

により低下し、血清中の VEGF-D は診断だけでなく、今後期待される新しい治療法の効果判定にも有用であると考えられる⁴⁾⁵⁾。

結論

Th2 サイトカイン、bFGF、VEGF-D は LAM 患者の病態に関連していた。その中で血清中 VEGF-D は最も診断に有用であり、治療効果判定にも利用できる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Hayashida M, Seyama K, Inoue Y, et al. The epidemiology of lymphangioleiomyomatosis in Japan: a nationwide cross-sectional study of presenting features and prognostic factors. *Respirology* 2007;12:523-30.
- 2) Inoue Y, King TE Jr, Barker E, et al. Basic fibroblast growth factor and its receptors in idiopathic pulmonary fibrosis and lymphangioleiomyomatosis. *Am J Resp Crit Care Med* 2002;166:765-773.
- 3) Young L, Inoue Y, McCormack F. Diagnostic potential of serum VEGF-D for lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med* 2008;358:199-200.
- 4) 井上義一、小堂直彦、是枝幸子、前田優華、坂谷光則. LAM における LAM 細胞の増殖と組織破壊のシグナル：マスト細胞の関与をみる. 分

子呼吸器病 9: 414-419, 2005.

- 5) 大家晃子、井上義一. リンパ脈管筋腫症. In 工藤翔二、中田紘一郎、貫和敏博編. *呼吸器疾患の最新の治療 2007-2009*. 南江堂, P318-320. 2007.

培養ヒト正常気道上皮における IL-13 α_2 受容体による粘液産生制御

信州大学医学部内科学第一講座

田名部 毅 安尾 将法 花岡 正幸 久保 恵嗣

信州大学医学部保健学科検査技術科学専攻生体情報検査学講座

藤本 圭作

東北大学大学院医学系研究科先進感染症予防学寄附講座

山谷 睦雄

はじめに

粘液過剰産生および杯細胞過形成は、気管支喘息および COPD 患者の気道に認められる[1]。喘息死患者の気道では、粘液栓の原因となる著しい杯細胞過形成と粘液産生の増加を認める[2,3]。気管支喘息患者の粘液過剰産生に、Th2 サイトカインである IL-13 および IL-4 が関与している[4]。我々は、ヒト気道上皮細胞において IL-13 が MUC5AC 遺伝子過剰発現そして杯細胞過形成を誘導することを報告した[5]。

IL-13 は細胞表面の受容体に結合し、生物学的活性を発揮する。IL-13 には、IL-13 α_1 受容体と IL-13 α_2 受容体の二つの受容体が存在する。IL-13 α_1 受容体は IL-4 α 受容体とヘテロダイマーを形成し、IL-4 の受容体としての役割も担う[6]。ヒト気道上皮細胞において IL-13 α_1 受容体からの IL-13 シグナルは、JAK-STAT pathway を経由し、核内 NF κ B の活性化を介して MUC5AC 遺伝子が惹起される[7,8]。IL-13 α_2 受容体には膜型と可溶型の二つの受容体が存

在する[6,7]。IL-13 との親和性に関して、膜型 IL-13 α_2 受容体は IL-13 α_1 受容体と同等の親和性だが、可溶型 IL-13 α_2 受容体は IL-13 により高い親和性を持つ[7]。IL-13 α_2 受容体は、細胞内シグナルの伝達に関与せず、IL-13 シグナルの伝達をブロックするデコイ受容体として機能している可能性を指摘されている。

我々は、ヒト気道上皮細胞において IL-13 α_1 受容体を介した IL-13 シグナルが杯細胞過形成を誘導することを証明してきた[5]。しかし、IL-13 に誘導される杯細胞過形成における IL-13 α_2 受容体の役割は、不明である。ゆえに、本研究において我々は、ヒト気道上皮細胞において IL-13 に誘導される杯細胞過形成および粘液過剰産生における IL-13 α_2 受容体の役割について検討することを目的とした。

方法

(倫理面への配慮)

ヒト気道上皮細胞培養について信州大学医学部倫理委員会の承認を得て

行った。

(細胞培養)

肺癌および良性肺腫瘍により肺葉切除術を施行された患者 22 人 (平均 67 ± 3.6 歳、範囲は 35 から 80 歳まで) より気管支を採取、既報[5]に示すようにヒト気道上皮細胞の分離、培養を行った。細胞は 2 継代まで液相培養にて増殖させた後、Costar Transwell®内の insert に撒いて 7 日間で confluence とし Air-liquid interface 法にて気相培養して検討に用いた[9]。

(IL-13 刺激培養)

ヒト気道上皮細胞が confluence となった後、insert 下面に IL-13 [recombinant human (rh) IL-13, Biotec, Hamburg, Germany] を添加した培地をいれ気相培養を行った。培地は連日交換し、最大 21 日間培養した。IL-13 は既報[5]の至適濃度 10 ng/ml で用いた。

(IL-4 刺激培養)

IL-13 と同様に、IL-4 [rhIL-4, Peprotech, London, UK] を添加し気相培養を行った。IL-4 の濃度は、0.1, 1, 10 ng/ml にて用い、さらに vehicle(PBS)をおいた。

(IL-13 受容体中和抗体添加実験)

IL-13 に誘導される杯細胞過形成および MUC5AC 発現に対する、IL-13 α_1 受容体、IL-13 α_2 受容体中和抗体のプロッキング効果を検討した。IL-13[10 ng/ml]に、IL-13 α_1 受容体中和抗体 [10 μ g/ml, R & D Systems Inc., Minneapolis, MN,

USA] または、IL-13 α_2 受容体中和抗体 [2.5 μ g/ml, R & D Systems Inc.] を加え、最大 14 日間気相培養した。培地交換は連日行った。ネガティブコントロールとして、mouse IgG₁ isotype control antibody [10 μ g/ml, R & D Systems Inc.] を用いた。

(recombinant IL-13 α_2 受容体添加実験)

IL-13 に誘導される杯細胞過形成および MUC5AC 発現に対する、可溶性 IL-13 α_2 受容体の抑制効果を検討した。IL-13 [10 ng/ml]に、rh-soluble IL-13R α_2 /Fc [rsIL-13R α_2 , 0.04, 0.4, 4 μ g/ml] さらに vehicle(PBS) を加え気相培養した。培地交換は連日行った。

(リアルタイム定量 PCR)

MUC5AC および IL-13 α_2 受容体の mRNA 発現のタイムコースを検討するため、IL-13 で刺激して気相培養を行った 7 日目、14 日目、21 日目の細胞から RNA 抽出を行った。既報 [5, 10] に示すように、Isogen [Nippon Gene, Tokyo, Japan] で処理して、Transwell®内の insert より total RNA を抽出した。PCR には、各々の遺伝子に関してマッチングさせた primer と hybridization probe [Nihon Gene Research Lab's Inc., Sendai, Japan] を使用し、Light Cycler 3.5 software [Roche Diagnostics, Mannheim, Germany] にて解析した。

(組織学的解析)

