

論文の内容の要旨

論文題目: 気道平滑筋細胞からの periostin 産生機序の検討

氏名 榎田 広佑

【背景・目的】

気管支喘息は繰り返す咳、喘鳴、呼吸苦、さまざまな程度の気流閉塞といった特徴をもつ慢性気道炎症性疾患である。吸入ステロイドの普及に伴い、喘息死は減少しているが、吸入ステロイドでも病勢コントロールができず、難治性の病態となる難治性喘息が問題であり、喘息死と関連している。慢性的な気道炎症により、気道上皮下基底膜の線維化、杯細胞の過形成、筋線維芽細胞の増生、気道平滑筋細胞の肥大・増生を特徴とする気道リモデリングが惹起される。その中でも気道平滑筋細胞は、サイトカイン・ケモカインの産生により気道炎症を惹起する働きや、肥大・増生により呼吸機能の低下が知られていることから気道リモデリングに重要な役割を果たしていると考えられる。

気道リモデリングに関与するサイトカインの中でも、特に CD4 陽性 T リンパ球のうち、T helper (Th) type 2 細胞より産生される Interleukin (IL)-13 は重要である。IL-13 は好酸球の気道への浸潤を惹起し、気道過敏性亢進、気道過分泌に関与するとともに、気道リモデリングにおいても中心的な役割を担っている。

IL-13 により気道上皮や線維芽細胞から産生される periostin という分子がある。Periostin は細胞外マトリックスタンパク質として、骨膜や心臓弁、歯周靭帯などに発現し、他の細胞外マトリックスと結合することによる組織構築の維持や線維化における役割を果たしている。近年、気管支喘息患者における血清 periostin 濃度が健常者と比較し高値であることが知られ注目を集めている。また、periostin が好酸球を遊走させ、自身がマトリセルラータンパク質として気管支喘息患者の基底膜上皮下に沈着が認められることから、気道リモデリングに密接に関連していると考えられている。

このように、気道平滑筋、IL-13、periostin は気道リモデリングに深く関与しており、相互に関係していることが示唆されるが、periostin の主要な産生細胞として報告があるのは、気道上皮細胞や肺線維芽細胞であり、気道平滑筋細胞が periostin を産生するかどうかに関して報告例はない。加えて、periostin 産生の細胞内シグナル伝達に関しても、報告例は少なく、気道平滑筋細胞における報告例はない。本研究では、気道リモデリングに重要な役割を担う気道平滑筋細胞と periostin に着目し、Th2 型サイトカインである IL-13 による気道平滑筋細胞からの periostin 産生およびその機序を検討した。

【方法・結果】

ヒト気道平滑筋を用いて IL-13 刺激による periostin の産生を評価した。はじめに、今回使用した passage6-10 の気道平滑筋細胞が平滑筋としての特性を保持しているか確認するため、western blot にて α -smooth muscle actin の発現を評価した。気道平滑筋細胞 passage 6-10 のいずれの細胞においても α -smooth muscle actin の発現を確認した。次に、IL-13 刺激による periostin mRNA の発現を検討した。気道平滑筋細胞を IL-13 (10 ng/ml) の濃度で刺激し、0, 4, 8, 12, 24, 48 時間後の periostin mRNA の発現を定量的 PCR にて評価した。periostin mRNA の発現はコントロールと比較し、24 時間後以降に有意に亢進した。次に、IL-13 を 1, 10, 100 ng/ml の濃度に設定し、IL-13 刺激後 24 時間の periostin mRNA の発現を評価した。Periostin mRNA の発現は無刺激群と比較し、IL-13 の濃度が 10, 100 ng/ml で有意に亢進していた。最後に、IL-13 刺激による periostin タンパクの産生を ELISA で検討した。気道平滑筋細胞を IL-13 で刺激し、24 時間後、48 時間後での培養上清中の periostin タンパク濃度を測定した。24 時間後、48 時間後で濃度は有意に上昇しており、各々 288 ± 19 ng/ml、 808 ± 46 ng/ml であった。IL-13 刺激により periostin mRNA、periostin タンパクいずれも上昇することを確認し、IL-13 により気道平滑筋細胞から periostin が産生されることを明らかにした。

次にステロイドが periostin 産生に与える影響について検討した。Dexamethasone を IL-13 刺激 1 時間前に投与し、培養上清中の periostin タンパクを ELISA で測定し、periostin タンパク産生が抑制されることを示した。

続いて、気道平滑筋細胞での IL-13 による periostin 産生の細胞内シグナリングを検討した。IL-13 によるシグナル伝達は、IL-13 受容体 $\alpha 1$ を介して行われるため、受容体の発現を western blot で確認した。続いて、IL-13 によるシグナル伝達で重要な、JAK/STAT6 経路、ERK 1/2 経路、PI3K/Akt 経路の関与について検討した。JAK/STAT6 経路の関与について、STAT6 リン酸化阻害薬(AS1517499)および STAT6 を標的とした siRNA を用いて検討した。STAT6 リン酸化の阻害および STAT6 をノックダウンすることで periostin 産生が減弱することを確認した。次に ERK 1/2 経路の関与について、MEK 阻害薬(U0126)を用いて検討した。MEK 阻害薬により ERK のリン酸化は有意に阻害され、periostin 産生についても control と同程度まで抑制されることを確認した。続いて、PI3K/Akt 経路の関与について、PI3K 阻害薬(LY294002)を用いて検討した。PI3K 阻害薬により Akt のリン酸化は有意に阻害され、periostin 産生についても ERK 阻害薬を用いた際と同様に、control と同程度まで産生が抑制されることを確認した。以上より、periostin 産生の細胞内シグナリングには JAK/STAT6 経路、ERK 1/2 経路、PI3K/Akt 経路が関与していることを明らかにした。

最後に、上記に挙げた経路以外にも periostin 産生に関わる経路が存在する可能性を考慮し、IL-13 刺激により活性化される遺伝子および pathway を探索するため、次世代シーケンサーによる網羅的解析を行った。IL-13 刺激後 0h, 12h, 24h, 48h の RNA を抽出し、解析した。RNA シークエンスデータの解析により 13031 個の発現変動遺伝子がマッピングさ

れた。control と比較し 12 時間後、24 時間後、48 時間後の発現変動遺伝子の分布を MA プロットで明らかにするとともに、階層的クラスタリングにより periostin 遺伝子がいずれの時間においても control と比較し 2 倍以上に発現が亢進しており、経時的に増加していたことが明らかになった。また、pathway 解析においては、IL-13 刺激後 48 時間後に発現変動する pathway として、先に検討した MAPK pathway や PI3K/Akt pathway 経路にかかわる遺伝子の発現が亢進していることが確認された。その他 periostin 産生に関わる可能性のある経路を示した。

【結論】

ヒト気道平滑筋細胞から IL-13 刺激により periostin mRNA の発現およびタンパクの産生が誘導されることを見出した。次に dexamethasone が、periostin タンパク産生を減少させることを明らかにした。さらに、阻害薬や siRNA を用いて、IL-13 が JAK/STAT6 経路、ERK 1/2 経路、PI3K/Akt 経路を介して、periostin を産生することを明らかにし、最後に RNA シークエンスを用いた網羅的解析を行い、IL-13 刺激後 48 時間後に MAPK や PI3K/Akt 経路にかかわる遺伝子発現が活性化していることを明らかにするとともに、periostin 産生に関わる候補となる経路を示した。

気道平滑筋細胞は IL-13 刺激により periostin の産生を亢進させることで気道リモデリングに関与している可能性が示唆された。