

論文要旨

Activation of PI3K-Akt pathway mediates antiapoptotic effects of beta-adrenergic agonist in airway eosinophils.

〔βアドレナリン刺激薬は PI3K-Akt の経路を活性化することにより
気道由来の好酸球に対する抗アポトーシス効果を示す〕

町田 健太郎

【序論および目的】

好酸球性気道炎症は気管支喘息の特徴の一つであり、炎症の程度と重症度は相関することが報告されている。

βアドレナリン刺激薬は強力な気管支拡張作用を有し、気管支喘息発作時の第一選択薬として使用されている。しかし一方で、喘息患者でのその過剰使用は好酸球性気道炎症、気道過敏性亢進やアレルギーによる気道の反応性を増悪させることが報告されているが、その機序は明らかにされていない。気道炎症の終息にはアポトーシスが関与しており、βアドレナリン刺激薬は末梢血好酸球のアポトーシスを減少させることが報告されている。

β₂刺激薬の好酸球性気道炎症に及ぼす影響に注目し、気道由来好酸球のアポトーシスへの作用、その細胞内シグナル伝達系について検討した。

【材料および方法】

6～8週齢の雄の BALB/c マウスを卵白アルブミン (OVA) で感作後、OVA を反復吸入させ好酸球性気道炎症を誘導した。最終抗原暴露より 48 時間後に気管支肺胞洗浄 (BAL) を施行し、好酸球を高純度で分離した。

分離した好酸球を *in vitro* で、βアドレナリン刺激薬 (isoproterenol、formoterol)、アデニル酸シクラーゼ活性化剤 (forskolin)、膜透過型 cAMP アナログ (8-bromoadenosine-cAMP)、抗マウス Fas モノクローナル抗体 (Jo-2)、GM-CSF でそれぞれ刺激し、24 時間インキュベート後に好酸球アポトーシスに対する効果を検討した。

isoproterenol 投与 30 分前に、アデニル酸シクラーゼ阻害薬 (2', 5'-dideoxyadenosine DDA) で前処置し、isoproterenol が好酸球アポトーシスに及ぼす効果に対する影響を検討した。

更に phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)、Akt、mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) の生存シグナルの関与について、PI3K 阻害薬 (wortmannin、LY-294002)、Akt 阻害薬

(1-L-6-hydroxymethyl-chiro-inositol 2-(R)-2-O-methyl-3-O-octadecylcarbonate)、MEK 阻害薬 (PD-98059) でそれぞれ前処置後に、isoproterenol で刺激し、24 時間インキュベート後に好酸球のアポトーシスへの影響を検討した。

フローサイトメトリーにて annexinV と propidium iodide を指標として好酸球のアポトーシスを検討

した。

生細胞の細胞膜の内側にはフォスファチジルセリンが局在しているが、アポトーシスを起こした細胞においては、アポトーシスのかなり早期に、この細胞内に局在していたフォスファチジルセリンが細胞外側に表出されることが認められている。annexin Vはフォスファチジルセリンと高い親和性を有しており、あらかじめ FITC で標識した annexin Vを反応させることによりアポトーシスを検出した。annexin V陽性、propidium iodide 陰性の細胞をアポトーシス細胞とした。

Isoproterenol 刺激による Akt、Forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) のリン酸化を western blot で検討した。更に PI3K の関与について、wortmannin で前処置し同様に Akt、FKHR のリン酸化を検討した。

【結果】

OVA で感作、暴露し好酸球性気道炎症を誘導した気管支喘息マウスモデルの BAL 液より分離した気道由来好酸球は、培養液単独でインキュベートすると時間依存性にアポトーシス細胞の増加を認めた。

β アドレナリン刺激薬である isoproterenol、formoterol は容量依存性に気道由来好酸球のアポトーシスを抑制した。更に、isoproterenol は Fas 受容体活性化によって誘発されるアポトーシスも抑制した。

β アドレナリン刺激薬はアデニル酸シクラーゼを活性化し細胞内の cAMP を増加させることによりその薬理作用を示すが、膜透過型の cAMP (8-Br-cAMP)、アデニル酸シクラーゼ活性化作用を示す forskolin による刺激においても好酸球のアポトーシスは抑制された。アデニル酸シクラーゼ阻害薬 (DDA) で前処置すると、isoproterenol の抗アポトーシス効果は阻害された。