既報 [5, 11, 12] に示すように、Transwell®より組織標本作製しPAS陽性細胞、杯細胞およびMUC5AC陽性細胞の細胞カウントを行った。各々の組織標本からランダムに長さ250 μ mの5つsiteを選択し細胞カウントを施行、これを6つの組織標本について行った。

(免疫組織学的解析)

MUC5AC蛋白およびIL-13R α_2 受容体に関して、免疫染色を行い解析した。一次抗体として、anti MUC5AC antibody [Lab Vision, Fremont, CA, USA]及びanti IL-13R α_2 antibody [R&D systems Inc.]を使用した。その手法の詳細については既報[13]を参照されたい。

(細胞上清および細胞溶解液中のIL-13 α_2 受容体蛋白の解析)

細胞上清および細胞溶解液中のIL-13 α_2 受容体蛋白を検出定量するためELISAを行った。細胞上清はTranswell®のinsert内の上面にPBSを添加することにより、また細胞溶解液はlysis bufferおよびprotease inhibitorを使用し採取した。また、ELISAにはHuman IL-13 soluble Receptor α_2 [human IL-13sR α_2] DuoSet ELISA development kit [R&D systems Inc.]を用いた。その手法の詳細については既報[13]を参照されたい。

(分泌MUC5AC蛋白の解析)

気道上皮細胞から分泌されるMUC5AC蛋白を解析するため、細胞上清中のMUC5AC蛋白のELISA

を行った。さらにこれらの分泌能に対するIL-13 α_1 、 α_2 受容体中和抗体、IL-4受容体中和抗体、さらにrecombinant可溶性IL-13 α_2 受容体の効果を検討した。ヒト気道上皮細胞がconfluenceとなった後、Transwell®のinsert下面にIL-13のみ添加した培地、IL-13に各種中和抗体、受容体を添加した培地、さらにvehicle(PBS)を添加した培地をいれ14日間気相培養を行った後検討した。細胞上清はTranswell®のinsert内の上面にPBSを添加することにより採取した。結果は既報[14]を参考に、vehicle(PBS)の結果を100%とした比(%)で表記した。ELISAの手法の詳細については、既報[13]を参照されたい。

(Western blot 解析)

IL-13 α_2 受容体蛋白および細胞内転写因子であるSTAT6、リン酸化STAT6(p-STAT6)についてWestern blot解析を行った。IL-13 α_2 受容体蛋白に関しては、気相培養を行った0日目、7日目、14日目、21日目の検体より、前述した方法で細胞上清および細胞溶解液を採取し解析に用いた。またpositive loading controlとしてrecombinant可溶性IL-13 α_2 受容体を使用した。STAT6、p-STAT6に関しては、IL-13およびIL-4単独と、これらにIL-13 α_1 中和抗体、recombinant可溶性IL-13 α_2 受容体を添加した検体、さらにvehicle(PBS)の細胞溶解液を検討に用いた。Western blotの手法の詳細

については、既報[13]を参照されたい。

結果

(IL-13 によって誘導される杯細胞過形成の経時的変化)

Fig.1 および Table1 に示すように、

IL-13 で刺激し気相培養を行った 7 日目、14 日目において総細胞数、PAS 陽性細胞数、杯細胞数、MUC5AC 陽性細胞数の増加を認めしたが、培養日数 day21 においてはこれらのいずれもコントロールレベル

Table 1.

Effect of IL-13 on the cultured NHBECs

Agents	Incubation time (days)	Total cells	PAS-positive cells	Goblet cells	MUC5AC-positive cells
PBS	7	28.3±0.7	1.7±0.6	0.0±0.0	0.0±0.0
	14	29.5±0.9	3.7±0.6	0.2±0.1	0.1±0.1
	21	28.7±1.6	2.2±0.6	0.1±0.2	0.1±0.1
IL-13	7	40.3±0.5*	28.7±0.9***	12.3±0.9***	27.0±1.1***
	14	40.3±0.7*	27.7±0.5***	19.5±1.2***	24.3±0.8***
	21	33.0±1.9	3.5±0.4	0.1±0.1	0.5±0.2

Values are the means±SEM from 6 samples. *p<0.05, ***p<0.001, vs. vehicle of IL-13 (PBS).

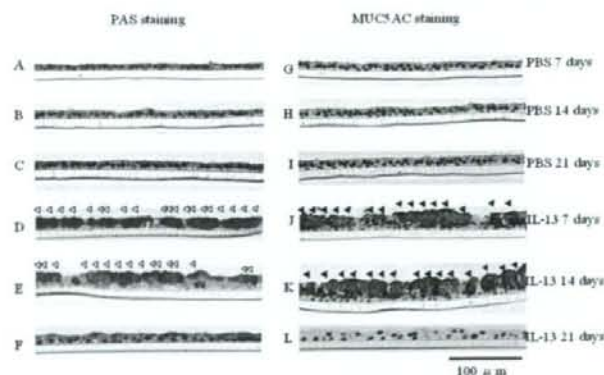


Figure 1

Fig.1.

Periodic acid-Schiff's (PAS) staining (A-F) and MUC5AC immunohistochemical staining (G-L) of normal human bronchial epithelial cells (NHBECs) incubated with IL-13 (10 ng/ml) (D-F, J-L) or vehicle (PBS) (A-C, G-I) for either 7 (A, D, G, J), 14 (B, E, H, K), or 21 days (C, F, I, L) at the air-liquid interface. White arrowheads show PAS-positive goblet cells (D, E). Black arrowheads show MUC5AC-positive cells (J, K). The goblet cells with secretory granules stained clearly with Periodic Acid-Schiff (PAS) staining method. On the other hand, there were also surface cells which did not have any goblet cell granules but were stained with PAS, PAS-positive-but-not-goblet cells. Bar=100 μm.

まで減少した。

(IL-13 によって誘導される杯細胞過形成における IL-13 受容体中和抗体および recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体の効果)

Fig.2 および Fig.3 に示すように、気相培養を行った 14 日目において IL-13 α_1 受容体中和抗体は、IL-13 により誘導される PAS 陽性細胞の数、杯細胞数、MUC5AC 陽性細胞数を減少させた。対照的に、IL-13 α_2 受容体中和抗体は、これらの細胞数のいずれも増加させた。さらに recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体

は、用量依存性にこれらの細胞数を減少させた。総細胞数は、IL-13 α_1 受容体中和抗体あるいは recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体により減少したが、IL-13 α_2 受容体中和抗体は総細胞数には変化を与えなかった。

一方、IL-4 で刺激し気相培養を行った 14 日目において総細胞数、PAS 陽性細胞数、杯細胞数、MUC5AC 陽性細胞数の増加を認めたが、IL-4 により誘導される PAS 陽性細胞の数、杯細胞数、MUC5AC 陽性細胞数は recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受

