

論文の内容の要旨

論文題目 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の喘息抑制効果に関する研究

氏名 細木 敬祐

気管支喘息は、気道の慢性炎症で特徴づけられ、気流制限の強度とともに臨床症状が変化する。発症の危険因子には遺伝的素因と環境因子の両者が存在する。昨今、種々の遺伝子多型との相関が解明されている。他方、環境因子の種類としては、アレルギーや気道感染のみならず、食事、肥満、ストレス、喫煙などが挙げられる。後天的な要因が個体へ影響を及ぼすメカニズムには、エピジェネティクス：DNAの塩基配列変化を伴わない遺伝子発現の多様性、の関与が指摘されている。気管支喘息には、ステロイド依存性および抵抗性の患者群が存在する。特に気道のリモデリングはステロイドによる制御が困難な病態であり、非可逆的な気道狭窄を生じ、気道過敏性が亢進する。エピジェネティクスの研究は、ステロイド抵抗性を克服し、リモデリングを制御しうる手段としても期待がもたれている。

本研究ではヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤を用い、喘息の治療応用への可能性を探究した。検証に用いる薬剤としては、実臨床で使用され、ヒトに対して一定の安全性が証明されている Suberoylanilide hydroxamic acid（SAHA）を選択した。SAHAは、皮膚T細胞性リンパ腫における皮膚症状の治療を適応としてFDAが認可し、我が国でも承認されている薬剤である。

まず我々は、Th2細胞が司る獲得免疫応答へ及ぼすSAHAの効果を、アレルギー特異的な気道炎症モデルマウスを用いて分析した。BALB/cマウスに対して、卵白アルブミン（OVA）とAlumを併用した腹腔内感作後にOVAを5日間連続で吸入させ、特異的IgE・気道への好酸球浸潤・気道上皮の杯細胞化生が誘導されるマウスモデルを作製した。SAHAを投与する群には、OVAを吸入させる1時間前にSAHAを腹腔内投与した。

次に、気道リモデリングへ及ぼす影響を検証した。リモデリングの形成過程では、TGF- β が上皮基底膜下の線維芽細胞に作用し、細胞外マトリックスの産生を促すことが知られている。線維芽細胞の起源については諸説あるものの、喘息では上皮間葉転換（epithelial-mesenchymal transition：EMT）の関与が明らかになっている。過去のリモデリングの研究では、マウスモデルの気道構造やステロイド反応性が、実際の喘息患者とは異なるという問題点も指摘されている。そのため本実験では、ヒト由来の気道上皮を用いたEMTモデルの分析により、SAHAの効果を評価した。ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞であるA549に対し、TGF- β_1 とTNF- α による共刺激でEMTを出現させ、SAHAの追加投与による遺伝子発現の変化を分析した。

さらに我々は、喘息における自然免疫応答の側面にも注目した。病原体の侵入門戸となる気道上皮は、細胞膜に Toll-like receptors (TLRs) を発現することで、喘息の病態形成に関わる。ヒトの喘息において、ダニは主要なアレルゲンに挙げられる。気道上皮へ直接作用し、TLR4 のほか TLR2 リガンド刺激により、nuclear factor-kappa B (NF- κ B) シグナルや mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を活性化し、IL-6 等の炎症性サイトカインが産生される。IL-6 は、ナイーブ T 細胞の Th2 細胞への分化を促進する作用を有し、獲得免疫系との連携に関わるサイトカインである。我々は、正常ヒト気管支上皮細胞 (NHBE) をコナヒョウダニ虫体由来粗抗原 (Df-b) で刺激したモデルを作製し、自然免疫系へ及ぼす SAHA の効果を検証するモデルとして使用した。

第一のアレルギー性気道炎症モデルマウスの分析により SAHA は、OVA 特異的 IgE、好酸球性気道炎症、および気道上皮の杯細胞化生を抑制することが確認された。一連の結果に基づくと、SAHA の作用機序は Th2 細胞の抑制にあると推定される。Th2 細胞を抑制しうる候補の中で、制御性 T 細胞を誘導する傾向は、SAHA を投与した群で示されなかった。同群については、肺組織標本の定量評価で粘液産生細胞の減少が見出されたが、その一方で BALF 上清中の IL-13 には有意な抑制が認められなかった。

