

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：11401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791097
 研究課題名（和文）イノシトールリン脂質代謝による喘息病態制御と新規治療薬開発の探究
 研究課題名（英文） The role of PI3Kgamma for the pathogenesis of asthma and potentiality for new therapeutic target of asthma
 研究代表者
 竹田 正秀（TAKEDA MASAhide）
 秋田大学・医学部・助教
 研究者番号：30466594

研究成果の概要（和文）：

好酸球は喘息をはじめとしたアレルギー疾患の病態形成に関わっている。我々は主に炎症細胞に発現し、遊走・生存など様々な細胞機能を制御することが知られているPI3Kgammaの好酸球機能への影響を、選択的阻害薬を用いて検討した。その結果、PI3Kgamma選択的阻害薬が好酸球のeotaxinによる遊走・活性化を抑制することを見いだした。本研究により、PI3Kgammaが好酸球の細胞機能に重要な役割を果たすことが明らかとなり、PI3K γ がアレルギー疾患治療の新たなターゲットとなりうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Eosinophils are involved in the pathogenesis of asthma. In this research, we investigated the role of PI3Kgamma for functions of human eosinophils using PI3Kgamma selective inhibitor. As a result, PI3Kgamma selective inhibitor suppressed eotaxin-induced eosinophil migration and activation. This study indicates that PI3Kgamma is involved in human eosinophil function and PI3Kgamma might be new therapeutic target of asthma and allergic diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：PI3K、アレルギー、喘息、好酸球、eotaxin

1. 研究開始当初の背景

現在でも喘息死患者は年間約2000人おり、喘息の治療応用に向けた新規治療ターゲットの検索は喘息研究における中核のひとつである。喘息の病態は炎症細胞による気道炎症が根幹にあると考えられており、炎症細胞をタ

ーゲットとした新規分子の探索が重要と考えられる。本研究で検討を行う、phosphoinositide 3-kinase(PI3K) gammaは、主に炎症細胞に発現し、遊走・生存など様々な細胞機能を制御することが知られている。我々は既に、動物実験による検討から、

PI3Kgammaのノックアウトマウスでは、喘息病態の形成が減弱し、局所への好酸球集積が Wild typeと比較し有意に抑制されることを報告した。

2. 研究の目的

以上の背景から、喘息病態に関与する主要な炎症細胞である、好酸球について、PI3Kgammaの細胞機能への関わりについてPI3Kgamma 選択的阻害薬を用いて検討する。以上の研究を通してPI3Kgammaをターゲットとした喘息治療への臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 末梢血好酸球の分離

ヒト好酸球の分離については、末梢血好酸球の軽度上昇した健常人より、インフォームドコンセントを行ったのち、同意を取得し、末梢血を採取する。末梢血は、percollによる比重遠心を行い、顆粒球を抽出したのち、CD16 マグネチックビーズを用いて、MACS システムにより negative selection を行い、好酸球を選択的に分離する。分離された好酸球の純度は99%以上のものを用いた。

(2) 好酸球生存能への影響の検討

分離好酸球を Vehicle、PI3K 阻害薬 LY294002 および PI3Kgamma 選択的阻害薬 AS605240 で1時間刺激し、その後の好酸球の生存の変化(24時間、48時間、72時間)について検討した。具体的には、AnnexinV、PIを用いて、好酸球と反応させ、生存への影響を flowcytometer により検討した。

(3) 好酸球接着能への影響の検討

Lab-Tech chamber slide を用いて、このスライドに接着分子である、ICAM-1 をコートし、このスライドに対する好酸球の接着を検討した。具体的には、Vehicle、PI3Kgamma 選択的阻害薬で好酸球を1時間刺激したのち、eotaxin 存在下、非存在下に ICAM-1 がコートされたスライドと1時間反応させ、反応後 Diff Quick 染色にて細胞を染め、顕微鏡にてスライドに接着した細胞数をカウントすることで、接着細胞について検討を行った。

