

原 著

# 培養気道上皮細胞および平滑筋細胞における 気道リモデリング関連サイトカイン遺伝子発現におよぼす 神経ペプチドの影響

獨協医科大学 内科学（呼吸器・アレルギー）

笛木 真 橋井 敦子 笛木 直人 太田 真弓

岡田 壮令 杉山公美弥 相良 博典

上武呼吸器科内科病院

笛木 真 笛木 直人 牧野 莊平

獨協医科大学 医学総合研究所

秋元 一三

**要 旨** 気管支喘息の基本的病態は慢性の気道炎症として認識され、その機序が徐々に解明されてきている。特に重症・難治化には気道リモデリングがその要因として注目されている。今回、我々は神経原性炎症に深く関与している神経ペプチド（サブスタンスP、ニューロキニンA）が気道リモデリング、特に線維化サイトカインTGF- $\beta$ のシグナル伝達機構に関与するTIEG, smad 7遺伝子発現に与える影響について検討した。これら神経ペプチドは線維化サイトカインTGF- $\beta$ の発現を誘導し、さらにTGF- $\beta$ の抑制型シグナル伝達分子smad 7の遺伝子発現を低下させた。これらの結果より神経ペプチドはTGF- $\beta$ のシグナル伝達分子smad 7発現を抑制することによりリモデリング形成に関与している可能性が示唆された。持続するTh2型気道炎症はTGF- $\beta$ 産生増加へ傾きTIEG発現を誘導し、その結果smad 7の発現を抑制する事が知られている。我々は、気道平滑筋におけるサブスタンスP刺激によりTIEG遺伝子発現が誘導される事を見出した。また、TGF- $\beta$ 前処置後サブスタンスPで刺激することによりその効果は増強される事も確認した。これらの結果より、アレルギー性炎症により惹起された神経原性炎症はTIEG発現を誘導し、結果としてsmad 7発現が抑制され気道の線維化・リモデリング形成を促進している可能性が示唆された。

**Key Words** : 気管支喘息, TGF- $\beta$ シグナル, smad 7, TIEG, サブスタンスP

## 緒 言

気管支喘息の基本的な病態である気道のアレルギー性炎症は、遺伝的要因と環境要因が複雑に絡み合い多彩な炎症性・免疫担当細胞、肺構成細胞（気道上皮細胞、肺線維芽細胞、気道平滑筋細胞）、メディエーター、サイトカインなどが関与して発生する<sup>1~3)</sup>。

気管支喘息の気道形態的特徴的な所見として気道上皮の剥離を認めるが、その気道上皮の中には神経ペプチドを分解し炎症を終息させる酵素として気道上皮からの中性エンドペプチダーゼ（neutral endopeptidase ; NEP）と血管内皮に存在するアンジオテンシン変換酵素（angiotensin-converting enzyme ; ACE）が重要である<sup>4)</sup>。従って、喘息では気道上皮が剥離しているためNEPが減少しており、結果として神経ペプチドの産生・増加が起こり気道炎症の増幅あるいは持続する環境となっているため喘息の治癒を妨げていると考えられている<sup>5)</sup>。

さらに喘息の重症・難治化に気道リモデリングが深く関与していることは様々な研究により明らかになってき

平成19年12月27日受付、平成20年2月20日受理

別刷請求先：笛木 真

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880

獨協医科大学 内科学（呼吸器・アレルギー）

ているが、特にtransforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) は気道リモデリング形成においてその中心的役割を果たしていると考えられている<sup>6-11)</sup>。現在までにそのシグナル伝達機構が明らかになりTGF- $\beta$ シグナルを正負に制御している分子機構がわかってきた。即ち、TGF- $\beta$ シグナル伝達に抑制的に作用するシグナル分子smad 7が過剰に発現した場合TGF- $\beta$ を介した現象は起こらないが、一方で発現が抑制されていた場合気道リモデリング形成が促進してしまうというものである<sup>12)</sup>。これらTGF- $\beta$ シグナル伝達に対し気道炎症局所で増加している神経ペプチドがどの程度関与しているか、また、気道リモデリング形成に関与しているか報告は無く、今回我々は気管支喘息の重症・難治化要因の一つである気道リモデリング形成に対する神経ペプチドの関与を示す目的で線維化サイトカインTGF- $\beta$ のシグナル伝達およびTGF- $\beta$ 発現時に誘導されるTGF- $\beta$  inducible early gene (TIEG) 遺伝子発現に及ぼす影響について検討を加えた。

## 方 法

### 細胞培養

今回我々の実験には2種類の培養細胞を用いた。

1. 正常ヒト気管支上皮細胞cell lineであるBEAS-2Bを10% FBS (fetal bovine serum) (Gibco BRL, New York, USA)を加えたDMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) (Nissui pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan)で37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。

