

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790547

研究課題名(和文)喘息におけるステロイド抵抗性メカニズムの解明と臨床応用への挑戦

研究課題名(英文)The challenge to underlying causes of steroid insensitivity in bronchial asthma and its clinical application

研究代表者

小林 良樹(KOBAYASHI, Yoshiki)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：10375298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：重症喘息におけるステロイド抵抗性のメカニズムとして、ホスファターゼの関与について検討した。我々が最近報告したホスファターゼと別のホスファターゼにも着目し、それらの発現が重症喘息患者の細胞で低下していることがわかった。また、イメージングフローサイトメーターを用いて、それらの各細胞レベルでの簡易な検出方法を至適化している。さらに、これらの発現レベルと実際のステロイド抵抗性との関連性についても検討中であり、今後、日常診療での応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined the involvement of protein phosphatases as underlying causes of steroid insensitivity in severe asthma. We focused on phosphatases other than the phosphatase recently reported by us, and revealed that their protein expression levels were reduced in the cells obtained from severe asthmatics. We have optimized the detection methods of them in each cell by using imaging flow cytometer. In addition, the association between their expression levels and practical steroid insensitivity is under study, which might lead to a clinical application in future.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：ステロイド抵抗性 ホスファターゼ 気管支喘息 ステロイド受容体

1. 研究開始当初の背景

吸入ステロイド治療の普及により喘息コントロールは著しく改善してきているものの、5%前後はステロイド抵抗性を有する難治性喘息である。さらに喘息医療費の50%を占めており社会経済的にも大きな問題となっている。ステロイド抵抗性のメカニズムとして、種々の原因で引き起こされるステロイド受容体の機能低下が重要であるが、ステロイド受容体セリン226残基 (GR-Ser226) のリン酸化がその一つとして考えられている。

GR-Ser226 のリン酸化亢進には、キナーゼの活性化あるいは、ホスファターゼの活性低下が関与しているが、我々は、喘息治療薬の1つである長時間作用性気管支拡張剤ホルモテロールが、GR-Ser226 のリン酸化およびその上流シグナルのリン酸化をわずか20分で抑制させることを発見した。このことから、キナーゼに何らかの修飾が加えられて活性低下を来すよりも、ホスファターゼが活性化されリン酸化を抑制したとする方が、時間的にも妥当であると考えた。実際に、重症喘息患者の末梢血単核球では、セリン/スレオニンホスファターゼの1つであるプロテインホスファターゼ2A (PP2A) の活性が低下することもわかっている。

一方で、ホルモテロールは、PP2A をダイレクトに活性化させることができる。活性化されたPP2Aは、GR-Ser226 のリン酸化を直接的および間接的に抑制し、その結果GRの核内移行能を促進させてステロイド抵抗性を改善させる。これらのことを喘息の病態において炎症制御に関わる単核球 (を用いて証明したが、気道炎症局所であり重要となる気道上皮細胞、そしてエフェクター相で中心的な役割を担う好酸球、さらに重症喘息において優位な上昇を認める好中球において検討することは必要不可欠である。

2. 研究の目的

(1) 気道上皮細胞、好酸球、好中球におけるステロイド抵抗性のメカニズムとしてGR-Ser226 のリン酸化、それに伴うGRの核内移行能の変化の測定方法をそれぞれの細胞で確立させる。同時にPP2Aの発現、活性の検出方法も至適化させ、GR-Ser226 のリン酸化レベルとの関連性を検討する。

(2) 日常臨床で活用できるようなステロイド抵抗性の指標となる検査法を確立させる。具体的には、フローサイトメーター (FCM) を用いてGR-Ser226 のリン酸化レベルとGR核内移行のレベルを検出できる方法のセッティングを行う。まずは、気道上皮細胞株やヒト末梢血分離好酸球、好中球を用いて検討し、次に全血 (ヒト末梢血) や気管支肺泡洗浄液中の細胞を用いた方法も検討する。

(3) (2) の確立後に、実際の臨床サンプルを用いて確認する。その他の臨床データ (肺機能や喘息コントロール状況など) と組み合わせ、臨床応用の可否を検討する。

(4) PP2A を活性化させるような薬剤の探索を行いその特徴を把握し、新薬開発への提言を行う。さらに、今後の発展として、GR-Ser226 のリン酸化を抑制させるその他のホスファターゼの探索を試みる。

3. 研究の方法

(1) ステロイド抵抗性メカニズムの精査

ヒト単球系においては、GR-Ser226 のリン酸化亢進によるGRの核内移行能の低下が、ステロイド抵抗性を引き起こすことがわかっているが、喘息病態において重要なその他の細胞 (気道上皮細胞、好酸球、好中球) でのリン酸化のメカニズムを検討する。