(4) 好酸球遊走能への影響の検討

Eotaxin による好酸球の遊走能に対する PI3Kgamma の影響については、Boyden chamber を用いて行った。具体的には、Vehicle、PI3Kgamma 選択的阻害薬と1時間反応させた好酸球を5・mの孔のあいた膜で隔てた chamber の上層に置き、下層に10nMの eotaxin を添加する。37度で1時間培養を行ったのち、膜を染色し、

上層から下層に移動した好酸球数を顕微鏡下にカウントを行うことで、遊走能への影響を検討した。

(5) 好酸球脱顆粒への影響の検討

EDN は好酸球の顆粒蛋白のひとつである。好酸球の脱顆粒について eotaxin 刺激後の EDN 産生について ELISA 法を用いて検討した。具体的には、Vehicle、PI3Kgamma 選択的阻害薬で1時間前処理を行ったのち、20nM の eotaxin で好酸球を刺激し、培養上清を採取する。採取した培養上清について PI3Kgamma の EDN 産生への影響を EDN ELISA kit を用いて検討した。

(6) 好酸球遊走に対する影響の

メカニズムについての検討

Eotaxin による好酸球の遊走増強については、好酸球細胞表面の eotaxin 受容体 CCR3 の発現増強や、細胞内シグナル経路、ERK1/2 のリン酸化が関与していることが知られている。PI3Kgamma 選択的阻害薬が eotaxin による好酸球の遊走を抑制するメカニズムについて各々を検討した。

①好酸球細胞表面 CCR3 受容体発現の検討

分離好酸球を Vehicle、PI3Kgamma 選択的阻害薬で1時間刺激したのち、FITC でラベルされた、抗 CCR3 抗体と反応させ、CCR3 発現への影響をフローサイトメーターを用いて検討した。

②好酸球細胞内シグナル、ERK1/2 リン酸化への影響

分離好酸球を Vehicle、PI3Kgamma 選択的阻害薬で1時間刺激・前処理を行ったのち、eotaxin 10nM で1分間刺激後、フローサイトメーターにより、ERK1/2 のリン酸化について検討した。

(7) 実験の解析方法

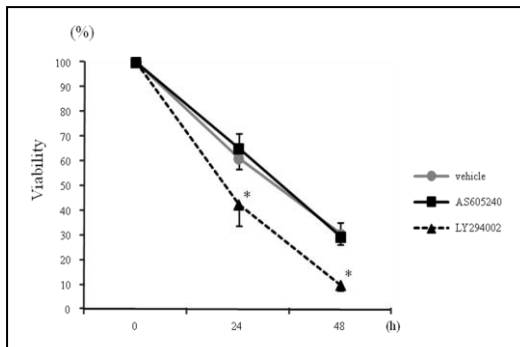
以上の実験の解析は、student t 検定を用いて行った。P < 0.05 を有意として検定を行った。全ての結果のグラフは、標準誤差を用いて表示している。

4. 研究成果

(1) 好酸球生存能への影響の検討

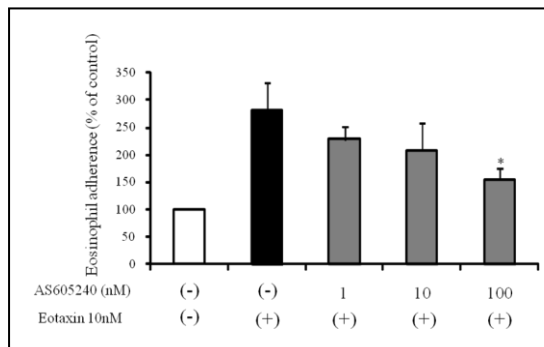
PI3Kgamma 選択的阻害薬の好酸球生存能への影響を検討した。対照として、Pan-PI3K 阻害薬 LY294002 も用いて実験を行った。Pan-PI3K 阻害薬刺激後の好酸球は、阻害薬非刺激群 (Vehicle) と比較して、24時間、48時間後の生存が有意に低下していた。一方で、PI3Kgamma 選択的阻害薬を前処理した好酸球