2. 正常ヒト気管支平滑筋細胞cell lineであるCryoB-SMCを平滑筋細胞基礎培地 SmBM (Smooth Muscle Cell Basal Medium) (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD, USA)で培養した。

### Real time reverse transcription-polymerase chain reaction (real time RT-PCR)

BEAS-2B培養細胞、CryoB-SMC培養細胞からのtotal RNA抽出は、ISOGEN solution (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を使用しacid guanidinium-phenol-chloroform法で行った。そしてcomplementary DNA (cDNA)合成はTakara RNA PCR kit (AMV) Ver.2.1 (Takara Bio INC., Shiga, Japan)を用いて行った。

Real time RT-PCRはTaq man universal PCR master mix (Applied Biosystems, Chiba, Japan)と後述のprobe及びprimerを使用してABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Tokyo, Japan)で計測した。

使用したsmad 7のprimerは5'-GGTGCTCCCTGCTTTTCCA-3' (sense) と5'-GCAGAGAAGCTCCCAG

AATGG-3' (antisense) (Espec Oligo Service Co., Ltd., Ibaraki, Japan)を、probeは5'-TTTCTCCATGGCTCCGGCCG-3' (Applied Biosystems, Chiba, Japan)を用いた。TGF- $\beta$ のprimerは5'-GCGCATCCTAGACCCTTCTC-3' (sense) と5'-GATGGGCGCGATCTGGTA-3' (antisense) (Espec Oligo Service Co., Ltd., Ibaraki, Japan)を、probeは5'-CTCCGACCTGCCACAGATCCCTATTC-3' (Applied Biosystems, Chiba, Japan)を用いた。また、TIEGはTIEG probe and primers mixture; Assay-on-demand Hs00194622-m1 (Gene Bank ID: U21847) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いた。

### 実験プロトコール1 サブスタンスP (SP), ニューロキニンA (NK-A) 刺激によるTGF- $\beta$ , smad 7遺伝子発現の検討

BEAS-2B培養細胞におけるTGF- $\beta$ 及びsmad 7遺伝子発現に対する神経ペプチドの影響を検討するためSP (substance P acetate salt hydrate, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan) (10<sup>-9</sup>M, 10<sup>-7</sup>M, 10<sup>-5</sup>M), NK-A (neurokinin A, Peptide Institute Inc., Osaka, Japan) (10<sup>-9</sup>M, 10<sup>-7</sup>M, 10<sup>-5</sup>M)でBEAS-2B培養細胞を4時間刺激し、TGF- $\beta$ 及びsmad 7の遺伝子発現をreal time RT-PCR法にて測定した。

### 実験プロトコール2 TGF- $\beta$ 刺激によるTIEG遺伝子発現の経時的变化の検討

BEAS-2B培養細胞におけるTIEG遺伝子発現に対する線維化サイトカインTGF- $\beta$ の影響を検討するため、TGF- $\beta$  (recombinant human TGF- $\beta$ 1, Pepro Tech, London, UK) (10 ng/ml)で刺激後30分から240分のTIEGの経時的遺伝子発現をreal time RT-PCR法にて測定した。

### 実験プロトコール3 TIEG遺伝子発現に与えるSPの効果

TGF- $\beta$ 刺激によるTIEG遺伝子発現を検討するためCryo BSMC培養細胞を4群に分け、第1群はTGF- $\beta$  (10 ng/ml)単独で1時間刺激しTIEG遺伝子発現をreal time RT-PCR法にて測定した。第2群はSP刺激によるTIEG遺伝子発現を検討するため、Cryo BSMC培養細胞を10<sup>-7</sup>MのSP単独で1時間刺激しTIEG遺伝子発現をreal time RT-PCR法にて測定した。第3群はTGF- $\beta$ 刺激によるTIEG遺伝子発現に対するSPの与える影響を検討するため、Cryo BSMC培養細胞をTGF- $\beta$  (10 ng/ml)とSP (10<sup>-7</sup>M)の同時混合培養にて1時間刺激し

