

## 論文の内容の要旨

論文題目：トランスクリプトーム解析によるヒト肺線維芽細胞における IL-13 シグナリングの  
解明

氏名：竹島 英之

### 【背景・目的】

気管支喘息は、生活の質を低下させる慢性気道疾患であり、時には致死的である。約 10%を占める重症気管支喘息患者の気道では、持続するアレルギー性気道炎症および反復性の気道収縮によって気道リモデリングが引き起こされ、平滑筋細胞の増生、線維芽細胞の活性化および上皮の線維化を特徴とする。抗炎症薬による治療では不十分であり、気道リモデリングを標的とした新規治療の開発が必要とされている。健常者や軽症の気管支喘息患者と比較して持続性の気管支喘息患者の気道において線維芽細胞数の増加が観察され、気管支拡張薬投与前後の一秒量が気管支喘息患者の線維芽細胞の数と負に相関しており、線維芽細胞が気道の粘膜下領域に侵入することで気道リモデリングにおいて重要な役割を果たすことが示唆されている。

肺線維芽細胞が活性化されると細胞外マトリックスの分解または産生だけでなく、好酸球を気道へ誘導するエオタキシンなどのケモカインを産生供給することで気道リモデリングに進展していく。Chemokine (C-C motif) ligand 26 (CCL26: エオタキシン-3)は好酸球を誘導し活性化し、持続性気管支喘息において重要な役割を果たす。したがって CCL26 を標的とすることは従来の治療に不応であった好酸球性の気管支喘息患者の治療に役立つ可能性がある。

Interleukin-4 (IL-4)、IL-5、IL-13 などの Th2 サイトカインはアトピー性疾患との関連性との報告がなされており、気管支喘息の病因に重要な役割を果たしている。特に IL-13 は IgE 合成、好酸球の誘導、気道上皮における粘液産生や剥離、平滑筋の肥大、線維芽細胞の活性化を制御し、気道リモデリングとの関連が示唆されている。IL-13 は受容体と結合すると Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6)をリン酸化する。活性化された STAT6 は二量体を形成して核内に移行し、好酸球性の気道炎症を誘導する CCL26 などの転写を促進させる。また、抗 IL-13 モノクローナル抗体が気道リモデリングを伴うような重症気管支喘息の治療として注目されており、肺線維芽細胞における IL-13 シグナル伝達が気道リモデリングの重要なメディエーターおよび治療標的となりえる。

Suppressor of cytokine signaling (SOCS)ファミリーの 1 種であるサイトカイン誘導性 SH2 含有タンパク質 (CISH)はネガティブ・フィードバックの調節因子としてサイトカインの作用を抑制しているが、気管支喘息における CISH の役割は明らかでない。

以上より、今回我々は気管支喘息のリモデリングにおいて重要な役割を果たす線維芽細胞と IL-13 を用いて、IL-13 シグナリングにて変動する遺伝子群を網羅的な解析により同定し、喘息の気道炎症や気道リモデリングに影響を与えるような因子、治療ターゲットの候補や新たなバイオマーカーの候補となるような因子を探索することを目的とした。

#### 【方法・結果】

肺線維芽細胞での IL-13 刺激によるトランスクリプトームの変化を Agilent SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v3 を用いて解析した。IL-13 刺激の 1、4、24 時間後にそれぞれ 309、316、387 種類の遺伝子の発現が 2 倍以上上昇し、307、387、541 種類の遺伝子の発現が半分以上に低下していた。canonical pathway 解析にて IFN シグナルが 1 時間後、24 時間後において強力に抑制され、エオタキシンファミリーを含むケモカインシグナルは IL-13 刺激の 1 時間後に有意に亢進していることが明らかになった。upstream regulators 解析では正の制御因子として IL-13 を認め、負の制御因子として IFN シグナル関連の制御因子を認めた。disease and bio functions 解析では好酸球やリンパ球の活性化と相関があることが確認された。これにより IL-13 に刺激された肺線維芽細胞がケモカインファミリーを産生し、好酸球を含めた炎症細胞を気道に誘導している可能性が示された。IL-13 刺激の 24 時間後に発現が亢進していた 387 個の遺伝子と、51 名の気管支喘息の気道生検データにて IL-13 の発現と強い相関を有していた 215 個の遺伝子と比較したところ、SOCS ファミリーの 1 つである CISH や好酸球を誘導するケモカインである CCL26 を含む 11 個の遺伝子が共通して認められた。実際に気管支喘息患者の気道組織において CISH と IL-13 との間に強い相関が認められた。SOCS ファミリーのうち CISH は IL-13 によって強く発現の亢進を認め、エオタキシンファミリーの中で CCL26 は IL-13 により強く誘導された。以上より、CISH は肺線維芽細胞における IL-13 シグナルの重要な制御因子である可能性が示唆された。