ステロイド抵抗性モデルの確立

ヒト正常気道上皮細胞株、ヒト末梢血分離好酸球および好中球を用いて検討する。ヒト末梢血からCD16 マイクロビーズを用いて好酸球と好中球を分離する。単核球系においては、IL-2/IL-4 共刺激によるステロイド抵抗性モデルが確立しているが (ステロイド感受性は、TNF 誘導性IL-8 産生抑制効果を評価)、気道上皮細胞、好酸球、好中球におけるステロイド抵抗性モデルを作成する (刺激条件の詳細な方法を検討する)。

ステロイド抵抗性モデルにおけるGR-Ser226リン酸化レベルの検討

ウエスタンブロット法およびFCMを用いて確認する。

ステロイド抵抗性モデルにおけるGR核内移行レベルの検討

核蛋白抽出法にて細胞質成分と核成分を準備し、ウエスタンブロット法を用いて確認する。もう一つの方法として、FCMを用いた測定法を確立させる。同時に共焦点レーザー顕微鏡を用いてGRの局在を調べ、その有用性を確認する。

ステロイド抵抗性モデルにおけるPP2Aの発現および活性の検討

ウエスタンブロット法やFCMを用いてPP2Aの発現を確認する。活性に関しては、PP2A特異的抗体にて免疫沈降処理をしたタンパク質中のホスファターゼ活性をフルオロメーターにて測定する方法を確立させる。

PP2A過剰発現あるいはRNA干渉によるノックダウンモデルの検討

ベクターを用いた過剰発現モデル、あるいはRNA干渉を用いたノックダウンモデルを作成し、ステロイド感受性、GR-Ser226リン酸化レベル、GR核内移行能に対するPP2Aの関与を評価する。

(2) 日常臨床で活用できるステロイド感受性テストの確立

実際の臨床応用を目的にFCMを用いた全血法による方法の設定を行う。末梢血中の好酸球および好中球におけるGR-Ser226のリン酸化レベル、GRの核内移行能を検出する方法を検討する。同時にPP2Aの発現レベルの測定法も検討する。

(3) 臨床サンプルでの検討

(2)の方法が確立されれば、実際の臨床サンプル(主に喘息患者からの末梢血)を用いて臨床応用を試みる。具体的には、治療前後あるいは症状の変動におけるGR-Ser226のリン酸化レベル、GRの核内移行能、PP2Aの発現レベルの変化を検討する。また、肺機能検査、症状スコアなども組み合わせることでその有効性を評価する。可能であれば、呼気一酸化窒素も同時に測定して総合的な評価を行う。場合によっては、気管支鏡検査で得られた気管支肺胞洗浄液や気道粘膜上皮を用いて、FCMや免疫染色によりGR-Ser226のリン酸化レベル、GRの局在、PP2Aの発現レベルを測定し、末梢血から得られた情報とリンクさせて病態を詳細に検討する。

(4) 新しい治療ターゲットの検討

本研究で確立されたシステムを用いて、ホルモテロールを足掛かりに、PP2Aを活性化させステロイド抵抗性を改善させる薬剤を探索する。候補にあがってきた薬剤の特徴を詳細に検討し、新しい治療薬開発への提言を試みる。可能であれば、PP2A以外のホスファターゼについても検討する。GR-Ser226リン酸化を誘導するシグナル経路の制御に関わるホスファターゼ(PP2A以外のもの)をスクリーニングして新たなターゲットを探索する。

4. 研究成果

(1) ステロイド抵抗性メカニズムの精査

気道局所におけるステロイド抵抗性のメカニズムを探るために、ヒト気道上皮細胞株(BEAS-2B)を用いて検討を行った。BEAS-2BにおけるGRの核内移行能の測定は、以前に単球・マクロファージ系細胞で行っていたウエスタンブロット法にて再現し、至適化することができた。ステロイド抵抗性が誘導されるIL-2/IL-4共刺激や酸化ストレス下にて、GR核内移行能が低下することも確認できた(図1A)。FCMにおけるGR核内移行能についても検討したが、至適条件を確立できず、後述のImaging FCMを用いて再検討中である。また、GR-Ser226リン酸化レベルの検出方法をウエスタンブロット法とFCMを用いた方法で確立し、同様の条件下にてGR-Ser226リン酸化が亢進することが確認できた(図1B)。

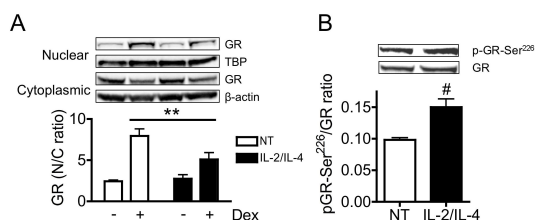


図1. 気道上皮細胞におけるステロイド抵抗性条件下でのステロイド受容体(GR)核内移行能とGR-Ser226リン酸化レベル

さらに、PP2Aの発現(ウエスタンブロット法、FCM)および活性(免疫沈降タンパクを用いた活性測定法)の測定条件もBEAS-2Bで至適化し、ステロイド抵抗性が誘導される条件下ではPP2A活性が低下することがわかった(PP2A発現レベルは変化しなかった)(図2A, B)。

