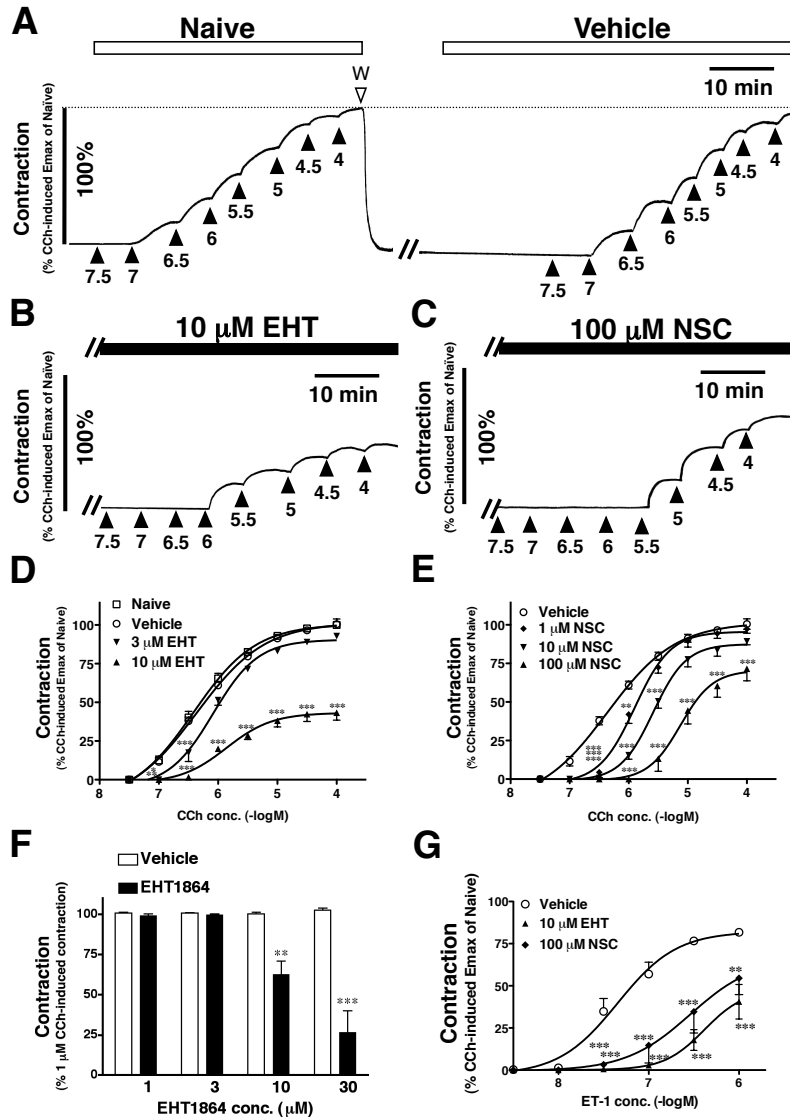


Fig. 1. Effects of Rac1 inhibitors on receptor agonist-induced contraction in rat bronchial smooth muscle. (A–C) Typical trace of carbachol (CCh)-induced force development with naive/vehicle (A), 10 μ M EHT1864 (EHT, B) or 100 μ M NSC23766 (NSC, C). (A) shows naive responses followed by those in the presence of vehicle. W represents the wash-out. Bronchial tissue was treated with Rac1 inhibitors for 20 min before the first application of cumulative CCh. The CCh concentrations are expressed as $-\log M$. (D, E) CCh concentration–contraction curves in the presence of EHT (D) and NSC (E). Before treatment of Rac1 inhibitor or vehicle, an accumulative CCh-induced contraction (naive) was observed. The contractions are represented as percentages of the first cycles of Emax of CCh-induced contraction of naive. (F) Effect of cumulative additional applications of EHT on 1 μ M CCh-induced bronchial smooth muscle contraction. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. vehicle. (G) Effects of EHT and NSC on endothelin-1 (ET-1) concentration–contraction curves. The contractions are represented as percentages of the first cycles of Emax of CCh-induced contraction (Naive). Values are means \pm S.E.M. from 4 to 6 independent experiments from 4 to 6 animals.

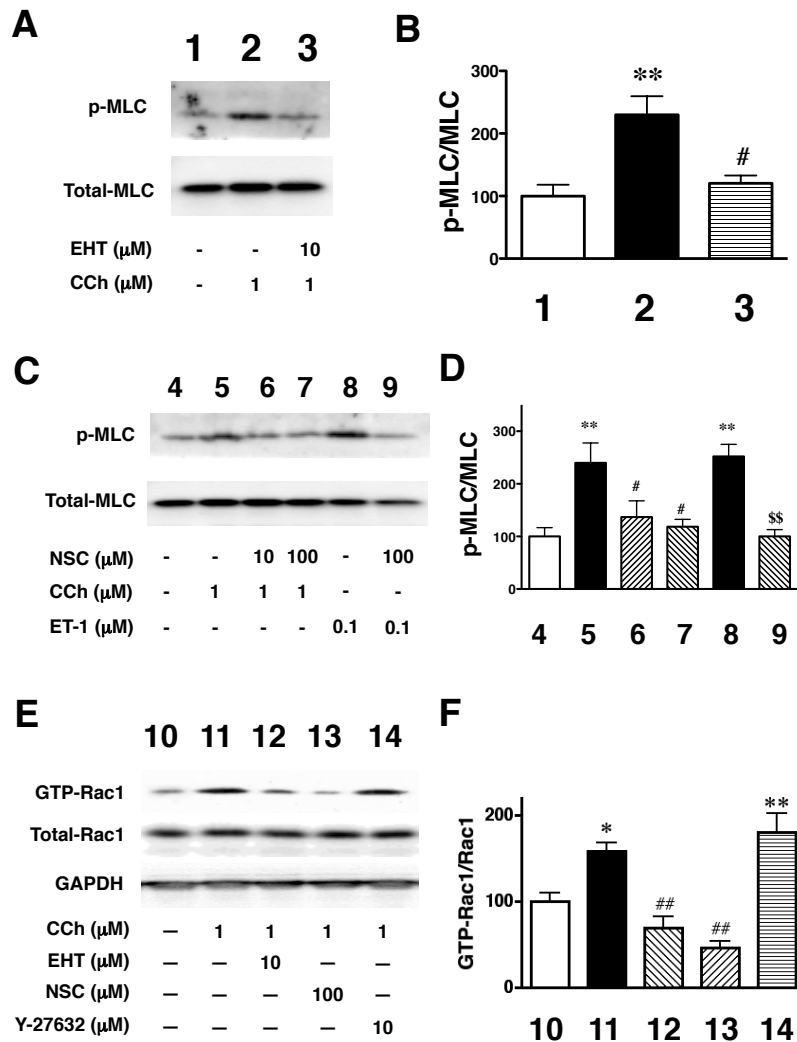


Fig. 2. Effects of Rac1 inhibitors on receptor agonist-induced phosphorylation of myosin light chain (MLC) and Rac1 activity in rat bronchial smooth muscle. (A-B) Western blot analysis of MLC and phospho-MLC with EHT1864 (EHT) treatment. Lanes represent rest (but treatment with vehicle; lane 1) and 15 min after 1 μM CCh with 10 μM EHT (lane 3) or without EHT (lane 2). Values are means \pm S.E.M. from four independent experiments. ** $P < 0.01$ vs. rest (lane 1), # $P < 0.05$ vs. CCh stimulation (lane 2). (C-D) Western blot analysis of MLC and phospho-MLC with NSC23766 (NSC). Lanes represent rest (lane 4), without NSC (lane 5), 15min after 1 μM CCh with 10 μM (lane 6) or 100 μM NSC (lane 7) and 20 min after 0.1 μM ET-1 with 100 μM NSC (lane 9) or without ET-1 (lane 8). Values are means \pm . from 4 in- dependent experiments from 4 animals. ** $P < 0.01$ vs. rest (lane 4), # $P < 0.05$ vs. CCh stimulation (lane 5), \$\$\$ $P < 0.01$ vs. ET-1 stimulation (lane 8). (E-F) Effects of Rac1 inhibitors on CCh-induced augmentation of Rac1 activity (GTP-Rac1). Lanes represent rest (lane 10), without inhibitors (lane 11) 15 min after 1 μM CCh with 10 μM EHT (lane 12) and 15min after 1 μM CCh with 100 μM NSC (lane 13). The levels of GTP-Rac1 are expressed as density ratios of the GTP-form signals to the corresponding total protein signals, and the data are summarized as percentages of the rest data. Values are means \pm S.E.M. from 3 independent experiments from 3 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. rest (lane 10); ## $P < 0.01$ vs. CCh stimulation (lane 11).

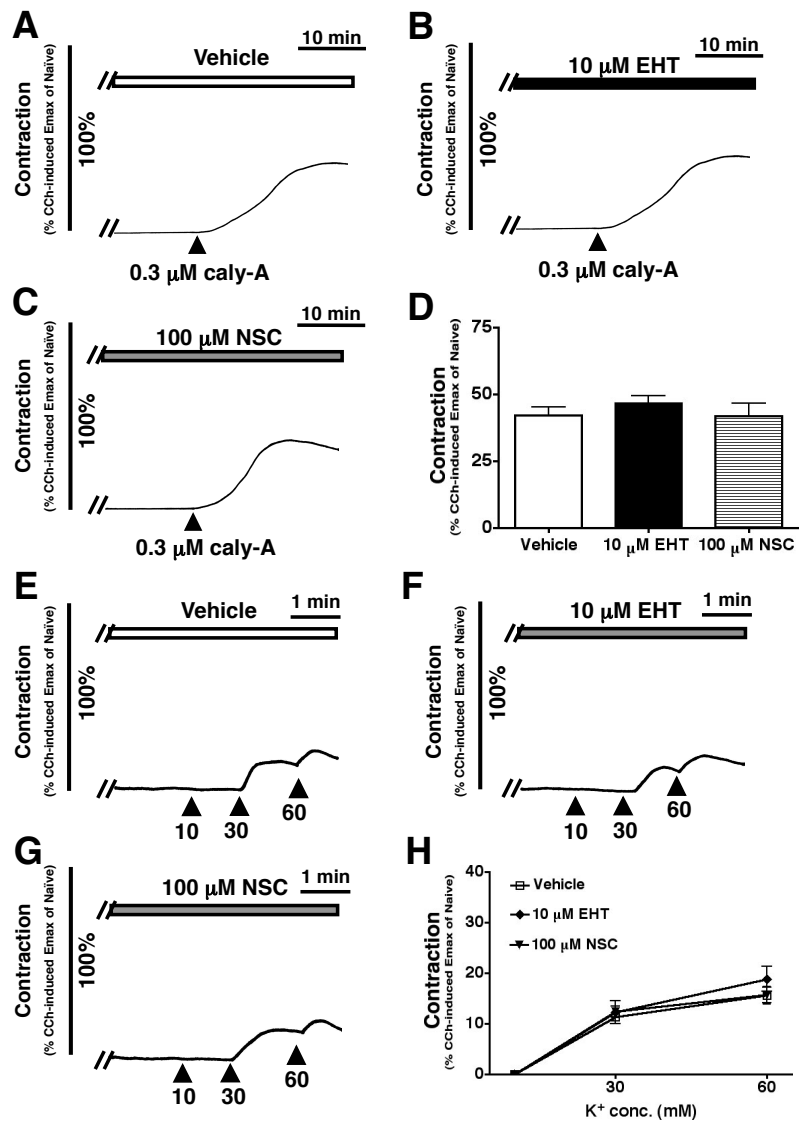


Fig. 3. Effects of Rac1 inhibitors on high K^+ depolarization- and calyculin-A-induced contractions in rat bronchial smooth muscle. (A–C) Typical traces of calyculin A-induced contractions in the presence of 10 μ M EHT1864 (EHT), 100 μ M NSC23766 (NSC) or vehicle. (D) Before treatment with Rac1 inhibitors or vehicle, an accumulative CCh-induced contraction (naive) was observed. The calyculin A-induced contractions are represented as percentages of the first cycles of Emax of CCh-induced contraction of naive. (E–G) Typical traces of high K^+ depolarization-induced contractions in the presence of 10 μ M EHT, 100 μ M NSC or vehicle. K^+ concentrations are expressed in mM. (H) High K^+ -induced contractions are represented as percentages of the first cycles of Emax of CCh-induced contraction (naive). Values are means with S.E.M. from 4 to 6 independent experiments.