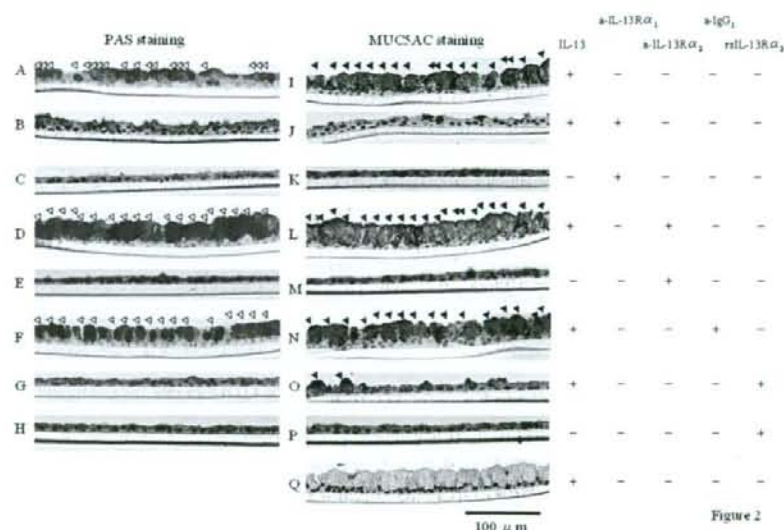


Fig. 2.

Periodic acid-Schiff's (PAS) staining (A-H) and MUC5AC immunohistochemical staining (I-P) of normal human bronchial epithelial cells (NHBECs) incubated at the air-liquid interface with IL-13 (10 ng/ml) (A, B, D, F, G, I, J, L, N, O, Q) or vehicle (PBS) (C, E, H, K, M, P) for 14 days in the presence of either anti-IL-13 α_1 antibody (10 μ g/ml) (B, C, J, K), anti-IL-13 α_2 antibody (2.5 μ g/ml) (D, E, L, M), anti-IgG₁ isotype control antibody (10 μ g/ml) (F, N) or recombinant human soluble IL-13 α_2 /Fc (rsIL-13 α_2 , 4 μ g/ml) (G, H, O, P). None of the cells were positive after treatment with IL-13 (10 ng/ml) in the absence of the 1st antibody (Q). White arrowheads show PAS-positive goblet cells (A, D, F). Black arrowheads show MUC5AC-positive cells (I, L, N, O). The goblet cells with secretory granules stained clearly with Periodic Acid-Schiff (PAS) staining method. On the other hand, there were also surface cells which did not have any goblet cell granules but were stained with PAS, PAS-positive-but-not-goblet cells. Bar=100 μ m.

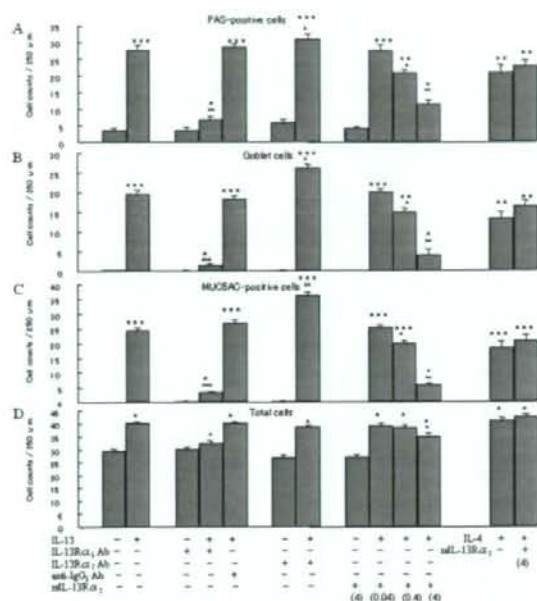


Figure 3

Fig. 3.

The number of periodic acid-Schiff's (PAS) staining positive cells (A, PAS-positive cells), goblet cells (B), MUC5AC staining positive cells (C, MUC5AC-positive cells) and total cells (D) of normal human bronchial epithelial cells (NHBECS) incubated with either IL-13 (10 ng/ml), IL-4 (1 ng/ml) or vehicle (PBS) for 14 days at the air-liquid interface, in the presence of either anti-IL-13R α_1 antibody (10 μ g/ml), anti-IL-13R α_2 antibody (2.5 μ g/ml), anti-IgG $_1$ isotype control antibody (10 μ g/ml) or recombinant human soluble IL-13R α_2 /Fc (rsIL-13R α_2 , 0.04, 0.4, or 4 μ g/ml). Results are the means \pm SEM from 5 different bronchi. Significant differences from PBS alone are indicated by * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001. Significant differences from IL-13 alone are indicated by + p <0.05, ++ p <0.01, and +++ p <0.001.

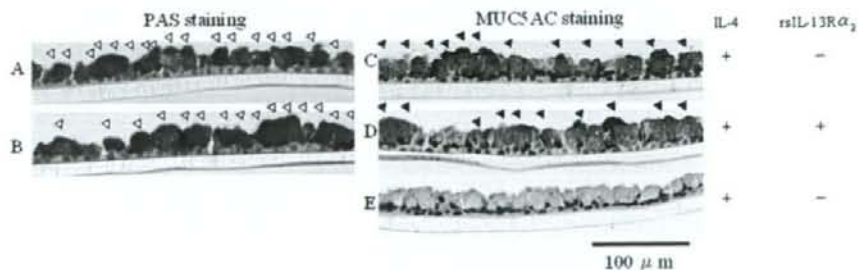


Fig. 4.

Periodic acid-Schiff's (PAS) staining (A, B) and MUC5AC immunohistochemical staining (C-E) of normal human bronchial epithelial cells (NHBECS) incubated at the air-liquid interface with IL-4 (1 ng/ml) (A-E) for 14 days in the presence of recombinant human soluble IL-13R α_2 /Fc (rsIL-13R α_2 , 4 μ g/ml) (B, D). None of the cells were positive after treatment with IL-13 (10 ng/ml) in the absence of the 1st antibody (E). White arrowheads show PAS-positive goblet cells (A, B). Black arrowheads show MUC5AC-positive cells (C, D). Bar=100 μ m.

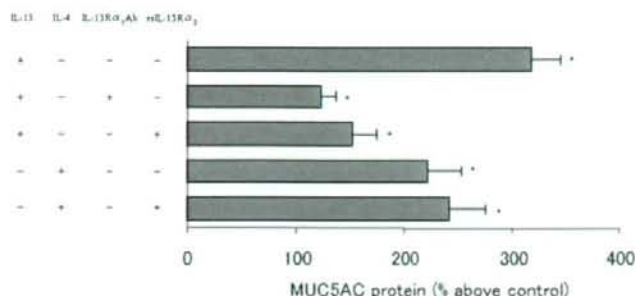


Fig. 5.

The MUC5AC protein concentrations in supernatants of NHBEs treated with IL-13 (10 ng/ml) or IL-4 (1 ng/ml) in the presence or absence of either anti-IL-13R α_1 antibody (10 μ g/ml) or recombinant human soluble IL-13R α_2 /Fc (rsIL-13R α_2 , 4 μ g/ml) for 14 days. Data are expressed as % above control vehicle (PBS). The results are the mean \pm SEM from 3 different bronchi. Significant differences from PBS alone are indicated by * p <0.05. Significant differences from IL-13 alone are indicated by † p <0.05.