次に CISH、SOCS1、CCL26 遺伝子の発現変化を定量的 RT-qPCR によって検証した。マイクロアレイの結果と同様に IL-13 刺激の 1 時間後に CISH、SOCS1 の発現が最大となり、CCL26 の発現は 24 時間後まで増加することが示された。また、CISH および SOCS1 の上昇は、ウエスタンブロットによってタンパク質レベルでも確認された。ELISA により IL13 が CCL26 を強力に誘導することをタンパク質レベルで確認した。

次に IL-13 によって刺激された肺線維芽細胞における STAT6 のリン酸化と CISH と CCL26 の誘導におけるその役割を検討した。STAT6 のリン酸化は IL-13 刺激の 30 分後に最も増強され、STAT6 の siRNA を用いたノックダウンにより mRNA レベル、タンパク質レベルにおける CISH および CCL26 の IL-13 誘発性発現が著明に減少した。以上より、IL-13 は肺線維芽細胞における STAT6 シグナル伝達を介して CISH および CCL26 の発現を誘導していることが明らかになった。

CCL26 の発現における CISH の役割を調べるために、loss of function として siRNA により CISH をノックダウンした。CISH の siRNA を用いたノックダウンにより、IL-13 刺激の 24 時間後における CCL26 の発現は mRNA レベルで有意に上昇し、ELISA でも IL-13 誘導性の CCL26 の産生がタンパク質レベルでも増強されることが分かった。次に、gain of function として発現ベクターで

ある pCMV6-CISH を肺線維芽細胞へトランスフェクションし、CISH の過剰発現を行った。CISH を過剰発現させた肺線維芽細胞を IL-13 で刺激したところ、IL-13 により誘導される CCL26 産生が減弱している事が確認できた。以上より CISH は肺線維芽細胞における IL-13 誘導性の CCL26 の産生における重要な制御因子であることが分かった。

気管支喘息患者における CISH の発現の臨床的意義を、公開データベースからの遺伝子発現プロファイルを入手し検討した。56 名の気管支喘息患者の喀痰の遺伝子発現プロファイルでは、気管支喘息患者の肺組織の解析と同様に喀痰中の CISH 発現が IL-13 発現と強く相関していた。これは CISH が組織だけでなく喀痰レベルでも上昇する可能性があることを示唆している。次に、17 名の好酸球性気管支喘息患者および 30 名の非好酸性気管支喘息患者からの喀痰の遺伝子発現プロファイルを比較した。CISH の発現は好酸球性気管支喘息患者の喀痰において、非好酸性気管支喘息患者の喀痰より有意に高く、好酸球性喘息患者では Th2 優位の好酸球性炎症となり IL-13 に関連して CISH の発現が誘導されている事が示唆された。最後に、86 名の気管支喘息患者からの気管支肺胞洗浄液の遺伝子発現プロファイルより、CISH の発現と BA の疾患重症度との関連を評価した。重症気管支喘息患者からの気管支肺胞洗浄液の CISH 発現は、健康な対照群または中等度の気管支喘息患者と比較して有意に高かった。以上より、CISH は新たなバイオマーカーあるいは治療ターゲットの候補となりうる可能性が示唆された。

#### 【結論】

CISH は肺線維芽細胞における IL-13 シグナル伝達経路の制御における重要な分子であり、CISH の制御不全により CCL26 などのケモカイン産生が増強され喘息における気道リモデリングが進展する可能性がある。CISH の機能増強は、気道リモデリングのための新しい治療法の選択肢になる可能性がある。