

論文の内容の要旨

論文題目 レプチンによる肺線維芽細胞の活性化作用と喘息病態に及ぼす作用の検討

氏名 渡邊 かおる

【背景】

気管支喘息は気道炎症を背景とし可逆性の気道狭窄と気道過敏性の亢進を特徴とする気道疾患であり、公衆衛生上最も重要な呼吸器疾患の一つである。これまで気管支喘息は単一疾患として捉えられ、吸入ステロイドと気管支拡張薬をベースとした画一的な治療が行われてきたが、気管支喘息には種々の原因や増悪因子が存在し多様な臨床像を持つことが明らかにされ、喘息患者をフェノタイプに分類し病態ごとに特異的な薬剤で治療する個別化治療へと向かう動きがある。複数存在する喘息フェノタイプは、大きく2型、非2型炎症に分類されるが、2型炎症による喘息病態については古くから研究が進み、2型炎症に関わる分子を標的とした抗体製剤の開発は近年目覚ましい発展を遂げ、重症喘息患者に対して効果を示している。一方で、非2型炎症による喘息病態には未解明の部分が多く残されている。

重症喘息のクラスター解析から見出された非2型炎症フェノタイプの一つに肥満合併喘息が存在する。肥満による呼吸機能への物理的な影響だけでなく、脂肪細胞から分泌されるアディポカインの一部が慢性持続炎症を引き起こし、喘息の発症や増悪に寄与すると考えられている。アディポカインの一つであるレプチンは、生体内のエネルギー出納に関わる以外に炎症性サイトカインとしての作用が明らかにされており、炎症細胞や気道上皮細胞を活性化することで気道炎症の形成に寄与する。さらに、喘息モデルマウスにレプチンを連続的に皮下注入すると、血清IgEが増加し、気道過敏性が亢進することからも、レプチンが喘息の病態形成機序に関わることを示唆されている。

重症喘息の病態において、難治化や重症化をもたらす重要な形態学的変化の一つに気道リモデリングがあり、様々な慢性呼吸器疾患の症状に寄与するが、その形成には肺線維芽細胞が中心的な役割を果たす。そこで本研究はレプチンがヒト肺線維芽細胞に及ぼす作用およびその作用機序を明らかにすることを目的とした。また、喘息気道におけるレプチンの発現レベルを明らかにし、さらには非喘息と喘息患者由来のヒト肺線維芽細胞のレプチンに対する反応性を比較することで、レプチンによる肺線維芽細胞に対する作用が喘息病態に及ぼす影響を検討することを目的とした。

【方法】

本研究は国立病院機構東京病院臨床研究倫理審査委員会による承認を得た上で文書による同意を取得して行った。当院における手術肺から分離した肺線維芽細胞、Lonza社から購入したヒト正常肺線維芽細胞、脂肪細胞を用いた。肺線維芽細胞を24時間培養後にレ

プチンを含む各種刺激因子を加えた。培養上清中のサイトカインやケモカイン濃度を cytometric bead assay もしくは ELISA で測定した。mRNA 発現量は逆転写後に real-time PCR を用いてサイクル比較法で相対定量した。細胞増殖能については cell proliferation ELISA kit を用いて測定した。肺線維芽細胞表面のレプチン受容体(Ob-R)発現はフローサイトメトリーで測定し、Ob-R の siRNA を電気穿孔法により肺線維芽細胞に導入しレプチンに対する反応性の変化を確認した。細胞内シグナル伝達経路を明らかにするため、転写活性因子の阻害剤を用いてレプチンへの反応性の変化を確認した。転写活性因子のリン酸化は Western blot(WB)法で測定した。患者の切除肺切片を用いて抗レプチン抗体および抗 CD163 抗体による免疫組織染色を行い、レプチン産生細胞を同定した。ヒト末梢血から magnetic cell sorting 法を用いて単球を精製して実験に使用した。レプチン産生能の評価は real-time PCR と WB 法、ELISA を用いた。喘息と非喘息患者の切除肺から分離した肺線維芽細胞を用いて、サイトカイン/ケモカイン産生能、Ob-R の発現量、転写活性因子のリン酸化を評価し、2 群のレプチンに対する反応性を比較した。連続変数の二群間比較は両側 t 検定もしくは Mann-Whitney の U 検定で、多群間比較は分散分析後に Tukey 法および Dunnett 法で評価し、統計学的有意差は $p < 0.05$ とした。