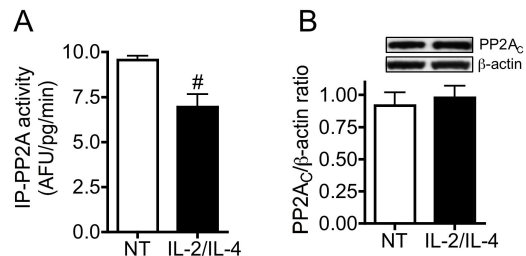


図2. 気道上皮細胞におけるステロイド抵抗性条件下でのPP2A活性と蛋白発現レベル

なお、BEAS-2BにおいてRNA干渉を用いたPP2Aのノックダウンモデルの作製、そして同モデルでのステロイド抵抗性を含めた機能解析を予定している。同モデルでPP2Aの病態への強い関与が示された場合には、PP2A過剰発現モデルを作製し、炎症局所の治療ターゲットとしての可能性を探っていきたい。好酸球においては、ヒト末梢血から採取可能な分離好酸球数に限りがあるためウエスタンブロット法を用いたGR核内移行能およびPP2A活性の検討は困難であった(PP2A発現レベルはウエスタンブロット法で検出可能であった)。GR-Ser226リン酸化の検出方法に関しては、BEAS-2Bと同様にFCMを用いた方法で確立することができた。全血法を用いたFCMでのGR-Ser226リン酸化レベルの検出方法も並行して行ってきた。なお、好酸球においては、これらの指標とステロイド抵抗性との関連性はまだ確認できていない。

(2) 日常診療で応用可能なステロイド感受性テストの検討

日常診療で活用できるような簡易でかつ再現性のある検査法について検討した。ステロイド抵抗性の指標となるGR-Ser226のリン酸化レベルやPP2Aの発現レベルをレーザー顕微鏡とフローサイトメーター(FCM)の2つの機能を持ち合わせたImaging FCMを用いて評価した。血球系細胞に関しては、比重分離法で単離した末梢血単核球、全血法での好酸球を、気道上皮細胞は下鼻甲介粘膜擦過細胞を用いてそれぞれ検討した。気道上皮細胞に関しては、採取時の非侵襲性を重視し、さらに質と量を兼ね備えた鼻粘膜擦過細胞を使用した。核内移行能についてもImaging FCMで解析可能であるが、現時点では至適条件が定まっていない状況である。また、現在、各細胞におけるGR-Ser226のリン酸化レベルやPP2Aの発現レベルが実際のステロイド抵抗性と関係するかどうか、それらの相関性を検

討している。

(3) 臨床サンプルでの検討

上記(2)において確立しつつある Imaging FCM を用いた解析を、主に重症喘息患者と健康者から得られたサンプル(末梢血および気道上皮細胞)で行った。データ蓄積中の段階であるが、副鼻腔炎を合併するタイプの重症喘息では、単核球における GR-Ser226 リン酸化レベルの上昇および PP2A 発現レベルの低下、さらに呼気中一酸化窒素濃度上昇、肺機能低下(閉塞性障害)も伴う傾向にある。なお、好酸球性肺炎合併喘息患者に気管支肺胞洗浄を施行した際に気管支粘膜擦過細胞を採取し、Imaging FCM で解析を行った。症例数が少ないものの、鼻粘膜擦過細胞との性質の相同性を確認していく予定である。

(4) 新しい治療ターゲットの検討

ホルモテロール以外の長時間作用型気管支拡張剤(LABA)や新規マクロライドも PP2A を活性化させることがわかった。さらに、GR-Ser226 リン酸化経路に關与するその他のホスファターゼとして、膜レセプタータイプのチロシンホスファターゼの一つである PTPRR やセリン・スレオニンホスファターゼとチロシンホスファターゼの2つの性質を持ち合わせる二重特異性ホスファターゼの一つである DUSP4 が關与することがわかってきた。実際にステロイド抵抗性を有する重症喘息患者の末梢血単核球ではそれらの発現が明らかに低下していて、新しい治療ターゲットとなる可能性が示唆された(論文投稿準備中)。引き続き、新規マクロライドの効果も含めたホスファターゼ活性化によるステロイド抵抗性改善についての研究を検討している。

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 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

小林 良樹、炎症局所におけるステロイド抵抗性と接着能亢進のメカニズム検討、第63回日本アレルギー学会秋季学術大会、2013年11月28日~30日、ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

Yoshiki Kobayashi, Impaired protein tyrosine phosphatase PTPRR reduces response to corticosteroid in mononuclear cells, The 23rd Annual Congress of European Respiratory Society, 2013年9月7日~11日, Barcelona, Spain

小林 良樹、酸化ストレス下のステロイド感受性制御における PP2A の役割、第53回

日本呼吸器学会学術講演会、2013年4月19日~21日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 良樹 (KOBAYASHI, Yoshiki)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10375298