容体により減少しなかった。

(IL-13 によって誘導される MUC5AC 蛋白分泌における IL-13 α_1 受容体中和抗体および recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体の効果)

Fig.5 に示すように、IL-13 および IL-4 で刺激し気相培養を行った 14 日目において、細胞上清中の MUC5AC 蛋白濃度は有意に上昇した。すなわち、正常ヒト気道上皮細胞において、IL-13 および IL-4 刺激により MUC5AC 蛋白が分泌されることが証明された。IL-13 α_1 受容体中和抗体および recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体は、IL-13 刺激によって誘導される MUC5AC 蛋白分泌を抑制した。一方、IL-4 刺激によって誘導される MUC5AC 蛋白分泌は recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体によって抑制されなかった。

(IL-13 によって誘導される MUC5AC および IL-13 α_2 受容体 mRNA 発現)

Fig.6 に示すように、IL-13 で刺激する前、MUC5AC mRNA 発現は感度以下であり、IL-13 α_2 受容体 mRNA 発現は少量であった。MUC5AC mRNA 発現量は、IL-13 で刺激し気相培養を行った 7 日目において有意に上昇し、21 日目にはベースラインの発現量に戻った。IL-13 α_2 受容体 mRNA 発現量は、7 日目において有意に上昇し、21 日目まで発現は持続した。

(MUC5AC mRNA 発現における IL-13 受容体中和抗体および recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体の効果)

Fig.7 に示すように、IL-13 で刺激し気相培養を行った 7 日目において IL-13 α_1 受容体中和抗体は、IL-13 に

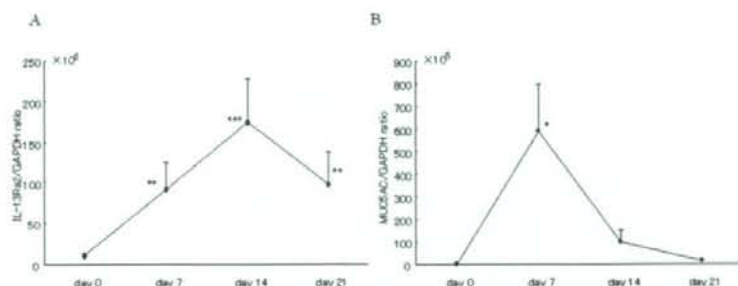


Fig. 6.

Figure 6

A and B: Time course of mRNA expression of MUC5AC (B) and IL-13R α_2 (A) in normal human bronchial epithelial cells (NHBEs) cultured with IL-13 (10 ng/ml). The results are the mean \pm SEM from 14 different bronchi. Significant differences from values on day 0 are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.005$.

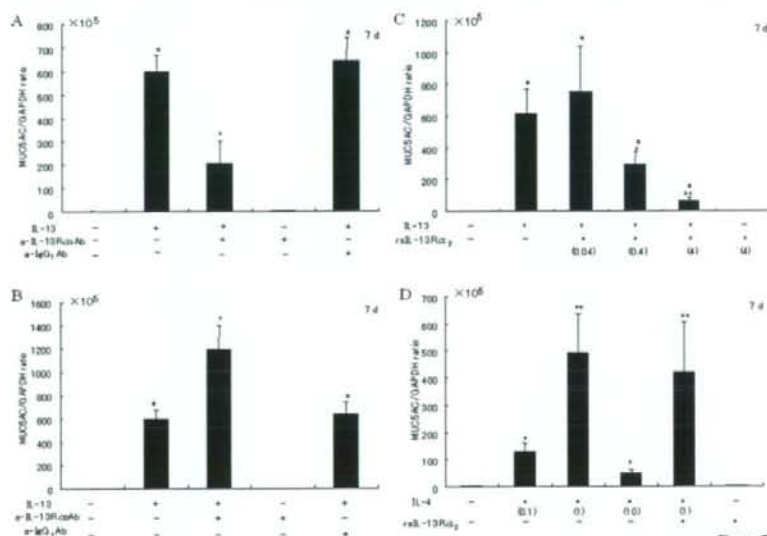


Figure 7

Fig. 7.

A and B: The amount of MUC5AC mRNA expression in NHBEs incubated with IL-13 (10 ng/ml) or vehicle of IL-13 (PBS) in the presence of anti-IL-13R α_1 antibody (10 μ g/ml) (A), anti-IL-13R α_2 antibody (2.5 μ g/ml) (B), anti-IgG $_1$ isotype control antibody (10 μ g/ml) or vehicle of antibodies (PBS) for 7 days. The results are the mean \pm SEM from 5 different bronchi. Significant differences from the vehicle of IL-13 (PBS) (Control) are indicated by * $p < 0.01$. Significant differences from IL-13 alone are indicated by + $p < 0.05$.

C: The amount of MUC5AC mRNA expression in NHBEs incubated with IL-13 (10 ng/ml) or vehicle of IL-13 (PBS) in the presence of recombinant human soluble IL-13R α_2 /Fc (rsIL-13R α_2 , 0.04, 0.4 or 4 μ g/ml) or vehicle of IL-13R α_2 (PBS) for 7 days. The results are the mean \pm SEM from 5 different bronchi. Significant differences from the vehicle of IL-13 (PBS) (Control) are indicated by * $p < 0.01$. Significant differences from IL-13 alone are indicated by + $p < 0.05$ and ++ $p < 0.01$.

D: The amount of MUC5AC mRNA expression in NHBEs incubated with IL-4 (10, 1 or 0.1 ng/ml) or vehicle of IL-4 (PBS) in the presence of rsIL-13R α_2 (4 μ g/ml) or vehicle of IL-13R α_2 (PBS) for 7 days. The results are the mean \pm SEM from 5 different bronchi. Significant differences from the vehicle of IL-4 (PBS) (Control) are indicated by ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$.

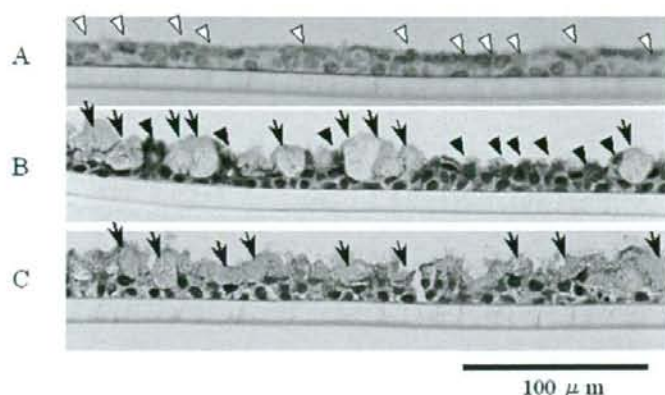


Fig. 8. Immunohistochemical staining of NHBEs for IL-13R α_2 proteins after exposure to PBS (A, vehicle of IL-13) or IL-13 (10 ng/ml) (B, C) for 14 days in the presence (A, B) or absence (C) of the first antibody. Weak staining of IL-13R α_2 protein (white arrowheads) was observed 14 days after adding the vehicle of IL-13 (PBS) (A). In contrast, the potency of IL-13R α_2 protein staining increased in NHBEs 14 days after adding IL-13 (10ng/ml) (B) with strong staining of IL-13R α_2 protein in some cells (black arrowheads). Arrows shows goblet cells (B,C). Bar = 100 μ m.