PI3K 阻害剤である wortmannin と LY-294002、Akt 抑制剤である 1-L-6-hydroxymethyl-*chiro*-inositol-2-(R)-2-O-methyl-3-O-octadecylcarbonate は、isoproterenol による好酸球の抗アポトーシス効果を阻害したが、MEK 抑制剤である PD-98059 は、isoproterenol による好酸球の抗アポトーシス効果を阻害しなかった。wortmannin は、cAMP による好酸球の抗アポトーシス効果も阻害した。

isoproterenol は、気道由来好酸球において Akt と FKHR のリン酸化を誘導した。isoproterenol による Akt と FKHR のリン酸化は、wortmannin の前処置にて抑制された。

【結論及び考察】

β アドレナリン刺激薬は、無刺激、及び、抗 Fas 抗体によって誘導されるマウス気道由来好酸球のアポトーシスを抑制した。

β アドレナリン刺激薬による好酸球アポトーシス抑制の細胞内シグナル伝達系として、アデニル酸シクラーゼを活性化することによる細胞内 cAMP 濃度の上昇、PI-3kinase の活性化を介した Akt、FKHR のリン酸化が関与していると考えられた。

β アドレナリン刺激薬は好酸球のアポトーシスを抑制することにより、気道局所での好酸球寿命を遷延化し、気道炎症の持続増悪をきたし、気道過敏性を悪化させる可能性が示唆された。

気道好酸球のアポトーシスシグナルの解明は、気道炎症に関する β アドレナリン刺激薬の副作用軽減や新たな治療法の開発に繋がる可能性があると考えられる。

論文審査の要旨

報告番号	医論第 1473	氏名	町田 健太郎
審査委員	主査	宮田 篤郎	
	副査	出雲 周二	黒野 祐一

Activation of PI3K-Akt pathway mediates antiapoptotic effects of beta-adrenergic agonist in airway eosinophils.

(βアドレナリン刺激薬は PI3K-Akt の経路を活性化することにより
気道由来好酸球に対する抗アポトーシス効果を示す)

吸入 β₂ 刺激薬のレギュラーユースによる過剰投与は喘息のコントロールを悪化させ、喘息死のリスクを高める可能性があることが指摘されている。しかし、その機序はわかっていない。今回の研究では、β₂ 刺激薬が気管支喘息の特徴の一つである好酸球性気道炎症に及ぼす影響に注目し、気道由来好酸球のアポトーシスへの作用、及び、その細胞内シグナル伝達経路を明らかにすることを目的としている。

本研究では、卵白アルブミン (OVA) で感作・暴露し、好酸球性気道炎症を誘導した喘息マウスモデルより気道由来の好酸球を分離し研究を行っている。高純度で分離した気道由来好酸球を βアドレナリン刺激薬 (isoproterenol) で刺激し in vitro で 24 時間インキュベート後に、好酸球の自発的なアポトーシス、および、抗 Fas 抗体によって誘導されるアポトーシスへの作用をフローサイトメトリーで検討している。アデニル酸シクラーゼの活性化、細胞内 cAMP の上昇による好酸球のアポトーシスへの作用を検討し、β₂ レセプターを介した作用であるかどうかを検討している。更に、βアドレナリン刺激薬 (isoproterenol) が示す好酸球のアポトーシス抑制作用への生存シグナル PI3K/Akt の関与を、PI3K 阻害剤 (wortmannin, LY-294002) 及び Akt 阻害剤 (1-L-6-hydroxymethyl-*chiro*-inositol 2-(*R*)-2-*O*-methyl-3-*O*-octadecylcarbonate) の前処置により検討し、Akt のリン酸化とその下流の因子である FKHR のリン酸化を western blot で検討している。

本研究で得られた新知見は以下の 3 点である。

1. βアドレナリン刺激薬は気道由来好酸球の自発的なアポトーシス、および、抗 Fas 抗体によって誘導されるアポトーシスを抑制した。
 2. βアドレナリン刺激薬による好酸球のアポトーシス抑制効果は、PI3K/Akt のシグナルを阻害剤でブロックすることにより消失した。
 3. βアドレナリン刺激薬は PI3K 依存性に Akt、FKHR をリン酸化した。
- 以上により、βアドレナリン刺激薬は生存シグナル PI3K/Akt を介して、気道由来好酸球のアポトーシスを抑制することが証明された。