【結果】

レプチンは濃度依存的に肺線維芽細胞による Eotaxin、MCP-1、IL-8、IP-10、IL-6 の産生を mRNA およびタンパク質レベルで有意に上昇させた。レプチンは肺線維芽細胞からの α -SMA および細胞外マトリックスの成分であるラミニンの産生を増強させ、肺線維芽細胞の増殖能を増強した。一方、レプチンは肺線維芽細胞からのコラーゲン I 産生能およびコラーゲンゲル収縮能には影響を及ぼさなかった。real-time PCR およびフローサイトメトリーで肺線維芽細胞の Ob-R の発現を確認した。Ob-R の siRNA を導入した肺線維芽細胞にレプチンを作用させると Eotaxin、IP-10、IL-6 の産生が抑制されたため、レプチンによる肺線維芽細胞からのこれらサイトカイン産生増強作用には Ob-R が関与していることが示唆された。Ob-R 以下のシグナル伝達経路については、JAK2、p38 MAPK、ERK1/2 経路に対する特異的阻害剤を用いると、Eotaxin、MCP-1 の産生が有意に抑制され、対応する転写活性因子のリン酸化抗体による WB では、p38 MAPK では 3 分、STAT5、ERK1/2 では 10 分をピークにレプチン刺激によりリン酸化が促進されることが示され、これらが関与することが示された。肺切片の免疫組織染色により、喘息患者では非喘息患者と比較して気道粘膜下に著明なレプチン陽性炎症細胞浸潤を認め、それらは抗 CD163 抗体で陽性に染色された。末梢血から精製した単球は、real-time PCR と WB 法によりレプチンを発現していることが示された。喘息と非喘息肺線維芽細胞によるレプチンの反応性についての比較では、2 群間で Ob-R の発現、サイトカイン産生能、p38 MAPK リン酸化について有意差を認めなかった。

【考察】

本研究により、レプチンが Ob-R およびその下流の JAK2、p38 MAPK、ERK1/2 経路を介して肺線維芽細胞に作用し、喘息の病態形成に関わるサイトカイン/ケモカイン、組織線維化や気道リモデリングの指標となる α -SMA やラミニンの産生を増強することを明らかにした。喘息患者肺は、非喘息患者と比較して気道粘膜下に著明なレプチン陽性炎症細胞浸潤を認め、その一部は CD163 陽性単球であることを見出した。Ob-R の発現、レプチン刺激に対するサイトカイン/ケモカインの産生、p38 MAPK リン酸化は、非喘息患者と喘息患者由来線維芽細胞の間で差を認めなかった。

本研究でレプチンにより肺線維芽細胞からの産生が増強された Eotaxin、MCP-1、IL-8、IP-10、IL-6 は、炎症細胞を誘導および活性化することで気道や呼吸器系の炎症、および気道上皮の損傷や組織の異常な線維化を引き起こし、喘息を含む線維化異常による疾患の病態形成に関わる。また筋線維芽細胞への分化マーカーである α -SMA 発現や細胞外マトリックス成分の発現が増強されたことから、レプチンが組織線維化およびリモデリングにも寄与する可能性が示唆された。またその機序としては、レセプター Ob-R および MAPK 経路の関与が示されたものの、他の経路も関わっている可能性があるためさらなる検討が必要である。

気道局所のレプチン発現については、これまでに COPD 患者や喫煙者のマクロファージや気道上皮細胞で示されていたが、本研究では喘息患者の肺局所における CD163 陽性単球を含む炎症細胞によるレプチン発現を新たに明らかにした。また、末梢血由来単球の real-time PCR と WB、ELISA により、産生量は脂肪細胞よりかなり低値であるものの、単球がレプチンを mRNA レベルから発現することを見出した。しかしながら、喘息と気道局所におけるレプチンとの直接的な因果関係までは明らかにできておらず、さらなる検討が必要である。

最後に、非喘息患者と喘息患者のレプチンに対する肺線維芽細胞の反応性を比較することにより、喘息の有無による肺線維芽細胞の性質の差異を明らかにした。肺線維芽細胞表面 Ob-R の発現レベル、レプチン刺激に対するサイトカイン/ケモカイン産生量、細胞内 p38 MAPK のリン酸化は、いずれも 2 群間で有意差を認めず、喘息と非喘息の肺線維芽細胞のレプチンに対する反応性は同等であることが示唆された。しかしながら、喘息と非喘息の気道局所におけるレプチン陽性細胞数は明らかに異なるため、レプチンは喘息気道局所における発現レベルが増加することで喘息増悪に寄与している可能性がある。

【結論】

本研究から、レプチンが肺線維芽細胞によるサイトカイン/ケモカインの産生、 α -SMA の発現、細胞増殖能を亢進させ、反応の少なくとも一部には Ob-R や p38 MAPK 経路が関与している可能性が示唆された。また、単球がレプチンを産生し気道局所でのレプチン発現量が増加することで喘息の病態悪化に関わる可能性について示したことは、喘息の病態

形成機序を解明するうえで重要であると考え。今後の展望としては、気道粘膜で局所的に産生されるレプチンが喘息の病態に直接関与する可能性を解明すると同時に、既存の喘息治療薬がレプチンによる気道炎症をどのように修飾するか検討し、将来的にはレプチンによる気道炎症を標的とした新規喘息治療薬の開発につなげていきたいと考えている。