では、Vehicle と同程度の生存曲線を描き、vehicle との間に有意差を認めなかった。



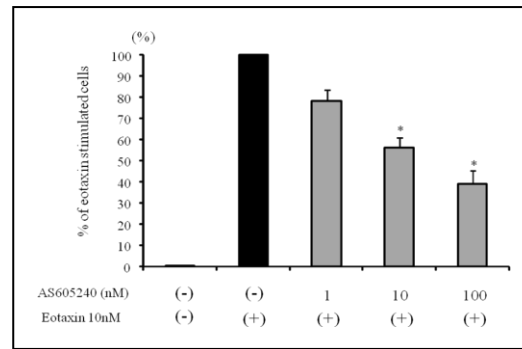
(2) 好酸球接着能への影響の検討

PI3Kgamma 選択的阻害薬の eotaxin による好酸球接着能への影響を検討した。阻害薬非刺激群では、eotaxin 刺激によって、eotaxin 非刺激群と比較し、有意に接着能の亢進を認めた。この eotaxin による接着能の亢進について、PI3Kgamma 選択的阻害薬 AS605240 の前処理により、濃度依存性に接着能の抑制を認め、AS605240 100nM の濃度において、阻害薬非刺激群と比較し、有意な接着能の抑制を認めた。



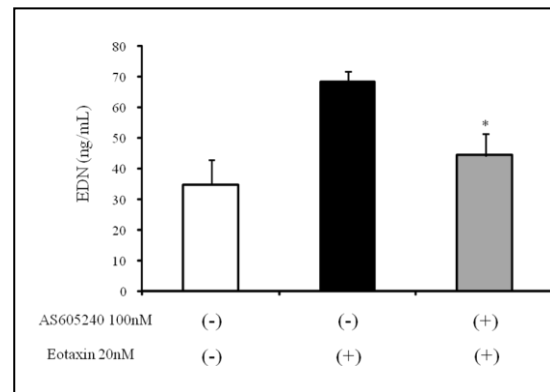
(3) 好酸球遊走能への影響の検討

Eotaxin による好酸球遊走に対する PI3Kgamma 選択的阻害薬の影響について検討した。阻害薬非刺激群では、eotaxin 刺激によって、有意な遊走能の亢進を認めた。この eotaxin による遊走亢進に対して、PI3Kgamma 選択的阻害薬の前処理により、濃度依存性に好酸球遊走の抑制が認められ、AS605240 10nM, 100nM において有意な抑制が観察された。



(4) 好酸球脱顆粒への影響の検討

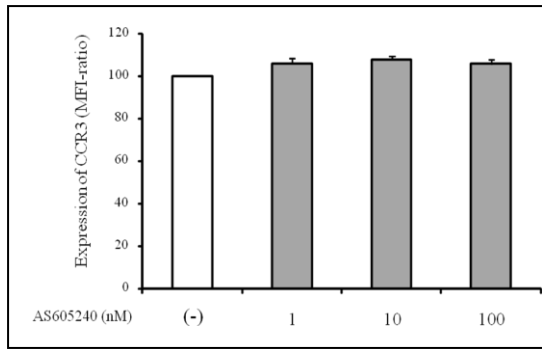
好酸球の活性化により、好酸球は内部の顆粒蛋白を放出する。顆粒蛋白のひとつである、EDN 産生を ELISA 法にて検出することで、PI3Kgamma の好酸球脱顆粒に対する影響を検討した。PI3Kgamma 選択的阻害薬非刺激群では、eotaxin 20nM 刺激によって、有意に EDN 産生亢進が認められた。この eotaxin による EDN 産生亢進に対して、PI3Kgamma 選択的阻害薬 100nM を前処理することで、有意に EDN 産生が抑制されることが観察された。



