

【17】

氏 名	渡 邊 泰 治
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第716号
学位授与の日付	平成30年3月6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	Expression of intelectin-1 in bronchial epithelial cells of asthma is correlated with T-helper 2 (Type-2) related parameters and its function (気管支喘息気道上皮細胞におけるintelectin-1の発現およびType-2炎症関連パラメータとの相関とその機能についての検討)
論文審査委員	(主査) 教授 吉 原 重 美 (副査) 教授 井 川 健 教授 小 端 哲 二

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

気管支喘息は好酸球、リンパ球などの炎症細胞、気道上皮細胞や平滑筋細胞、線維芽細胞などの気道構成細胞、および液性因子が関与する慢性気道炎症を基本病態とし、可逆性のある気道狭窄と過敏性亢進を呈する閉塞性呼吸器疾患である。また、多くの症例で2型ヘルパーT細胞（Type-2）のサイトカインであるinterleukin（IL）-4、5、13が病態に重要な役割を果たしており、喘息患者の52%でType-2炎症が中心的に寄与していると報告されている。

Intelectin-1（ITLN-1）はガラクトフラノースに結合する分泌型の動物レクチンで、主に腸管の杯細胞から分泌される糖タンパク質である。ITLN-1はGPIアンカー型のタンパクで、腸管でラクトフェリンの受容体として知られ、胎児期に多く発現している。また、寄生虫感染の際に腸管で増加し感染防御に関与していることが示唆されている。また、ITLN-1は抗炎症作用のあるアディポサイトカインとしても報告されており、様々な機能をもつことが知られている。一方で、IL-13強発現マウスの気道でITLN-1 mRNAが亢進していること、IL-13刺激でヒト気道上皮細胞に誘導されること、さらに喘息死の剖検症例の気道においてITLN-1は粘液の主要タンパクであることが示され、アレルギー炎症との関与が報告されている。しかし、ITLN-1が喘息におけるバイオマーカーになり得るか、またその機能については明らかでなかった。

【目 的】

気管支喘息におけるITLN-1の発現と機能を検討する。

【対象と方法】

2009年6月から2014年3月まで当科を受診した患者61人を対象とした。本研究は獨協医科大学病院の倫理委員会の承認を得て（hop-m22095）、すべての患者に書面で同意を得た。その内吸入ステロイド未治療（inhaled corticosteroid-naïve asthma：SN-Asthma）（18人）および吸入ステロイド既治療（inhaled corticosteroid-treated asthma：ST-Asthma）（13人）気管支喘息、対照として慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive lung disease：COPD）（17人）、疾患コントロール（13人）から気管支鏡で気道上皮細胞（bronchial epithelial cells：BECs）を採取した。マイクロアレイ、quantitative polymerase chain reaction（qPCR）で*ITLN-1* mRNA発現を検討し、Type-2炎症関連パラメータとの相関を検討した。免疫組織染色で発現分布を検討し、気管支肺胞洗浄液（bronchial alveolar lavage fluid：BALF）および血清中のITLN-1をenzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）で測定した。さらにBECsをIL-13で刺激し*ITLN-1* mRNA、蛋白の発現を検討した。1型ヘルパーT細胞（Type-1）の刺激によって誘導されるケモカインの1つであるC-X-C motif chemokine-10（CXCL10；IP-10）発現に対するITLN-1の影響を検討した。

【結 果】

気道上皮において*ITLN-1* mRNAはSN-Asthmaで顕著に発現が亢進し、既知のType-2炎症関連パラメータ（fractional exhaled nitric oxide：FeNO、immunoglobulin E：IgE、inducible nitric oxide synthase：iNOS、chemokine ligand 26：CCL26、periostin、dipeptidyl peptidase-4：DPP4）と有意な相関を認めた。免疫組織染色では杯細胞を中心とした気道上皮細胞でITLN-1蛋白の発現を認めた。BALF中のITLN-1は未治療群で高値であったが、血清ではむしろ健常群よりもむしろSN-Asthma群は低値であった。BECsの初代培養細胞でITLN-1はIL-13で誘導され、ステロイドで抑制された。ITLN-1は*CXCL10* mRNA、蛋白ともに抑制した。その機序として、TNF α 、IFN γ 、IL-1 β により活性化する転写因子、Signal Transducers and Activator of Transcription（STAT-1）のリン酸化も抑制した。

【考 察】

今までITLN-1は試験管内および生体内でType-2炎症に関連している報告はあるが、ITLN-1と他の喘息バイオマーカーとの比較や、ヒトの気管支喘息でITLN-1の機能はこれまで検討されていなかった。

喀痰中のITLN-1が好酸球高値群でより高く、Type-2炎症優位の喘息でも関連している報告があり、本研究のITLN-1の免疫染色でもSN-Asthmaの気道上皮細胞、特に杯細胞で蛋白が高発現しており、これまでの報告を支持するものであった。