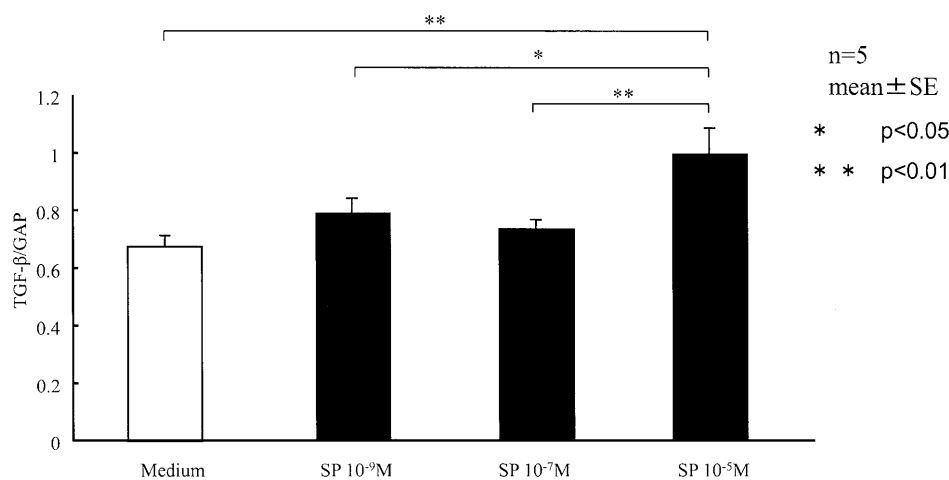


図1 BEAS-2B培養細胞におけるサブスタンスP刺激によるTGF- $\beta$ 発現  
10<sup>-5</sup>MサブスタンスPはコントロールと比較し有意にTGF- $\beta$ 発現を誘導した ( $p < 0.01$ ,  $n = 5$ , mean  $\pm$  SE).

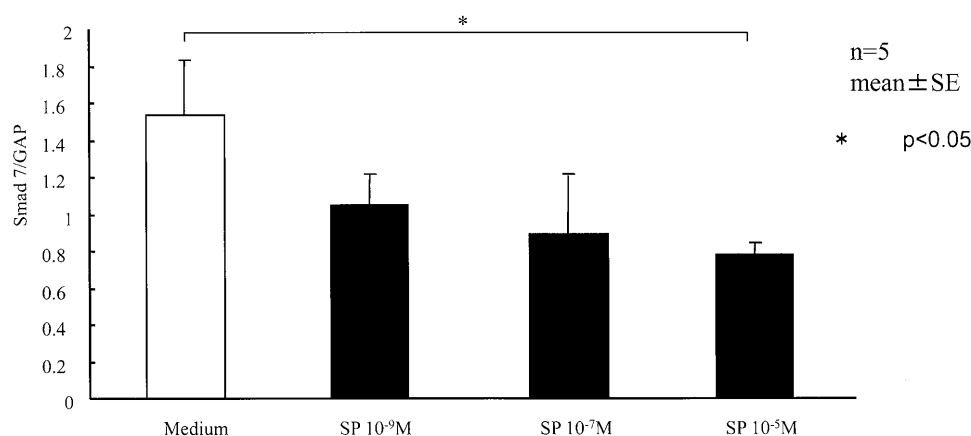


図2 BEAS-2B培養細胞におけるサブスタンスP刺激によるsmad 7遺伝子発現  
10<sup>-5</sup>MサブスタンスP刺激によりsmad 7遺伝子発現は有意に抑制され ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ , mean  $\pm$  SE), その効果は濃度依存性に抑制する傾向を認めた。

TIEG遺伝子発現をreal time RT-PCR法にて測定した。第4群はTh2サイトカイン環境下における神経原性炎症の影響を検討する目的でCryo BSMC培養細胞をTGF- $\beta$  (10ng/ml) で1時間前処置した後SP (10<sup>-7</sup>M) を添加して1時間後のTIEG遺伝子発現をreal time RT-PCR法にて測定した。

#### 統計学的有意差検定

結果はmean  $\pm$  SEで示した。統計学的有意差検定は、対応のないStudent's t検定で検討し、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

### 結 果

ヒト気管支上皮細胞におけるTGF- $\beta$ 及びsmad 7遺伝子発現に対する神経ペプチドの影響を検討した。図1

に示すように、BEAS-2B培養細胞においてSP10<sup>-5</sup>M刺激にてTGF- $\beta$ の発現は有意に増強した(コントロール群0.68  $\pm$  0.04, SP群1.00  $\pm$  0.09,  $P < 0.01$ ,  $n = 5$ )。図2に示すようにSP刺激はTGF- $\beta$ シグナル伝達抑制因子であるsmad 7の遺伝子発現を10<sup>-5</sup>M刺激にて有意に抑制した(コントロール群1.53  $\pm$  0.31, SP10<sup>-5</sup>M群0.78  $\pm$  0.06,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ )。その効果は濃度依存的に低下させる傾向を認めた(SP10<sup>-7</sup>M群0.89  $\pm$  0.33, SP10<sup>-9</sup>M群1.05  $\pm$  0.17,  $n = 5$ )。神経ペプチドの一つであるNK-Aに関して同様の検討を行い、10<sup>-5</sup>Mおよび10<sup>-7</sup>M刺激にてsmad 7遺伝子発現を有意に抑制した(コントロール群1.53  $\pm$  0.31, NK-A10<sup>-7</sup>M群0.74  $\pm$  0.09,  $P < 0.05$ , NK-A10<sup>-5</sup>M群0.75  $\pm$  0.08,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ) (図3)。次にTGF- $\beta$ 刺激にて誘導されるTIEG遺伝子発現の影響を検討する目的でTGF- $\beta$ 刺激後の経時的変化を検討し