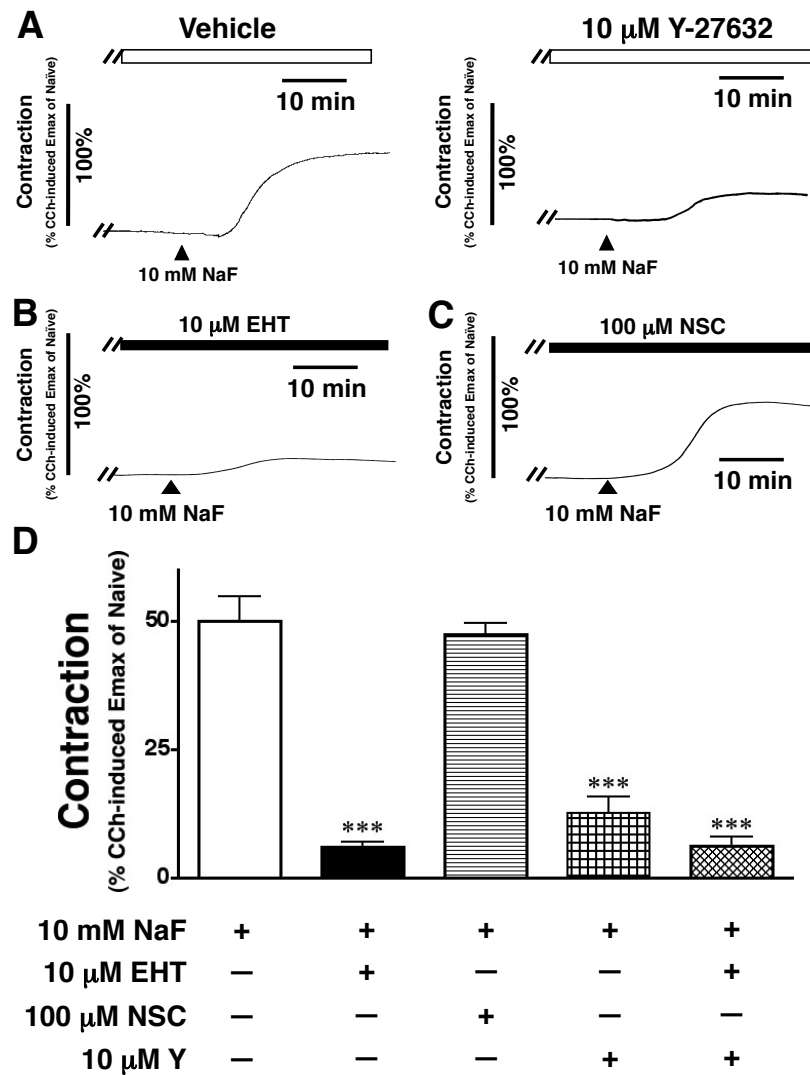


Fig. 4. Effects of Rac1 inhibitors on NaF-induced contractions in rat bronchial smooth muscle. (A–C) Typical traces of NaF-induced contractions in the presence of 10 μ M EHT1864 (EHT), 100 μ M NSC23766 (NSC) or vehicle. (D) Statistical representation. Before treatment with Rac1 inhibitors or vehicle, an accumulative CCh-induced contraction (naive) was observed. The contractions are represented as percentages of the first cycles of Emax of CCh-induced contraction of naive. Values are means \pm S.E.M. from 4 to 5 independent experiments from 4 to 5 animals. *** P < 0.001 vs. vehicle.

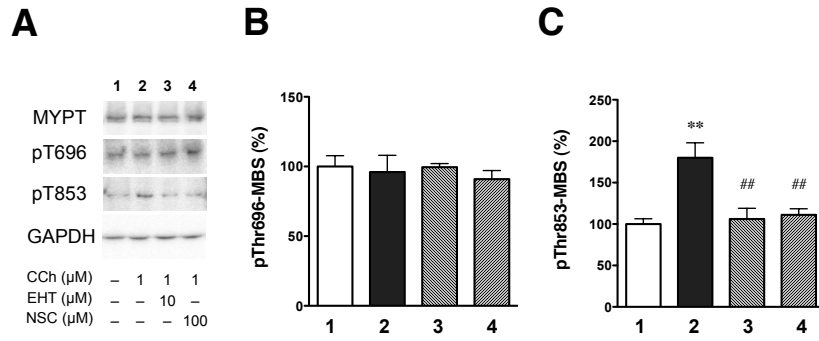


Fig. 5. Effects of Rac1 inhibitors on carbachol (CCh)-induced phosphorylation of MYPT Western blot analysis of MYPT and phospho-MYPT at Thr696 and 853 with EHT1864 (EHT) and NSC23766 (NSC) treatments. Lanes represent rest (lane 1), without inhibitors (lane 2) 15 min after 1 μ M CCh with 10 μ M EHT (lane 3) and 15 min after 1 μ M CCh with 100 μ M NSC (lane 4). Values are means \pm S.E.M. from 3 independent experiments from 3 animals. **P < 0.01 vs. rest (lane 1), ##P < 0.01 vs. CCh stimulation (lane 2).

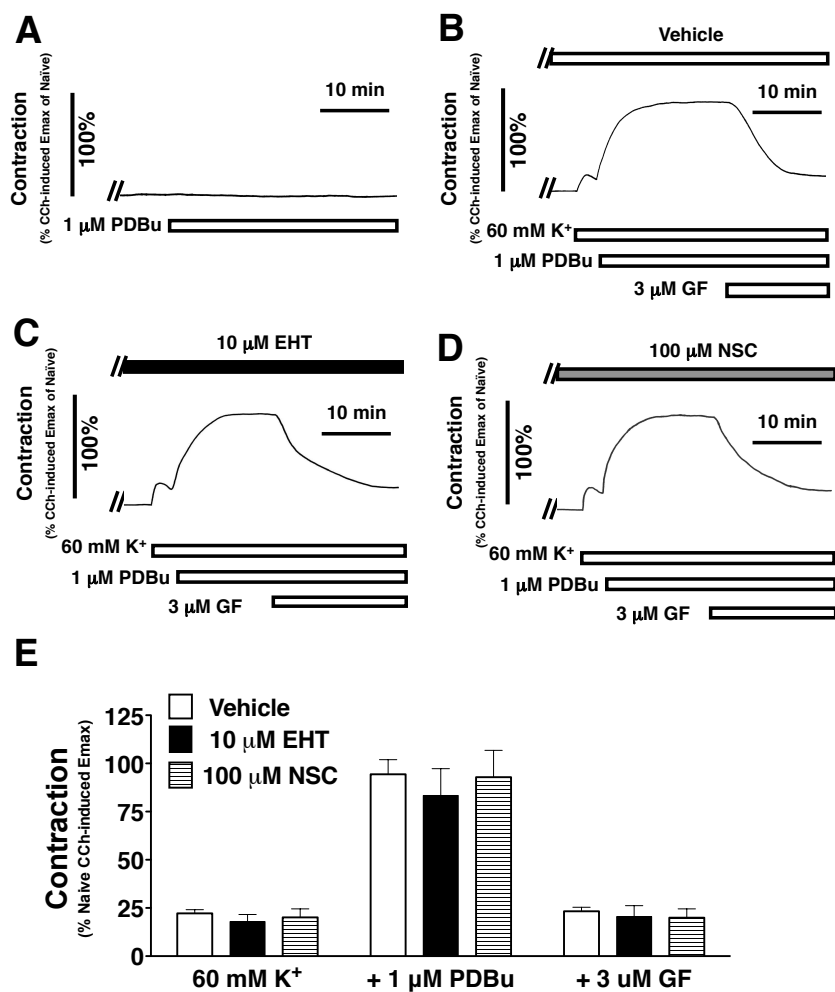


Fig. 6. Effects of Rac1 inhibitors on phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) with high K⁺ depolarization-induced contractions in rat bronchial smooth muscle. (A) Typical trace of application of PDBu alone in bronchial smooth muscle. (B–D) Typical traces of high K⁺/PDBu-induced contractions in the presence of 10 μ M EHT1864 (EHT), 100 μ M NSC23766 (NSC) or vehicle. 3 μ M GF109203X, a PKC inhibitor, was applied after attainment of a plateau response to high K⁺/PDBu. (E) Before treatment with Rac1 inhibitors or vehicle, an accumulative CCh-induced contraction (naive) was observed. Contractions are represented as percentages of the first cycles of Emax of CCh-induced contraction of naive. Values are means \pm S.E.M. from 4 to 5 independent experiments from 4 to 5 animals.

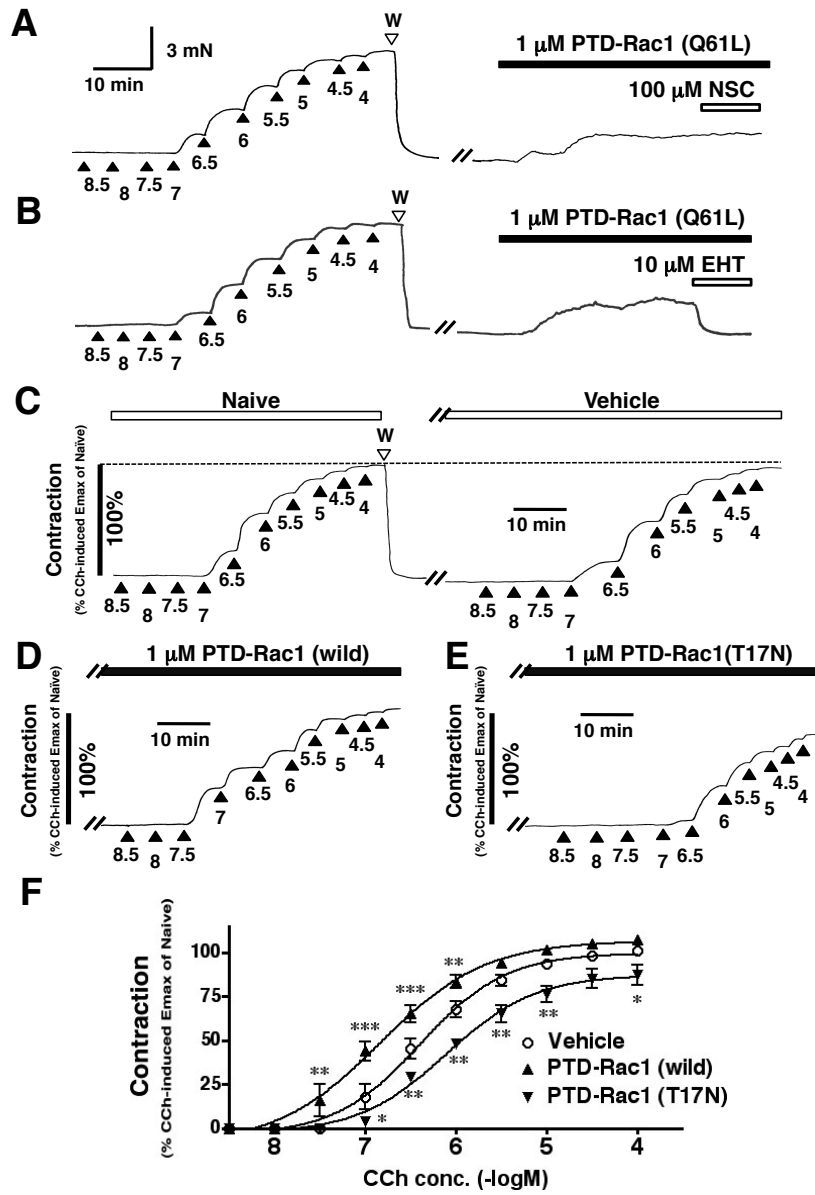


Fig. 7. Effects of applications of PTD-Rac1 products in bronchial smooth muscle. (A, B) Typical traces of force development with 1 μM constitutively-active form of PTD-Rac1 (Q61L). The contraction is inhibited by additional application of EHT. (C-F) Typical traces of CCh-induced force development with vehicle (C), 1 μM wild-type PTD-Rac1 (D) or 1 μM dominant-negative form of PTD-Rac1 (T17N, E). W represents the wash-out. CCh concentrations are expressed as $-\log\text{M}$. (F) Before treatment with PTD-Rac1 or vehicle, an accumulative CCh-induced contraction (naive) was observed. Contractions are represented as percentages of the first cycles of Emax of CCh-induced contraction of naive. Values are means \pm S.E.M. from 4 independent experiments from 4 animals. **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. vehicle.

