

【 1 】

氏 名	しお ぼら た いち 塩 原 太 一
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第680号
学 位 授 与 の 日 付	平成28年10月27日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項 (内科学（呼吸器・アレルギー）)
学 位 論 文 題 目	Dipeptidyl peptidase-4 is highly expressed in bronchial epithelial cells of untreated asthma and it increases cell proliferation along with fibronectin production in airway constitutive cells (DPP4は未治療喘息患者の気道上皮細胞に高発現しており、気道構成細胞の増殖を刺激し、ファイブロネクチンの産生を促す)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 麻 生 好 正 (副査) 教授 菱 沼 昭 教授 倉 沢 和 宏

論 文 内 容 の 要 旨

【 背 景 】

喘息の病態にとってIL-13等のTh2サイトカインは中心的な役割を果たしている。

我々はIL-13で気道上皮に誘導される分子の中に、喘息の新規バイオマーカー、または治療ターゲットとなる分子を検索し、その過程で得られたdipeptidyl peptidase-4 (DPP4) に注目した。そこで我々は、喘息患者の気道上皮のDPP4発現と、喘息におけるDPP4の役割を検討した。

【 目 的 】

喘息患者におけるDPP4の発現と分布を調査し、喘息の病態における役割を検討する。

【 対 象 と 方 法 】

安定期の未治療喘息患者と既治療喘息患者に対して、気管支鏡下に末梢気道および中枢気道から選択的に気道上皮細胞 (bronchial epithelial cells: BECs) をブラシ生検にて採取した。可能な症例では鉗子を用いて気道組織検体も採取した。気管支鏡で採取したBECsを二群にわけ、一群は採取直後の新鮮なBECsに対し microarrayを施行し、もう一群はair-liquid interface (ALI) methodsで培養しIL-13刺激の有無に分けmicroarrayを施行した。新鮮BECsに対するmicroarrayから、吸入ステロイド既治療喘息患者に比較して未治療喘息患者で2倍以上発現が亢進した遺伝子を抽出した。次にALIでの培養BECsに対してmicroarrayを施行し、IL-13非刺激群に比較し、IL-13刺激群で2倍以上発現が亢進した遺伝子を抽出した。そして両群に共通して発現が亢進した遺伝子の中からDPP4に注目した。

次に喘息患者から採取した新鮮BECsと、IL-13刺激、非刺激群に分けてALI法で培養した気道上皮細胞に対してquantitative real-time PCR (qPCR) を施行しDPP4 mRNAの発現を検討し、細胞上清のDPP4タンパクをenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定した。喘息患者から採取した気道検体に対して免疫染色にてDPP4タンパクの局在を確認した。喘息患者のBECsのDPP4 mRNA発現とexhaled nitric oxide (eNO) の相関を検討した。DPP4の喘息病態での役割を知る目的で肺線維芽細胞 (human fetal lung fibroblast : HFL-1) および気道平滑筋細胞 (bronchial smooth muscle cell : BSMC) に対する細胞増殖作用、リモデリングに関する分子であるfibronectin (FN) の産生作用を検討した。

コントロールと各々の刺激群間の比較はWilcoxon rank sum test (Mann-Whitney U test) を用いた。全ての比較において $P < 0.05$ を有意差ありとした。統計解析には JMP version 10 (SAS Institute, Cary, NC) を用いた。

【結 果】

DPP4は未治療喘息患者の新鮮BECsに強発現しており、さらにIL-13で気道上皮細胞を刺激することによって有意に発現が亢進した。喘息患者の気道検体ではDPP4免疫染色にてDPP4が気道上皮細胞に強く発現していた。喘息患者の気道上皮細胞におけるDPP4 mRNA発現はeNOと有意な相関を示した。DPP4刺激によってHFL-1、BSMCは細胞増殖効果を認め、FN産生亢進を認めた。