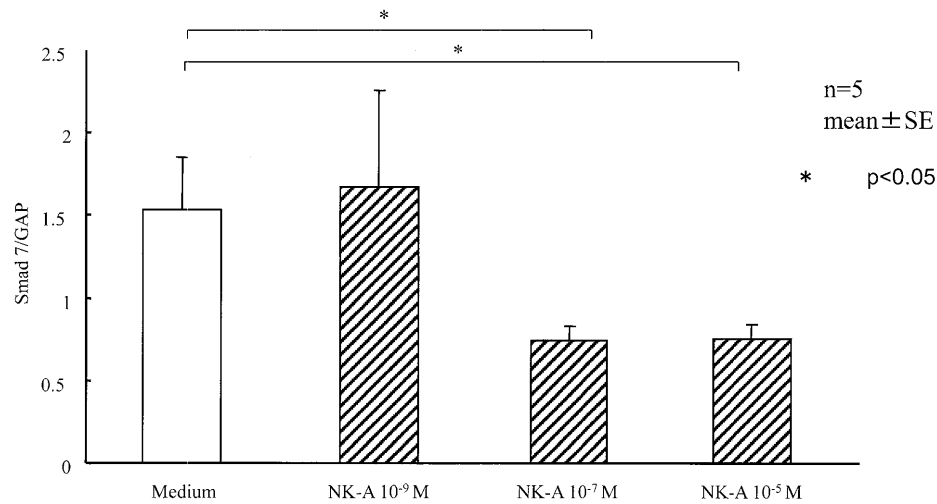


図3 BEAS-2B培養細胞におけるニューロキニンA刺激によるsmad 7遺伝子発現  
 $10^{-7}$ Mおよび $10^{-5}$ MのニューロキニンA刺激にてsmad 7遺伝子発現は有意に抑制された  
 ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ , mean  $\pm$  SE).

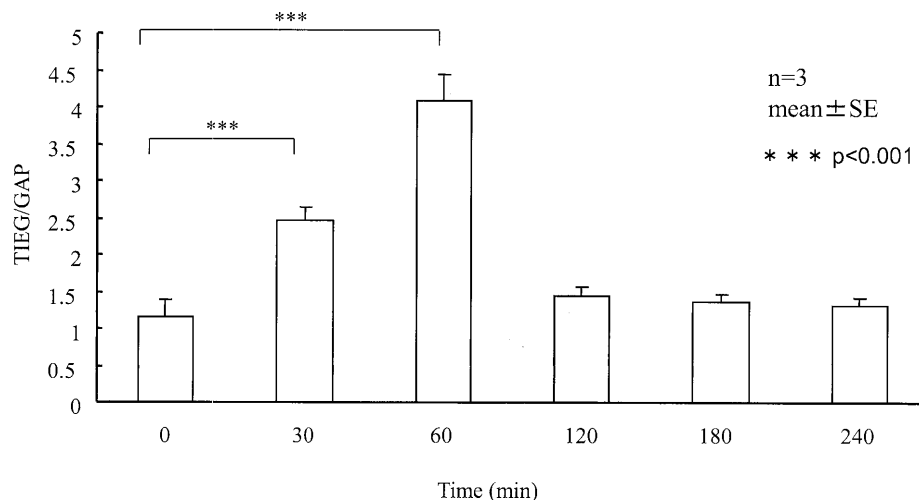


図4 BEAS-2B培養細胞におけるTGF- $\beta$ 刺激によるTIEG遺伝子発現の経時的変化  
 $10 \text{ ng/ml}$  TGF- $\beta$ 刺激にて60分後でTIEG遺伝子発現はピークを示した( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ ,  
 mean  $\pm$  SE).