より誘導される MUC5ACmRNA 発現を減少させた。対照的に、IL-13 α_2 受容体中和抗体は、MUC5ACmRNA 発現を有意に増加させた。さらに recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体は、用量依存性に MUC5ACmRNA 発現量を減少させた。

一方、至適濃度である 1ng/ml の IL-4 で刺激し気相培養を行った 7 日目において、recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体は、MUC5ACmRNA 発現量に影響を与えなかった。

(IL-13 によって誘導される膜型 IL-13 α_2 受容体の発現)

Fig.8 に示すように、IL-13 で刺激し気相培養を行った 14 日目において IL-13 α_2 受容体の免疫染色を行ったところ、Vehicle(PBS)下で気相培養

を行った control 検体に比較して、濃染される結果を得た。IL-13 刺激により膜型 IL-13 α_2 受容体の発現が誘導されることが証明された。

(IL-13 によって誘導される可溶性 IL-13 α_2 受容体蛋白の発現)

Fig.9a に示すように、細胞上清中の IL-13 α_2 受容体蛋白は IL-13 刺激する前に比べ、IL-13 刺激し気相培養を行った 14 日目において有意に上昇し、21 日目まで持続した。一方、Fig.9b に示すように、細胞溶解液中の IL-13 α_2 受容体蛋白は IL-13 刺激する前から IL-13 で刺激した 21 日目まで発現量に変化を認めなかった。すなわち、細胞内に同定される IL-13 α_2 受容体蛋白量は IL-13 刺激により変化を認めなかったが、細胞外に同定される可溶性 IL-13 α_2 受容

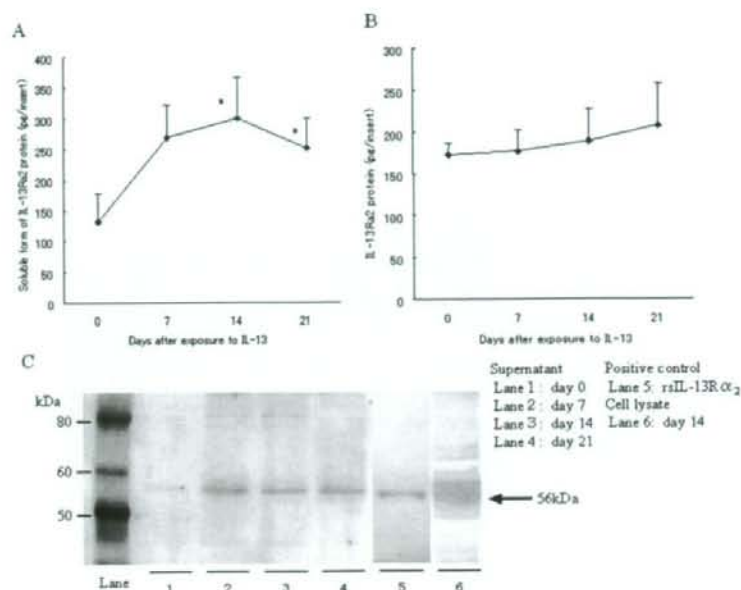


Figure 9

Fig. 9.

A: Time course of a soluble form of IL-13R α_2 proteins concentrations in supernatants of NHBE cells after adding IL-13 (10 ng/ml). The results are the mean \pm SEM from 4 different bronchi. Significant differences from values on day 0 are indicated by * $p < 0.05$.

B: Time course of IL-13R α_2 proteins in lysates of NHBEs after adding IL-13 (10 ng/ml). The results are the mean \pm SEM from 4 different bronchi.

C: A Western blot analysis of IL-13R α_2 protein in the culture supernatants (lane 1-4) and the cell lysates (lane 6) of NHBEs incubated with IL-13 (10 ng/ml) for 21 days. Lanes shows samples before (day 0, lane 1), and 7 days (day 7, lane 2), 14 days (day 14, lane 3 and lane 6) and 21 days (day 21, lane 4) after adding IL-13. The recombinant human soluble IL-13R α_2 /Fc (rsIL-13R α_2 , 100 ng) is immunoblotted as positive loading sample (lane 5). The arrow (56kDa) shows IL-13R α_2 . Data are representative of three different experiments.

体蛋白量は IL-13 刺激によって上昇した。

(IL-13 によって誘導される IL-13 α_2 受容体蛋白発現の Western blot 解析)

Fig.9c に示すように、細胞上清中の IL-13 α_2 受容体蛋白は IL-13 刺激する前に比べ、IL-13 刺激し気相培養を行った 7 日目、14 日目、21 日目のいずれにおいても発現量の上昇を認めた。細胞上清中、細胞溶解液中のいずれの IL-13 α_2 受容体蛋白も positive control として loading した

recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体と同様にバンドを検出した。

(STAT6 と p-STAT6 の Western blot 解析)

気相培養を行った 14 日目の気道上皮細胞の細胞溶解液を用いて、Western blot 解析を行った。Fig.10 に示すように、Vehicle(PBS)刺激では、活性化 STAT6(p-STAT6)を認めなかったが、IL-13 刺激し気相培養を行った 14 日目の細胞溶解液において p-STAT6 発現の増加を認めた。IL-13 α_1 受容体中和抗体および

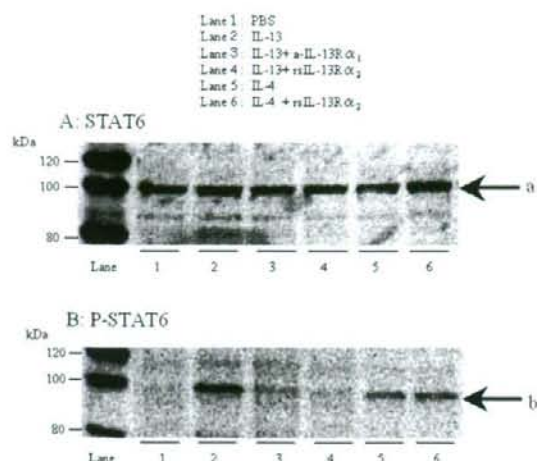


Figure 10

Fig. 10.