(5) 好酸球遊走に対する影響のメカニズムについての検討

①好酸球細胞表面 CCR3 受容体発現の検討

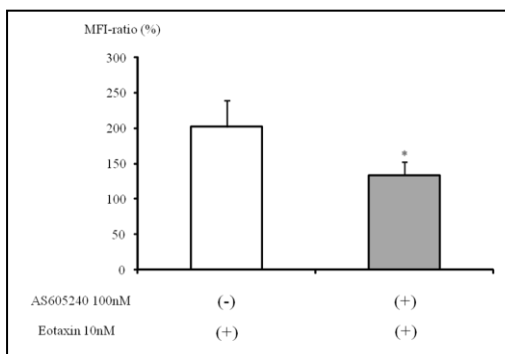
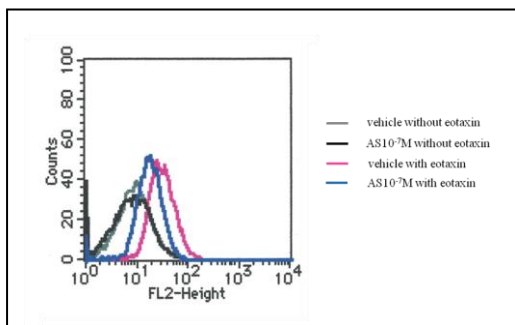
PI3Kgamma 選択的阻害薬が eotaxin による好酸球遊走を濃度依存性に抑制することが認められたことから、遊走抑制のメカニズムについて、eotaxin の受容体である CCR3 の発現を測定することで検討した。PI3Kgamma 選択的阻害薬 AS605240 を 3 段階に濃度を変え、CCR3 の好酸球表面上の発現をフローサイトメーターを用いて検討したが、CCR3 の発現は Vehicle 群と同程度であり、いずれの濃度でも非刺激群と比較し、有意な差を認めなかった。



②好酸球細胞内シグナル、ERK1/2 リン酸化への影響

PI3Kgamma 選択的阻害薬が eotaxin による好酸球遊走を濃度依存性に抑制することが認められたことから、遊走抑制のメカニズムについて、好酸球細胞シグナル ERK1/2 のリン酸化を測定することで検討した。

PI3Kgamma 選択的阻害薬 100nM で好酸球を前処理したのち、eotaxin 刺激 1 分後の ERK1/2 のリン酸化をフローサイトメーターを用いて検討した。Eotaxin 10nM で好酸球を刺激することで、ERK1/2 のヒストグラムが右に移動し、リン酸化が確認されたが、PI3Kgamma 選択的阻害薬で前処理された好酸球のヒストグラムは左に移動していた。MFI-ratio によって、有意差検定を行うと、PI3Kgamma 選択的阻害薬で好酸球を前処理することで、有意に ERK1/2 のリン酸化が抑制されることが観察された。



以上の、研究により、PI3Kgamma 選択的阻害薬で好酸球を前処理することで、eotaxin による、好酸球の①接着②遊走③EDN 産生が有意に抑制されることが観察された。また、この抑制のメカニズムについては、eotaxin 刺激による好酸球細胞内シグナル経路の ERK1/2 のリン酸化を抑制することで引き起こされることが示唆された。

好酸球は喘息をはじめとしたアレルギー疾患の病態に重要な役割を果たす炎症細胞と考えられている。今回の PI3Kgamma 選択的阻害薬を用いた検討により、好酸球の接着、遊走、活性化といった細胞機能に PI3Kgamma が関与することが示唆された。

また、PI3K は多くの細胞の生存を含めた機能に関与していることが知られているが、Pan-PI3K 阻害薬を用いた生存への影響の検討では、Vehicle 群と比較し、Pan-PI3K 阻害薬は有意に好酸球の生存を抑制したが、PI3Kgamma 選択的阻害薬は、細胞の生存に影響を及ぼさず、Vehicle と同程度の生存能を示した。