た. TGF- $\beta$ 刺激1時間後でTIEG遺伝子発現は最大を示した(コントロール群 $1.16 \pm 0.22$ , 1時間刺激群 $4.08 \pm 0.36$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 3$ )(図4). 気道リモデリング形成において気道平滑筋の肥大・増殖は特徴的な組織所見である. これら気道平滑筋(CryoBSMC培養細胞)に対する神経ペプチドの影響を検討する目的で実験的にアレルギー性炎症におけるTh2環境を作成し神経ペプチドの一つであるSPが及ぼす影響について検討した(図5). TGF- $\beta$ 1時間刺激にてTIEG遺伝子発現は有意に増強した(コントロール群 $0.64 \pm 0.03$ , TGF- $\beta$ 群 $1.39 \pm 0.04$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ). SP $10^{-7}$ M1時間刺激にてTIEG遺伝子は

有意に発現が増強した(SP群 $1.10 \pm 0.02$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ). TGF- $\beta$ およびSPを同時添加した1時間後のTIEG遺伝子発現は, コントロール群と比較し有意に増強したもののTGF- $\beta$ 単独刺激群との差は見られなかった(TGF- $\beta$ ・SP同時刺激群 $1.39 \pm 0.01$ ,  $n = 3$ ). 一方, TGF- $\beta$ で1時間前処置後, SPで1時間刺激した群ではTGF- $\beta$ 単独刺激群, SP単独刺激群と比較してTIEG遺伝子発現は有意に増強した(TGF- $\beta$ 前処置後SP刺激群 $1.91 \pm 0.02$ ,  $P < 0.05$ および $P < 0.002$ ,  $n = 3$ ).

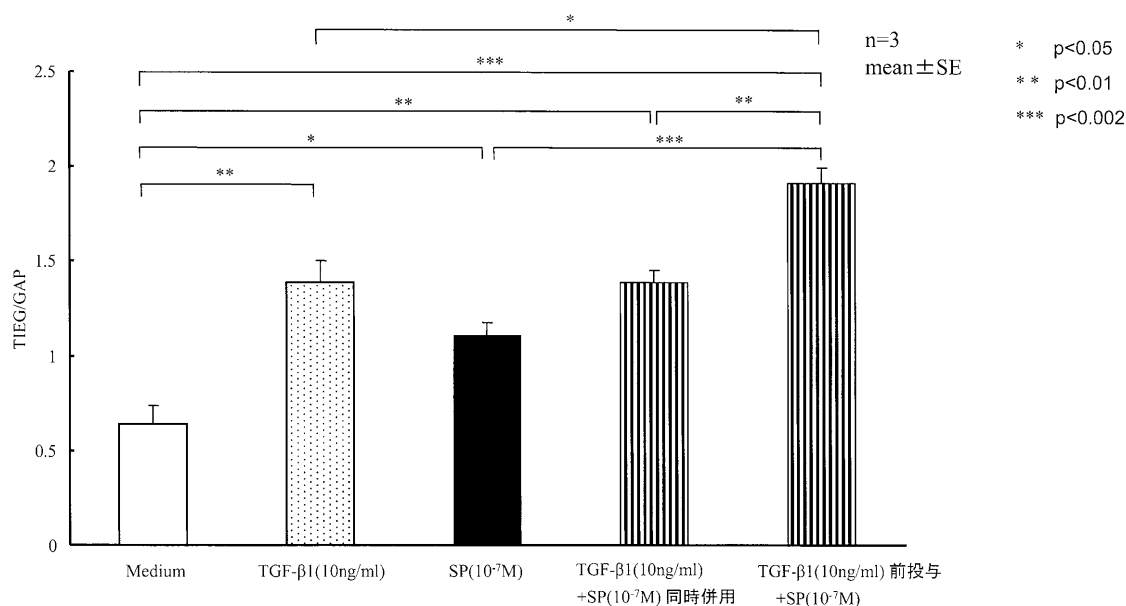


図5 Cryo BSMC培養細胞におけるTIEG遺伝子発現に対するTGF- $\beta$ およびサブスタンスPの影響  
TGF- $\beta$ およびサブスタンスP刺激にてTIEG遺伝子発現は有意に増強した ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , mean  $\pm$  SE). TGF- $\beta$ およびサブスタンスP同時刺激は相加, 相乗作用を認めなかった. TGF- $\beta$ による1時間前処置後サブスタンスP刺激するとTIEG遺伝子発現は同時刺激と比較し有意に増強した ( $p < 0.01$ ,  $n = 3$ , mean  $\pm$  SE).