第三節 考察

本章では、ラット気管支平滑筋において Rac1 が各種アゴニストによる MLC のリン酸化反応がそれらの収縮反応を調節しているか、さらに Rac1 活性がそれらの収縮反応に影響を与えるか否かを検討した。Rac1 阻害薬は GPCR アゴニストである CCh および ET-1 誘発収縮反応を有意に抑制した。さらに、Rac1 阻害薬はこれら GPCR アゴニストによる MLC リン酸化反応を抑制した。以上のことより、Rac1 は MLC リン酸化反応を介して気管支平滑筋収縮反応を調節していることが示唆された。次に、この Rac1 を介する収縮反応が MLCK 経路と MLCP 経路のどちらによって引き起こされているかを検討した。Calyculin-A は MLCP の強力な阻害薬として知られている (12)。また、high K⁺ 脱分極誘発収縮反応は、電依存性カルシウムチャネル (VDCC) 開口により細胞内に Ca²⁺ が流入する。流入した Ca²⁺ は CAM と結合して MLCK を活性化させて収縮反応を引き起こす (12)。High K⁺ 誘発収縮反応および calyculin-A 誘発収縮反応は Rac1 阻害薬によって影響を受けなかったことから、Rac1 は MLCK 経路およびアクチン-ミオシンの相互作用に関与しない可能性が示唆された。

続いて、Rac1 が MLCP 経路に関与するかを検討した。MLCP 経路は RhoA 経路と PKC/CPI-17 経路の二つが知られているため、それぞれの経路に Rac1 が関与するか検討した。NaF は RhoA 活性化を介して MLCP 活性を抑制して収縮反応を引き起こす。興味深いことに、NaF 誘発収縮反応は Rho kinase 阻害薬である Y-27632 および Rac1 阻害薬である EHT1864 により抑制されたが、Rac1 GEFs 特異的阻害薬である NSC23766 では抑制されなかった。NaF は 三量体 G タンパク質活性化作用があり、さらに、RhoA を活性化することも報告されているが (28)、Rac1 経路の上流にある GEFs を阻害しても NaF 誘発収縮反応に変化

がなかったことから、Rac1 も RhoA と同様に NaF によって活性化した可能性が考えられる。また、EHT1864 および Y-27632 の共処置がそれぞれの単独投与と比べて NaF 誘発収縮反応を同程度しか抑制せず、Rac1 活性は Y-27632 によって抑制がみられなかったことから MLCP 経路の収縮反応において Rac1 が RhoA 経路の上流に位置するなど、少なくとも Rac1 を介する経路の一部が RhoA 経路に参与していることが考えられる (Fig. 8)。さらに、MLCP のサブユニットとして MYPT1 があり、MLCP 活性抑制経路に Thr696 および Thr853 2つのサイトのリン酸化が重要であることが報告されている (29)。RhoA 経路は、この MYPT1 の Thr853 をリン酸化し、収縮反応を引き起こすことが明らかになっている (27)。そこで、CCh による Thr696 および Thr853 のリン酸化反応の変化について検討したところ、Thr853 は CCh 処置によりリン酸化反応が亢進したが、Thr696 では変化がなかった。Thr696 のリン酸化反応に変化がなかったことはこれまでの知見と同様の結果となった (22)。CCh により亢進した Thr853 のリン酸化反応は NSC23766 および EHT1864 処置により抑制されたことおよび CCh による Rac1 活性の亢進が Rho kinase 阻害薬である Y-27632 によって影響を受けなかった。このことから、Rac1 は RhoA/Rho kinase/MLCP 経路を調節している可能性が考えられるが、その可能性を証明するためには、Rac1 阻害薬によって RhoA/Rho kinase 活性が抑制されるかなど、さらなる研究が必要である。

もう一方の MLCP 経路である PKC/CPI-17 経路に Rac1 が関与するかについても検討した。血管平滑筋において、Rac1 阻害は PKC 活性および CPI-17 のリン酸化反応を抑制するとの報告があるが (22)、本研究ではラット気管支平滑筋において、PKC 活性化薬である PDBu 誘発収縮反応は EHT1864 処置によって抑制されなかった。したがって、Rac1 を介する経路は血管平滑筋と気管支平滑筋では

異なる収縮反応機構である可能性が示唆された。

最後に、Rac1 活性が気管支平滑筋収縮反応に影響を与えるかを検討した。TAT タンパク質が細胞内に移行できる機能を応用した膜透過性 protein transduction domain-Rac1 (PTD-Rac1) を使用した。恒常的活性化体である PTD-Rac1 (Q61L) を気管支平滑筋に処置したところ、収縮反応が引き起こされ、この収縮反応が EHT1864 処置により抑制されたことから、活性化 Rac1 は直接的に気管支平滑筋を収縮させる機能があることが明らかとなった。また、PTD-Rac1 (Q61L) 誘発収縮反応が NSC23766 処置によって変化がみられなかった要因としては、NSC23766 は Rac1 GEFs 阻害効果を示すため、すでに活性化された Rac1 による収縮反応には影響しなかったことが考えられる。CCh 誘発収縮反応に対して他の PTD-Rac1 活性状態の検討も行った。野生型 PTD-Rac1 処置は CCh 誘発収縮反応の亢進、dominant negative 変異体である PTD-Rac1 (T17N) 処置は CCh 誘発収縮反応の抑制がみられたことから、気管支平滑筋収縮反応に Rac1 の活性状態が関与する可能性が示唆された。

以上のことから、本章では、ラット気管支平滑筋収縮反応において Rac1 が Ca^{2+} sensitization 機構に関与することおよび Rac1 活性状態が収縮反応に影響を及ぼしている可能性を明らかにした。

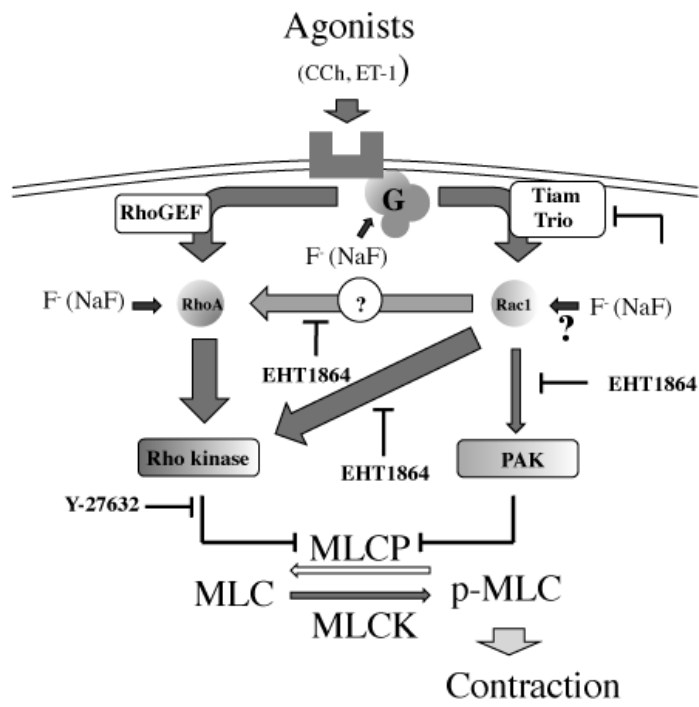


Fig. 8. Simplified schematic illustration of the role of Rac1 in regulating agonist-, such as carbachol (CCh) and endothelin-1 (ET-1), induced bronchial smooth muscle contraction.

第二章 過敏性気管支平滑筋組織における Rac1 発現および活性亢進

第一節 緒言

気管支喘息は、気道閉塞、気道炎症および気道過敏性 (AHR) を特徴とする疾患である (1)。気管支喘息を引き起こす気道炎症と AHR は病気の重症度と相関することが示されている (30)。したがって、AHR 発症の基礎的な機序を深く解明することは、気管支喘息の新たな治療を確立する上で非常に有用である。

Rho GTPase superfamily は細胞骨格、細胞運動等の様々な生理反応に関与することが明らかになっている (31, 32)。その中でも RhoA はその標的タンパク質である Rho kinase とともに平滑筋収縮反応の Ca^{2+} sensitization に関与することが明らかにされている (12, 20)。一方で、これまでにほとんど報告がなかった Rac1 については、第一章において、ラット気管支平滑筋収縮反応の Ca^{2+} sensitization に Rac1 が関与する可能性を明らかにした。

そこで、本研究では、Rac1 阻害薬である EHT1864 を用いることによりマウス気管支平滑筋収縮反応における Rac1 の役割を検討した。さらに、抗原誘発気道過敏性モデル動物を作製し、AHR 時の気管支平滑筋収縮反応の増強における Rac1 の役割について検討するとともに、AHR モデル動物の気管支平滑筋における Rac1 遺伝子発現変化を検討した。

第二節 実験結果

CCh 誘発マウス気管支平滑筋収縮反応は、ラット気管支平滑筋と同様に Rac1 阻害薬である EHT1864 により抑制された (Fig. 9A)。マウス気管支平滑筋においても、Rac1 を介した CCh 誘発収縮反応が Ca^{2+} 依存性反応経路ではなく Ca^{2+} 非依存性反応機序 (sensitization) に関与するかを確かめるために、high K^+ 脱分極誘発反応に対する Rac1 阻害効果を検討したところ、high K^+ 脱分極収縮反応は EHT1864 により影響を受けなかった (Fig. 9B)。次に、マウスにおいても CCh 刺激によって Rac1 が活性化されるかを pull down assay 法にて検討したところ、CCh 刺激によって Rac1 の活性化、すなわち活性型 Rac1 である GTP-Rac1 の割合が増加し、その活性化された Rac1 は EHT1864 により活性化が抑制された (Fig. 10A)。続いて、Rac1 を介する経路が MLC のリン酸化に影響を与えるかを検討した。CCh 投与により増加した MLC のリン酸化は EHT1864 処置により抑制された (Fig. 10B and C)。

第一章において、ラット気管支平滑筋収縮反応に Rac1 を介する経路が Ca^{2+} sensitization に関わることが示している。 Ca^{2+} sensitization は PKC/CPI-17 と RhoA 経路の二つが知られているため (26, 33)、Rac1 を介する経路がこれらのマウス気管支平滑筋収縮反応に関与するかを検討した。PKC/CPI-17 経路においては、これまでにマウス気管支平滑筋において、PKC 活性化薬である PDBu 単独投与では収縮反応が引き起こされず、high K^+ 処置後に PDBu を投与すると収縮反応が引き起こされることが示されているため (34)、本実験では high K^+ 処置後に PDBu を投与した。その結果、high K^+ および PDBu 誘発収縮反応は、EHT1864 により影響を受けなかった (Fig. 11A)。一方、三量体 G タンパク質ならびに RhoA を活性化し、 Ca^{2+} sensitization を活性化させることで MLC のリン酸化を亢進さ

せることが報告 (35) されている NaF 誘発収縮反応は、EHT1864 処置により有意に抑制された (Fig. 11B)。

次に AHR と Rac1 の関係を明らかにするために抗原誘発気道過敏性モデル動物 (AHR マウス) を用いて実験を行った。抗原チャレンジ群 (Chal.) は感作のみを行った (S.C.) 群と比較して CCh 誘発収縮反応の増強が見られた (Fig. 12A)。

この AHR マウスの気管支平滑筋における CCh 誘発収縮反応の増強は EHT1864 処置によって S.C. 群と同じレベルにまで抑制された (Fig. 12A)。次に、

AHR マウス気管支平滑筋における Rac1 の発現変化について検討した (Table 1)。

Chal. 群は S.C. 群と比較して遺伝子およびタンパク質レベルにおいてともに有意な Rac1 の発現増加がみられた (Fig. 12B-D)。

MLCP の酵素活性は、サブユニットである MYPT1 の Thr696 および Thr853 の 2 つのサイトがリン酸化されることにより減弱する (29)。したがって、これらの阻害サイトのリン酸化を Rac1 が阻害するかを検討した。Chal. 群の気管支平滑筋において S.C. 群と比較して、Rho kinase 特異的サイト (36) である Thr853 の CCh によりリン酸化の亢進がみられたが、Thr696 ではリン酸化の変化はみられなかった。さらに、Thr853 でみられた CCh によるリン酸化の亢進は、Chal. 群と S.C. 群いずれにおいても EHT1864 処置によりリン酸化反応が抑制された (Fig. 13A-C)。MLC のリン酸化変化についても AHR マウスの気管支組織で検討したところ、MYPT1 の Thr853 のリン酸化と同様に、Chal. 群において S.C. 群と比較して CCh 処置により有意な MLC リン酸化亢進がみられ、亢進したリン酸化反応は EHT1864 処置により抑制された (Fig. 13A and D)。

Table 1. Primer sequences for RT-PCR used in the present study.