本研究は、βアドレナリン刺激薬が気道由来好酸球のアポトーシスを抑制し好酸球の生存率を上昇させることを明らかにし、吸入 β₂ 刺激薬のレギュラーユースが喘息のコントロールを悪化させる機序の一端を明らかにした。さらに、その生存シグナルを明らかにしたことは、気道炎症に関する β₂ 刺激薬の副作用の軽減や喘息の新たな治療法の開発につながる可能性がある。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1473号	氏名	町田 健太郎
審査委員	主査	宮田 篤郎	
	副査	出雲 周二	黒野 祐一
<p>主査および副査の3名は、平成22年10月20日、学位請求者 町田 健太郎 に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 動物モデルを作成する際に、アジュバントとして水酸化アルミニウムを使用しているが、水酸化アルミニウムによって誘導されるアレルギー反応にはどのような特徴があるのか。 解答: アレルギーの研究でマウスモデルの作成にもっともよく用いられており、抗原特異的な Th2 細胞が誘導され、B 細胞は Th2 細胞由来の IL-4 の作用を受けて抗原特異的 IgE を産生する。</p> <p>質問2) このモデルではヒトの喘息と同じことが起こっているのか。組織学的にはどうか。 解答: ヒトの喘息と同様に気道過敏性の亢進を認める。組織学的にも好酸球の浸潤、杯細胞の過形成を認める。</p> <p>質問3) コントロールマウスの気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中に好酸球はどの程度含まれているのか。抗原で刺激すると好酸球のみが90%以上に増えるのか。 解答: コントロールマウスでは、BAL 中の細胞はほとんどがマクロファージで好酸球は認めない。抗原で刺激すると好酸球は60%位に増加する。マクロファージが30%、リンパ球が10%、好中球が1~2%程度であり、マクロファージをプラスチックに吸着させ除去し、更にフローサイトメトリーで顆粒球の分画にゲートをかけると好酸球が99%以上になる。</p> <p>質問4) BAL 中の好酸球は組織中の好酸球を反映しているのか。BAL 中の好酸球は活性化されているのか。BAL 中の好酸球増多は喘息の病態を反映しているのか。 解答: BAL 中の好酸球数と組織中の好酸球数は相関することがすでに報告されている。また、喀痰中や BAL 中に含まれる好酸球顆粒成分である major basic protein や eosinophil cationic protein は高値であることから BAL 中の好酸球は活性化されていると思われる。さらに、好酸球増多を伴う重症喘息に対して抗 IL-5 モノクローナル抗体療法を行うと急性発作の頻度が減少することから、BAL 中の好酸球は喘息の病態を反映していると考えられる。</p> <p>質問5) ディスカッションで肺の組織中で増殖する好酸球もあると述べているが、今回検討した好酸球は組織で増殖した好酸球なのか、それとも血液中から漏出してきた好酸球なのか。 解答: 今回の実験では検討していない。慢性好酸球性肺炎では末梢血と肺の好酸球では異なったアポトーシス反応を起こすことも報告されている。</p>			

質問6) アレルギー性鼻炎の重症度や過敏性と鼻汁中の好酸球は相関せず、組織中の好酸球数とのみ相関するが、喘息ではどうか。

解答：喘息では喀痰中や BAL 中の好酸球数が重症度や気道過敏性と相関することが報告されている。また、組織中の好酸球数と相関することも報告されている。

質問7) アポトーシスのピークが24時間となっているが、好酸球の寿命はもっと長いのではないか。

解答：ヒトの末梢血の好酸球を用いた実験では好酸球の寿命は6~8日位と報告されている。今回の実験では24時間がであったが、ヒトとマウスの違い、末梢血とBAL中の違いによるものと思われる。

質問8) 最終抗原暴露48時間後にBALを行っているが、下気道では抗原刺激後2日位してから好酸球が増えてくるのか。

解答：5日間連続で抗原暴露を行っており、好酸球の集積を見ていると思われる。最終抗原暴露直後より好酸球性炎症は認めており、この実験系では単純に好酸球数が増加しているのが48時間後であった。

質問9) この実験系でステロイドはどこに作用すると考えられるのか。

解答：デキサメサゾンで刺激すると、ほぼすべての細胞が数時間でアネキシンV陽性、プロピウムイオダイド陽性となり解析できなかった。ステロイドは強力に好酸球のアポトーシスを誘導すると考えられるが、シグナルについては検討していない。

質問10) Forkhead transcription factor のリン酸化以降はどのような機序が考えられるか。

解答：アポトーシス誘導因子である Bim や FasL の転写抑制や、SOD やカタラーゼの転写を制御し酸化ストレスと関与していることが報告されている。

質問11) 喘息の病態において、交感神経の活性化が関与しているのか。内因性の神経因子による β 受容体の刺激により喘息の病態が悪化することがあるのか。

解答：交感神経・副交感神経のバランスが喘息の病態に関与していると考えられる。気道上皮や気管支平滑筋に β 受容体が発現しているが血流を介した刺激により反応していると考えられる。

質問12) 内服や貼付剤の β 2刺激薬でも同様の影響があるのか。

解答：内服薬や貼付薬でも同様の影響があると思われる。臨床において抗炎症薬であるステロイドと併用することが勧められている。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・見識を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。