A Western blot analysis of STAT6 (A) and the phosphorylated, active form of STAT6 (p-STAT6) (B) in the cell lysates of NHBECs incubated with IL-13 (10 ng/ml) or IL-4 (1 ng/ml) for 14 days. Lanes show the data from samples treated with either the vehicle of IL-13 or IL-4 (PBS) (lane 1), IL-13 (10 ng/ml) plus the vehicle of antibody (PBS) (lane 2), IL-13 plus anti-IL-13R α_1 antibody (10 μ g/ml) (lane 3), IL-13 plus recombinant human soluble IL-13R α_2 /Fc (rsIL-13R α_2 , 4 ng/ml) (lane 4), IL-4 (1 ng/ml) plus the vehicle of antibody (PBS) (lane 5), or with IL-4 (1 ng/ml) plus rsIL-13R α_2 (4 ng/ml) (lane 6). The arrows show STAT6 (a) and p-STAT6 (b) (100~120kDa). Data are representative of three different experiments.

recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体は、IL-13 刺激によって誘導される p-STAT6 発現を抑制した。一方、IL-4 刺激によって誘導される p-STAT6 発現は、recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体によって抑制されなかった。

考察

本研究において、我々は、正常ヒト気道上皮細胞の気相培養において、IL-13 が PAS 陽性細胞、杯細胞、MUC5AC 陽性細胞の数を増加させたこと。さらに、MUC5AC 蛋白の分泌を誘導したこと。IL-13 で刺激し気相培養した 7 日目に

MUC5AC mRNA 発現は増加したが、21 日目にベースラインの発現量に戻ったこと。IL-13 α_1 受容体中和抗体は、IL-13 により誘導される PAS 陽性細胞の数、杯細胞数、MUC5AC 陽性細胞数、さらに MUC5AC 蛋白および mRNA の発現量を減少させたことを示した。これらの知見は、我々の以前の報告 [5] と同様に、IL-13 は IL-13 α_1 受容体を介して、杯細胞過形成、MUC5AC 蛋白分泌を誘導することを示した。

一方、我々は、IL-13 α_2 受容体中和抗体は、IL-13 により誘導される PAS 陽性細胞の数、杯細胞数、MUC5AC 陽性細胞数、さらに

MUC5ACmRNA の発現量を増加させたこと。IL-13 で刺激し気相培養した7日目に IL-13 α_2 受容体 mRNA 発現は増加し、21日目まで発現が持続したこと。IL-13 で刺激し気相培養を行った14日目の気道上皮細胞の免疫染色にて、IL-13 α_2 受容体蛋白の発現を認めたこと。IL-13 で刺激し気相培養を行った7日目に、細胞上清中の可溶性 IL-13 α_2 受容体の濃度は有意に増加し、21日目まで発現が持続したこと。対照的に、細胞溶解液中の IL-13 α_2 受容体蛋白の発現量は、IL-13 刺激前から刺激後21日目まで変化を認めなかったこと。さらに IL-13 α_2 受容体は、IL-13 により誘導される PAS 陽性細胞の数、杯細胞数、MUC5AC 陽性細胞数、さらに MUC5AC 蛋白の分泌量、MUC5ACmRNA の発現量を減少させたことを示した。これらの知見は、可溶性 IL-13 α_2 受容体が、正常ヒト気道上皮細胞において IL-13 に誘導される杯細胞過形成および粘液分泌を制御する可能性があることを示した。

分泌顆粒を持った杯細胞は PAS 染色によって明らかに染色された。一方、分泌顆粒を持たない PAS 陽性細胞、すなわち PAS 陽性非杯細胞が存在した。PAS 陽性に染色されるムチンは、MUC5AC と同様に様々なムチンによって構成されると報告されており[15]、本研究においても、MUC5AC 以外のムチンが PAS 陽性に染色されたと判断した。

本研究において、IL-13 で刺激していない分化培養正常ヒト気道上皮細胞は、MUC5AC に染色されなかった。これは、本実験系における共通の現象であり、理由は明らかではないが、細胞の継代数や培養様式、各種成長因子の違いにより MUC5AC による染色に違いが出るとの Mataらによる報告がある[16]。

気道上皮細胞において、IL-4 や IL-13 を含む様々な刺激が、膜型 IL-13 α_2 受容体を誘導することが報告されている[17-20]。本研究においても、過去の報告[7,19]と同様に、IL-13 により IL-13 α_2 受容体が誘導されることを確認した。しかしながら、いずれの型の IL-13 α_2 受容体がデコイ受容体として機能しているかは明らかではない。我々は、IL-13 で刺激し気相培養した14日目の正常ヒト気道上皮細胞の細胞質に、IL-13 α_2 受容体蛋白が発現することを免疫染色によって示した。さらに、細胞上清中の可溶性 IL-13 α_2 受容体の濃度は IL-13 で刺激した7日目に上昇した。ところが、膜型 IL-13 α_2 受容体の発現に関連がある[7,21]とされる細胞溶解液中の IL-13 α_2 受容体蛋白量は、IL-13 刺激の前後で変化がなかった。IL-13 α_1 受容体中和抗体および recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体は、IL-13 刺激によって誘導される PAS 陽性細胞の数、杯細胞数、MUC5AC 陽性細胞数、MUC5AC 蛋白分泌および MUC5ACmRNA 発現を減少させた。これらの IL-13 受容

体の細胞機能上の抑制効果は、気道上皮細胞[7,19]および肝の線維化[18]における IL-13 シグナルに関する報告に一致していた。以上より、可溶性 IL-13 α_2 受容体蛋白が杯細胞過形成、MUC5AC 蛋白の発現および分泌の down regulation に関わっている可能性がある。

また、本研究において免疫染色で、IL-13 刺激後の気道上皮細胞に、IL-13 α_2 受容体蛋白の発現の増加を認めたが、細胞溶解液中の IL-13 α_2 受容体蛋白の発現量の増加は認めなかったこと。対照的に、可溶性 IL-13 α_2 受容体の濃度の上昇を認めたことより、IL-13 は、可溶性 IL-13 α_2 受容体蛋白と膜型の IL-13 α_2 受容体蛋白の発現を増加させるが、同時に受容体蛋白の turnover も増加させることが示唆された。

我々は、IL-4 が PAS 陽性細胞、杯細胞、MUC5AC 陽性細胞の数を増加したこと。さらに、MUC5AC 蛋白の分泌を誘導し、MUC5AC mRNA 発現が増加したことを示した。しかし、IL-13 α_2 受容体は、IL-4 による各種細胞数の増加、MUC5AC 蛋白、mRNA の発現には影響を与えなかった。IL-4 シグナルに関するこれらの IL-13 受容体の効果は、in vitro における過去の報告[22]に一致していた。

STAT6 は IL-13、IL-4 シグナルに関する重要な転写因子として良く知られている[23,24]。また、気道上皮細胞において IL-13 は STAT6 を介

して IL-13 α_2 受容体を誘導するとの報告がある[7]。本研究において、我々は、IL-13 による STAT6 の活性化が、IL-13 α_1 容体中和抗体および recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体によって抑制されることを確認した。対照的に、我々は、IL-4 による STAT6 の活性化が、recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体によって抑制されないことを示した。