	Assession No.	Direction	Primers Deoxyribonucleotide sequences	Product size (base pairs)
GAPDH	NM_008084.2	forward	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	100 bp
		reverse	TCTCCACTTTGCCACTGCAA	
Rac1	NM_009007.2	forward	AGTTGCGTTGTGCTGAGAACA	80 bp
		reverse	CTCCAGAAGCTGCGGTCTTC	

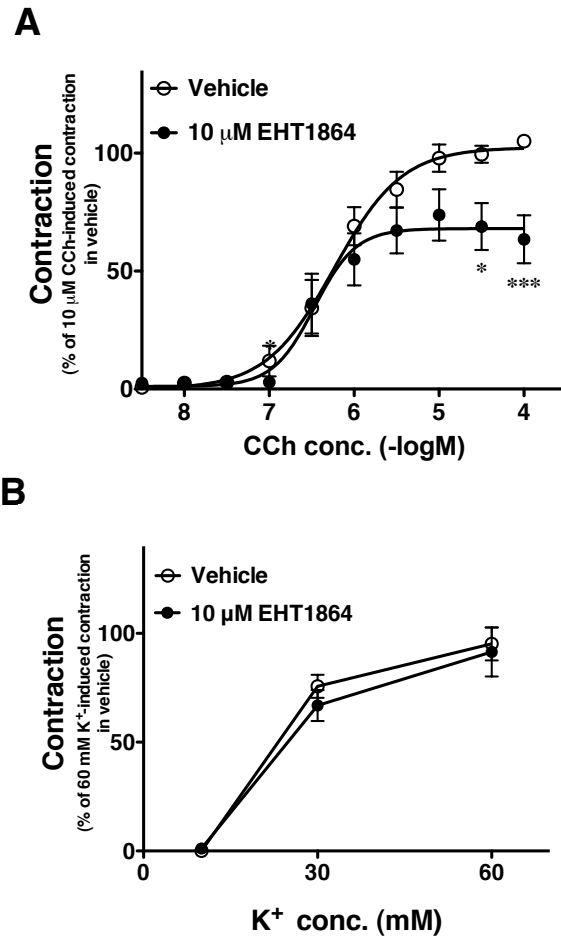


Fig. 9. Effect of EHT1864, a Rac1 inhibitor, on carbachol (CCh) and high K⁺ depolarization-induced contractions in bronchial smooth muscles (BSMs) of the mouse. The CCh concentrations are expressed as -logM. CCh (A) and high K⁺ (B) responsiveness in the absence or presence of EHT1864. The strength of the contractions is expressed as percentages in response to 10 μM CCh. All values are depicted as mean ± S.E.M. of 6 independent experiments, respectively. *P < 0.05 and ***P < 0.001 vs. vehicle.

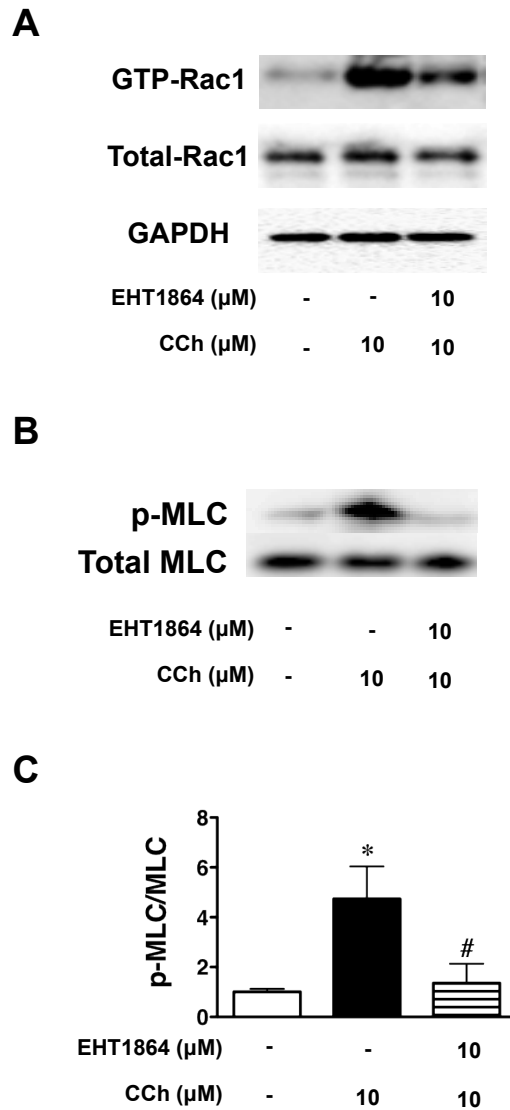


Fig. 10. Effects of EHT1864 on CCh-induced Rac1 activation (GTP-Rac1) and myosin light chain (MLC) phosphorylation. The active form of Rac1, GTP-bound Rac1, in murine BSM was measured by a Rac1 pull-down assay (A). Photographs show typical results of Western blot analysis of MLC and phospho-MLC with EHT1864 (B). The data are summarized in panels (C). Values are depicted as mean \pm S.E.M. of 5 independent experiments, respectively. *P < 0.05 vs. vehicle; #P < 0.05 vs. CCh stimulation.

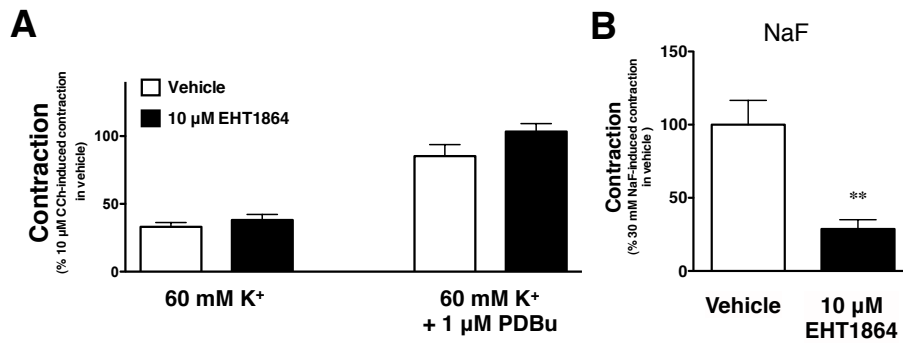


Fig. 11. Effect of EHT1864 on PKC activation and NaF-induced contraction in the BSM of the mouse. Force development was not induced by the application of PDBu alone in murine BSM (data not shown). Nevertheless, PDBu-induced contraction induced force with high K^+ -depolarizing stimulation. High K^+ and high K^+ + PDBu-induced contraction in the presence of EHT1864 or vehicle (A). Effects of EHT1864 on NaF-induced contractions in BSM of mouse. NaF-induced contraction in the presence of 10 EHT1864 μ M (B) Values are depicted as mean \pm S.E.M. of 5 independent experiments, respectively. ** $P < 0.01$ vs. vehicle.

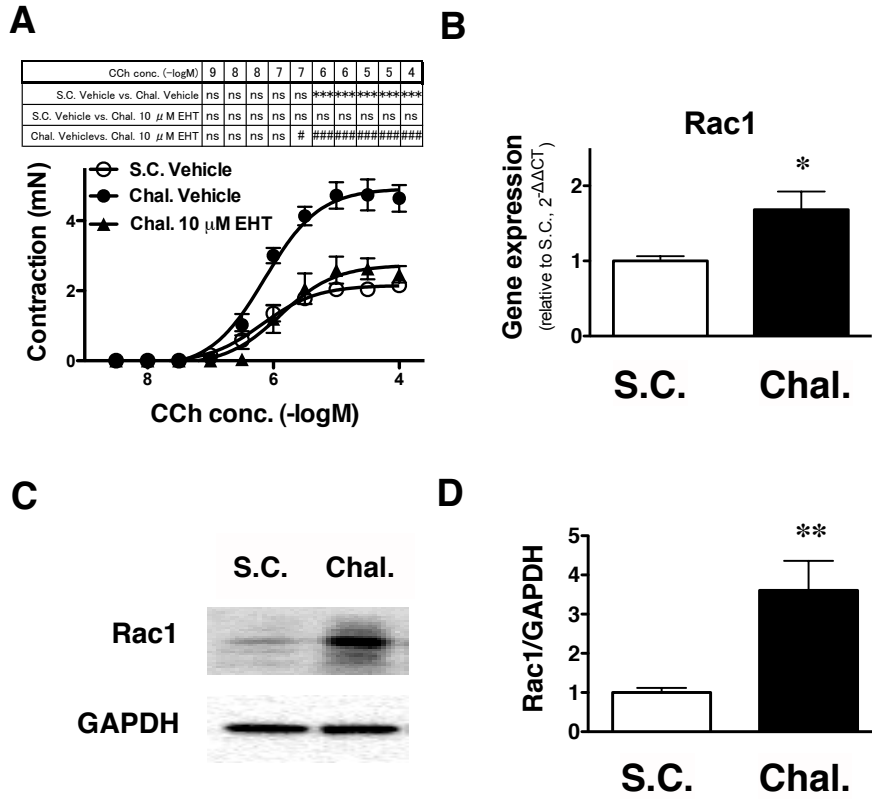


Fig. 12. Effect of EHT1864 on CCh-induced contractions in the BSM of repeated antigen-challenged mice (A). The contractions are represented in mN of tension. Values are depicted as mean \pm S.E.M. of 5 independent experiments, respectively. ***P < 0.001 vs. S.C. vehicle; #P < 0.05 and ### P < 0.001 vs. Chal. vehicle. Changes in mRNA (B) and protein (D) levels of Rac1 in the BSM of repeated antigen-challenged mice (Chal.) and S.C. mice. Typical photograph of the protein expression of Rac1 (C). Values are depicted as mean \pm S.E.M. of 4 independent experiments, respectively. *P < 0.05 and **P < 0.01 vs. S.C.