## 考 察

喘息における気道炎症の特徴は, 好酸球, T細胞 (特にTh2細胞), 肥満細胞, 好中球などの炎症細胞浸潤, 血管拡張, 気道上皮の剥離, 粘膜・粘膜下浮腫と粘液栓の充満である<sup>1,2,13</sup>). これらは, 好酸球, 肥満細胞, リンパ球, 好塩基細胞, 好中球, マクロファージなどの炎症細胞, および気道上皮細胞, 線維芽細胞, 筋線維芽細胞, 平滑筋細胞, 血管内皮細胞などの細胞構成細胞が遊離する炎症性メディエーターやサイトカイン, ケモカインの直接作用, あるいはほかの細胞, 神経系, 接着分子を介した間接作用によって起こると考えられる<sup>14,15</sup>). 慢性喘息患者で認められる上皮杯細胞過形成, 粘膜下腺増生, 血管新生, 上皮線維増生 (基底膜肥厚), 弾力線維の破壊, 平滑筋肥大, 気道外膜の線維化などはリモデリングによる変化である<sup>16,17</sup>). 気道炎症や気道リモデリングの機序は徐々に解明されてきたものの未だ不明の点が多い. その中において線維化サイトカインの役割は重要であり, 特にTGF- $\beta$ は気道リモデリング形成においてその中心的役割を果たしていると考えられている<sup>16,17</sup>). 現在までにそのシグナル伝達機構が明らかになりTGF- $\beta$ シグナルはその作用により正負に巧妙に制御されている分子機構が分かってきた<sup>11,12</sup>). 即ち, TGF- $\beta$ シグナル伝達に抑制的に作用するsmad 7が過剰に発現した場合, TGF- $\beta$ を介した現象は起こらないが, 一方で発現が抑

制されていた場合気道リモデリング形成が促進してしまうというものである. 事実, 喘息患者においてその発現が抑制されており, また, 動物モデルにおいても気道リモデリング形成が起こるとsmad 7発現が抑制されていることが示されている<sup>11,12,18</sup>). これらの分子機構には様々な要素が関与していることが考えられるが, 神経原性炎症が気道リモデリング形成, またシグナル伝達にどの程度関与しているかは不明であり, 今回我々は神経ペプチドがこれら線維化シグナルにどの程度影響を及ぼしているかについて検討した.

今回の我々の結果からSPは線維化サイトカインTGF- $\beta$ の発現を誘導することがわかった. 即ち, 神経ペプチドの一つSPは気道リモデリング形成に何らかの関与をしていることが示唆された. 次に我々は, そのシグナル伝達分子smadの遺伝子発現に対して検討を進めた. その結果, TGF- $\beta$ の抑制型シグナル分子であるsmad 7の遺伝子発現を低下させることがわかった. さらに神経ペプチドの一つであるNK-Aに関しても同様の検討を行いsmad 7の遺伝子発現が低下することを確認した. これらの結果から神経ペプチドはTGF- $\beta$ のシグナル伝達分子smad 7発現を抑制することによりリモデリング形成に関与している可能性が示唆された.

これまでの報告からsmad 7発現調整にはTIEGが関与していることが知られている. 即ち, 持続するTh2型気道炎症によりTGF- $\beta$ が産生されTIEG発現が誘導さ

れ, smad 7 の発現が抑制されるというものである。そこで, 我々は次に気道平滑筋において SP が smad 7 発現調節分子 TIEG 遺伝子発現を誘導するか否か検討を加え, SP が TIEG 遺伝子発現を誘導する事を確認した。また TGF- $\beta$  と SP の混合培養にてその効果は増強され, これらの結果を併せると持続する Th2 型気道炎症により誘導される線維化サイトカインの一つ TGF- $\beta$  とその結果惹起された神経原性炎症により産生された SP をはじめとする神経ペプチドにより TIEG 遺伝子発現が誘導され smad 7 遺伝子発現が抑制され, その結果気道の線維化・リモデリング形成が促進される可能性が示唆された。

気道の神経細胞は, アドレナリンおよびノルアドレナリンを伝達物質として気道平滑筋を弛緩させる交感神経 (アドレナリン作動性), アセチルコリンを伝達物質として気道平滑筋を収縮する副交感神経 (コリン作動性), および非アドレナリン非コリン作動性神経細胞 (nonadrenergic noncholinergic nerve; NANC) が存在している<sup>19~22)</sup>。さらに, NANC は気道収縮に働く興奮性 NANC (e-NANC) 神経と, 気道を拡張させる抑制性 NANC (i-NANC) 神経に分けられる<sup>23,24)</sup>。喘息ではこれら自律神経の機能異常が病態に関与している。一方, 気道には有髄神経であり伝導速度が早い A $\delta$  神経細胞 (A $\delta$  線維) と, 無髄神経であり伝導速度の遅い c 神経細胞 (c 線維) が分布している<sup>25,26)</sup>。e-NANC 神経は副交感神経求心路にあたる c 線維と考えられており<sup>27)</sup>, c 線維から分泌される SP, NK-A, ニューロキニン B およびカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide; CGRP) などの神経ペプチドにより喘息病態が修飾される<sup>28)</sup>。気道炎症などにより c 線維刺激を受けると, 中枢神経を介さない気道局所反射 (axon reflex: 軸索反射) により神経ペプチドが放出される<sup>29)</sup>。i-NANC 神経はコリン作動性の交感神経遠心路を介すると考えられており, その神経末端からはアセチルコリンとともに血管作動性腸管ペプチド (vasoactive intestinal peptide; VIP) や一酸化窒素 (NO) が放出される<sup>30)</sup>。通常は神経ペプチドを分解し炎症を終息させる酵素として気道上皮からの NEP と血管内皮に存在する ACE が存在しているが<sup>4)</sup>, 喘息では気道上皮が剥離しているため NEP が減少しており気道炎症が持続する環境となっているため喘息の治療を妨げ炎症を増悪させている<sup>5)</sup>。今回の我々の検討結果により, このような環境におかれた喘息気道では傷害を受けた上皮の剥離により NEP が減少し SP をはじめとする神経ペプチドの産生が増加し, アレルギー性炎症により産生が増加している Th2 サイトカインとの相加あるいは相乗作用を示すことにより気道リモデリング形成に関与している可能性, また, Th2 環境下にて気道平滑筋