血清中の可溶性 IL-13 α_2 受容体は、IL-13 反応を制御する抑制蛋白として働くと報告されている[25]。マウスモデルにおいて、recombinant IL-13 α_2 受容体蛋白は、IL-13 と結合し中和することができ[26]、気道過敏性を減弱させる[27]。さらに、卵白アルブミン感作マウスにおいて、気道過敏性、粘液過剰産生、肺組織における炎症性変化などの late phase の反応を、recombinant IL-13 α_2 受容体の投与によって抑制したとの報告もある[28]。本研究において、我々は、recombinant 可溶性 IL-13 α_2 受容体が、正常ヒト気道上皮細胞において、杯細胞過形成、MUC5AC 蛋白分泌および MUC5AC mRNA 発現を減弱することを示した。それゆえ、IL-13 を含む可溶性の受容体は、重要な炎症の制御因子であり、杯細胞過形成と同様にサイトカインシグナルや反応[29]を down regulate する可能性がある。

本研究において、IL-13 α_2 受容体は正常ヒト気道上皮細胞において発現

し、可溶性 IL-13 α_2 受容体は、IL-13 による杯細胞過形成および粘液過剰産生の制御に重要な役割を果たしている可能性が示された。以上より、IL-13 α_2 受容体は気管支喘息において、気道粘液過剰分泌治療標的分子となる可能性があると考えられた。

謝辞

本研究において、テクニカルアシスタントとしてご尽力頂いた手塚文恵さん、今村仁美さんに深謝申し上げます。

参考文献

1. Fahy JV. Goblet cell and mucin gene abnormalities in asthma. *Chest* 2002; 122(Suppl): 320S-6S.
2. Shimura S, Andoh Y, Haraguchi M, et al. Continuity of airway goblet cells and intraluminal mucus in the airways of patients with bronchial asthma. *Eur Respir J* 1996; 9: 1395-401.
3. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, et al. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest* 1992; 101: 916-21.
4. Ordonez CL, Khashayar R, Wong HH, et al. Mild and moderate asthma is associated with goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 517-23.
5. Yasuo M, Fujimoto K, Tanabe T, et al. The relationship between calcium-activated chloride-channel 1 and MUC5AC in goblet cell hyperplasia induced by interleukin-13 in human bronchial epithelial cells. *Respiration* 2006; 73: 347-59.
6. Izuhara K, Umeshita-Suyama R, Akaiwa M, et al. Recent advances in understanding how interleukin-13 signals are involved in the pathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp* 2000; 48: 505-12.
7. Yasunaga S, Yuyama N, Arima K, et al. The negative feedback regulation of the IL-13 signal by the IL-13 receptor alpha2 chain in bronchial epithelial cells. *Cytokine* 2003; 24: 293-303.
8. Li JD, Feng W, Galluap M, et al. Activation of NF- κ B via a Src-dependent Ras-MAPK-pp 90 rsk pathway is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced mucin overproduction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5718-23.
9. Yamaya M, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *Am J Physiol* 1992; 262: L713-24.
10. Yoon JH, Gray T, Gutzman K, et al.

- Regulation of the secretory phenotype of human airway epithelium by retinoic acid, triiodothyronine, and extracellular matrix. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 724-31.
11. Kondo M, Tamaoki J, Takeyama K, et al. Interleukin-13 induces goblet cell differentiation in primary cell culture from guinea pig tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 536-41.
 12. Atherton HC, Jones G, Danahay H. IL-13-induced changes in the goblet cell density of human bronchial epithelial cell cultures: MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase regulation. *Am J Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285: L730-9.
 13. Tanabe T, Fujimoto K, Yasuo M, et al. Modulation of mucus production by interleukin-13 receptor $\alpha 2$ in the human airway epithelium. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 122-34.
 14. Kouri K, Ueki IF, Nadel JA. Neutrophil elastase induces mucin production by ligand-dependent epidermal growth factor receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L531-40.
 15. Caramori G, Di Gregorio C, Carlstedt I, et al. Mucin expression in peripheral airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Histopathology* 2004; 45: 477-84.
 16. Mata M, Sarria B, Buenestado A, et al. Phosphodiesterase 4 inhibition decreases MUC5AC expression induced by epidermal growth factor in human airway epithelial cells. *Thorax* 2005; 60: 144-52.
 17. Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, et al. Genetic variants of IL-13 signaling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 549-59.
 18. Chiaramonte MG, Mentink-Kane M, Jacobson BA, et al. Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. *J Exp Med* 2003; 197: 687-701.
 19. Zheng T, Zhu Z, Liu W, Lee CG, et al. Cytokine regulation of IL-13Ralpha2 and IL-13Ralpha1 in vivo and in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 720-8.
 20. Arima K, Sato K, Tanaka G, et al. Characterization of the interaction between Interleukin-13 and Interleukin-13 Receptors. *J Biol Chem* 2005; 280: 24915-22.
 21. Daines MO, Hershey GK. A novel mechanism by which interferon-gamma can regulate interleukin (IL)-13 responses. Evidence for intracellular stores of IL-13 receptor α -2 and their rapid mobilization by interferon- γ . *J Biol Chem* 2002; 277: 10387-93.

22. Andrews AL, Nasir T, Bucchieri F, et al. IL-13 receptor alpha 2: a regulator of IL-13 and IL-4 signal transduction in primary human fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 858-65.
23. Mullings RE, Wilson SJ, Puddicombe SM, et al. Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6) expression and function in asthmatic bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 832-8.
24. Tekkanat KK, Maassab HF, Cho DS, et al. IL-13-induced airway hyperreactivity during respiratory syncytial virus infection is STAT6 dependent. *J Immunol* 2001; 166: 3542-8.
25. Zhang JG, Hilton DJ, Wilson TA, et al. Identification, purification, and characterization of a soluble interleukin (IL)-13-binding protein. Evidence that it is distinct from the cloned IL-13 receptor and IL-4 receptor α -chains. *J Biol Chem* 1997; 272: 9474-80.
26. Donaldson DD, Whitters MJ, Fitz LJ, et al. The murine IL-13 receptor α 2: molecular cloning, chracterization, and comparison with murine IL-13 receptor α 1. *J Immunol* 1998; 161: 2317-24.
27. Leigh R, Ellis R, Wattie J, et al. Is interleukin-13 critical in maintaining airway hyperresponsiveness in allergen-challenged mice? *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 851-6.
28. Taube C, Duez C, Cui ZH, et al. The role of IL-13 in established allergic airway disease. *J Immunol* 2002; 169: 6482-9.