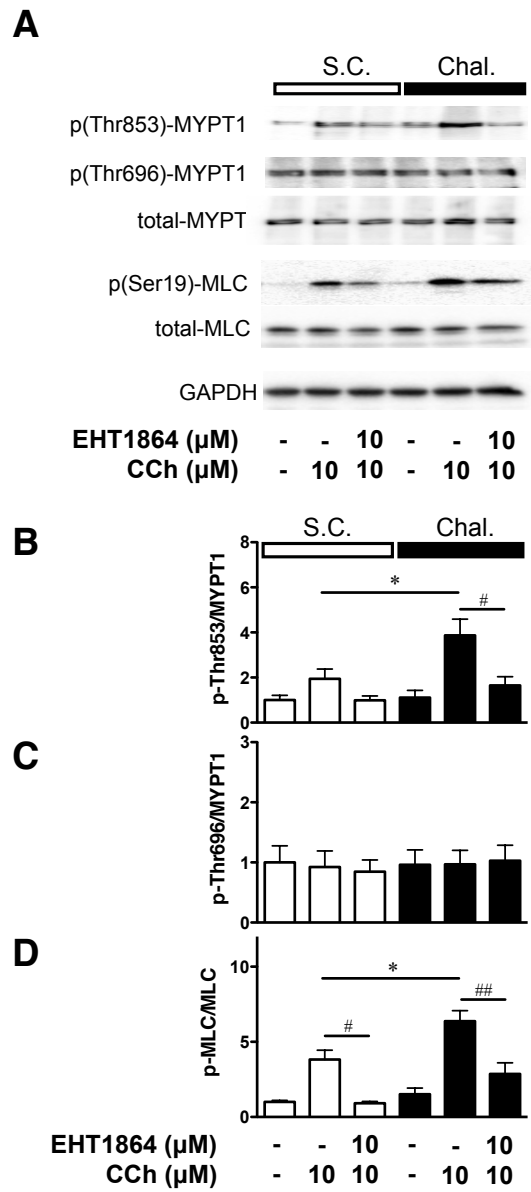


Fig. 13. Effect of EHT1864 on CCh-induced phosphorylation of myosin phosphatase targeting protein (MYPT) and MLC on repeated antigen-challenged mice. Typical photograph of the phosphorylation of MYPT at Thr853, Thr696, MLC and GAPDH in the BSM of repeated antigen-challenged (Chal.) and S.C. mice (A). These data are summarized in B-C. Values are depicted as mean \pm S.E.M. of 5 independent experiments, respectively. * $P < 0.05$ vs. S.C., # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ vs. EHT + CCh.

第三節 考察

CCh 誘発マウス気管支平滑筋収縮反応は EHT1864 により抑制されたことから、Rac1 を介する経路はマウス気管支平滑筋の収縮反応においても関与することが示唆された。一方で、high K⁺ 脱分極誘発収縮反応は EHT1864 により影響を受けなかった。さらに、PKC 活性化による収縮反応にも EHT1864 が影響を与えなかったことから、Rac1 は Ca²⁺/CaM/MLCK 経路および PKC/CPI-17/MLCP 経路に関与しないことが示唆された (Fig. 14)。

AHR マウスの気管支平滑筋において増強した CCh 誘発収縮反応は EHT1864 により抑制された。また、Rac1 の遺伝子およびタンパク質発現は、AHR マウス気管支組織において増加がみられた。Rac1 はウサギ大腿動脈や第一章において MLCP 経路を不活性化することによって平滑筋収縮反応を調節していることが報告されている (22)。ウサギ大腿動脈において、Rac1 阻害によって PKC のリン酸化に関連した CPI-17 の活性が抑制されることが報告されている (22)。しかしながら、本実験では、PKC 活性化による気管支平滑筋収縮反応は EHT1864 によって抑制されなかった。この結果は、ラットの気管支平滑筋収縮反応の結果と同様であった。すなわち、Shibata ら (22) が提唱する Rac1 を介する収縮経路は血管平滑筋と気管支平滑筋で異なるということを強く支持する結果となった。RhoA 経路に関与することが知られている NaF 誘発収縮反応は、EHT1864 によって抑制された。本研究では、Chal. 群において CCh 処置により Rho kinase 特異サイトである MYPT1 の Thr853 のリン酸化が亢進し、この亢進したリン酸化反応は、EHT1864 処置により抑制された。これらの結果は、第一章で述べたラットと同様にマウス気管支平滑筋収縮反応においても Rac1 を介する経路が RhoA/Rho kinase 経路の一部に関与することを示唆している。

これまでに、GPCR アゴニスト誘発の Ca^{2+} sensitization による収縮反応は、抗原誘発気道過敏性モデル動物において強く亢進することが明らかになっている。モデル動物の気管支組織において、RhoA および CPI-17 のタンパク質発現の増加がみられ、結果として Ca^{2+} sensitization 経路の亢進がみられる。健常のヒトおよびマウスの気管支平滑筋細胞に interleukin-13 (IL-13)、IL-17 および tumor necrosis factor- α (TNF- α) のような喘息に関連したサイトカインを処置し培養したところ、RhoA の発現増加が引き起こされることが知られている (20)。しかし、Rac1 の発現については何が引き金となり発現増加を引き起こすかは明らかになっていないため、さらなる研究が必要とされる。

ヒトおよびマウスの気道平滑筋細胞において、CCh 刺激によって Rac1 が活性化されることが報告されている (18)。CCh による Rac1 の活性化は、phospholipase (PLC) β 2 を介して細胞質内 Ca^{2+} 経路によって収縮反応を引き起こす。この報告は、細胞質内の Ca^{2+} の調節、気道平滑筋細胞の収縮反応および AHR の亢進における本研究の考えである Rac1 を介する経路の重要な役割と一致する。しかしながら、げっ歯類の AHR モデルの気管支平滑筋収縮反応において Ca^{2+} 依存性収縮反応は変化しないことを報告している (20)。ヒトにおいてもこれらの反応がみられるかは定かではないが、RhoA および CPI-17 だけでなく Rac1 のさらなる研究を行うことが、アレルギー性気管支喘息の治療において有用で可能性がある。

したがって本章の結果から、Rac1 はマウス気管支平滑筋収縮反応にも関与していることを明らかにし、AHR マウスの気管支平滑筋収縮反応において Rac1 を介する経路が亢進している可能性を明らかにした。

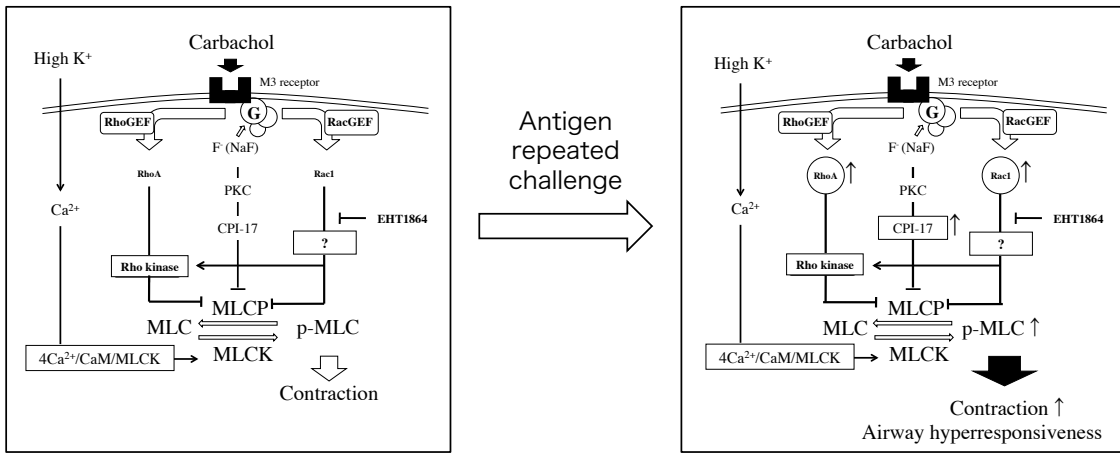


Fig. 14. Simplified schematic illustration of the upregulated Rac1 signaling pathway in carbachol-induced BSM contraction of repeated antigen-challenged mice. These pathways are discussed in the Discussion section.

第三章 過敏性の気管支平滑筋組織における Rac1 を介する carbachol 誘発収縮反応の増強

第一節 緒言

第一章および第二章において、Rac1 が気管支平滑筋収縮反応の Ca^{2+} sensitization に関与していることを明らかにし、AHR マウス気管支平滑筋収縮反応の増強に Rac1 が関与する可能性を明らかにした。そこで本章では、AHR マウスでみられる CCh 誘発気管支平滑筋収縮反応の増強と Rac1 を介する経路の関連についてさらなる検討を行った。

Rac1 は Rho GTPase superfamily の一つであり、superfamily は GEFs を介して活性化体の GTP と 不活性化体の GDP の状態を行き来している。Rac1 活性化は、様々な GEFs によって調節されているが、本実験では Rac1 の代表的な GEF である Trio および Tiam1 に着目した (37-40)。Trio および Tiam1 は Rac1 特異的な GEFs として知られているが、気管支平滑筋収縮反応および AHR に関与するか明らかになっていない。

そこで本章では、Rac1 GEFs である Trio および Tiam1 を阻害する NSC23766 (41) および Rac1 阻害薬である EHT1864 (42) を用いて AHR 時の収縮反応に Rac1 を介する経路が関与しているかを検討した。また、AHR 時の気管支組織における Rac1 を介する経路の発現変化についても検討した。CCh はムスカリン性アセチルコリン受容体 3 (Chrm3) のみに作用して気管支平滑筋収縮反応を惹起していることから (43, 44)、AHR 時の気管支平滑筋における Chrm3 の発現変化についても検討を行った。

第二節 実験結果

AHR モデルマウスを作製し、気管支平滑筋収縮反応における Rac1 阻害薬 (NSC23766 および EHT1864) の効果を検討した。CCh 誘発気管支平滑筋収縮反応において、Chal. 群は S.C. 群と比較して有意な収縮反応の増強がみられた。この増強した収縮反応は、Rac1 阻害薬の NSC23766 および EHT1864 いずれによっても収縮反応の抑制が見られた (Fig. 15A)。一方、high K⁺ 脱分極誘発収縮反応においては、Chal. 群と S.C. 群の間に変化がなく、NSC23766 および EHT1864 処置下においても変化がなかった (Fig. 15A)。

そこで、AHR マウスの気管支平滑筋収縮反応における Rac1 を介する経路の関連因子および CCh の受容体である Chrm3 の遺伝子発現変化について検討した (Table 2)。Chal. 群において、Rac1 および Rac1 特異的 GEFs である Trio および Tiam1 の遺伝子発現上昇がみられた (Fig. 15B-D)。一方、Chrm3 においては遺伝子発現変化はみられなかった (Fig. 15E)。さらに、タンパク質発現変化においても検討したところ、遺伝子発現変化と同様に、Chal. 群の気管支組織において、Rac1、Trio および Tiam1 のタンパク質発現亢進がみられ、Chrm3 のタンパク質発現は Chal. 群と S.C. 群で変化がなかった (Fig. 16A-E)。

次に、AHR マウスの CCh 刺激による Rac1 活性の変化についても検討した。S.C. 群において CCh 処置を行うと Rac1 活性の亢進がみられた。Chal. 群に CCh 処置を行ったところ、S.C. 群の CCh 処置と比較してさらなる Rac1 活性の亢進がみられた。このさらなる Rac1 活性の亢進は、NSC23766 および EHT1864 により有意に抑制された (Fig. 16F and G)。

Table 2. Primer sequences for RT-PCR used in the present study.

	Assession No.	Direction	Primers Deoxyribonucleotide sequences	Product size (base pairs)
GAPDH	NM_008084.2	forward reverse	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG TCTCCACTTTGCCACTGCAA	100 bp
Rac1	NM_009007.2	forward reverse	AGTTGCGTTGTGCTGAGAACA CTCCAGAAGCTGCGGTCTTC	80 bp
Trio	XM_006520050.1	forward reverse	CGGGATGCCATCGATATCAT TCCTCCGTATCGAAGTCATTCA	83 bp
Tiam1	NM_009384.3	forward reverse	CAAGGTCGCCAGTCACATCA TCTCCCGTCTGCTCAGCAAT	90 bp
Chrm3	NM_033269	forward reverse	CCTCGCCTTTGTTCCCAAC TTGAGGAGAAATCCAGAGGT	129 bp

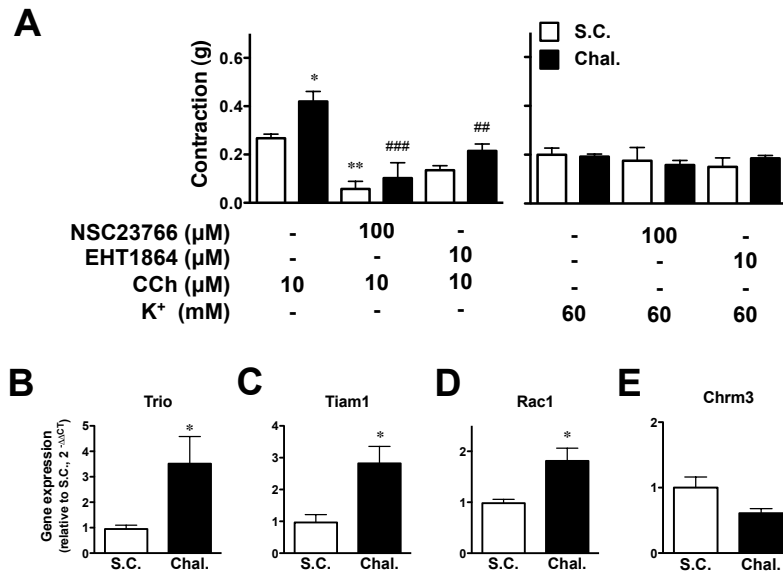


Fig. 15. Effects of NSC23766 and EHT1864 on carbachol (CCh) and high K⁺ depolarization-induced contractions in the bronchial smooth muscles (BSMs) of sensitized-control (S.C.) and OA-challenged (Chal.) mice. The 10 μM CCh and 60 mM high K⁺ responsiveness in the absence or presence of 100 μM NSC23766 and 10 μM EHT1864 (A). Each column represents the mean ± S.E.M. of 4–8 independent experiments. *P < 0.05 and **P < 0.01 vs. CCh only (S.C.). ##P < 0.01 and ###P < 0.001 vs. CCh only (Chal.). Gene expression changes of Trio, Tiam1, Rac1, and Chrm3 in BSMs of S.C. and Chal. mice (B–E). Each column represents the mean ± S.E.M. from four experiments. *P < 0.05 vs. S.C.