上に NK1 受容体の発現が誘導され<sup>31)</sup>, そこに産生・遊離された神経ペプチドが結合することによりさらに気道炎症を増幅している可能性が示唆された。

## 結 論

SP, NK-A などの神経ペプチドは培養 BEAS-2B, Cryo BSMC 細胞における TGF- $\beta$  の遺伝子発現を増強し, その抑制シグナル分子 smad 7 の遺伝子発現を低下させた。Smad 7 発現抑制に関与する TIEG は TGF- $\beta$  前処置後の SP 刺激にて遺伝子発現が増強された。以上より, 神経原性炎症は気道炎症の増幅に影響を与え, 気道リモデリング形成に深く関与していることが示された。

## 文 献

- Holgate ST, Davies DE, Powell RM, et al.: Local genetic and environmental factors in asthma disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms. *Eur Respir J*, **29**: 793-803, 2007.
- Bel EH.: Clinical phenotypes of asthma. *Curr Opin Pulm Med*, **10**: 44-50, 2004.
- Kauffmann F.: Post-genome respiratory epidemiology. *Eur Respir J*, **24**: 471-480, 2004.
- Sagara H, Yukawa T, Arima M, et al.: Effect of capsaicin on the migration of eosinophils into the bronchi of guinea pigs. *Arerugi*, **42**: 236-242, 1993.
- Matai R, Barker MD.: Cyclical variation of serum neutral endopeptidase lost in asthmatics: A pilot study. *J Pathophys*, **14**: 29-33, 2007.
- Massague J.: Transforming growth factor- $\beta$  signal transduction. *Annu Rev Biochem*, **67**: 753, 1998.
- Nakao A, Imamura T, Souchenlytskyi S, et al.: TGF- $\beta$  receptor-mediated signaling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J*, **16**: 5353, 1997.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P.: TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. *Nature*, **390**: 465, 1997.
- Nakao A, Afrankhte M, Moren A, et al.: Identification of smad 7 a TGF- $\beta$  inducible antagonist of TGF- $\beta$  signaling. *Nature*, **389**: 631, 1997.
- Nakao A, Fuji M, Matsumura R, et al.: Transient gene transfer and expression of smad 7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Clin Invest*, **104**: 5-11, 1999.
- Sagara H, Okada T, Okumura K, et al.: Activation of TGF- $\beta$ /Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, **110**:

- 249-254, 2002.
- 12) Nakao A, Sagara H, Setoguchi Y, et al. : Expression of Smad 7 in bronchial epithelial cells is inversely correlated to basement membrane thickness and airway hyperresponsiveness in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, **110** : 873-878, 2002.
  - 13) Fahy JV. : Remodeling of the airway epithelium in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, **164** : 46-51, 2001.
  - 14) Barnes PJ. : Achieving asthma control. *Curr Med Res Opin*, **21** : 5-9, 2005.
  - 15) Barnes PJ. : New therapies for asthma. *Trends Mol Med*, **12** : 515-520, 2006.
  - 16) Vignola AM, Kips J, Bousquet J. : Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol*, **105** : 1041-1053, 2000.
  - 17) Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, et al. : Asthma. From broncho-constriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*, **161** : 1720-1745, 2000.
  - 18) Ota M, Nakao A, Sugiyama K, et al. : Airway expression of Smad 7, a TGF- $\beta$ -inducible inhibitory molecule of TGF- $\beta$  signaling, decreases after repeated airway antigen challenges. *Dokkyo J Med Sci*, **31** : 17-26, 2004.
  - 19) Almeida TA, Rojo J, Nieto PM, et al. : Tachykinins and tachykinin receptors : structure and activity relationships. *Curr Med Chem*, **11** : 2045-2081, 2004.
  - 20) Hasaneen NA, Foda HD, Said SI. : Nitric oxide and vasoactive intestinal peptide as co-transmitters of airway smooth-muscle relaxation : analysis in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *Chest*, **124** : 1067-1072, 2003.
  - 21) Braun A, Nockher WA, Renz H. : Control of nerve growth and plasticity. *Curr Opin Pharmacol*, **2** : 229-234, 2002.
  - 22) Mackay TW, Hulks G, Douglas NJ. : Non-adrenergic, non-cholinergic function in the human airway. *Respir Med*, **92** : 461-466, 1998.
  - 23) Lammers JW, Barnes PJ, Chung KF. : Nonadrenergic, noncholinergic airway inhibitory nerves. *Eur Respir J*, **5** : 239-246, 1992.
  - 24) Barnes PJ. : Neural mechanisms in asthma. *Br Med Bull*, **48** : 149-168, 1992.
  - 25) Watanabe N, Horie S, Michael GJ, et al. : Immunohistochemical localization of vanilloid receptor subtype 1 (TRPV1) in the guinea pig respiratory system. *Pulm Pharmacol Ther*, **18** : 187-197, 2005.
  - 26) Amadesi S, Moreau J, Tognetto M, et al. : NK1 receptor stimulation causes contraction and inositol phosphate increase in medium-size human isolated bronchi. *Am J Respir Crit Care Med*, **163** : 1206-1211, 2001.
  - 27) Kageyama N, Ichinose M, Igarashi A, et al. : Repeated allergen exposure enhances excitatory nonadrenergic noncholinergic nerve-mediated bronchoconstriction in sensitized guinea-pigs. *Eur Respir J*, **9** : 1439-1444, 1996.
  - 28) Barnes PJ. : Neurogenic inflammation in the airways. *Respir Physiol*, **125** : 145-154, 2001.
  - 29) Kamei J, Yoshikawa Y, Saitoh A. : Effect of N-arachidonoyl-(2-methyl-4-hydroxyphenyl) amine (VDM11), an anandamide transporter inhibitor, on capsaicin-induced cough in mice. *Cough*, **2** : 2, 2006.
  - 30) Barnes PJ. : Respiratory pharmacology. in "Textbook of Respiratory Medicine. 2<sup>nd</sup> ed." ed by Murray JF, Nadel JA, Saunders, Philadelphia : 251, 1994.
  - 31) Naline E, Molimard M, Regoli D, et al. : Evidence for functional tachykinin NK1 receptors on human isolated small bronchi. *Am J Physiol*, **271** : L763, 1996.

## Effect of Neuropeptides for Cytokine Gene Expression Associated with Airway Remodeling in Cultured Airway Epithelial and Smooth Muscle Cell Lines

Makoto Fueki<sup>1,2</sup>, Atsuko Hashii<sup>1</sup>, Kazumi Akimoto<sup>3</sup>, Naoto Fueki<sup>1,2</sup>, Mayumi Ota<sup>1</sup>, Takenori Okada<sup>1</sup>, Kumiya Sugiyama<sup>1</sup>, Sohei Makino<sup>2</sup> and Hironori Sagara<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Department of Pulmonary Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo Medical University School of Medicine*

<sup>2</sup> *Jobu Hospital for Respiratory disease*

<sup>3</sup> *Institute for Medical Science, Dokkyo Medical University School of Medicine*

Airway remodeling is a typical issue of asthma. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  plays an important role for the regulation of airway inflammation and remodeling in asthma.

The expression of TGF- $\beta$  in the asthmatic airways was predominantly detected in eosinophils and fibroblasts and it was significantly correlated with the severity of the disease, basement membrane thickness, and submucosal fibroblast number, thus suggesting that TGF- $\beta$  is involved in airway remodeling in adult asthma. TGF- $\beta$ -inducible early gene (TIEG) is a Kruppel-like transcription factor that is rapidly induced upon TGF- $\beta$  treatment. TIEG promotes TGF- $\beta$ /smad signaling by down-regulating negative feedback through the inhibitory smad 7. Among numerous peptide mediators such as tachykinin, calcitonin gene-related peptide, substance P or neurokinin A is one of the most abundant molecules found in the respiratory tract. Neurogenic

inflammation might contribute to selective upregulation of TIEG through unknown mechanisms. We therefore examine whether neuropeptides modulate TGF- $\beta$  and TIEG expression. In this study, we found that TIEG was significantly increased in the cultured smooth muscle cells stimulating with substance P. Furthermore, we found the synergistic effect on TIEG expression in cultured smooth muscle cells stimulating with substance P and pretreatment of TGF- $\beta$ . These results suggest that increased TIEG expression in airway epithelial and smooth muscle cells might result in increased substance P, TGF- $\beta$  activity and contribute to the development of airway inflammation seen in chronic asthma.

**Key words :** Bronchial asthma, TGF- $\beta$  signaling, smad 7, TIEG, substance P