そこで、Th2 細胞への分化を促進し、かつ気道疾患の粘液過分泌を引き起こしうる増悪因子として、我々は IL-6 に焦点を当てた。ヒトでも喘息患者の BALF 中の IL-6 は、アレルゲンの吸入後に増加することが報告されている。IL-6 は、転写因子である nuclear factor of activated T cells (NFAT) c2 や c-Maf を介し、Th2 細胞の分化を促進することが明らかになっている。本実験では、SAHA を投与した群で BALF 中の IL-6 が低下した結果より、同サイトカインの抑制が病態の改善に寄与したと推定された。

喘息の EMT を想定する A549 のモデルを用いた第二の実験では、TGF- β による *E-CADHERIN* の遺伝子発現の抑制が SAHA の投与によって回復し、間葉系マーカーである *VIMENTIN* の発現誘導が抑制された。マウスの実験で杯細胞化生に及ぼす影響を確認したが、EMT はステロイドによる予防がさらに困難な、リモデリングの病態と考えられている。本実験より、ステロイド抵抗性を改善しうる効果が SAHA に示された。

TGF- β は、転写調節因子である *SNAIL* を誘導することで、上皮系マーカーの遺伝子発現を抑制し、間葉系マーカーの発現を促進する。*SNAIL* が *E-CADHERIN* 遺伝子の promoter 領域へ結合する際に、HDAC1/2 をリクルートし、転写を抑制することが明らかになっているため、本実験ではこれらの HDAC を阻害する機序が推定された。

第三の、ダニが誘発する上皮の自然免疫応答のモデルでは、SAHA と Df-b による細胞毒性を事前に評価した。細胞生存率と、培地中へ放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定後、それらの結果に基づく濃度の SAHA と Df-b で NHBE を刺激し、培養上清中のタンパク質を定量分析した。細胞生存に影響を与えない濃度の SAHA は、気道上皮細胞の産生する IL-6 および *FIBRONECTIN* を抑制することが見出された。

Fibronectin は、上皮下に沈着した細胞外マトリックスを構成する糖タンパク質であり、

気道狭窄を増悪させる。EMT の過程では上皮の遊走を促進するため、Fibronectin は気道リモデリングの指標と見なされる。本実験から、TLR を介した自然免疫応答による気道炎症やリモデリングに対し、SAHA の有効性が示された。

上皮における IL-6 と Fibronectin の産生には、共通の転写因子として NF- κ B や activator protein 1 (AP-1) が報告されている。NF- κ B に関しては p65 に存在するリジンがアセチル化を受けると、転写活性が低下し、DNA との結合が減弱するという知見が存在する。HDAC 阻害剤は、NF- κ B の活性を抑制する手段になりうると考えられている。一方、抗炎症作用としての MAPK 経路への関与は、上皮を用いたこれまでの HDAC 阻害剤の報告の中では明らかにされていない。それゆえ本実験では、HDAC 阻害剤による NF- κ B の制御機序が示唆された。

もとより、喘息や慢性閉塞性肺疾患に関するヒストンアセチル化修飾の研究は、ステロイド治療と結び付けられることが多かった。ヒストンのアセチル化に際しては、アセチル化の標的となるリジン残基の違いにより、炎症性サイトカインの遺伝子とステロイド応答性の遺伝子発現が誘導される。さらにヒストンのほかにも、NF- κ B 等の非ヒストンタンパク質に対し、HAT と HDAC は機能調節を担う。したがって、気道炎症へ及ぼす HDAC 阻害剤の効果については、過去の文献の中でも相反する見解が存在し、議論の余地が残されている。

本研究から、血液腫瘍領域で実用化されている SAHA は、喘息の病態を効果的に制御する潜在性を有することが示された。喘息は均一な疾患ではないため、薬剤効果の有無は多方面から検討していく必要がある。HDAC を治療ターゲットとするにはさらなる分子機構の解明が必須となるが、その基盤として期待できる結果であった。