【考 察】

今回の我々の研究で得られた新たな知見は大きく分けて2つある。

第一に喘息BECs、及びIL-13刺激BECsではDPP4発現が亢進していること、第二にDPP4刺激でHFL-1およびBSMCに対して細胞増殖効果とFN産生を認めることである。

まず第一の知見である喘息BECs、及びIL-13刺激BECsではDPP4発現が亢進していることに関して考察する。

これまで国内外からの多くの報告により、IL-13は喘息の病態に大きな役割を果たすことが広く周知されている。しかしながらDPP4の喘息病態における役割は明らかではなく、その解明は喘息の病態及び治療に対する新たなアプローチをもたらす可能性があると考えられた。我々は喘息患者気道上皮検体およびIL-13にて刺激した培養気道上皮細胞でDPP4が誘導されることをmicroarray、qPCR、ELISAで確認した。これまで、DPP4は喘息動物モデルにおいて気道炎症との関連が指摘されているが、本研究でも喘息患者気道上皮のDPP4発現は気道炎症の指標であるeNOとも有意に相関していたことから、DPP4はIL-13によって惹起される気道炎症を反映していると考えられた。さらに我々は免疫染色を用い、ヒト気管支喘息患者から得られた気道上皮でDPP4の発現亢進を確認し、inhaled corticosteroid (ICS) 治療した同一患者の気道上皮DPP4タンパク発現が低下していることを初めて確認した。このことは、ICSが喘息の病態を改善する過程でDPP4発現を低下させることを示唆した。

次に第二の知見であるDPP4刺激は肺線維芽細胞、気道平滑筋細胞に対し細胞増殖をもたらし、FN産生を亢進させたことに対して考察する。

これまでDPP4と喘息の報告は気道炎症に関する報告が主なものであったが、我々は気道リモデ

リングにも影響を与えていると仮説を立て、recombinant human (rh) DPP4を用い、HFL-1およびBSMCに対するDPP4の影響を検討した。その結果、rhDPP4はHFL-1およびBSMCの細胞増殖効果を呈した。またHFL-1、BSMCに対して、FNの産生を亢進させたことをmRNA、タンパクで確認した。この結果から、DPP4は直接的にHFL-1やBSMCの増殖効果と、FN等の細胞外基質を産生することで喘息リモデリングに関与している可能性が示唆された。これまで報告されているDPP4の機能は主に3つある。リンパ球等の表面に発現したCD26への結合による免疫賦活機能、細胞表面上に発現しcollagen、FNを介した細胞接着機能、セリンプロテアーゼとしての機能である。これまでDPP4がヒト喘息においてリモデリングに関与している可能性を示唆した報告はなく、今回の報告が最初の報告となった。今回の研究で得られたDPP4の新たな機能におけるpathwayやreceptorは現時点で明らかにできていないが、DPP4がセリンプロテアーゼとしての特性をもつことからトロンビンなどと同様に、protease-activated receptor-2 (PAR2) やinsulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R) などのレセプターを介した細胞増殖、FN産生である可能性を考えている。

【結 論】

ヒト喘息においてDPP4は気道上皮細胞で高発現しており、IL-13で誘導されることが明らかとなった。また、気道平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖を促進させ、細胞外マトリックスであるFN産生を亢進し、気道リモデリングに関与していることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