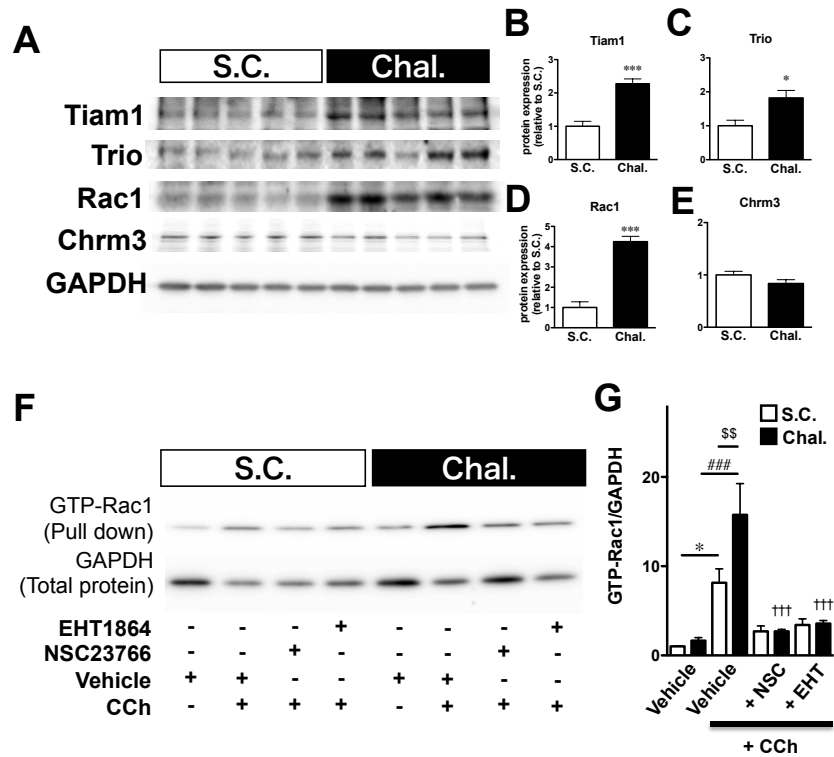


Fig. 16. Protein levels of Tiam1, Trio, Rac1, and Chrm3 and CCh-Induced Rac1 activation in BSMs of S.C. and Chal. mice. Representative photographs showing bands for Tiam1, Trio, Rac1, Chrm3, and Gapdh (A). Levels of Tiam1, Trio, Rac1, and Chrm3 expressed as the ratios of the intensities of Tiam1, Trio, Rac1, and Chrm3 to GAPDH protein bands (B-E). Each column represents the mean \pm S.E.M. from four experiments. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ vs. S.C. The active form of Rac1, GTP-bound Rac1, in BSMs of mice was measured using Rac1 pull-down assay (F and G). Representative photographs showing bands for pull-down Rac1-GTP (upper) and Gapdh in total protein (lower). Each column represents the mean \pm S.E.M. of 3-4 independent experiments. * $P < 0.05$: Vehicle (S.C.) vs. CCh (S.C.). ### $P < 0.001$: Vehicle (Chal.) vs. CCh (Chal.). \$\$ $P < 0.01$: CCh (S.C.) vs. CCh (Chal.), ††† $P < 0.001$: CCh (Chal.) vs. NSC + CCh (Chal.) or EHT + CCh (Chal.).

第三節 考察

第二章において、AHR マウスにおいて CCh 誘発気管支平滑筋収縮反応は最大反応が増強し、10 μM CCh で最大反応が引き起こされることを明らかにした。そこで本章では、Chal. および S.C. マウスにおける、10 μM CCh 誘発気管支平滑筋収縮反応が Rac1 阻害薬 (NSC23766 および EHT1864) に影響を受けるかを検討した。NSC23766 は、Rac1 特異的 GEFs である Trio および Tiam1 を介した Rac1 活性を阻害するが、100 μM では他の低量体 G タンパク質である Cdc42 や Rho には影響を与えないことが報告されている (41)。一方、EHT1864 は、Rac1 を介する経路の下流を抑制するが、50 μM という濃度を用いても GTPase に影響を及ぼさないことが報告されている (42)。Chal. 群は S.C. 群と比較して、10 μM CCh 誘発気管支平滑筋収縮反応の増強がみられた。この収縮反応の増強は、100 μM NSC23766 および 10 μM EHT1864 によって抑制された。一方で、60 mM high K^+ 脱分極誘発収縮反応は、Chal.群 および S.C. 群の間に変化はなく、NSC23766 および EHT1864 処置下においても変化がなかった (Fig. 7A)。これらの結果は第二章と同様の結果になった。第二章において、AHR マウスの収縮反応増強に Rac1 発現増加が関与することが示されている。上述したように、NSC23766 は Rac1 特異的 GEFs である Trio および Tiam1 を阻害することによって Rac1 結合や活性を抑制する。ムスカリン性アセチルコリン受容体 3 (Chrm3) はムスカリン性アゴニストによる気道平滑筋収縮反応を主に調節していることが報告されている (43, 44)。したがって、AHR マウス気管支組織における Rac1、Trio、Tiam1 および Chrm3 の遺伝子発現変化について検討した。興味深いことに、Chal. 群と S.C. 群において Chrm3 の遺伝子発現に変化はみられなかったが、Rac1、Trio および Tiam1 遺伝子発現は Chal. 群において有意な増加が

みられた (Fig. 15B-E)。さらに、Rac1、Trio、Tiam1 および Chrm3 のタンパク質発現変化についても検討したところ、Chal. 群は S.C. 群と比較して遺伝子発現変化に加えタンパク質レベルにおいても、Rac1、Trio および Tiam1 の発現増加がみられた (Fig. 16A-E)。つまり、AHR マウスにおける気管支平滑筋収縮反応の増強は、受容体の発現増加ではなく、Rac1 を介する経路の亢進によって引き起こされている可能性が示唆された。

そこで、AHR マウスの気管支組織において、CCh による Rac1 活性の変化について検討した。S.C. および Chal. マウスにおいて、CCh は Rac1 を活性化し、この CCh による Rac1 の活性化は、NSC23766 および EHT1864 の前処置によって抑制された。さらに、Chal. 群は S.C. 群と比較して CCh 処置によりさらなる Rac1 活性の亢進がみられ、このさらなる Rac1 活性の亢進も NSC23766 および EHT1864 により抑制された (Fig. 16F and G)。しかしながら、Rac1 GEFs である Trio および Tiam1 が CCh によってどのように活性化が引き起こされるかなど、さらなる研究が必要である。

本章の結果から、AHR マウスの CCh 誘発気管支平滑筋収縮反応の増強には、受容体である Chrm3 発現変化なしに、Rac1 の発現増加だけでなく、Trio および Tiam1 発現増加を介した Rac1 活性亢進も重要である可能性を明らかにした。

第四章 過敏性の気管支平滑筋組織における Rac1 を介する endothelin-1 誘発収縮反応の増強

第一節 緒言

エンドセリン (ET) は当初、血管を強力に収縮させるペプチドとした発見された (45)。それ以来 ET について多くの研究がなされ、現在では血管収縮作用だけでなく *in vitro* において強力な気管支収縮作用があることも明らかになっている (46, 47)。ET は気道平滑筋を収縮させる 3 つの内在性ペプチドから構成され、3 つのアイソフォーム (ET-1, 2 and 3) のうち ET-1 が最も研究されている。また、ET-1 は、Gq タンパク質共役型受容体である ETAR および ETBR を活性化することにより、げっ歯類の気管平滑筋収縮反応を引き起こすことが報告されている (36)。さらに、ET-1 は平滑筋収縮反応において Ca^{2+} 依存性収縮機序だけでなく Ca^{2+} 非依存的収縮機序に関与することも明らかになっている (13, 48)。

これまでに述べてきたように AHR は気管支喘息において重要な病態の一つである。AHR マウスにおいて、Rac1 の発現増加および活性亢進がおり、結果として high K^+ 脱分極誘発収縮反応の変化なしに、CCh 誘発収縮反応の増強がみられる。つまり、 Ca^{2+} sensitization が関与することを明らかにしている。さらに、当研究グループではムスカリン受容体アゴニストではない ET-1 によって AHR マウスの気管支平滑筋収縮反応の増強が引き起こされることを報告 (49, 50) しているが、AHR マウスの ET-1 誘発気管支平滑筋収縮反応の増強に Rac1 が関与するかは明らかになっていない。

そこで本章では、AHR マウス気管支平滑筋における ET-1 誘発収縮反応および MLC のリン酸化反応の亢進に対する Rac1 阻害薬である NSC23766 の効果を

検討した。さらに、ET-1 が Rac1 活性状態を変化させるかについても検討を行った。

第二節 実験結果

AHR モデルマウスを作製し、ET-1 誘発気管支平滑筋収縮反応における Rac1 阻害薬である NSC23766 の効果を検討した。ET-1 誘発気管支平滑筋収縮反応において、Chal. 群は S.C. 群と比較して有意な収縮反応の増強がみられた。この増強した収縮反応は、NSC23766 によって抑制された (Fig. 17A)。

続いて、AHR マウスの気管支組織における Rac1 および ET-1 受容体である ETAR および ETBR のタンパク質発現変化について検討した。Chal. 群において、Rac1 発現上昇がみられた (Fig. 17B and E)。一方、ETAR および ETBR においてはタンパク質発現変化がみられなかった (Fig. 17B-D)。

次に、AHR マウスの ET-1 誘発気管支平滑筋収縮反応における MLC リン酸化反応および NSC23766 の効果について検討した。S.C. 群気管支組織において、ET-1 処置により有意な MLC リン酸化亢進がみられた。さらに Chal. 群における ET-1 処置は S.C. 群における ET-1 処置と比較してさらなる MLC リン酸化亢進がみられた。S.C. 群および Chal. 群ともに、ET-1 により亢進した MLC のリン酸化は NSC23766 により抑制された (Fig. 18A and B)。

最後に、AHR マウスの気管支組織における ET-1 による Rac1 活性化の変化について検討した。Pull down assay によって活性型 Rac1 (GTP-Rac1) を分離できたか確認するために GAPDH のタンパク質発現を検討したところ、S.C. 群および Chal. 群ともに、気管支組織の total 群では GAPDH の発現がみられたが、pull down assay を行なったサンプルでは観察されなかった (Fig. 19A)。そこで Rac1 の活性化について検討したところ、S.C. 群において、ET-1 処置により Rac1 活性亢進がみられ、さらに Chal. 群における ET-1 処置では S.C. 群における ET-1 処置と比較してさらなる Rac1 活性亢進がみられた。S.C. 群および Chal. 群とも