喘息死患者の肺病変部における IL-18 の発現

久留米大学 医学部 内科学講座

呼吸器・神経・膠原病内科部門 (第1内科)

星野友昭、坂崎優樹、澤田昌典、川山智隆、相澤久道

はじめに

喘息は気道の慢性炎症と種々の程度の気道狭窄と気道過敏性、臨床的には繰り返して起こる咳、喘鳴、呼吸困難が特徴とされる。病態は好酸球、Tリンパ球、肥満細胞などの炎症細胞と、上皮細胞、分泌腺、線維芽細胞、気管支平滑筋などの気道を構成する細胞が、慢性気道炎症、気道構築変化(リモデリング)気道平滑筋の肥大、過形成、分泌腺過形成、血管新生さらには気道の過敏性によって特徴づけられる。喘息死は喘息の急性増悪における最たるものである。喘息死の病因にCD4陽性T細胞、Th2サイトカインが関与していると考えられるが未だ不明である。われわれは炎症性サイトカインIL-18が肺障害、IPF、COPDを含む炎症性肺疾患に重要な役割をしていることを報告している。本研究では喘息死患者の肺病変部のCD4、CD8陽性T細胞及びIL-18産生細胞の検討を行った。

対象と方法

1971年から1999年まで久留米大学病院及び関連病院で病理解剖を行った15人の喘息死患者の肺病理組織を用いた。肺病変部におけるCD4、CD8陽性T細胞のIL-18産生を2重免疫染

色法で解析した。

好酸球と好中球の解析は蛍光色素(FITC)を標識した抗IL-18抗体を用いて免疫染色し、UV下で蛍光顕微鏡を用いて解析した。

結果

喘息死患者の肺病変部は気道平滑筋の肥大、過形成、分泌腺過形成を伴った著明な気道リモデリング、分泌物等による気道の閉塞、好酸球を主体とした炎症細胞浸潤炎症が見られた。これまでの報告と違いCD8陽性T細胞はCD4陽性T細胞に比べ15名全例で肺病変部に著明に浸潤していた。CD4/CD8比は約0.4であった。また肺胞上皮細胞や炎症細胞はIL-18を強く産生していた。2重染色の結果CD8陽性T細胞はCD4陽性T細胞、好中球、好酸球はほぼ100%IL-18を産生していた。

考察

喘息死の病因にCD8陽性T細胞が好中球、好酸球とともに関与していることが示唆された。

シンバスタチンによる気道被覆液中サイトカインの減少

川崎市立川崎病院¹、東京電力病院²、慶應義塾大学医学部呼吸器内科³、酪農学園大学獣医化学教室⁴

高橋左枝子¹、仲村秀俊²、白畑 亨³、小熊 剛¹、上石修史¹、辻村周子³、
宮庄 拓⁴、峰松直人³、佐山宏一³、大曾根康夫¹、秋月哲史¹、石坂彰敏³

はじめに

COPD の罹患率と死亡率は全世界的に増加傾向にあり、本邦では喫煙率はいまだに高く、在宅酸素療法、非侵襲的陽圧換気療法を要する呼吸器疾患患者の多くはCOPD患者となっている。COPDの病因として酸化ストレス、プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡、アポトーシスなどの関与が考えられ、気道炎症をターゲットとした有効な治療薬の開発が望まれる。

スタチンには血中脂質低下作用以外に、抗炎症・抗酸化・血管内皮機能改善など多彩な作用がある。近年、スタチン投与による動物モデルにおける肺気腫の改善¹⁾や、疫学的検討でのCOPD患者の肺機能の改善が報告されている^{2, 3)}。本研究では臨床検体を用い、スタチンがCOPD患者の肺機能の改善をもたらす機序の解明を目的とした。

対象と方法

COPD患者5名・喫煙者11名に3ヶ月

間シンバスタチン20mgを投与した。投与前後でマイクロサンプリングブロープを用いて気道上皮被覆液を採取し^{4, 5)}、ルミネックスシステム (Bio-Plex™ Assay Kits: BIO-RAD) を使用して18種類の炎症性サイトカイン・ケモカイン・増殖因子濃度を測定した。また、動脈血液ガス分析・肺機能検査を施行し、臨床的評価も行った。本研究プロトコールは川崎市立川崎病院倫理委員会において承認された。

結果

シンバスタチン投与後、気道被覆液中IL-4・IL-6・IL-8・IL-10・GM-CSF・IFN γ ・IL-1 β ・IL-7・IL-12 p70・MCP-1・VEGF ($P \leq 0.01$)、GCSF ($P \leq 0.05$)濃度の低下を認めた。機能別にみても、炎症性サイトカイン (図1)、ケモカイン (図2)、増殖因子 (図3)のいずれも抑制する傾向が明らかであった。また、一秒量は改善傾向であった (約70ml増加・ $P=0.14$)。1名での皮疹以外に副作用を認めなかった。

図1 気道上皮被覆液中炎症性サイトカイン

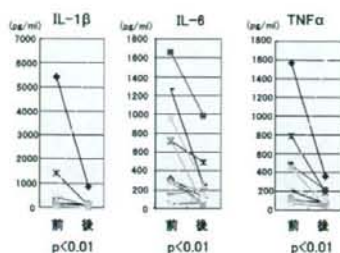


図2 気道上皮被覆液中ケモカイン

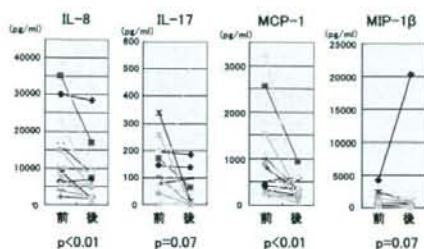
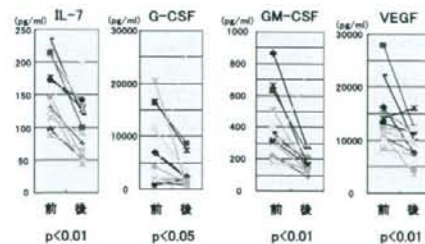


図3 気道上皮被覆液中増殖因子



考察

スタチンは喫煙による気道の炎症を抑え、COPDの病態を改善する可能性が示唆された。今回測定したサイトカイン、ケモカイン、増殖因子は線毛細胞、杯細胞、クララ細胞、炎症細胞などから産生されたと考えられる。COPD患者では、喫煙による histon

deacetylase (HDAC) の機能低下などにより、多数の炎症性遺伝子発現が亢進するため、その治療には多数の因子を同時に抑制する必要があると考えられる。非喫煙者との比較が必要であるが、今回の結果は喫煙による広範な炎症の出現とスタチンによるその制御の可能性を明らかにしたものと考えられる。実際の COPD 患者は多様な病態を呈し、それぞれの患者でサイトカイン、ケモカイン、増殖因子の発現パターンは異なるものと考えられる。しかしながら今回の結果は、スタチンが COPD 患者およびそのリスクをもつ患者に対し、グローバルに投与する価値がある可能性を示唆するものと思われる。臨床研究において、その強力な抗炎症作用を提示しえた点に意義があると考えられる。その要因として、近年の検体採取におけるマイクロサンプリング法とサイトカイン測定におけるルミネックスシステムの発展があげられる。今回の結果を踏まえ、COPD のいかなる段階でスタチンを投与すべきか、またその長期的な効果と安全性の検証が必要と考えられる。

参考文献

- 1) Takahashi S, Nakamura H, Seki M, Shiraishi Y, Yamamoto M, Furuuchi M, Nakajima T, Tsujimura S, Shirahata T, Nakamura M, Minematsu N, Yamasaki M, Tateno H, Ishizaka A. Reversal of elastase-induced pulmonary emphysema and promotion of alveolar epithelial cell