申請論文では、IL-13刺激や、喘息患者気道上皮で発現が亢進している遺伝子を検出し、喘息の病態に関与する新たなバイオマーカーの確立を試み、その過程で得られた遺伝子の一つであるdipeptidyl peptidase 4 (DPP4) と喘息病態との関わりを検討している。その結果、1) DPP4は未治療喘息患者の新鮮分離気道上皮に強発現していること、2) IL-13で培養気道上皮細胞を刺激することで有意にDPP4の発現が亢進すること、3) 未治療喘息患者の気道検体に対する免疫染色で気道上皮細胞にDPP4が強く発現していること、4) 喘息患者の気道上皮細胞のDPP4 mRNA発現は気道炎症の指標である呼気一酸化窒素濃度と有意な相関を示すこと、5) recombinant human (rh) DPP4刺激によって肺線維芽細胞、気道平滑筋細胞は細胞増殖効果を認め、ファイブロネクチンの産生亢進を認めたことなどを明らかにしている。これらの結果から、DPP4は喘息病態における気道炎症のみならず気道リモデリングに関与している可能性がある」と結論づけている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、喘息患者気道上皮細胞を採取し、未治療及び吸入ステロイド既治療喘息患者の新鮮分離気道上皮細胞に対し microarrayを施行した一群と、採取した気道上皮をair-liquid interface (ALI) 法で培養しIL-13刺激の有無に分けmicroarrayを施行した一群に分けて検討している。それにより既治療喘息患者に比較して未治療喘息患者で2倍以上発現が亢進した遺伝子と、IL-13非刺激群に比較してIL-13刺激群で2倍以上発現が亢進した遺伝子を抽出し、両群に共通して発現が亢進し

た遺伝子の中でDPP4に注目している。DPP4発現の上昇をquantitative real-time PCR (qPCR) にて mRNA を、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて細胞上清のDPP4タンパクを測定している。また気道検体に対して免疫染色を用い、DPP4の局在も確認している。さらに喘息患者の気道上皮のDPP4 mRNA発現と気道炎症の指標である呼気一酸化窒素濃度の相関を検討している。そして気道構成細胞に対する細胞増殖作用やファイブロネクチンの産生作用も検討している。適切な対象群の設定と多様な実験手段を用い、客観的な統計解析を行っており、本論文における研究方法は妥当なものであると判断する。

【研究結果の新奇性・独創性】

DPP4と喘息病態との関連はこれまで詳細な報告は少なく、申請論文では多様な実験手段を用い、DPP4と喘息との関わりを検討している。その結果、DPP4は未治療喘息患者の新鮮気道上皮細胞に高発現し、IL-13刺激で気道上皮細胞に有意に発現が亢進することや、未治療喘息患者の気道検体への免疫染色にて気道上皮細胞に強く発現していることを明らかにしている。またDPP4の喘息における役割に関しては、喘息患者の気道上皮細胞のDPP4 mRNA発現と呼気一酸化窒素濃度との相関を示すことで気道炎症との関わりを示している。さらにDPP4刺激により気道構成細胞の細胞増殖効果を示し、ファイブロネクチンの産生亢進を明らかにすることで、リモデリングとの関わりも示した。これらの点において本研究は新奇性・独創性にすぐれた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、適切な実験手法と統計解析を用いて、DPP4と喘息との関係に迫っている。その結果、喘息においてDPP4は気道上皮細胞に高発現しており、IL-13で誘導されることを明らかにしている。また、DPP4と気道炎症の指標である呼気一酸化窒素との相関関係を示し、DPP4が肺線維芽細胞や気道平滑筋細胞の増殖を促進させ、細胞外マトリックスであるファイブロネクチン産生を亢進することも示すことで、気道リモデリングへの関与も示唆している。今回の結果から導き出されたこれらの結論は、非常に興味深く、循環器学などの関連領域における知見を踏まえても矛盾せず、妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、喘息領域での報告が少ないDPP4の未治療喘息患者における高発現に着目し、その生体内における局在と喘息病態における役割を検討することで、気道炎症と喘息リモデリングに関与している可能性を示している。このことは、喘息領域におけるバイオマーカーや治療薬のメルクマールとして今後注目される可能性が大いに期待される。

【申請者の研究能力】

申請者は、臨床呼吸器学やアレルギー学の理論を学び、基礎研究分野の手技にも習熟している。その上で、作業仮説をたて、実験計画を立案し、適切に本研究を遂行し、今回の貴重な知見を得ている。本研究成果は当該領域の国際紙への掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与にふさわしいと判定した。

（主論文公表誌）

Respiratory Research

17 : 28, 2016