SN-Asthmaの気道上皮細胞で*ITLN-1* mRNAが高発現していたことから、BALFでITLN-1を測定したところ、ST-Asthmaと比して上昇していた。BALFよりも低侵襲である血清を測定したが、血清ITLN-1両群での差は認めず、血清ITLN-1はバイオマーカーとはなり得なかった。これは、気道上皮のITLN-1が気腔内に放出され、全身のITLN-1は腸管や他の器官からの分泌で修飾されている可能性が

考えられた。

以前の報告から、ITLN-1は寄生虫と微生物に対する防御機能をもつレクチンであり、免疫防御の一助であるラクトフェリンの受容体である。そこでType-1炎症に対する気道でのITLN-1の機能を調べた。CXCL10は、IFN- γ によって誘導されるType-1炎症の指標と考えられている。ITLN-1がType-1炎症を制御すると仮定し、ITLN-1がTNF α 、IFN γ 、IL-1 β の刺激によるCXCL10発現を抑制するか検討した。

ITLN-1は濃度依存的に線維芽細胞でTNF α 、IFN γ 、IL-1 β によって誘導されたCXCL10を部分的に抑制し、その機序としてSTAT1のリン酸化も抑制することが示された。ITLN-1が喘息の気道におけるType-2炎症に傾くことに寄与しうることが示唆された。

【結 論】

本研究では、ITLN-1はIL-13によって誘導され、主に未治療喘息患者の気道の杯細胞で発現していた。未治療喘息患者の*ITLN-1* mRNAは、Type-2関連パラメータと有意に相関した。ITLN-1がType-1炎症を抑制することでType-2炎症がさらに増強する可能性があることを、我々の結果は示した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

気管支喘息は炎症細胞、気道構成細胞、および液性因子が関与する慢性気道炎症を基本病態とし、可逆性のある気道狭窄と過敏性亢進を呈する閉塞性呼吸器疾患である。Intelectin-1 (ITLN-1) は主に腸管の杯細胞から分泌される糖タンパク質であり、腸管でラクトフェリンの受容体として知られ、寄生虫感染の際に腸管で増加し感染防御にも関与しているが、近年気管支喘息との関連が指摘されている。申請論文では気管支喘息の気道上皮でのITLN-1の発現やバイオマーカーとしての役割、機能について明らかにすることを目的として、ステロイド未治療気管支喘息患者 (SN-Asthma) 18人を含む計61人を対象に検討した。気道上皮においてITLN-1 はSN-Asthmaで顕著に発現が亢進し、既知の2型ヘルパーT細胞性炎症 (Type-2) 関連パラメータと有意な相関を認めた。気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のITLN-1はSN-Asthmaで高値であったが、血清では健常群よりもむしろSN-Asthmaは低値であった。SN-Asthmaの初代培養細胞でITLN-1はinterleukin (IL) -13で誘導され、ステロイドで抑制された。またヒト胎児線維芽細胞においてITLN-1はTNF α 、IFN γ 、IL-1 β 刺激によるC-X-C motif chemokine-10 (CXCL10 ; IP-10) mRNA、蛋白発現を抑制し、その機序として、CXCL10発現の転写因子であるsignal transducers and activator of transcription (STAT-1)のリン酸化も抑制した。以上よりITLN-1はIL-13によって誘導され、主にSN-Asthmaの気道の杯細胞で発現し、Type-2関連パラメータと有意に相関すること、ITLN-1がType-1炎症を抑制しType-2炎症がさらに増強する可能性があることと結論づけている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、臨床研究目的に気管支鏡で気道上皮を採取しているが、獨協医科大学病院の倫理委員会の承認を得て (hop-m22095)、すべての患者に書面で同意を得ている。またITLN-1が気道上皮に

発現していることから、血清のITLN-1だけではなくBALF中のITLN-1濃度も測定している。また、ステロイド既治療気管支喘息患者でITLN-1発現がわずかだったことから、SN-Asthmaの気道上皮の初代培養細胞を用いてITLN-1の発現を検討している。以上より本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

今までステロイド未治療喘息患者でのITLN-1の発現やType-2炎症関連パラメータとの相関を検討した報告は無く、この点において本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、少数の症例ではあるが、適切な対照群の設定の下、確立された実験手法と統計解析を用いて、ステロイド未治療気管支喘息におけるITLN-1の発現とバイオマーカーとしての役割、その機能について述べられている。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、また、呼吸器学、アレルギー学、免疫学など関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、ITLN-1がステロイド未治療気管支喘息患者で発現していること、Type-2炎症関連パラメータと相関していることから、アレルギー性炎症の制御に関与している可能性が高いことを明らかにしている。これは気管支喘息の発生機序の解明に大いに役立つ大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、臨床呼吸器学や呼吸器免疫学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌に掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の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)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Allergy, Asthma & Clinical Immunology

13 : 35, 2017