に、ET-1 により亢進した Rac1 活性は NSC23766 により抑制された (Fig. 19B and C)。

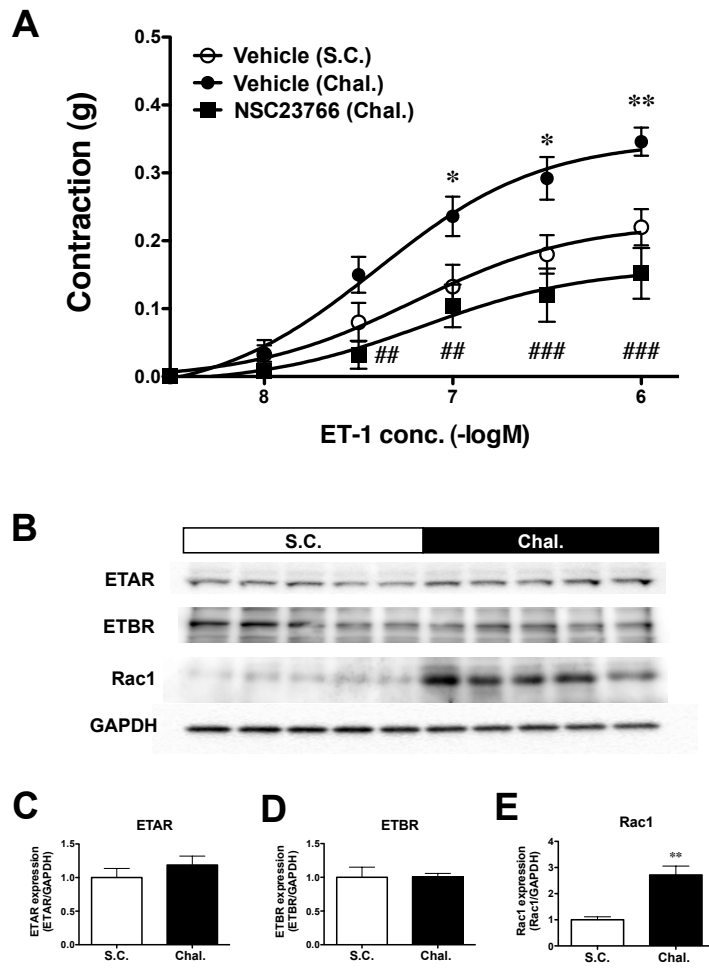


Fig. 17. Effect of 100 μ M of the Rac1 inhibitor NSC23766 on ET-1-induced BSM contractions in S.C. and Chal. mice (A). Each point represents the mean \pm SEM of 4 independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. S.C. vehicle; ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ vs. Chal. vehicle. Representative photograph of protein expression of ETAR, ETBR, Rac1, and the internal control GAPDH (B). Each column represents the mean \pm SEM of 5 independent experiments (C-E). ** $P < 0.01$ vs. S.C..

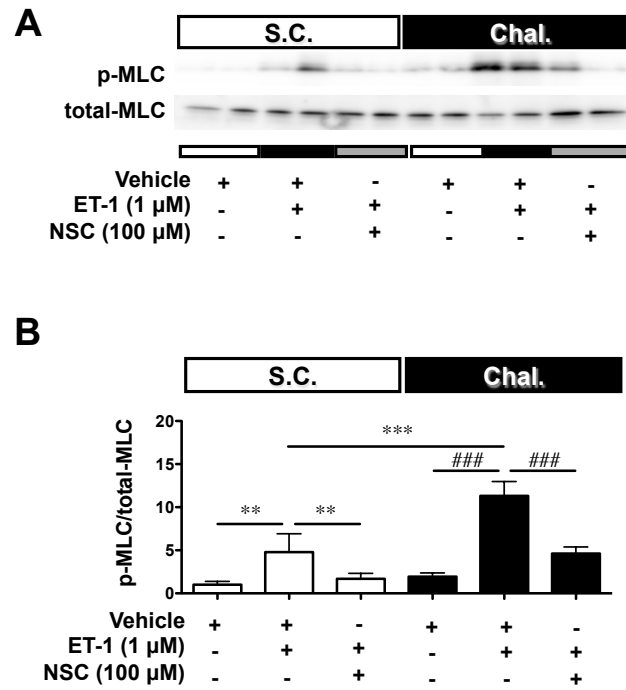


Fig. 18. ET-1-induced MLC phosphorylation in the BSMs of S.C. and Chal. mice. Representative photographs of immunoblot analysis of total-MLC and p-MLC in BSM following vehicle, 1 μ M ET-1, and 100 μ M NSC23766 + 1 μ M ET-1 treatment (A). The data are summarized in panel (B). Values are expressed as mean \pm SEM of 4 independent experiments. ** P < 0.01 and *** P < 0.001 vs. ET-1 stimulation in S.C.; ### P < 0.001 vs. ET-1 stimulation in Chal.

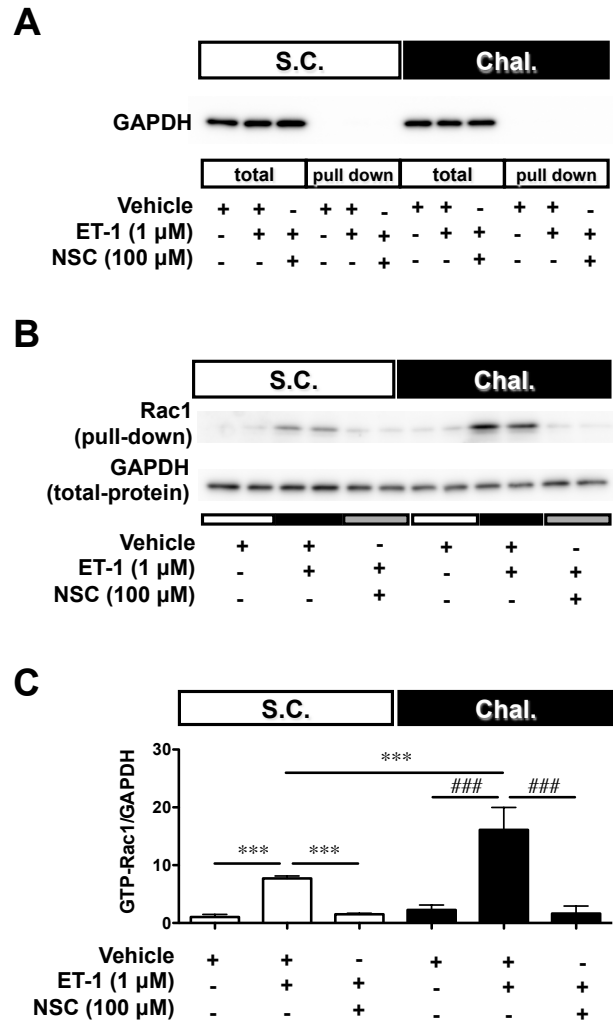


Fig. 19. ET-1-induced Rac1 activation in BSMs of S.C. and Chal. mice. Representative photographs showing bands for GAPDH in total protein and pull-down samples following vehicle, 1 μM ET-1, and 100 μM NSC23766 + 1 μM ET-1 treatment (A). Representative photographs showing bands for pull-down Rac1-GTP (upper) and GAPDH in total protein (lower) (B). These data are summarized in panel (C). Each column represents the mean ± SEM of 4 independent experiments. *** P < 0.001 vs. ET-1 stimulation in S.C.; ### P < 0.001 vs. ET-1 stimulation in Chal.

第三節 考察

AHR マウスにおいて ET-1 誘発気管支平滑筋収縮反応の有意な増強がみられ、増強した収縮反応は Rac1 阻害薬である NSC23766 により抑制された (Fig. 17A)。第三章において、AHR マウスの気管支組織では CCh の受容体 (Chrm3) の発現変化なしに、Rac1 タンパク質発現が亢進することを明らかにしている。そこで、ET-1 受容体タンパク質発現の変化について検討したところ、S.C. 群および Chal. 群においてタンパク質発現の変化はみられなかった。このことから、AHR マウスの ET-1 誘発気管支平滑筋収縮反応の増強は、CCh による気管支平滑筋収縮反応の増強と同様に、ET-1 受容体の発現変化ではなく Rac1 を介する経路の亢進が関与する可能性が示唆された。

次に、ET-1 誘発気管支平滑筋収縮反応が MLC のリン酸化を引き起こすかを検討したところ、Chal. 群における ET-1 処置は S.C. 群における ET-1 処置と比較してさらなる MLC リン酸化亢進がみられた。S.C. 群および Chal. 群ともに、ET-1 により亢進した MLC のリン酸化は NSC23766 により抑制された (Fig. 18A and B)。これらのことから、AHR マウスにおける ET-1 誘発気管支平滑筋収縮反応の増強は、Rac1 を介した MLC のリン酸化反応の亢進により引き起こされている可能性が示唆された。

最後に、pull down assay を用いて ET-1 処置による Rac1 活性状態の変化について検討した。Total 群では GAPDH の発現がみられたが、Pull down assay を行なった群では内在性コントロールである GAPDH の発現が観察されなかった。しかしながら、Pull down 群において GTP-Rac1 の発現が確認できた。このことにより pull down assay により活性型 Rac1 (GTP-Rac1) のみを分離できたことが示された。Chal. 群において ET-1 処置により S.C. 群の ET-1 処置と比較して

さらなる Rac1 の活性亢進がみられ、この活性亢進は NSC23766 の前処置によって抑制された。このことから、AHR マウスの気管支平滑筋収縮反応の亢進に Rac1 活性亢進が関与している可能性が示唆された。さらに、これらの亢進は Chrm3 を刺激することによって収縮反応を引き起こす CCh 処置のみだけでなく、ET 受容体を刺激することで収縮反応を引き起こす ET-1 処置によっても引き起こされたことから CCh 特異的でなく様々なアゴニストによっても Ca²⁺ sensitization を介した AHR がみられるか可能性が示唆でき、過去の報告と一致する (49)。しかしながら、マウスだけでなくラットやウサギなどの異なる動物種の AHR モデル動物において Rac1 を介する経路が関与しているか等さらなる検討の余地がある。また、近年、ダニ抗原による AHR モデルおよびヒトの気管支平滑筋細胞において Rac1 が関与することが報告された (18)。つまり、本実験で使用した OVA 抗原のみならずダニ抗原においても気道過敏性の亢進に Rac1 が関与することが明らかとなっているため、OVA 特異的ではなく、喘息時にみられる AHR 全般に Rac1 を介する経路が関与している可能性が考えられる。

本章では、AHR マウスの気管支平滑筋収縮反応の増強は、ET-1 によってもたらされ、この ET-1 による収縮反応の増強は MLC リン酸化亢進および Rac1 活性亢進を介して引き起こされることを示唆した。

総括

気管支喘息は、気道閉塞、気道炎症および気道過敏性（AHR）に特徴付けられる疾患である。なかでも AHR は、重症度と相関を示し、悪化により気道の狭窄を引き起こすことによって、最悪の場合死に繋がるため喘息の治療を行う際の最も重要な病態の一つである。一方、Rac1 は低分子量 G タンパク質として知られ、近年、平滑筋収縮反応に関与することが報告され始めていることから、本研究では気管支喘息における AHR における Rac1 の関与を明らかにすることを目的として研究を行なった。

第一章では、ラット気管支平滑筋収縮反応に Rac1 が関与しているか検討を行なったところ、Rac1 を介する経路は Ca^{2+} 依存的な反応には関わらずに、 Ca^{2+} 非依存的な反応機序（ Ca^{2+} sensitization）を介して MLC をリン酸化し、収縮反応を調節することを示唆した。さらに、Rac1 の活性状態が収縮反応に直接影響を及ぼすことを示唆した。

第二章では、正常マウスの気管支平滑筋収縮反応においても、ラット気管支平滑筋と同様に Ca^{2+} sensitization を介して MLC をリン酸化し、収縮反応を調節することを示唆した。さらに、抗原を反復吸入させ抗原誘発気道過敏性モデル動物を作製し、気管支平滑筋収縮反応の増強が引き起こされることを確認した。この AHR マウスの気管支において Rac1 阻害薬が増強した収縮反応を抑制すること、Rac1 の遺伝子およびタンパク質の発現が増加することを明らかにした。