動物実験における検討でも、PI3K の isoform である PI3Kalpha や PI3Kbeta のノックアウトマウスは、マウスが胎生死亡することが報告されている。このことから、PI3K のすべての isoform を阻害する Pan-PI3K 阻害薬は生体への多大な影響も懸念され、生体への治療応用には難点を多く抱えている。

一方で PI3Kgamma のノックアウトマウスは、マウスの生存に影響を及ぼすことはなく、また今回の実験でもヒト好酸球に対して PI3Kgamma 選択的阻害薬が生存に影響を及ぼさなかったことから、PI3Kgamma 選択的阻害薬の細胞毒性・生体への影響は低いことが予想される。

以上の結果より、PI3Kgamma 選択的阻害薬は、生体細胞の生存に影響を及ぼすことなく、好酸球の遊走や活性化を抑制する可能性があることから、喘息をはじめとしたアレルギー疾患の新規治療ターゲットとして有望であると考えられる。

喘息治療では吸入ステロイド薬の登場によりその治療効果や患者の QOL は飛躍的に向上したが、ステロイド抵抗性など、吸入ステロイドが奏功しない症例も存在し、わが国においても年間約 2000 人の患者が喘息により命を落としているという現状がある。今回の研究では、PI3Kgamma 選択的阻害薬が、ステロイド抵抗性の喘息患者に使用できる新たな喘息治療薬となり得ることを明らかにしたものであり、国内外の喘息治療において重要な結果をもたらしたものと考えている。今

後、PI3Kgamma 選択的阻害薬の好酸球細胞機能への影響を検討し、PI3Kgamma 選択的阻害薬が臨床応用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

竹田正秀, 荏原順一: アレルギー性炎症における気道構成細胞とイノシトールリン脂質のかかわり. 臨床免疫・アレルギー科 56 巻 2 号 159-165, 2011

[学会発表] (計 6 件)

1. 齊藤由紀子、竹田正秀、植木重治、小林良樹、守時由起、糸賀正道、荏原真実、今野泰典、伊藤亘、荏原順一: ヒト好酸球の接着能および活性酸素産生に対する Phosphoinositide 3-kinase γ の関わり. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012 年 11 月 (大阪)

2. Takeda M, Saito Y, Ueki S, Konno Y, Chihara M, Itoga M, Moritoki Y, Kobayashi Y, Ito W, Chihara J. The roles of Phosphoinositide 3-kinase gamma for eosinophil functions. 31th Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, 2012. 6 (Geneva, Switzerland)

3. 竹田正秀、伊藤亘、齊藤由紀子、植木重治、守時由起、小林良樹、糸賀正道、荏原真実、今野泰典、萱場広之、荏原順一: 好酸球の接着能・顆粒蛋白放出における Phosphoinositide 3-kinase γ の関わり. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会. 2012 年 4 月 (神戸)

4. 竹田正秀、伊藤亘、植木重治、今野泰典、荏原真実、糸賀正道、守時由起、小林良樹、萱場広之、荏原順一: ヒト好酸球機能におけ

る Phosphoinositide 3-kinase gamma の役割. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011 年 11 月 (幕張)

5. 齊藤由紀子, 竹田正秀, 伊藤亘, 木原純子, 植木重治, 小林良樹, 守時由起, 糸賀正道, 今野泰典, 荏原真実, 萱場広之, 荏原順一: 好酸球細胞機能における Phosphoinositide 3-kinase γ の関わり.

第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2011 年 11 月 (東京)

6. 竹田正秀, 伊藤亘, 植木重治, 木原純子, 守時由起, 谷貝朋美, 糸賀正道, 萱場広之, 荏原順一: ヒト好酸球の細胞生存および遊走能における Phosphoinositide 3-kinase γ の関わり. 第 31 回日本炎症・再生医学会, 2011 年 8 月 (東京)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 正秀 (TAKEDA MASAHIDE)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号: 30466594