第三章では、AHR マウス気管支組織における Rac1 を介する経路関連因子の発現変化および CCh による Rac1 活性状態の変化について検討した。AHR マウス気管支平滑筋において high K^+ 収縮反応の変化なしに、CCh 誘発収縮反応が増強したことから、AHR は Ca^{2+} sensitization に関与する可能性が示唆された。また、

AHR マウス気管支組織において、CCh の受容体の遺伝子およびタンパク質の発現変化なしに、Rac1 および Rac1 特異的 GEF である Trio および Tiam1 の遺伝子およびタンパク質発現亢進がみられた。さらに CCh により Rac1 活性の亢進がみられた。これらのことより、AHR マウスの CCh 誘発気管支平滑筋収縮反応の増強は、受容体の発現変化なしに、Rac1 を介する経路の関連因子の発現増加および Rac1 活性の亢進によって引き起こされることを示唆している。

第四章では、CCh とは異なる Gq タンパク質共役型受容体アゴニストである ET-1 を用いて、AHR と Rac1 の関係性について検討した。AHR マウスの気管支平滑筋において ET-1 は CCh と同様に収縮反応の増強がみられ、増強した収縮反応は Rac1 阻害薬で収縮反応の抑制がみられた。また、ET 受容体の発現変化はみられず、MLC リン酸化増加および Rac1 活性亢進がみられたことから、AHR は CCh だけでなく様々なアゴニストによる Rac1 を介する経路の亢進が関与する可能性が示唆された。

以上のことより、喘息の重要な病態である AHR は Ca^{2+} sensitization の Rac1 を介する経路が亢進して引き起こされる可能性が示唆された。しかしながら、Rac1 阻害薬は RhoA 経路の MYPT1 のリン酸化変化に影響を与えたため、AHR における Rac1 を介する経路と RhoA 経路の関係や、ヒトの AHR における Rac1 の役割の解明など研究課題は山積である。本研究結果は、AHR と Rac1 を介する経路が関与していることを明らかにした。そして、さらなる AHR と Rac1 を介する経路の関係を明らかにすることで気管支喘息の新たな治療法のターゲットになる可能性があることを示唆している。

結論

- 1) Rac1 が気管支平滑筋収縮反応の Ca^{2+} sensitization に関与することを明らかにした。
- 2) Rac1 の活性状態が気管支平滑筋収縮反応に直接影響を及ぼすことを明らかにした。
- 3) Rac1 は、抗原誘発気道過敏性時に発現および活性亢進し、CCh および ET-1 誘発気管支平滑筋収縮反応の増強を引き起こすことを明らかにした。
- 4) 気道過敏性時には、Rac1 GEF である Trio および Tiam1 の発現増加も引き起こされていることを明らかにした。

謝辞

本研究にあたり、御心強い励ましと御助言を賜りました、生体分子薬理学
亀井淳三 教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、多大なる御指導および御鞭撻を賜りました 酒井寛泰 准教授に謹
んで心より感謝いたしますと共に、謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究にあたり、熱心な御指導と御助言を賜りました 五十嵐信智 講師、
今 理紗子 特任講師に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、数々のご協力を頂きました、
薬理学研究室 成田 年 教授、生理分子科学研究室 千葉義彦 教授、
疾患病態解析学研究室 湯本哲郎 教授、里 史明 講師、堀内正子 助教に厚く
御礼申し上げます。

本研究に際しご協力いただきました星薬科大学 生体分子薬理学教室および
薬剤師職能開発研究部門の皆様には大変お世話になり、深く感謝申し上げます。

最後に、貴重な大学院生活の場を与えてくださり、どんな時も支えとなり温かく見
守ってくださった家族、研究生活から学校生活に至るまで、あらゆる支援をしてい
ただきました、先輩、友人、後輩、全ての方々に心より感謝申し上げます。

1. Walter H, Sadeque-Iqbal F, Ulysse R, Castillo D, Fitzpatrick A, Singleton J. The effectiveness of school-based family asthma educational programs on the quality of life and number of asthma exacerbations of children aged five to 18 years diagnosed with asthma: a systematic review protocol. *JBIC Database System Rev Implement Rep.* 2015;13(10):69-81.
2. Anenberg SC, Henze DK, Tinney V, Kinney PL, Raich W, Fann N, et al. Estimates of the Global Burden of Ambient [Formula: see text], Ozone, and [Formula: see text] on Asthma Incidence and Emergency Room Visits. *Environ Health Perspect.* 2018;126(10):107004.
3. Zainab R, Akram M, Daniyal M, Riaz M. Awareness and Current Therapeutics of Asthma. *Dose Response.* 2019;17(3):1559325819870900.
4. Lauzon AM, Martin JG. Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor. *F1000Res.* 2016;5.
5. Prakash YS. Emerging concepts in smooth muscle contributions to airway structure and function: implications for health and disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016;311(6):L1113-L40.
6. Prakash YS. Airway smooth muscle in airway reactivity and remodeling: what have we learned? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013;305(12):L912-33.
7. Billington CK, Penn RB. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res.* 2003;4:2.
8. Deshpande DA, Penn RB. Targeting G protein-coupled receptor signaling in asthma. *Cell Signal.* 2006;18(12):2105-20.
9. Pera T, Penn RB. Bronchoprotection and bronchorelaxation in asthma: New targets, and new ways to target the old ones. *Pharmacol Ther.* 2016;164:82-96.
10. Nayak AP, Villalba D, Deshpande DA. Bitter Taste Receptors: an Answer to Comprehensive Asthma Control? *Curr Allergy Asthma Rep.* 2019;19(10):48.
11. Ozaki H, Kwon SC, Tajimi M, Karaki H. Changes in cytosolic Ca^{2+} and contraction induced by various stimulants and relaxants in canine tracheal smooth muscle. *Pflugers Arch.* 1990;416(4):351-9.
12. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003;83(4):1325-58.

13. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* 2000;522 Pt 2:177-85.
14. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:247-69.
15. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002;420(6916):629-35.
16. Chiba Y, Ueno A, Shinozaki K, Takeyama H, Nakazawa S, Sakai H, et al. Involvement of RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization in antigen-induced bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in mice. *Respir Res.* 2005;6:4.
17. Chiba Y, Nakazawa S, Todoroki M, Shinozaki K, Sakai H, Misawa M. Interleukin-13 augments bronchial smooth muscle contractility with an up-regulation of RhoA protein. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40(2):159-67.
18. Andre-Gregoire G, Dilasser F, Chesne J, Braza F, Magnan A, Loirand G, et al. Targeting of Rac1 prevents bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142(3):824-33 e3.
19. Chiba Y, Tanabe M, Goto K, Sakai H, Misawa M. Down-regulation of miR-133a contributes to up-regulation of Rhoa in bronchial smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(8):713-9.
20. Sakai H, Suto W, Kai Y, Chiba Y. Mechanisms underlying the pathogenesis of hyper-contractility of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *J Smooth Muscle Res.* 2017;53(0):37-47.
21. Rahman A, Davis B, Lovdahl C, Hanumaiah VT, Feil R, Brakebusch C, et al. The small GTPase Rac1 is required for smooth muscle contraction. *J Physiol.* 2014;592(5):915-26.
22. Shibata K, Sakai H, Huang Q, Kamata H, Chiba Y, Misawa M, et al. Rac1 regulates myosin II phosphorylation through regulation of myosin light chain phosphatase. *J Cell Physiol.* 2015;230(6):1352-64.
23. Blackmore PF, Exton JH. Studies on the hepatic calcium-mobilizing activity of aluminum fluoride and glucagon. Modulation by cAMP and phorbol myristate acetate. *J Biol Chem.* 1986;261(24):11056-63.
24. Cockcroft S, Taylor JA. Fluoroaluminates mimic guanosine 5'-[gamma-thio]triphosphate in activating the polyphosphoinositide phosphodiesterase of hepatocyte membranes. Role for the guanine nucleotide regulatory protein Gp in signal transduction. *Biochem J.* 1987;241(2):409-14.

25. Gilman AG. G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell*. 1984;36(3):577-9.
26. Kanaho Y, Moss J, Vaughan M. Mechanism of inhibition of transducin GTPase activity by fluoride and aluminum. *J Biol Chem*. 1985;260(21):11493-7.
27. Muranyi A, Derkach D, Erdodi F, Kiss A, Ito M, Hartshorne DJ. Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells. *FEBS Lett*. 2005;579(29):6611-5.
28. Baek I, Jeon SB, Song MJ, Yang E, Sohn UD, Kim IK. Flavone Attenuates Vascular Contractions by Inhibiting RhoA/Rho Kinase Pathway. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2009;13(3):201-7.
29. Barman SA, Zhu S, White RE. RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5:663-71.
30. Chapman DG, Irvin CG. Mechanisms of airway hyper-responsiveness in asthma: the past, present and yet to come. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(4):706-19.
31. Bokoch GM. Regulation of cell function by Rho family GTPases. *Immunol Res*. 2000;21(2-3):139-48.
32. Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(Pt 5):891-5.
33. Perrino BA. Calcium Sensitization Mechanisms in Gastrointestinal Smooth Muscles. *J Neurogastroenterol Motil*. 2016;22(2):213-25.
34. Sakai H, Kurihara Y, Hashimoto Y, Chiba Y, Misawa M. Phorbol 12,13-dibutyrate-mediated contraction of the stimulated bronchial smooth muscles of mice. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010;173(2):120-4.
35. Jeon SB, Jin F, Kim JI, Kim SH, Suk K, Chae SC, et al. A role for Rho kinase in vascular contraction evoked by sodium fluoride. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343(1):27-33.
36. Ito M, Nakano T, Erdodi F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem*. 2004;259(1-2):197-209.
37. Kowluru A. Small G proteins in islet beta-cell function. *Endocr Rev*. 2010;31(1):52-78.
38. Sidarala V, Veluthakal R, Syeda K, Kowluru A. EHT 1864, a small molecule inhibitor of Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1),

attenuates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Cell Signal*. 2015;27(6):1159-67.

39. Jayaram B, Syed I, Kyathanahalli CN, Rhodes CJ, Kowluru A. Arf nucleotide binding site opener [ARNO] promotes sequential activation of Arf6, Cdc42 and Rac1 and insulin secretion in INS 832/13 beta-cells and rat islets. *Biochem Pharmacol*. 2011;81(8):1016-27.

40. Veluthakal R, Madathilparambil SV, McDonald P, Olson LK, Kowluru A. Regulatory roles for Tiam1, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1, in glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Biochem Pharmacol*. 2009;77(1):101-13.

41. Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J, Zheng Y. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(20):7618-23.

42. Shutes A, Onesto C, Picard V, Leblond B, Schweighoffer F, Der CJ. Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *J Biol Chem*. 2007;282(49):35666-78.

43. Barnes PJ. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci*. 1993;52(5-6):521-7.

44. Haddad EB, Landry Y, Gies JP. Muscarinic receptor subtypes in guinea pig airways. *Am J Physiol*. 1991;261(4 Pt 1):L327-33.

45. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332(6163):411-5.

46. Lee HK, Leikauf GD, Sperelakis N. Electromechanical effects of endothelin on ferret bronchial and tracheal smooth muscle. *J Appl Physiol* (1985). 1990;68(1):417-20.

47. Knott PG, Henry PJ, McWilliam AS, Rigby PJ, Fernandes LB, Goldie RG. Influence of parainfluenza-1 respiratory tract viral infection on endothelin receptor-effector systems in mouse and rat tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1996;119(2):291-8.

48. Yoshimura H, Jones KA, Perkins WJ, Kai T, Warner DO. Calcium sensitization produced by G protein activation in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281(3):L631-8.

49. Chiba Y, Sakai H, Yu Y, Misawa M. Effects of repeated antigen exposure on endothelin-1-induced bronchial smooth muscle contraction and

activation of RhoA in sensitized rats. *J Biochem.* 2005;137(6):751-6.

50. Sakai H, Chiba Y, Misawa M. Augmentation of endothelin-1-induced phosphorylation of CPI-17 and myosin light chain in bronchial smooth muscle from airway hyperresponsive rats. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(9):1897-9.